

Diplomarbeit

**Expression von Lipoproteinrezeptoren in humanen
Plazentagefäßen und der Einfluss des
Gestationsdiabetes**

eingereicht von

Robert Kreysing

Mat.Nr.: 0534054

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

unter der Anleitung von

Ass.-Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. rer. nat. Christian Wadsack

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, am 23.03.2011

Unterschrift: _____

Danksagungen

Ich möchte mich bei Ass. Prof. Dr. rer. nat. Christian Wadsack für seine kompetente und freundliche Betreuung während der Diplomarbeit bedanken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Manuela Augsten widmen, die mich während der ganzen Zeit im Labor, sowohl beim praktischen Teil als auch beim Verfassen meiner Arbeit, optimal betreut und beraten hat.

Außerdem danke ich dem gesamten Forschungslabor der Gynäkologie für die tolle Zeit im Labor und für die Aktivitäten außerhalb der Arbeitszeiten.

Für die statistische Auswertung und unterstützende Beratung danke ich Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Josef Haas.

Weiters danke ich meiner Freundin Nadine Zimmermann fürs Korrekturlesen und für jegliche Motivationsschübe und Ablenkung.

Als letztes möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken, die es mir ermöglicht haben in Graz zu studieren und auch sonst immer ein offenes Ohr für mich haben.

Zusammenfassung

Einleitung: Das Smith Lemli Opitz Syndrom (SLOS), eine Erkrankung, welche durch eine reduzierte endogene fetale Cholesterinbiosynthese charakterisiert ist, sowie eine maternale Hyperlipidämie, welche zu einer vermehrten “fatty streak”-Bildung in der fetalen Aorta führt, zeigen die Bedeutung des transplazentaren Cholesterintransportes von der mütterlichen zur fetalen Zirkulation, an welchem verschiedene Lipoproteinrezeptoren beteiligt sind.

In dieser Studie wurde die Expression von vier verschiedenen wichtigen Lipoproteinrezeptoren (SR-BI, LDLR, LRP-8, LOX-1) in Arterien und Venen der Chorionplatte untersucht. Weiters ist beschrieben, dass ein Gestationsdiabetes (GDM) während der Schwangerschaft u.a. zu einer verstärkten Fettstoffwechselstörung mit Veränderung der Blutfettkonzentrationen der Mutter führt. Deshalb wurde ebenfalls untersucht, ob ein GDM die Genexpression der oben genannten Lipoproteinrezeptoren in Plazentagefäßen verändert.

Methoden: Es wurden Arterien und Venen aus gesunden (Kontrollgruppe) und aus Plazenten mit White A/B Gestationsdiabetes (GDM-Gruppe) bei termingerechter Schwangerschaft aus der Chorionplatte heraus präpariert (n=10). Die RNA wurde nach der TRI-Reagent-Methode isoliert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch die Messung der Absorption bei 280 und 260nm in einem Spektralphotometer, sowie durch Gelelektrophorese bestimmt. Bei der cDNA und der quantitativen RT-PCR wurden Standardprotokolle verwendet. Als Referenzgene wurden L30, vWF und CD34 verwendet. Zur statistischen Auswertung wurden SPSS- und Sigma Plot- Software herangezogen. Es lagen sowohl eine Einverständniserklärung von Seiten der Patientinnen als auch die Einwilligung der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz zur Durchführung der Studie vor.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: SR-BI, LOX-1, LRP-8 and LDLR werden in den in der Chorionplatte liegenden Arterien und Venen exprimiert.

In gesunden Plazenten war SR-BI in den Venen (26-63%; $p < 0,001$) höher exprimiert als in den Arterien. Weiters induzierte GDM die Expression von SR-BI in den Gefäßen signifikant (3-74%; $p < 0,001$). Der Unterschied der LRP-8- und LOX-1-mRNA-Expression zwischen Arterien und Venen war in gesunden

Plazenten fraglich. Aber auch hier induziert ein GDM die Genexpression beider Rezeptoren und führt zur einer erhöhten Expression in den Venen (LRP-8 27-80; $p < 0,001$ and LOX-1 26-69%; $p < 0,001$). Die Expression des LDLR zeigte zu große Schwankungen und war stark von den Normierungsgenen abhängig.

Weiters wichen die Ergebnisse in den meisten Fällen bei der Normierung gegen vWF im Vergleich zu L30 und vWF häufiger ab, sodass vermutet werden kann, dass vWF durch den GDM reguliert wird und damit als Referenzgen ungeeignet wäre.

Eine mögliche Abhängigkeit zwischen Lokalisation der Gefäße und dem Expressionsverhalten der Rezeptoren und die kleine Anzahl an Patientinnen in Kombination mit den geringen Unterschieden schränken allerdings die Aussagekraft dieser Studie ein.

Schlüsselwörter: Lipoproteine, Lipoproteinrezeptoren, Gestationsdiabetes, menschliche Plazenta, SR-BI, LDLR, LRP-8, LOX-1, Referenzgene, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, RT-PCR

Abstract

Introduction: The Smith Lemli Opitz Syndrome (SLOS), a disease characterized by an impaired endogenous fetal cholesterol biosynthesis, and an excessive supply of maternal cholesterol to the fetus, which leads to an enhanced fatty streak formation in the fetal aorta, are evidences for transplacental cholesterol transport from the maternal to the fetal circulation. The transport of maternal cholesterol through the placenta to the fetus is mediated by different lipoprotein receptors. This study was performed to investigate the expression of four different important lipoprotein receptors (SR-BI, LDLR, LRP-8, LOX-1) within placental chorionic arteries and veins. Moreover, it is described that gestational diabetes (GDM) during the pregnancy leads to an imbalanced fat metabolism and to an altered blood lipid concentration in the mother. Therefore, this study was also aimed to elucidate if GDM alters the gene expression of the above mentioned receptors in placental chorionic vessels.

Methods: Term placental arteries and veins were dissected from GDM and normal pregnancies (n=10). RNA was isolated by the Tri-Reagent method. RNA quality was determined by the protein absorbance ratio at 260nm to 280nm and by gel electrophoresis. Standard protocols were used for cDNA synthesis and quantitative RT-PCR. The gene-normalization with three different housekeeping genes (L30, vWF, CD34) was tested. Statistical analyses were performed by SPSS and Sigma Plot software. Informed consent was obtained from the patients and the committee of the Medical University of Graz, granted ethical approval.

Results and Conclusion: SR-BI, LOX-1, LRP-8 and LDLR are expressed in term placental chorionic arteries and veins, respectively.

In healthy placentas SR-BI was higher expressed in veins compared to arteries (26-63%; $p < 0,001$). Additionally, in GDM vessels SR-BI expression was induced (3-74%; $p < 0,001$). No differences of LRP-8 and LOX-1 mRNA expression between arteries and veins were detected in healthy placentas. However, GDM induced the gene expression of both receptors (LRP-8 27-80%; $p < 0,001$ and LOX-1 26-69%; $p < 0,001$) and revealed a higher expression in veins.

The expression of the LDLR showed large variations within placentas and vessels and was strongly dependent by the housekeeping genes used for normalization.

Furthermore, the results of the normalization against vWF showed different gene regulation of the receptors in comparison to L30 and CD34. Hence we conclude that the vWF protein itself may be regulated by GDM, and therefore it might be not an appropriate housekeeping gene.

Indeed, this study exhibits some limitations. Firstly, the dissection of the vessels was selected by chance. Whether the localization of the vessel influences the investigated lipoprotein receptor expression cannot be clearly ruled out. Secondly the low number of patients in combination with the small differences in gene-expressions are limiting the validity and conclusion of this study.

Keywords: lipoprotein, lipoprotein receptor, gestational diabetes, human placenta, SR-BI, LDLR, LRP-8, LOX-1, Housekeeping Gene, RNA-Isolation, cDNA synthesis, RT-PCR

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	v
Inhaltsverzeichnis	vii
Glossar und Abkürzungen	ix
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Die humane Plazenta	1
• 1.1.1 Die Funktion	3
• 1.1.2 Plazenta nach der Geburt	5
1.2 Maternaler- fetaler Cholesterinstoffwechsel	6
• 1.2.1 Cholesterinmetabolismus in Endothelzellen	8
1.3 Lipide und Lipoproteine in der Schwangerschaft	9
1.4 Gestationsdiabetes	10
1.5 Lipoproteine, Stoffwechsel und Apolipoproteine	13
1.6 Lipoproteinrezeptoren	15
• 1.6.1 Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I	15
• 1.6.2 Lektin-like oxidized Low-Density-Lipoprotein Rezeptor	18
• 1.6.3 Low-Density-Lipoprotein Rezeptor	20
• 1.6.4 Low- Density- Lipoprotein Rezeptor related Protein 8	22
1.7 Referenzgene	24
• 1.7.1 Ribosomales Protein L30	25
• 1.7.2 Von Willebrandt-Faktor	25
• 1.7.3 Cluster of Differentiation Molecule 34	26
2 Hypothese und Fragestellungen	27
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.2 RNA-Isolierung	29
3.3 cDNA-Synthese	30
3.4 RNA-Gele	31
3.5 Real Time-PCR	32
• 3.5.1 Pooling der cDNA	32

•	3.5.2 TaqMan®-Technologie und Durchführung.....	32
3.6	Auswertung	34
4	Ergebnisse und Diskussion	36
4.1	Klinische Parameter der Mütter und der Neugeborenen	36
4.2	Bestimmung der RNA.....	39
4.3	Expression der Lipoproteinrezeptoren.....	40
•	4.3.1 Übersicht.....	40
•	4.3.2 Ergebnisse der univariaten Varianzanalyse.....	42
4.3.2.1	Normierung gegen das Ribosomale Protein L30.....	42
4.3.2.2	Normierung gegen von Willebrand Faktor.....	43
4.3.2.3	Normierung gegen Cluster of Differentiation Molecule 34	44
•	4.3.3 Zusammenfassung	46
•	4.3.4 Auswertung der einzelnen Lipoproteinrezeptoren (t-Test).....	47
4.3.4.1	Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I	47
4.3.4.2	Low-Density-Lipoprotein Rezeptor	52
4.3.4.3	Low-Density-Lipoprotein Rezeptor related Protein 8.....	58
4.3.4.4	Lektin-like oxidized Low-Density-Lipoprotein Rezeptor.....	62
•	4.3.5 Physiologische Relevanz.....	68
•	4.3.6 Limitation der Studie	71
4.4	Zusammenfassung.....	72
5	Literaturverzeichnis.....	74
6	Curriculum vitae.....	79

Glossar und Abkürzungen

ACAT.....	Acetyl-CoA-Acetyltransferase
Ac-LDL.....	Acetyliertes LDL
AGE.....	Advanced Glycation Endproducts
AS.....	Aminosäure
BMI.....	Body Mass Index
CD34.....	Cluster of Differentiation Molecule 34
cDNA.....	complementary DNA
CE.....	Cholesterinester
GDM.....	Gestationsdiabetes
hCG.....	humanes Choriongonadotropin
HDL.....	High-Density-Lipoprotein
HMG-CoA-Reduktase....	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
hPL.....	humanes Plazentalaktogen
ICAM-1.....	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IgG.....	Immunglobulin G
L30.....	Siehe RPL30
LDL	Low- Density- Lipoprotein
LDLR	Low-Density-Lipoprotein Rezeptor
LOX-1.....	Lektin-like oxidized Low-Densitiy-Lipoprotein Rezeptor
LRP-8.....	Low-Density-Lipoprotein Rezeptor related Protein 8
MCP-1.....	Monocyte Chemotactic Protein-1
oGTT.....	Oraler Glukosetoleranztest
ox-LDL.....	oxydiertes LDL
PL.....	Phospholipide
RCT.....	Reverser Choesterintransport
RPL30.....	Ribosomales Protein L30 (Synonym: L30)
RNA.....	Ribonukleinsäure
RT-PCR.....	Real Time- Polymerase Chain Reaction
SLOS.....	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom
SCAP.....	SREBP cleavage-activating-protein
SR-BI.....	Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I
SREBP.....	Sterol-regulatory-element-binding-protein

SSW.....	Schwangerschaftswoche
TG.....	Triglyceride
VCAM-1.....	vascular cell adhesion molecule 1
VLDL.....	Very Low -Density-Lipoprotein
vWF.....	von Willebrandt-Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Plazenta (3)	1
Abbildung 2: Schematischer Schnitt durch eine Plazentazotte (5)	2
Abbildung 3: Strukturformel des Cholesterins: $C_{27}H_{46}O$ (10).....	6
Abbildung 4: Möglichkeiten des Cholesterineffluxes in die fetale Zirkulation (11) ..	8
Abbildung 5: Schematische Abbildung des SR-BI (35)	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur des LOX-1 (41).....	18
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des LDLR (44)	20
Abbildung 8: Funktion des LDLR (45)	21
Abbildung 9: Der LRP-8 im Vergleich zum LDLR und VLDLR.....	22
Abbildung 10: Chorionplatte und Gefäßverlauf der Plazenta.....	28
Abbildung 11: Versuchsaufbau zur Homogenisierung der Proben	29
Abbildung 12: Pellet (RNA) am Boden eines Eppendorfgefäßes (66).....	30
Abbildung 13: Intakte (links) und degradierte RNA (rechts).....	32
Abbildung 14: Die 3 wichtigsten Schritte der TaqMan [®] -Technologie (68)	33
Abbildung 15: Ergebnis einer Gelelektrophorese am Beispiel der Kontrolle 20....	39
Abbildung 16: Boxplots der Arterien und Venen unabhängig von Normierung und Pathologie	40
Abbildung 17: Boxplots der Kontroll- und der GDM-Gruppe unabhängig von der Gefäßart und der Normierungen	41
Abbildung 18: Mögliche Wechselwirkungen (Abhängigkeiten) in bzw. zwischen der Kontroll- und GDM-Gruppe.....	42
Abbildung 19: Boxplots der Expression des SR-BI in Arterien und Venen der Kontrollgruppe	48
Abbildung 20: Boxplots der Expression des SR-BI in Arterien und Venen der GDM-Gruppe.....	49
Abbildung 21: Boxplots der Expression des SR-BI in den Arterien der Kontroll- und der GDM-Gruppe.....	50
Abbildung 22: Boxplots der Expression des SR-BI in den Venen der Kontroll- und der GDM-Gruppe.....	50
Abbildung 23: Boxplots der Expression des LDLR in Arterien und Venen der Kontrollgruppe	53
Abbildung 24: Boxplots der Expression des LDLR in Arterien und Venen der GDM-Gruppe	54

Abbildung 25: Boxplots der Expression des LDLR in Arterien der Kontroll- und der GDM-Gruppe.....	55
Abbildung 26: Boxplots der Expression des LDLR in Venen der Kontroll- und der GDM-Gruppe.....	56
Abbildung 27: Boxplots der Expression des LRP-8 in Arterien und Venen der Kontrollgruppe	58
Abbildung 28: Boxplots der Expression des LRP-8 in Arterien und Venen der GDM-Gruppe.....	59
Abbildung 29: Darstellung der Expression des LRP-8 in Arterien der Kontroll- und der GDM-Gruppe.....	60
Abbildung 30: Darstellung der Expression des LRP-8 in Venen der Kontroll- und der GDM-Gruppe.....	61
Abbildung 31: Boxplots der Expression des LOX-1 in Arterien und Venen der Kontrollgruppe	63
Abbildung 32: Boxplots der Expression des LOX-1 in Arterien und Venen der GDM-Gruppe.....	64
Abbildung 33: Boxplots der Expression des LOX-1 in Arterien der Kontroll- und der GDM-Gruppe.....	65
Abbildung 34: Boxplots der Expression des LOX-1 in Venen der Kontroll- und der GDM-Gruppe.....	66
Abbildung 35: Logarithmische Darstellung der Expression des LOX-1 normiert gegen L30 in Arterien in Bezug zu den Venen in der Kontrollgruppe (gelb) und GDM-Gruppe (rot) inklusive Signifikanzen	68
Abbildung 36: Triplikate von drei Arterien von Kontrollplazenten	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: White-Klassifikation des Gestationsdiabetes	12
Tabelle 1-2: Beurteilung eines oGTT mit 75 g Glukose anhand von Normwerten	12
Tabelle 1-3: Eigenschaften von Lipoproteinen und deren Apolipoproteine.....	14
Tabelle 4-1: Klinische Daten der Mutter	37
Tabelle 4-2: Klinische Daten der Neugeborenen.....	38
Tabelle 4-3: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen der Lipoproteinrezeptoren normiert gegen L30.....	43
Tabelle 4-4: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen der Lipoproteinrezeptoren normiert gegen vWF	44
Tabelle 4-5: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen der Lipoproteinrezeptoren normiert gegen CD34	45
Tabelle 4-6: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen des SR-BI	47
Tabelle 4-7: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen des LDLR.....	52
Tabelle 4-8: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen des LRP-8.....	58
Tabelle 4-9: Übersicht der Signifikanzen und Regulierungen des LOX-1.....	62
Tabelle 4-10: Übersicht über Signifikanzen der Lipoproteinrezeptoren innerhalb der einzelnen Plazenten.....	70

1 Einleitung

1.1 Die humane Plazenta

Die Plazenta (deutsch: Mutterkuchen, Nachgeburt) bildet die Grundlage der Versorgung des Feten während der Schwangerschaft (1). Es ist das sich über die Schwangerschaft entwickelnde Gewebe zwischen mütterlicher und fetaler Zirkulation. An der Entwicklung der Plazenta sind sowohl Mutter als auch Fetus beteiligt. Dieses Organ erfüllt viele Funktionen, die weit über die Blutversorgung hinausgehen. Während der Schwangerschaft entsteht eine materno-plazentare-embryonale Einheit (2).

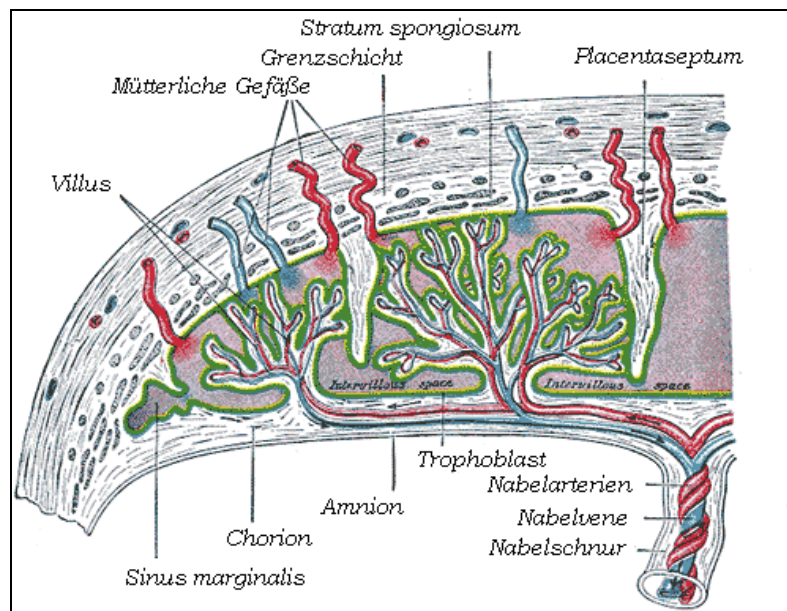


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Plazenta (3)

Die Plazenta (Abbildung 1) ist in der Regel ein scheibenförmiges und ovales Organ (Placenta discoidales). Sie ist bei einer normal verlaufenden Schwangerschaft ca. 2-3cm dick, 500g schwer und hat einen Durchmesser von 20cm. Bei bestimmten Pathologien (z. B. beim Gestationsdiabetes) kann sie durchaus schwerer und größer sein. An der kindlichen Seite ist sie durch die mit Amnionepithel überzogene Chorionplatte begrenzt. Die mütterliche Begrenzung bilden die zwischen intervillösem Raum und Myometrium liegenden Dezidua und die Basalplatte. Die Nabelschnur (bestehend aus 1 Vene, 2 Arterien) inseriert in die Chorionplatte. Am Rand der Plazenta verschmelzen Chorion- und Basalplatte miteinander. Am wichtigsten für die Funktion der Plazenta sind die Zottenbäume.

Ein einzelner Zottenbaum hat einen Durchmesser von 2-4cm und wird als Kotyledon (Synonym: Plazentom) bezeichnet. Diese plazentaren Einheiten werden durch Septen getrennt, wodurch das charakteristisch gelappte Aussehen entsteht (makroskopisch durch Furchen erkennbar). Insgesamt gibt es ungefähr 200 dieser Kotyledonen, von denen jedoch lediglich 60-70 voll funktionsfähig sind.

Im Laufe der Schwangerschaft nehmen Oberfläche, Volumen und Anzahl der Zotten zu und der Durchmesser der Zotten ab. Dadurch wird die Diffusionsstrecke kürzer und die O₂- und Nährstoffversorgung verbessert (4).

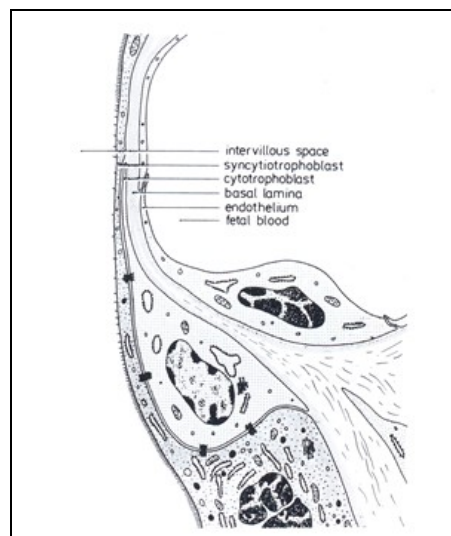


Abbildung 2: Schematischer Schnitt durch eine Plazentazotte (5)

Die bei der Diffusion zu überwindende Strecke, die materno-fetale Barriere, wird als Plazentaschranke bezeichnet (Abbildung 2). Sie setzt sich aus dem Syncytiotrophoblasten, der trophoblastären bzw. endothelialen Basalmembran sowie dem fetalen Endothel zusammen. Im Gegensatz zu anderen Säugetieren ist die Plazentaschranke beim Menschen einschichtig. Dadurch wird sie auch als hämo-monochorial beschrieben. Trotz ihrer Dichte können viele Medikamente, Alkohol und andere Gifte die Plazentaschranke passieren (6-7).

1.1.1 Die Funktion

Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung ist die wichtigste Funktion der Plazenta. Dafür ist eine adäquate Durchblutung der Plazenta notwendig. Die Spiralarterien besitzen nicht die Möglichkeit der Autoregulation, das bedeutet, dass die uterinen Gefäße maximal dilatiert sind und bei Hypoxie nicht mit einer Dilatation reagieren können. Eine Minderdurchblutung der Plazenta durch Blutdruckabfall, Uteruskontraktionen oder eine Kompression der Nabelschnur kann daher zu einer Minderperfusion des Feten und damit zu einem lebensbedrohlichen Zustand führen (8).

Im folgenden Teil werden die unterschiedlichen Wege der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung erläutert:

1) Einfach Diffusion

Die Diffusion geschieht entlang eines Konzentrations- oder Druckgefälles ohne Energieaufwand durch die Plazentaschranke. Für die Diffusion ist sowohl die Konzentration, die Größe der Austauschfläche als auch die Länge des Diffusionsweges entscheidend (Fick'sches Gesetz). Die einfache Diffusion spielt eine wichtige Rolle beim Austausch der Atemgase O_2 und CO_2 (2, 7).

2) Erleichterte Diffusion

Auch hier findet die Diffusion entlang eines Gradienten statt. Zusätzlich werden jedoch stoffspezifische Carrier benötigt, welche die Diffusion beschleunigen. Glukose und Laktat werden durch diesen Mechanismus in bzw. aus dem Feten gebracht (8).

3) Diapedese

Dabei treten zelluläre Bestandteile durch die Gefäßwand hindurch. Dies ist bei viralen (Röteln) oder bakteriellen (Syphilis) Infektionen von Bedeutung (2, 7).

Neben den bisher erwähnten passiven Transportmechanismen, existieren auch noch aktive Transportmechanismen.

- 4) Der aktive Transport findet zum einen über ATP-abhängige Kanäle statt. Dies ist u.a. erforderlich, um Stoffe entgegen eines Konzentrationsgefälles zu transportieren. Wichtig ist dies z.B. für Ionenkanäle oder für den Transfer von Aminosäuren, Glukose oder Vitaminen.
- 5) Zum anderen gibt es noch die rezeptorvermittelte Endozytose. Dabei werden Immunglobuline (IgG) von der Mutter zum Feten transferiert (Aufbau des Nestschutzes). Auch Glykoproteine werden über diesen Mechanismus transportiert (2).

Nicht nur für den Transport von notwendigen Molekülen, sondern auch durch ihre Barrierefunktion hat die Plazenta eine bedeutende Rolle. Zum Schutz des Feten werden so schädliche Einflüsse von der Plazenta zurückgehalten. Da viele Krankheitserreger die Plazenta nicht durchdringen können, schützt sie den Feten vor unterschiedlichsten Infektionen. Weiters können die in die fetale Zirkulation gelangten schädlichen Substanzen wieder herausgefiltert werden (6).

Die Durchlässigkeit für IgG bietet dem Säugling Schutz in den ersten Lebenswochen, da der kindliche Organismus noch nicht in der Lage ist selbst Antikörper zu bilden. Allerdings birgt diese Durchlässigkeit für Antikörper auch eine Gefahr: Antikörper gegen den Rhesusfaktor (Sensibilisierung einer Rhesus-negativen Mutter mit Rhesus-positivem Kind) können bei der Geburt eines zweiten Rhesus-positiven Kindes ins fetale Blut gelangen und zu schweren Komplikationen (Hämolyse der fetalen Erythrozyten → Erythroblastosis fetalis) führen (Rhesusinkompatibilität) (7).

Weiters stellt die Plazenta ein endokrines Organ dar. Die vier wichtigsten Hormone, welche von der Plazenta synthetisiert werden, sind Östrogen, Progesteron, humanes Choriongonadotropin (hCG) und humanes Plazentalaktogen (hPL). Das wohl bekannteste Plazentahormon hCG wandelt das Corpus luteum menstruationis in das Corpus luteum graviditatis um. Dadurch werden genügend Progesteron und Östrogen freigesetzt, die für den Erhalt der Schwangerschaft wichtig sind. Außerdem stimuliert es die Testosteronbildung im fetalen Hoden und hat damit einen wichtigen Stellenwert in der Differenzierung des männlichen Geschlechts.

Da der Trophoblast nicht über die komplette Enzymausstattung verfügt, ist die Plazenta bei der Hormonsynthese auf die Anlieferung von Synthesevorstufen angewiesen. Für die Östrogene (Östradiol, Östron und Östriol) wird Dehydroepiandrosteron zunächst aus der maternalen, später aus der fetalen Nebenniere zur Verfügung gestellt.

Östrogene führen zur Proliferation und Ödematisierung der Uterusschleimhaut. Sie synthetisieren kontraktile Proteine und Energiedonatoren im Myometrium, stimulieren die Prostaglandinsynthese und führen zur Zervixreifung. Progesteron schafft günstige Nidationsbedingungen für die befruchtete Eizelle und hält die Schwangerschaft aufrecht. Neben der Wehenhemmung, stimuliert es die Mammo- und Laktogenese.

Das hPL ähnelt strukturell sehr dem Wachstumshormon aus der Hypophyse und stimuliert den maternalen Stoffwechsel. Es bewirkt eine Lipolyse und führt zu einer Freisetzung von freien Fettsäuren, die anstelle von Glukose als Energiesubstrat dienen. Die nicht mehr verwendete Glukose kann nun dem Feten bereitgestellt werden (1, 2, 6).

1.1.2 Plazenta nach der Geburt

Da sich die Plazenta nur für die Versorgung des Feten entwickelt und nach der Geburt nicht mehr benötigt wird, wird sie als „Nachgeburt“ ausgestoßen. In der Regel bildet sich zentral (90%) ein retroplazentares Hämatom aus, was zur Ablösung der Plazenta führt. Im Normalfall erscheint die Plazenta mit der Insertionsstelle der Nabelschnur voran in der Vulva. Fibrinauflagerungen auf der Wundfläche verringern das Blutungsausmaß. Die Plazenta sollte sowohl auf der fetalen als auch auf der maternalen Seite nach der Geburt auf Vollständigkeit überprüft werden, da es durch die mechanische Belastung und die auftretenden Scherkräfte zu Abrissen von einzelnen Kotyledonen kommen kann. Diese müssten dann im Nachhinein manuell entfernt werden (3, 6).

1.2 Maternal- fetaler Cholesterinstoffwechsel

Cholesterin spielt in vielen physiologischen Prozessen und so auch in der Entwicklung des Feten eine essentielle Rolle.

Cholesterin (Abbildung 3) ist ein Schlüsselement für die Fluidität von Membranen und die Entstehung von lipidreichen Mikrodomänen. Eine andere Aufgabe des Cholesterins ist die Aktivierung des sogenannten Hedgehog-Proteins, welches an der Entwicklung des Vorderhirns beteiligt ist. Außerdem dient es als Vorläufermolekül für Gallensäuren, Steroidhormone, Vitamin D und Oxysterole (9).

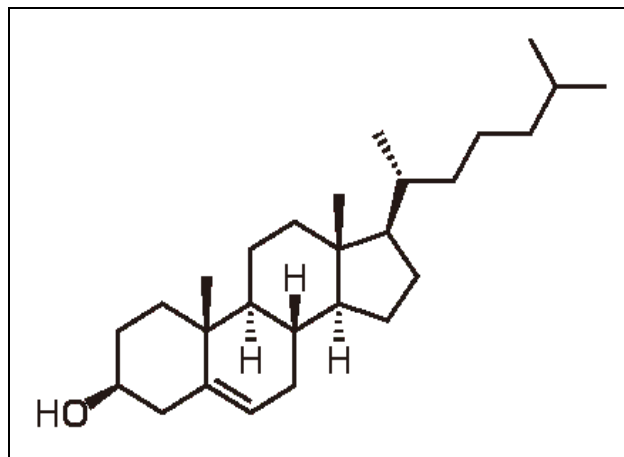


Abbildung 3: Strukturformel des Cholesterins: $C_{27}H_{46}O$ (10)

Die Entdeckung des SLOS (1990) zeigt beispielhaft die Wichtigkeit des Cholesterins für die Entwicklung des Feten. Bei diesem Syndrom führt eine reduzierte endogene Cholesterinbiosynthese (Defekt der Δ^7 -Dehydrocholesterol Reduktase) im Feten zu verschiedenen kongenitalen Defekten (11).

Da der Mensch ca. 1g Cholesterin über die Bildung von Gallensäure ausscheidet, muss die gleiche Menge dem Körper wieder zugefügt werden, um das Gleichgewicht von Aus- und Einfuhr zu gewährleisten. Der größte Teil entsteht durch Neusynthese (700-800mg) und nur ein kleiner Teil (200-300mg) wird bei ausgewogener, cholesterinarmer Ernährung über die Nahrung aufgenommen (12). Beim Feten gibt es ebenfalls diese beiden Möglichkeiten der Cholesteringewinnung. Während beim Erwachsenen ein „steady-state-Zustand“ herrscht, d. h. der Input entspricht dem Output, gibt es beim Feten dieses

Gleichgewicht nicht. Hier ist die Cholesterin-Syntheserate viel höher, da das Substrat für das schnelle Wachstum des Feten gebraucht wird (9).

Da beim SLOS geringe Cholesterinkonzentrationen in fetalem Blut und Gewebe nachgewiesen werden konnten, muss dem Feten Cholesterin aus einer externen Quelle zugeführt worden sein. Es gibt mehrere Hinweise, dass die mütterliche Zirkulation als Cholesterinlieferant dient. So wiesen Mc McConihay et al. (13) eine direkte Korrelation zwischen mütterlicher und fetaler Cholesterinkonzentration bei Hamstern nach und Napoli et al. zeigten, dass eine maternale Hypercholesterinämie mit einer verstärkten „Fatty streak“-Bildung in der fetalen Aorta assoziiert ist (14).

Die Aufnahme von Cholesterin über Lipoproteine auf der apikalen Seite der Plazenta erfolgt über Lipoproteinrezeptoren (Low-Density-Lipoprotein Rezeptor, Very-Low-Density-Lipoprotein Rezeptor, Klasse A Scavenger Rezeptor, Low-Density-Lipoprotein Rezeptor related Protein Low-Density-Lipoprotein Rezeptor related Protein 8, Megalin, Cubillin und Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I).

Auf folgenden Wegen kann Cholesterin in die fetale Zirkulation abgegeben werden (Abbildung 4) (11):

- I. Sekretion von Lipoproteinen (apo-B-haltig)
- II. Sekretion von Apolipoproteinen (apoE und apoA1) mit Cholesterin und Lipiden
- III. Cholesterinefflux entlang eines Konzentrationsgradienten zu phospholipidhaltigen Partikeln oder HDL (Protein-unabhängig)
- IV. SR-BI- abhängiger Cholesterinefflux entlang eines Konzentrationsgradienten zu phospholipidhaltigen Partikeln oder HDL
- V. Mittels ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) kann Cholesterin an lipidarme Apolipoproteine abgegeben werden. Eine andere Möglichkeit ist Cholesterin und Oxysterol an HDL mittels ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) zu überführen (14).

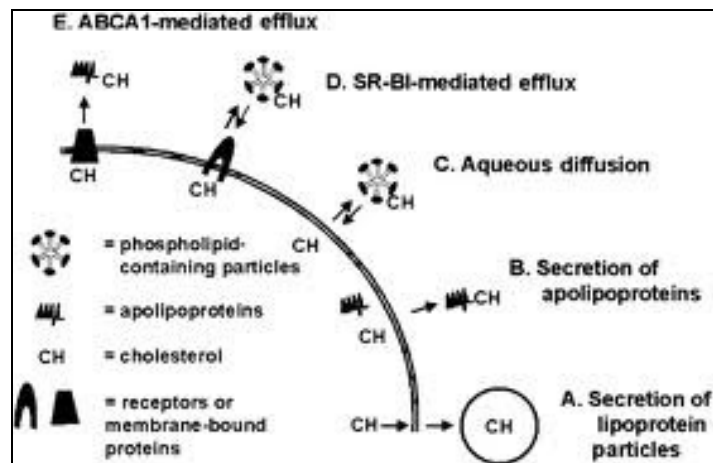


Abbildung 4: Möglichkeiten des Cholesterineffluxes in die fetale Zirkulation (11)

Eine geringe Cholesterinkonzentration in der Zirkulation der Mutter hat keinen negativen Effekt auf die Entwicklung des Feten, da dieser die mangelnde Zufuhr durch eine Erhöhung der eigenen Produktion kompensieren kann. Eine exogene Cholesterinquelle ist also nur bei einer Störung der endogenen Cholesterinproduktion (z.B. SLOS) von Bedeutung (11).

1.2.1 Cholesterinmetabolismus in Endothelzellen

Über die genauen Abläufe der Cholesterinhomöostase in humanen Endothelzellen ist aktuell noch wenig bekannt (16).

Cholesterin wird über Lipoproteinrezeptoren in die Endothelzelle (insbesondere über den LDLR) aufgenommen (17). Weiters findet über SR-BI eine selektive Aufnahme von Cholesterinestern (CE) statt. Über diesen Rezeptor kann Cholesterin auch an HDL abgegeben werden. Die Cholesterinaufnahme über den SR-BI spielt jedoch nur eine untergeordnete Rolle, wichtiger scheint die Aktivierung der eNOS zu sein (16). Über LOX-1 kann vermehrt ox-LDL aufgenommen werden, was zu einer Dysfunktion führen kann und damit die Bildung von Atherosklerose initiiert.

Im Gegensatz zu glatten Muskelzellen und Makrophagen kommt es in Endothelzellen zu keiner Akkumulation von Cholesterin. Erklärungsansätze hierfür könnten eine verminderte Cholesterinsynthese innerhalb der Endothelzelle oder herunter regulierte Lipoproteinrezeptoren (SR-BI und LDLR) sein. Weiters wird Cholesterin über den ABCG1 an HDL weitergeben, wodurch die Endothelzelle vor Cholesterinakkumulation geschützt wird (17).

1.3 Lipide und Lipoproteine in der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft kommt es zu zahlreichen metabolischen Veränderungen, auch im Fettstoffwechsel. In der Frühschwangerschaft herrscht ein anaboler Zustand: Es werden vermehrt Fettdepots aufgebaut und die Lipolyse wird gehemmt. Verantwortlich dafür sind die Hormone Östrogen, Progesteron und Insulin. Die Entwicklung einer Hyperphagie führt bei der Mutter zur Gewichtszunahme und Aufbau von Fettdepots. In der Spätschwangerschaft kommt es dann durch Einfluss des hPL zu einer Lipolyse und Fettdepotmobilisierung (katabole Phase) (16). Dadurch, dass die Fettsäuren der Mutter durch den Wechsel zur katabolen Phasen als Energiequelle dienen, bleiben Glucose und Aminosäuren für den Feten. Es entwickelt sich also im Laufe der Schwangerschaft eine physiologische maternale Hyperlipidämie (19).

Es findet sich eine starke Erhöhung der Triglyceride (TG), sowie eine leichte Erhöhung von Phospholipiden und Cholesterin. Dies bedingt eine Erhöhung der Lipoproteine (VLDL, LDL, HDL) und einen vermehrten TG-Gehalt innerhalb der Lipoproteine (20).

Total- und LDL-Cholesterin fallen zwar initial ab, erreichen jedoch im 3. Trimenon ihr Maximum. Ein Effekt den man bei den TG und den VLDL innerhalb der ersten 8 Wochen ebenfalls beobachtet. Die Ursache für den Anstieg liegt in der veränderten VLDL-Clearance auf Grund der verminderten Aktivität der Lipoproteinlipase im Fettgewebe und in der Leber (19) sowie in der Östrogenbedingten VLDL-Synthese (21).

Nach 12 Wochen kommt es zu einem Anstieg des HDL-Spiegels, der aber im Laufe der Schwangerschaft leicht abfällt, aber dennoch über dem Ausgangswert bleibt (19, 21).

Weil der ausgesprochen hohe Cholesterinbedarf des Feten primär über die Cholesterin-Biosynthese gedeckt wird, spielt der materno-fetale Transfer in der Versorgung des Feten mit Cholesterin nur eine ergänzende Rolle.

1.4 Gestationsdiabetes

Beim Gestationsdiabetes (GDM) handelt es sich um eine Glukosetoleranzstörung, die erstmals während der Schwangerschaft mit einem oralen Glukosetoleranztest (oGTT) diagnostiziert (Tabelle 1-2) und nach der White-Klassifikation (Tabelle 1-1) eingeteilt wird. Dieses Screening sollte zwischen der 24. und 28. Schwangerschaftswoche durchgeführt werden. Danach ist der Test auf Grund des fetalen Hyperinsulinismus nur eingeschränkt beurteilbar (6).

Die Stoffwechselstörung ist in der Regel auf die Schwangerschaft beschränkt. Man unterscheidet zwei Typen: G1 (nur diätische Therapie nötig) und G2 (insulinabhängige Therapie) (22).

Der GDM manifestiert sich erst im 3. Trimenon und hat wegen dem höheren Vaskularisierungsgrad der Plazenta einen stärkeren Effekt auf das Endothel (23). Es handelt sich nicht um eine gestörte Insulinsekretion, sondern um eine Insulinresistenz. Die Häufigkeit liegt je nach Population zwischen 1 und 14%.

Als Risikofaktoren für eine Entwicklung eines GDMs gelten eine positive Familienanamnese bezüglich Diabetes, ein Gestationsdiabetes während früheren Schwangerschaften, hohes Lebensalter, Übergewicht und Adipositas sowie ein hohes Geburtsgewicht bei früheren Schwangerschaften (6).

Während der GDM bei der Mutter relativ lang symptomlos bleibt und lediglich durch starke Gewichtszunahme und einen großen Bauchumfang auffällt, kann es beim Feten zu weitaus schwerwiegenderen Folgen kommen.

Neben dem Blutzuckeranstieg kommt es auch zu einem Anstieg von TG, Fettsäuren und Aminosäuren. Es liegt also ein „State of Dyslipidaemia“ vor (19). Veränderungen der mütterlichen Lipidkomposition und Erhöhung der Lipidspiegel führen durch einen höheren Gradienten zu einem gesteigerten Lipidtransfer. Dieser Gradient, sowie der uteroplazentare Blutfluss und die Größe der Plazenta führen zur Makrosomie des Feten (per definitionem >4000g) (24). Durch diese kann es schon während dem Geburtsvorgang zu Komplikationen kommen (Schulterdystokie).

Während der Schwangerschaft entsteht durch das vermehrte Glukoseangebot, bedingt durch eine Insulinresistenz der Mutter, ein fetaler Hyperinsulinismus. Nach der Geburt und der „Disconnection“ von der Mutter fällt der Glukoseüberschuss weg und der hohe neonatale Insulinspiegel senkt den Blutzuckerspiegel zu stark.

Auf Grund der daraus resultierenden Hypoglykämie besteht aus Sicht des Feten dringend die Indikation zur Behandlung des GDM (2, 6).

Desweiteren können Adaptationsschwäche, Atemnotsyndrom, Hyperbilirubinämie und Hypokalziämie auftreten. Sowohl bei der Mutter als auch beim Kind entsteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Typ-2 Diabetes. Während Diabetes (Typ 1 und 2) in der Frühschwangerschaft durch Störung von Proliferations- und Differenzierungsschritte des Trophoblasten Langzeitschäden verursacht, kommt es beim GDM (klinische Manifestation erst in der 2. Hälfte der Schwangerschaft) eher zu Kurzzeitschäden wie z.B. Varietät von Molekülen inkl. Genexpression oder Beeinflussung von Transportprozessen (25).

Verminderter Sauerstofftransport resultiert aus einer verlängerten Diffusionsstrecke durch vermehrte Kollagenbildung in Trophoblasten. Die Plazenta reagiert auf diese Mangelversorgung mit einer Oberflächenvergrößerung. Diese Anpassungsreaktion erklärt das postpartal größere Plazentagewicht verglichen mit normalen Schwangerschaften (23). In der Frühschwangerschaft kommt es in der anabolen Phase zum Aufbau von Fettspeichern durch Lipogenese. Das dient der Vorbereitung für die Bereitstellung von Nährstoffen für das schnelle Wachstum in der Spätschwangerschaft. Durch die Insulinresistenz kommt es zur vermehrten Lipolyse. Ein vermehrter Fluss von Fettsäuren zur Leber und erhöhte TG führen zu vermehrter VLDL- und damit zur LDL-Bildung. Bei der Konzentration von HDL gibt es keine Unterschiede zwischen normalen und diabetischen Schwangerschaften.

Häufig geht ein Gestationsdiabetes auch mit einem erhöhten BMI einher. Außerdem kommt es beim Diabetes zu einem erhöhten oxidativen Stress, welcher durch ein Ungleichgewicht zwischen freien Radikalen und antioxidativen Protektoren charakterisiert ist (26). Ein Erkennen ist deshalb so wichtig, damit die perinatale Morbidität und Mortalität gesenkt werden kann (27).

Tabelle 1-1: White-Klassifikation des Gestationsdiabetes: Diese berücksichtigt Manifestationszeitpunkt, Dauer sowie auftretende Spätkomplikationen

Typ	Beschreibung
A	Nicht insulin-pflichtiger Diabetes
B	Diabetes seit <10 Jahren oder Beginn ab 20. Lebensjahr
C	Diabetes seit 10-19 Jahren oder Beginn ab 10.-19. Lebensjahr
D	Diabetes seit >20 Jahren oder Beginn vor 10. Lebensjahr oder benigne Retinopathie
F	Diabetische Retinopathie
G	Vermeehrt geburtshilffliche Misserfolge
H, R oder NR	KHK, proliferative Retinopathie oder diabetische Nephro- und Retinopathie
T	Status post Nierentransplantation

Tabelle 1-2: Beurteilung eines oGTT mit 75 g Glukose anhand von Normwerten

Nüchtern-Blutzucker	>100 mg/dl	GDM gilt als bewiesen bei 2 pathologischen Werten
Nach 1h	>180 mg/dl	
Nach 2 h	>155 mg/d	
Nüchtern-Blutzucker	>90 mg/dl	Gestörte Glukosetoleranz, aber Werte im Grenzbereich
Nach 1 h	>160 mg/dl	
Nach 2h	>140 mg/dl	

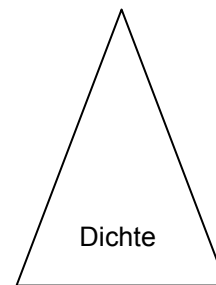
1.5 Lipoproteine, Stoffwechsel und Apolipoproteine

Lipide (hauptsächlich Cholesterin und Cholesterinester (CE), Phospholipide, Triglyceride (TG)), welche über die Nahrung aufgenommen werden, können auf Grund ihres hydrophoben Charakters nicht im Blut transportiert werden. Deshalb bedarf es spezieller Transportmoleküle: den sogenannten Lipoproteinen (9).

Diese Partikel bestehen aus einem hydrophoben Kern (CE, TG), die Hülle wird aus hydrophileren Lipiden (unverestertes Cholesterin und Phospholipiden) und Proteinen, den Apolipoproteinen (Apo A, B-100, B-48, C, E) gebildet. Diese haben nicht nur die Funktion die Lipoproteine wasserlöslicher zu machen, sie dienen auch als Ligand für Rezeptoren und Aktivatoren von Enzymen.

Die Klassifikation erfolgt nach der Dichte, wobei Chylomikronen die am wenigsten dichten und die HDL-Partikel die dichtesten Lipoproteine sind.

- Chylomikronen
- Chylomikronen-Remnants
- VLDL (Very-Low-Density-Lipoprotein)
- LDL (Low-Density-Lipoprotein)
- HDL (High-Density-Lipoprotein)



In Tabelle 1-3 sind die wichtigsten Eigenschaften der einzelnen Lipoproteine und deren Apolipoproteine dargestellt (28).

Die Chylomikronen transportieren vor allem die TG und andere Lipide aus der Nahrung vom Darm über das Lymphsystem zu den peripheren Zellen. In den dort vorhandenen Blutgefäßen (z.B. von Muskelzellen, Herz, Fettgewebe) befinden sich Lipoproteinlipasen. Diese werden durch ApoCII aktiviert, wodurch sie die TG hydrolysieren und die dabei entstehenden Fettsäuren als Energie verwerten. Nachdem die TG abgegeben wurden, wandern sie als Chylomikronen-Rest (engl. Chylomikronen-Remnants) zur Leber, wo sie über ApoE an Rezeptoren binden und endozytotisch aufgenommen werden. Als einziges der Lipoproteine besitzt es den Apo-B48 als Apolipoprotein (24, 29).

Besteht ein Überangebot an Fettsäuren in der Leber, sezerniert diese VLDL mit ApoB-100, ApoC und ApoE. Aus den VLDL werden ebenfalls, wie bei den Chylomikronen aus den TG Fettsäuren gewonnen. Der Mechanismus erfolgt auch hier über die Lipoproteinlipase, allerdings haben die Chylomikronen eine höhere Affinität zu diesem Enzym.

Je mehr TG entfernt werden, desto dichter werden die Partikel. Werden die VLDL-Reste nicht von der Leber entfernt, entstehen zunächst kurzlebige IDL (Intermediate- Density- Lipoproteine) und daraus dann LDL (24).

LDL sind besonders reich an Cholesterin und Cholesterinestern, welche zu den peripheren Geweben transportiert werden. Das wichtigste Apolipoprotein ist das Apo-B100, das als Ligand für den LDL-Rezeptor fungiert. Die nicht mehr benötigten ApoC und E werden von HDL-Partikel aufgenommen.

Während bisher nur diejenigen Lipoproteine besprochen wurden, welche die Zellen mit Lipiden versorgen, geht es im Folgenden um das HDL, das für den reversen Cholesterintransport (RCT) zuständig ist.

Das Apoprotein ApoA1 wird von der Leber und vom Dünndarm synthetisiert. Durch das ApoA1 kann HDL das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase binden, welches Cholesterin verestert, das im Inneren des HDL-Partikels gespeichert wird. Dadurch erhält das zunächst scheibenförmige HDL seine kugelige Form. Auf der einen Seite kann HDL über spezifische Rezeptoren (SR-BI; Cubillin, LRP-8) CE an bestimmte Zellen abgeben, auf der anderen Seite kann delipidiertes HDL gespeichertes Cholesterin von den Zellen wieder aufnehmen und zur Leber zurücktransportieren (RCT) (12, 28, 29).

Tabelle 1-3: Eigenschaften von Lipoproteinen und deren Apolipoproteine; TG=Triglyceride, CE=Cholesterinester, C=freies Cholesterin, PL=Phospholipide, P=Protein

Lipoprotein	Dichte (g/ml)	Durchmesser (in mm)	Apolipoproteine	Zusammensetzung (in %)				
				TAG	CE	C	PL	P
Chylomikronen	< 0,95	75-1200	B-48,C,E	86	3	1	8	1
VLDL	0,95-1,01	30-80	B-100,C,E	52	14	7	18	8
LDL	1,02-1,06	18-25	B-100	10	38	8	22	21
HDL	1,06-1,21	7,5-20	A	5-10	14-21	3-7	19	33-57

1.6 Lipoproteinrezeptoren

1.6.1 Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I

Abkürzung: SR-BI

Synonym: CLA1; CLA-1; SR-B1; CD36L1; MGC138242; SCARB1

SR-BI ist ein transmembraner Oberflächenrezeptor, welcher der CD36 Superfamilie angehört und mit hoher Affinität LDL und HDL bindet (30- 33). Ursprünglich als Rezeptor für modifiziertes LDL (ox-LDL) entdeckt, wurde im Laufe der Zeit mehr und mehr deutlich, dass seine Hauptaufgabe in der selektiven Aufnahme von Cholesterinestern (CE) aus HDL besteht (30, 32, 34).

Beim SR-BI handelt es sich um ein Glykoprotein, der in vielen Organen des Körpers in den Caveolae der Plasmamembran, eine spezielle Mikrodomäne in der Plasmamembran, die angereichert an Cholesterin, Sphingolipiden und Proteine der Caveolin-Familie ist, exprimiert wird (31). SR-BI wird vor allem in der Leber und steroidproduzierenden Organen, da diese einen erhöhten Cholesterinumsatz haben, exprimiert. Weiters ist eine hohe SR-BI-Expression im Plazentagewebe und im Dünndarm festgestellt worden (32).

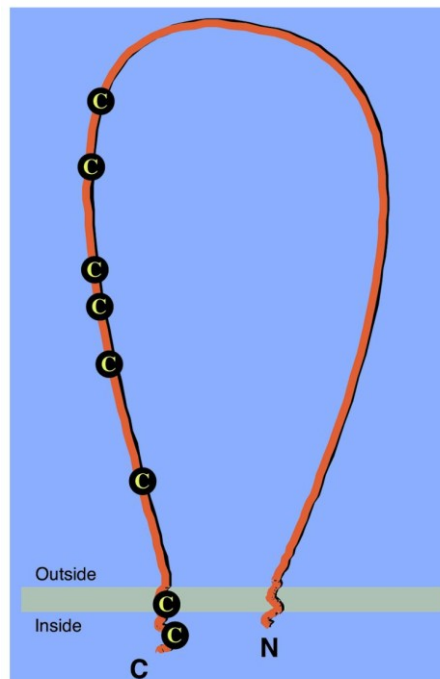


Abbildung 5: Schematische Abbildung des SR-BI (35)

Das Protein besteht aus 509 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 82 kD. Strukturell lässt sich der SR-BI in 3 Teile unterteilen: Die 2 transmembranen Bestandteile (28 und 25 Aminosäuren (AS)) werden zum Zytoplasma hin durch eine kurze Amino (8 AS) - und eine Carboxy (45 AS)-terminale Gruppe abgeschlossen. Die große extrazelluläre Domäne (403 AS) weist einen cysteinreichen Anteil mit vielen N-Glykosilierungen auf und bildet die Form eines Hufeisens (Abbildung 5) (32, 35).

Neben HDL vermag SR-BI auch andere Lipoproteine (LDL, VLDL) und Liganden (z.B. Albumin, AGEPs, apoptotische Zellen) zu binden, wobei die Effizienz für die LDL-Aufnahme deutlich geringer ist als die des LDL-Rezeptors (31, 36). Die Fähigkeit von SR-BI, modifizierte Lipoproteine zu binden, wurde bereits erwähnt. Allerdings ist der Mechanismus ein anderer. Während beim CE-Uptake das HDL-Partikel nicht in die Zelle aufgenommen wird (keine lysosomale Degradierung), findet z.B. in Makrophagen eine Internalisierung und Degradierung des oxidierten LDLs statt (32, 36).

Das dominante Apolipoprotein am HDL und damit wichtiges Bindungsprotein zum Rezeptor ist das Apoprotein A1. Nach dem Binden des Lipoproteins kommt es zum Lipidtransfer (2-Stufen Mechanismus) (31).

Bei der selektiven Lipidaufnahme vom HDL werden neben dem CE auch PL, TG und nicht-verestertes Cholesterin an die Zelle abgegeben. Dabei können hydrophobe Lipide weitaus einfacher transferiert werden (34). Außerdem können über SR-BI fettlösliche Vitamine in die Zelle aufgenommen werden (Vitamin E), ein essentielles Antioxidant, welches die Zellmembran schützt. Der selektive CE-Uptake von HDL spielt besonders in steroidproduzierenden Zellen eine wichtige physiologische Rolle (37).

Eine weitere wichtige Funktion ist der Efflux von Cholesterin aus den Zellen in die extrazelluläre Flüssigkeit mit anschließendem Transport zur Leber. Das ist die initiale Phase des Reversen Cholesterintransportes (RCT) (34). Wieder sind die Caveolae, an denen der SR-BI vermehrt exprimiert wird, beteiligt und die Expression des Rezeptors korreliert mit dem Efflux von nicht-verestertem Cholesterin. Vermutlich wird das Cholesterin über einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle gebracht.

In der Leber wird das HDL-Cholesterin entweder zur Synthese von Gallensäuren verwendet oder es werden neue Lipoproteine gebildet. Durch die CE-Aufnahme

werden etwa 60-80 Prozent des HDL-Cholesterins entfernt. Eine Überexpression des SR-BI führt zu einer Senkung des Plasma HDL und zu einer Steigerung des Cholesterins in der Galle. Das hat einen suppressiven Effekt auf die Bildung von Atherosklerose zur Folge, da der RCT angekurbelt wird. Ein Verlust der Funktion des SR-BI hat einen negativen Effekt auf die kardiovaskuläre Physiologie, da das Plasma-HDL stark ansteigt (33, 37).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der SR-BI für den bidirektionalen Transfer von Cholesterin insbesondere in steroidogenen Organen verantwortlich ist.

Die Regulation dieses Rezeptors kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Diätetisch betrachtet stimulieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren die SR-BI - Expression, während es bei Myristinsäuren zu einer Reduktion kommt. Posttranskriptional wird die Expression über ein lösliches, aus mehreren PDZ-Domänen bestehendes Protein reguliert. Das PDZK1 (auch CLAMP genannt) sitzt am C-terminalen Ende des SR-BI und kontrolliert die Stabilität und Aktivität des SR-BI (37). Dieser Regulationsmechanismus ist aber spezifisch für die Leber und die epithelialen Zellen des Dünndarms. In Organen der Steroidbildung wirken Hormone als Regulator (Adrenocorticotropes Hormon; hCG und Östrogen).

In der humanen Plazenta finden wir ebenfalls eine starke SR-BI -Expression in den unterschiedlichen Zellpopulationen. Es wurde SR-BI-Protein in Syncytiotrophoblasten sowohl auf mütterlicher als auch fetaler Seite gefunden (36). Allerdings gibt es unterschiedliche Meinungen über die Wichtigkeit der Rolle von SR-BI. Während Wadsack et al. 2003 (36) in der SR-BI Expression eine große Rolle in der Cholesterinversorgung sieht, behaupten Ethier-Chiasson et al. 2007 (38), dass es keine Korrelation zwischen HDL und SR-BI gibt und damit die Rolle als minimal angesehen werden kann.

Allerdings ist SR-BI wichtig für die Reproduktion, wie eine Studie durch infertile SR-BI Knock-Out Mäuse zeigte (31). Zwar wird die zyklische Steroidproduktion nicht beeinträchtigt, aber es beeinflusst die Möglichkeit das fetale Wachstum und die Produktion von erhöhten Steroidkonzentrationen aufrechtzuerhalten, was für die Schwangerschaft von elementarer Bedeutung ist (33, 37).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass SR-BI eine Schlüsselrolle im selektiven Cholesterintransport, in der Kontrolle der Plasmacholesterinlevel, der

Cholesterinkonzentration in der Galle, dem RCT und der Verwendung des Cholesterins durch die Zellen spielt.

1.6.2 Lektin-like oxidized Low-Density-Lipoprotein Rezeptor

Abkürzung: LOX-1

Synonym: LOXIN; SLOX1; CLEC8A; SCARE1; OLR1

LOX-1 wurde erstmals 1997 durch Sawamura et al. beschrieben (30) und erstmals in Endothelzellen der Rinderaorta und der menschlichen Lunge (40) nachgewiesen. Als Typ-II Membran-Glykoprotein gehört LOX-1 der C-Typ Lectin Superfamilie, abstammend von der NK-Zellrezeptorfamilie, an.

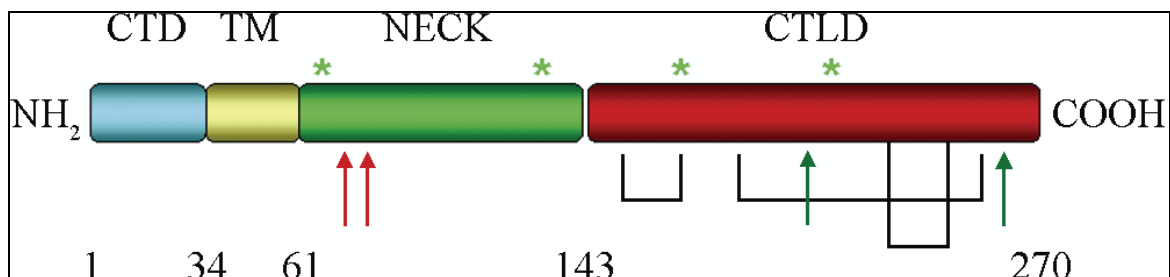


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur des LOX-1 (41)

LOX-1 (Molekulargewicht: 47 kD) entsteht aus pre-LOX-1 durch Glykosilierungen und besteht aus einem kurzen N-terminalen zytoplasmatischen und einem C-terminalen extrazellulären Ende (Abbildung 6). Die Hauptaufgabe dieses Rezeptors ist die Bindung, die Aufnahme und der anschließende Abbau von ox-LDL. Außerdem bindet es noch acetyliertes LDL (ac-LDL), jedoch kein natives LDL (42).

Ox-LDL entsteht durch Oxidation von LDL. Dabei kommt es zur Fragmentierung und Modifikation, sodass die Lipide negativ geladen werden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Ligandenerkennung von LOX-1 (30). Hauptligand scheint das durch Oxidation modifizierte Apo B-100 zu sein. Freie Sauerstoffradikale, durch oxidativen Stress generiert, greifen Lipoproteine oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren an, wodurch ox-LDL als Hauptprodukt entsteht.

LOX-1 wird hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert und kann durch verschiedene Faktoren induziert werden (Angiotensin-II, TNF-alpha, advanced glycation end products und ox-LDL) (40). Außerdem wird LOX-1 in Makrophagen,

Gefäßmuskelzellen und Chondrozyten gebildet. LOX-1 wird in verschiedensten Geweben exprimiert, aber in der humanen Plazenta ist die Expression am höchsten. Das dient vermutlich dem Schutz des Feten und der Plazenta vor dem toxischen Effekt des ox-LDL.

Durch die Aktivierung dieses Scavenger-Rezeptors kommt es zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (MCP-1, ICAM-1 und VCAM-1), zu einer Freisetzung von Superoxidanionen und einer verminderten Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO), was den zellulären Abläufen bei einer endothelialen Dysfunktion entspricht (30).

In gesundem Gewebe ist der LOX-1 basal gering exprimiert, dagegen findet man in atherosklerotischen Läsionen, bei arterieller Hypertension, Diabetes oder Hyperlipidämie eine erhöhte Expression. Die erhöhte Konzentration an LOX-1 in der Plazenta wird durch die vermehrte metabolische Aktivität, sowie der verminderten Clearance von ox-LDL durch Antioxidantien erklärt. Außerdem korreliert ein hoher Body Mass Index (BMI) mit der Expression dieses Rezeptors (42).

1.6.3 Low-Density-Lipoprotein Rezeptor

Abkürzung: LDLR

Synonym: FH, FH, LDLCQ2

LDLR gehört zur Familie der Low-Density-Lipoprotein Rezeptor Gene. Er wurde von Goldstein und Brown 1974 in humanen Fibroblasten der Haut entdeckt (43). Der Rezeptor ist ein aus 839 Aminosäuren bestehendes transmembranes Glykoprotein und wird als Vorläuferprotein im rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und danach posttranslatorisch modifiziert bis er als „coated pits“ zur Zelloberfläche gelangt. LDLR lässt sich in 5 funktionelle Abschnitte unterteilen (Abbildung 7).

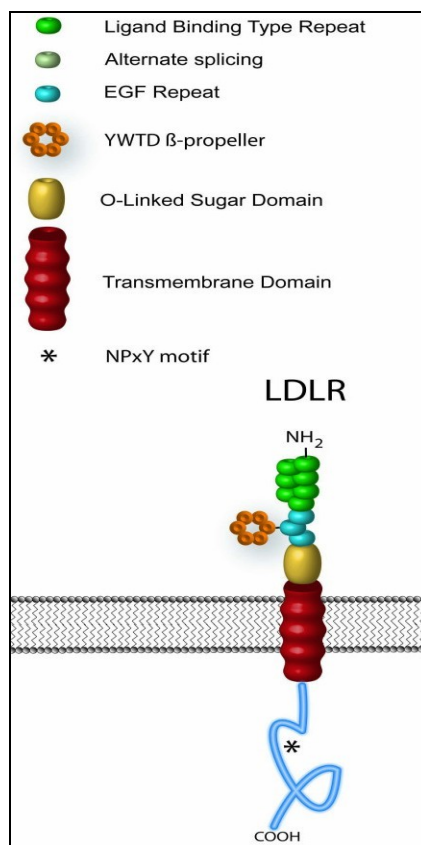


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des LDLR (44)

LDLR wird ubiquitär exprimiert mit hoher Expression in der Leber, über die ca. 70% des zirkulierenden Plasma-LDLs verstoffwechselt werden.

Der Hauptligand des LDLR ist das LDL mit seinen Proteinkomponenten Apo B-100 und ApoE. Diese beiden Proteine binden an den Rezeptor und bilden einen

Liganden-Rezeptorkomplex, der, von einem Clathringerüst umgeben, in die Zelle aufgenommen wird (Endozytose). Nachdem das Gerüst entfernt wurde, fusioniert der Komplex mit einem Endosom. Durch Änderung des pH-Wertes löst sich der Rezeptor vom LDL (Dissoziation). Während der Rezeptor recycelt wird und zur Zelloberfläche zurückkehrt, man spricht von „rezeptorabhängiger Reinternalisierung“, kann das LDL im Lysosom weiter verarbeitet werden (Abbildung 8) (45). ApoB-100 wird abgebaut und der CE wird in freie Fettsäuren und Cholesterin gespalten. Das freie Cholesterin bewirkt zum einen die Aktivierung der Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT), damit das Cholesterin wieder verestert und im Zytosol gespeichert werden kann. Zum anderen hemmt es die Neusynthese von Cholesterin, indem es die Bindung von SREBP verhindert und damit die Transkriptionsrate der HMG-CoA-Reduktase und des LDLR reduziert (negative Rückkopplung). Weitere Regulationsmechanismen finden über Zytokine, Wachstumsfaktoren, Insulin und andere Hormone (z.B.: Östrogene) statt (46).

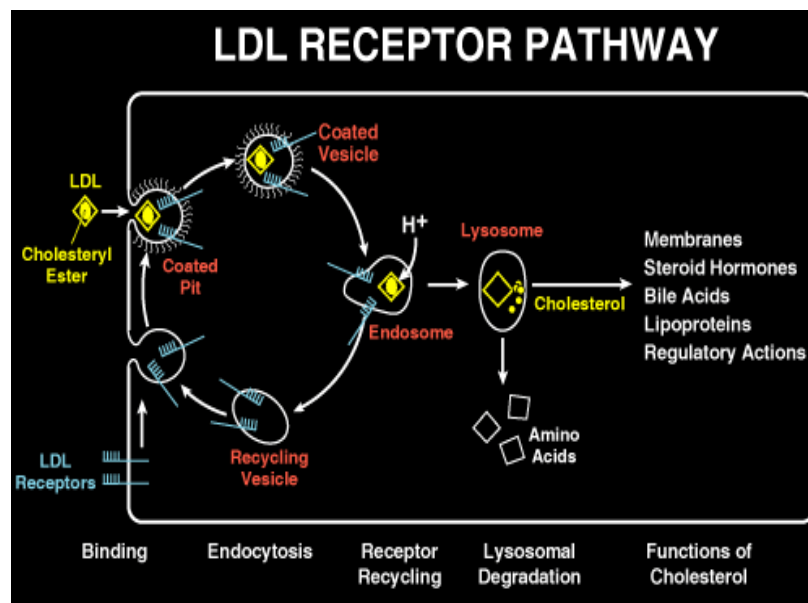


Abbildung 8: Funktion des LDLR (45)

Es sind zahlreiche Mutationen im Gen (Chromosom 19) des LDLR bekannt, unter anderem die autosomal dominant vererbte familiäre Hypercholesterinämie.

In der Plazenta nimmt der LDLR eine wichtige Funktion ein. Bei niedrigen maternalen LDL-Plasmaleveln wird der Rezeptor hochreguliert, um eine ausreichende Versorgung mit Cholesterin zu gewährleisten. Dagegen scheint der LDLR vermindert exprimiert zu werden, wenn im mütterlichen Plasma sehr hohe

Spiegel an Cholesterin, LDL oder Apo-B100 vorliegen. Das bedeutet, dass der LDLR indirekt proportional zum Plasmacholesterin reguliert ist. Das erklärt auch, warum bei Hypercholesterinämie der Mutter die LDL-Cholesterinkonzentration in der fetalen Zirkulation weitgehend unbeeinträchtigt bleibt. Der LDLR spielt also eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Cholesteringleichgewichtes (39).

Eine Studie von Furuhashi et al. zeigte, dass der LDL-Rezeptor in den ersten 2 Trimestern auf Trophoblasten am stärksten exprimiert wird, um eine ausreichende Cholesterinversorgung für das Zellwachstum zu garantieren (48).

1.6.4 Low- Density- Lipoprotein Rezeptor related Protein 8

Abkürzung: LRP-8

Synonym: MCI1; APOER2; HSZ75190

LRP-8 wird vom gleichnamigen Gen, welches auf dem Chromosom 1 lokalisiert ist, codiert. Erstmals beschrieben wurde es von Kim et al. im Jahre 1996.

LRP-8 gehört zur Familie der LDL-Rezeptoren und ist strukturell sehr verwandt mit den LDL- und den VLDL-Rezeptoren. Die aminoterminal Bindestelle für Liganden besteht aus Cystein reichten Wiederholungen, einer epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Domäne, einer O-gebundenen Zuckerdomäne, einem transmembranen und einem cytoplasmatischen Anteil (Abbildung 9) (49). Diese fünf Domänen bestehen aus insgesamt 963 Aminosäuren (50).

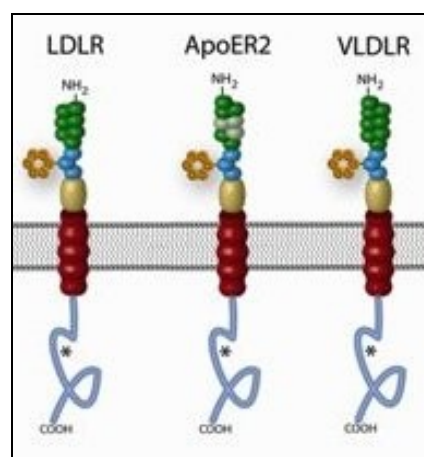


Abbildung 9: Der LRP-8 im Vergleich zum LDLR und VLDLR

Hauptsächlich wird LRP-8 im Gehirn und in der Plazenta exprimiert, in Herz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas konnte keine mRNA

nachgewiesen werden. Der Rezeptor hat eine hohe Affinität zu β -VLDL. Das Apolipoprotein E wird vom LRP-8 erkannt. Somit können VLDL, HDL und Chylomikronen via Clathrin umhüllten „coated pits“ in die Zelle aufgenommen werden. Im Gegensatz zum VLDLR ist er unabhängig vom ApoE in Bezug auf die Lipoproteinbindung (51).

Neben der Aufnahme von Lipoproteinen spielt LRP-8 eine Rolle in der Selenaufnahme von Zellen (52), sowie in der Signaltransduktion. Dabei fungiert er zusammen mit dem VLDLR und dem Signalmolekül Reelin als Rezeptor und nimmt eine besondere Stellung durch neuronale Migration in der Entwicklung des Gehirns ein. Außerdem könnte LRP-8 eine Wirkung auf die Thrombozytenaggregation haben (53).

Bei Feten mit SLOS und gleichzeitigem Defekt im LRP-8-Gen liegt eine schwerere Form des SLOS vor als bei Feten mit intaktem LRP-8-Gen. Zwar ist LDL nicht sehr affin zu LRP-8, aber dieser Rezeptor könnte eine besondere Rolle beim LDL-Transport von der mütterlichen zur fetalen Zirkulation bei Feten mit einer Störung der endogenen Cholesterinproduktion (z.B. SLOS) spielen (11).

1.7 Referenzgene

Referenzgene werden auch als „Housekeeping-Gene“ oder als „Normalisierungsgene“ bezeichnet. Die Genprodukte, meist Enzyme z.B. im Glukosestoffwechsel, werden in konstanter Anzahl bzw. Häufigkeit und unabhängig von äußeren Einflüssen transkribiert, da sie Bestandteile vom Energiestoffwechsel sind und deshalb ständig bereitgestellt werden müssen (konstitutiv exprimierte Gene). Im menschlichen Genom finden wir um die 10.000 „Housekeeping“-Gene.

Um in Studien Aussagen über die Expression von Genen zu treffen, muss zuvor die Expressionsmenge in gesundem Gewebe ermittelt werden. Das ist die Voraussetzung für die Analyse und Interpretation von Genprofilen in pathologischen Geweben.

Die Real-Time-PCR-Technik (RT-PCR) ermöglicht die Erkennung von DNA-Amplifikationsraten. Diese Art der Erkennung von Gentranskriptionsprodukten ist schnell und präzise.

Der größte Problemfaktor bei der RT-PCR liegt in der Variabilität der DNA-Mengen zwischen den einzelnen Proben. Die Ursache ist in der Vorbereitungsphase zu finden: Ungenauigkeiten in der RNA-Isolation und der cDNA-Synthese können gewisse Unterschiede hervorrufen. Um diese Unterschiede auszugleichen, benötigt man Referenzgene. Mit diesen Referenzgenen werden die Probenvariationen ausgeglichen und die zu untersuchenden Gene normalisiert. Wie oben schon beschrieben, muss das Referenzgen folgende Voraussetzungen erfüllen: stabile und unregulierte Expression (54-55).

In dieser Studie wurden die folgenden 3 Gene zur Normalisierung verwendet:

- L30
- vWF
- CD34

Vorweg ist anzumerken, dass es sich nur bei L30 um ein Housekeeping-Gen im eigentlichen Sinne handelt. Die anderen beiden Gene sind Endothelzellmarker.

1.7.1 Ribosomales Protein L30

Abkürzung: RPL30

Synonym: L30

Das „Ribosomales Protein L30“-Gen codiert Proteine, welche wichtige Bestandteile von Ribosomen sind. Ribosomen bestehen in Eukaryonten aus einer kleinen 40S und einer größeren 60S Untereinheit. Diese nehmen eine zentrale Stellung in der Proteinbiosynthese ein, indem sie die mRNA in ein Protein von bestimmter Aminosäuresequenz umwandeln. Für die Synthese eines solchen Ribosoms werden vier RNA-Moleküle und 80 verschiedene Proteine gebraucht. An der Produktion von ribosomalen Proteinen ist die RNA-Polymerase II beteiligt (56).

Das RLP-30 codiert ein Protein, das zur L30E Familie der ribosomalen Proteine gehört und einen Teil der 60S-Untereinheit bildet. Es hat eine Größe von 3824 bp und eine „coding sequence“ von 348 bp.

Welche Folgen eine Mutation in diesem Gen für den Menschen hat, ist noch nicht ausreichend erforscht. Allerdings kann man aus Studien an der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* auf mögliche Folgen schließen (57).

1.7.2 Von Willebrandt-Faktor

Abkürzung: vWF

Synonym: VWD, F8VWF

Der von Willebrandt-Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein im Blut, welches seine Hauptaufgabe in der primären Hämostase (Blutstillung) hat. Die Bildung findet in Endothelzellen, Makrophagen oder Thrombozyten statt (58-60). Bei einer Gefäßverletzung liegen subendothelial Kollagenfasern frei. Dadurch wird der vWF aus dem Endothel freigesetzt und bewirkt, dass sich Thrombozyten an diese Stelle anlagern können. Außerdem vernetzt der vWF die Thrombozyten untereinander, sodass sich ein Thrombozytenpfropf ausbilden kann. Darüber hinaus kommt dem vWF auch eine Bedeutung in der plasmatischen Gerinnung (sekundäre Hämostase) zu, da er zusätzlich den Faktor VIII bindet (8).

Eine Mutation im vWF-Gen führt zum von-Willebrandt-Jürgens-Syndrom. Dabei kommt es durch Fehler in der Thrombozytenadhäsion und in der plasmatischen

Gerinnung zu Blutungsstörungen. Je nach Typ (I-III) liegt eine verminderte Aktivität oder ein kompletter Funktionsverlust vor (61).

Da der vWF aufgrund seiner Herkunft als endothelspezifisch beschrieben ist, wird er in dieser Studie als Referenzgen und Marker zur Normalisierung der zuvor beschriebenen Lipoproteinrezeptoren herangezogen (62).

1.7.3 Cluster of Differentiation Molecule 34

Abkürzung: CD34

Synonym: nicht bekannt

Dieses Gen codiert für ein transmembranes Glykoprotein, dessen Funktion bisher nicht ausreichend erforscht wurde. Das 105-115 kD schwere Oberflächenantigen findet sich auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, auf Endothelzellen von kleinen Gefäßen verschiedener Gewebearten sowie auf embryotischen Fibroblasten. Dadurch wird vermutet, dass es als Adhäsionsmolekül zur Bindung von Stammzellen fungiert und so als Stammzellmarker verwendet wird (63-65).

2 Hypothese und Fragestellungen

Eine normale fetale Entwicklung während der Schwangerschaft und die Synthese von Steroidhormonen erfordert eine ausreichende Versorgung des Feten mit Cholesterin. Dieser Bedarf kann im Wesentlichen durch 2 Mechanismen abgedeckt werden:

- 1) Durch die endogene Cholesterinbiosynthese des Feten und
- 2) mittels mütterlicher Versorgung von Cholesterin über den transplazentaren Transfer.

Die relativen Beiträge der beiden Mechanismen sind noch nicht geklärt, in der Literatur wird ein bis zu 40%iger mütterlicher Cholesterinanteil beschrieben.

Die Relevanz und Funktion dieser Mechanismen werden deutlich, bei Feten, welche nicht in der Lage sind endogen Cholesterin zu synthetisieren sind (SLOS-Krankheit) und trotzdem –wenn auch mit schweren Missbildungen- überleben, höchstwahrscheinlich durch den Cholesterintransport von der Mutter. Darüber hinaus sind Schwangerschaftskomplikationen, wie z.B. der GDM, sehr oft mit einer Dyslipoproteinämie verbunden, assoziiert mit Veränderungen im Wachstum des Ungeborenen. Daher liegt der Fokus dieser Arbeit in der Untersuchung der wichtigsten Lipoproteinrezeptoren an der humanen Plazentabariere, welche möglicherweise den Transport des Cholesterins beeinflussen.

Die Arbeitshypothese lautet daher:

Aufgrund der Veränderung im Lipoproteinprofil der Mutter beim Schwangerschaftsdiabetes im Vergleich zu gesunden Schwangerschaften ist das Expressionsmuster der wichtigsten fetalen Lipoproteinrezeptoren (SR-BI, LOX-1, LDLR und LRP-8) in den Plazentagefäßen verändert, um den Feten vor einer möglichen Überversorgung mit Cholesterin zu schützen.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Sind die vier ausgewählten Rezeptoren zwischen Arterie und Vene innerhalb einer gesunden Plazenta unterschiedlich exprimiert?
- 2) Ist ein signifikanter Unterschied in der Expression der Rezeptoren in den Gefäßen bei Schwangerschaftsdiabetes festzustellen?
- 3) Beeinflusst die Pathologie das Expressionsmuster der Lipoproteinrezeptoren zwischen Arterien und Venen innerhalb einer Plazenta?

3 Material und Methoden

3.1 Material

Unmittelbar nach der Geburt der Plazenta (spontane Geburt und nach primärer Sectio) wurde das Amnion entfernt und es wurden je 3 Arterien und 3 Venen aus der Chorionplatte präpariert. Die Gefäße wurden von umliegendem Gewebe befreit, in PBS gewaschen und jedes Gefäßstück (ca. 1-2 cm) in 1ml TRI-Reagent bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

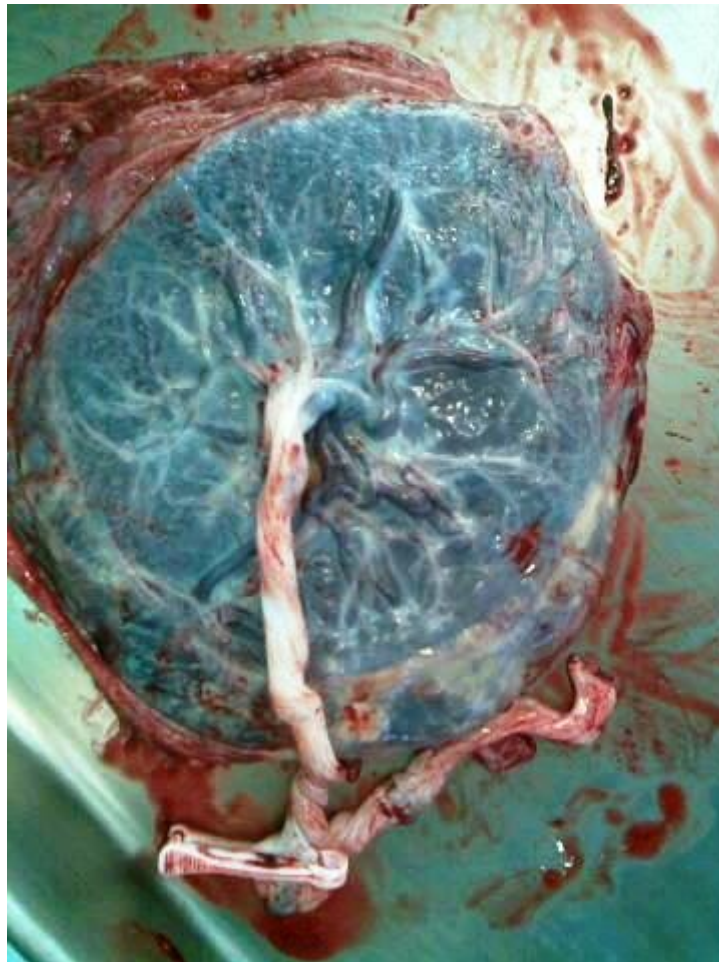


Abbildung 10: Chorionplatte und Gefäßverlauf der Plazenta

Die Präparation der Gefäße erfolgte ohne Systematik bezüglich Lokalisation innerhalb der Plazenta bzw. Lokalisation von Venen und Arterien zueinander. Es wurden je 10 gesunde und je 10 GDM Plazenten untersucht (Abbildung 10).

Kriterien: Für die Kontrollgruppe wurden Plazenten von gesunden Müttern ohne schwangerschaftsspezifische Komplikationen ausgewählt. Die GDM-Gruppe bestand aus Müttern mit einem diagnostizierten White A/B- Diabetes mellitus.

3.2 RNA-Isolierung

Die Plazentaprobe wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ultra Turrax® homogenisiert (Abbildung 11). Die RNA-Isolierung wurde aufgrund der leicht flüchtigen und toxischen Wirkung des TRI-Reagent im Abzug durchgeführt. Es wurde auf Eis gearbeitet.



Abbildung 11: Versuchsaufbau zur Homogenisierung der Proben

Zu jeder Probe wurden 100µl Bromochloropropane (BCP) hinzugeben. Durch mehrmaliges Schwenken wurde alles gut vermischt, anschließend bei Raumtemperatur 15 Minuten lang inkubiert und danach bei 12000g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Dadurch kam es zu einer Phasentrennung: obere Phase (wässrige Phase) enthielt die RNA, in der mittleren Phase (Interphase) war die DNA und die untere organische Phase enthielt Proteine.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 500µl Isopropanol zugesetzt und einige Male geschwenkt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 2000g und 4°C zentrifugiert.

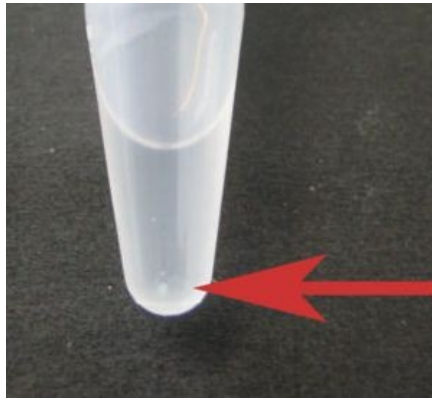


Abbildung 12: Pellet (RNA) am Boden eines Eppendorfgefäßes (66)

Die ausgefällte RNA wurde als Pellet (Abbildung 12) am Boden des Eppendorfgefäßes sichtbar. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 500µl eiskaltem 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Danach erfolgte eine letzte Zentrifugation (5 Minuten, 7500g und 4°C). Der Überstand wurde möglichst vorsichtig abgehoben und anschließend wurden die Proben 2-3 Minuten luftgetrocknet. Je nach Größe der erhaltenden Pellets wurde es in 30-100µl RNase freiem Wasser gelöst und in einem Heizblock für 10 Minuten bei 50°C und 400rpm geschüttelt. Zur Überprüfung der Reinheit und der Menge wurden die Proben nun im Eppendorf Biophotometer in einer 1:50 Verdünnung vermessen. Die isolierte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese kann in 3 Schritte unterteilt werden. Von jeder Probe (A1-V3) wurden 2µg RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden zuvor die Konzentrationen aller Proben nochmals bestimmt (s.o.). Außerdem wurde aus jeder Plazentaprobe zusätzlich eine genomische Kontrolle erstellt, d.h. dass bei der cDNA-Synthese kein Enzym (Superscript II) verwendet wird, wobei alle anderen Schritte gleich bleiben.

- Schritt 1:

2µl RNA wurden mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl gebracht. Danach wurde ein Mastermix I, bestehend aus 2µl Random Hexamer Primer (0,2µg/ml) (Fermentas, Germany) und 2µl dNTP-Mix (100mM) (Qiagen Hilden, Germany), hinzugefügt. Dieses Reaktionsgemisch wurde für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und auf Eis gestellt.

- Schritt 2:

Für jede Probe wurde ein Mastermix II aus 8µl 5x First-Strand Buffer (Invitrogen, CA, USA), 4µl DTT (0.1M) (Invitrogen, CA, USA), und 2µl RNase Out (Invitrogen, CA, USA) (40U/µl) hergestellt. Die 14µl wurden nun jeder Probe zugeführt, sodass wir ein Gesamtvolumen von 38µl erhielten. Das Reaktionsgemisch wurde bei 25°C für 2 Minuten inkubiert.

- Schritt 3:

Zu jeder Probe wurden 2µl Superscript II RT (200U/µl) (Invitrogen, CA, USA) pipettiert mit Ausnahme der genomischen Kontrolle, welcher 2µl RNase freies Wasser zugesetzt wurde, um mögliche DNA-Kontaminationen zu detektieren. Die cDNA wurde mit folgendem Programm synthetisiert. 25°C für 10 Minuten; 42°C für 50 Minuten und 70°C für 15 Minuten. Nach vollendeter Synthese wurde jeder Probe noch 160µl RNase freies H₂O zugesetzt, um eine cDNA-Konzentration von 10ng/µl zu erhalten.

Die cDNA konnte direkt für die RT-PCR verwendet werden oder zur Lagerung wieder tiefgefroren werden (-80°C).

3.4 RNA-Gele

Ob die RNA degradiert oder mit DNA kontaminiert ist, wurde mittels Gelelektrophorese festgestellt. Während die RNA auf Eis stand und auftaute, wurde das Gel für die Elektrophorese gegossen. Dazu wurden 75g Biozym LE Argarose mit 50ml Tris-Acetat-EDTA (TAE)-(1x) Puffer vermischt, aufgeschmolzen und nach Zusatz von 3µl Ethidiumbromid in die dafür vorgesehene Kammer gegossen. In der Zeit, in der das Gel auspolymerisierte, wurden die Proben vorbereitet: 4µl RNA (100ng/µl) wurden mit 4µl Loading Dye (6x) vermischt. Um später die einzelnen Proben zu applizieren, wurde ein Kamm mit 8 Kammern verwendet.

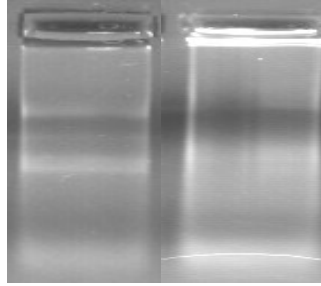


Abbildung 13: Intakte (links) und degradierte RNA (rechts)

Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit TAE-(1x) Puffer überschichtet, 8µl Probe aufgetragen und bei 100V für 20 Minuten das elektrische Feld angelegt. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid, welches in RNA und DNA interkaliert, konnten die einzelnen Banden im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. Anhand des Bildes konnte nun gezeigt werden, ob die RNA intakt oder degradiert war. Abbildung 13 zeigt degradierte bzw. intakte RNA nach der Gelelektrophorese.

3.5 Real Time-PCR

3.5.1 Pooling der cDNA

Zur Erstellung einer Kalibrationskurve wurden cDNA-Proben (10µl) aus gesunden und pathologischen Arterien und Venen (A1+A2, V1+V2) gepoolt. Die Ausgangskonzentration betrug 50ng/µl, welche im Anschluss dann in 1:5 Verdünnungsschritten auf eine 96-well-Platte aufgetragen wurden. Für die Erstellung der „non template control“ wurde anstelle von einer Probe RNase freies Wasser verwendet.

Mit Hilfe der Konzentrationskurven wurden die TaqMan[®]-Assays auf ihre Funktion überprüft. Anhand dieser Kurven könnte die cDNA-Konzentrationen der einzelnen Gene berechnet werden.

3.5.2 TaqMan[®]-Technologie und Durchführung

Mit dieser Methode kann man neben der Vervielfältigung von Nucleinsäuren auch deren Quantifizierung messen. Es handelt sich um eine relative Quantifizierung, da nur Veränderungen in einer Genexpression im Vergleich zu Referenzgenen determiniert werden kann. Es wurde die TaqMan[®]-Technologie verwendet, bei der mittels Fluoreszenztechnik die Amplifikationsrate gemessen werden kann. Am 3'-Ende der TaqMan[®]-Sonde sitzt der Quencher, am 5'-Ende der Reporter. Der

Quencher hemmt die Aktivität des Reporters. Weiters werden ein genspezifischer Primer und eine Taq-Polymerase benötigt. Letztere baut durch ihre Endonukleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde ab und entlässt so den Reporterfarbstoff, der nicht mehr durch den Quencher unterdrückt wird und nun gemessen werden kann (Abbildung14) (67).



Abbildung 14: Die 3 wichtigsten Schritte der TaqMan[®]-Technologie (68)

Nach den Standardprotokollen der Firma Applied Biosystems wurden die Proben für die RT-PCR vorbereitet. Eine Probe enthält neben 16 µl cDNA (10ng/µl) 40µl TaqMan[®] master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, US), 20µl dest H₂O and 4µl vom Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, US). Da die Proben jeweils in Triplikaten (technische Replikate) laufen, wurde die Gesamtmenge von 80 µl auf 3 Wells aufgeteilt, sodass ein Well 25 µl enthielt. Auf eine 96-Well Reaktion Plate passten dadurch 4 Plazentaprobe(n) (z.B. A1-V3 von Kontrolle 4, 8, 10, 18). Desweiteren wurden eine „non template control“ (H₂O), eine Plazentagewebeprobe und eine genomische Kontrolle aufgetragen, um DNA-Verunreinigungen zu entdecken. Für die Realtime-PCR wurden folgende Gene Expression Assays verwendet:

- SR-BI: Hs00194092_m1
- LDLR: Hs00181192_m1
- LRP-8 Hs00182998_m1
- LOX-1: Hs00234028_m1
- L30: Hs00265497_m1
- vWF: Hs00169795_m1
- CD34: Hs02576490_m1

Für den RT-PCR-Zyklus wurden am Thermocycler AB7900 Syllabus folgende Parameter eingestellt:

- Phase 1: 50°C für 2 Minuten
- Phase 2: 95°C für 10 Minuten
- Phase 3: 40 Wiederholungen bei 95°C für 15 Sekunden und dann 60°C für 1 Minute

3.6 Auswertung

Nach Durchlauf der RT-PCR erhält man sogenannte CT-Werte (Threshold cycle). Dieser Wert bestimmt den Zeitpunkt bzw. Zyklus bei dem die Reporterfluoreszenz die Quencherfluoreszenz übersteigt.

Diese CT-Werte ermöglichen nun durch folgende weitere Formeln eine Auswertung der Daten und die Berechnung der relativen Genexpression:

- $\Delta CT = CT_{\text{Ziel}} - CT_{\text{ref}}$
- $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Ziel}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$
- $\text{Foldchange (Ratio)} = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Bei CT-Werten handelt es sich um Messergebnisse, die wiedergeben, wieviele Zyklen gefahren werden mussten, um eine bestimmte Menge eines Gens zu erhalten. Je höher also die CT-Werte waren, desto geringer war die Menge des Gens.

Die ΔCT -Werte geben nun die Zyklusdifferenz zwischen dem zu untersuchenden Gen und dem Referenzgen an und wurden dafür verwendet, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse dem Zufall unterliegen oder ob es einen signifikanten Unterschied gibt. $\Delta\Delta CT$ -Werte stellen die Differenz von ΔCT -Werten einer Zielgruppe (z. B. GDM) und einer Kontrollgruppe dar. Um diesen Wert anschaulicher darzustellen, wird daraus ein Foldchange-Wert ($2^{-\Delta\Delta CT}$) errechnet. Ein Foldchange-Wert > 1 bedeutet eine Hochregulation des untersuchten Gens und ein Foldchange-Wert < 1 ein herunter reguliertes Gen im Verhältnis zur vergleichenden Gruppe.

Mittels SPSS wurde eine Varianzanalyse als Screening durchgeführt. Allerdings konnten hier nur der Unterschied zwischen Arterie und Vene unabhängig von der

Pathologie bzw. zwischen Kontrolle und Pathologie unabhängig von der Gefäßart, als auch auf Wechselwirkungen (Abhängigkeiten) zwischen den beiden Gruppen untersucht werden.

Deshalb wurde bei der Analyse der einzelnen Lipoproteinrezeptoren gegen die Normierungen (siehe 4.3.3) ein einfacher t-Test bzw. Mann-Whitney-Rang-Summen-Test (falls die Daten nicht normalverteilt waren) zur genaueren Prüfung von Abhängigkeiten zwischen den Gruppen durchgeführt.

Die Darstellung der ΔCT -Werte in den Boxplots dient in dieser Arbeit lediglich einer Veranschaulichung der Streuung der Werte (Standardabweichung) sowie der Ausreißer. Es gilt zu beachten, dass ein niedriger ΔCt -Wert eine erhöhte Genexpression bedeutet und umgekehrt. Außerdem wird so das Verhältnis zwischen den zu untersuchenden Gruppen deutlicher.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Klinische Parameter der Mütter und der Neugeborenen

Bei der Kontrollgruppe (n=10) handelte es sich um Plazenten von gesunden Müttern, d.h. bei diesen Müttern wurden keine Pathologien während der Schwangerschaft diagnostiziert. In der GDM- Gruppe (n=10) wurden Plazenten verwendet, bei denen während der Schwangerschaft ein Gestationsdiabetes vom Typ White A/B (White-Klassifikation siehe Gestationsdiabetes) diagnostiziert wurde.

In Tabelle 4-1 und 4-2 sind klinische Daten von Mutter und Neugeborenen dargestellt. Leider waren diese Daten nicht vollständig und konnten auch im Nachhinein nur mehr zum Teil rekonstruiert werden. Von Seiten der Mutter wurden die Körpergröße, Schwangerschaftswoche, sowie das Körpergewicht vor der Entbindung und vor der Schwangerschaft ermittelt (Tabelle 4-1). Von Seiten des Neugeborenen sind das Plazentagewicht, Körpergewicht, Körpergröße und Geschlecht des Neugeborenen, Art der Geburt (spontan oder Sectio) sowie pH-Werte aus Nabelschnurarterie und –vene aufgelistet (Tabelle 4-2). In den Tabellen sind nur jene Probanden dargestellt, bei denen die Werte vollständig waren. Unvollständige Plazenten wurden bei der Darstellung der Parameter aus den Tabellen gestrichen, bei der Analyse der Expression der Lipoproteinrezeptoren aber nicht ausgeschlossen.

Bei der Analyse der Werte fiel auf, dass die Plazenten im Mittel in der GDM-Gruppe ein höheres Gewicht hatten als in der Kontrollgruppe ($640,3\text{g}\pm 132,2$ vs. $583,8\text{g}\pm 170,1$). Überraschenderweise hatten die Neugeborenen in der Kontrollgruppe ein höheres Geburtsgewicht ($3395,1\text{g}\pm 652,0$ vs. $3192,9\text{g}\pm 618,1$) und waren größer als in der GDM-Gruppe ($50,2\text{cm}\pm 2,8$ vs. $49,4\text{cm}\pm 2,8$). Allerdings konnte beim Vergleich dieser klinischen Parameter keine Signifikanz nachgewiesen werden [Plazentagewicht $p=0,446$; Geburtsgewicht $p=0,509$ und Geburtsgröße $p=0,541$]. Normalerweise wäre durch den gesteigerten Lipidtransfer, den uteroplazentaren Blutfluss und die Größe der Plazenta eine Makrosomie des Neugeborenen (2) in der GDM-Gruppe zu erwarten gewesen. Auf eine Mangelversorgung durch eine verlängerte Diffusionsstrecke durch Kollagenbildung (23) beim GDM reagiert die Plazenta mit einer Oberflächenvergrößerung, was das erhöhte Gewicht der Plazenta in der GDM-Gruppe erklärt hätte. Eine Erklärung für

einen fehlenden Unterschied zwischen GDM- und Kontrollgruppe in den Kategorien „Plazentagewicht“ und „Geburtsgewicht“ könnte sein, dass der GDM in der GDM-Gruppe frühzeitig erkannt wurde und die Patientinnen gut eingestellt werden konnten.

Die vor der Schwangerschaft und nach der Entbindung ermittelten BMI-Werte waren in der GDM-Gruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe ($32,7\text{kg/m}^2 \pm 3,6$ und $37,9\text{kg/m}^2 \pm 4,5$ vs. $26,6\text{kg/m}^2 \pm 5,2$ und $30,1\text{kg/m}^2 \pm 4,0$). Allerdings gab es lediglich einen signifikanten Unterschied zwischen den BMI-Werten von Kontroll- und GDM- Gruppe nach der Entbindung ($p=0,012$).

Die Zunahme des Gewichtes in der Schwangerschaft ist ein Prozess, der durch Hyperphagie, Aufbau von Fettdepots und Hemmung der Lipolyse gekennzeichnet und damit physiologisch ist (18). Der gemessene erhöhte BMI vor der Schwangerschaft in der GDM-Gruppe bestätigte die Tatsache, dass Adipositas bzw. ein erhöhter BMI zu den Risikofaktoren für die Entstehung eines Gestationsdiabetes gehören.

Die restlichen Parameter ergaben keinen Unterschied zwischen der Kontroll- und der GDM- Gruppe.

Tabelle 4-1: Klinische Daten der Mutter

Kodierung	SSW	Größe [m]	Gewicht vor SS [kg]	Gewicht vor Entbindung	BMI vor SS [kg/m ²]	BMI vor Entbindung [kg/m ²]
Ko 4	41	1,62	66	83	25,1	31,6
Ko 8	41	1,55	64	76	26,6	31,6
Ko 10	38	1,65	95	99	34,9	36,4
Ko 11	40	1,71	59	72	20,2	24,6
Ko 18	41	1,67	57	70	20,4	25,1
Ko 20	39	1,55	61	69	25,4	28,7
Ko 22	38	1,69	79	83	27,7	29,1
Ko 38	42	1,64	87	90	32,3	33,5
MW+ STAB	40,1+/-1,5	1,64+/-0,06	71,0+/-4,2	80,3+/-10,6	26,6+/-5,2	30,1+/-4,0
GDM 22	35	1,76	96	119	31,0	38,4
GDM 33	40	1,6	74	83	28,9	32,4
GDM 73	38	1,65	92	102	33,8	37,5
GDM 74	40	1,6	95	111	37,1	43,4
MW+ STAB	38,1+/-2,2	1,64+/-0,08	93,5+/-10,3	106,5,0+/-15,5	32,7+/-3,6	37,9+/-4,5

Legende: MW = Mittelwert; STAB= Standardabweichung

Tabelle 4-2: Klinische Daten der Neugeborenen

Kodierung	Plazenta Gewicht [g]	Secio/ Spontan	Geschlecht	Geburtsgewicht [g]	Geburtsgröße [cm]	NA-ph	NV-ph
Ko 4	1000	Prim. Sectio	♂	4510	53	7,27	7,35
Ko 8	640	Spontan	♀	3720	54	7,29	7,37
Ko 10	400	Prim. Sectio	♀	2822	47	7,28	7,35
Ko 11	500	Prim. Sectio	♂	3116	50	7,22	7,32
Ko 18	540	Prim. Sectio	♀	2758	48	7,32	7,33
Ko 20	490	Prim. Sectio	♂	3326	50	7,26	7,27
Ko 21	590	Spontan	♀	3634	51	7,26	7,33
Ko 22	570	Prim. Sectio	♀	2570	46	7,29	7,40
Ko 38	525	Spontan	♀	4100	53	7,31	7,40
MW + STAB	583,8+/-170,1			3395,1+/- 652	50,2+/-2,8	7,28+/-0,03	7,35+/- 0,04
GDM 14	560	Sek. Sectio	♂	2300	46	7,28	7,32
GDM 22	430	Prim. Sectio	♀	2030	44,5	7,34	7,36
GDM 23	590	Spontan	♀	3228	50	7,33	7,43
GDM 27	600	Spontan	♂	3288	50	7,34	7,52
GDM 33	780	Prim. Sectio	♀	3570	54	7,33	7,41
GDM 35	810	Prim. Sectio	♀	3580	49	7,12	7,28
GDM 60	740	Prim. Sectio	♂	3830	52	7,35	7,42
GDM 73	740	Prim. Sectio	♂	3630	49	7,25	7,35
GDM 74	510	Spontan	♂	3280	50	7,19	7,46
MW + STAB	640,0+/- 132,3			3192,9+/- 618,1	49,4+/-2,8	7,28+/-0,08	7,39+/- 0,07
Legende: MW = Mittelwert; STAB= Standardabweichung							

4.2 Bestimmung der RNA

Für die weiteren Experimente war es notwendig, dass die isolierte RNA eine Mindestkonzentration von 100µg/ml hatte, damit genug Material für die cDNA-Synthese zur Verfügung stand.

Um RNA-Degradierung oder DNA-Kontamination auszuschließen, wurde jede RNA-Probe mittels Gelelektrophorese überprüft. Es zeigte sich, dass es weder eine Kontamination mit DNA, noch eine Degradierung der RNA gab. Als repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 15 ein Ergebnis einer Gelelektrophorese dargestellt.

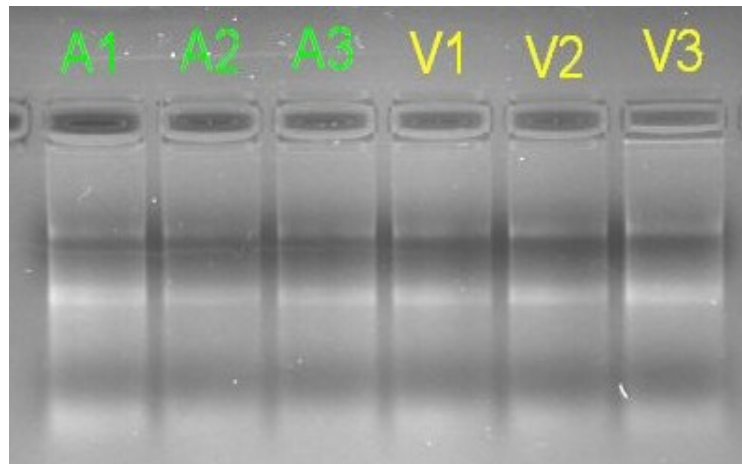


Abbildung 15: Ergebnis einer Gelelektrophorese am Beispiel der Kontrolle 20 (A1=Arterie1; V1=Vene1 etc.)

4.3 Expression der Lipoproteinrezeptoren

4.3.1 Übersicht

Um einen Überblick über Unterschiede zwischen Arterien und Venen sowie zwischen der Kontrollgruppe und der GDM-Gruppe zu erhalten, werden als erstes die Ergebnisse der univariaten Varianzanalyse dargestellt.

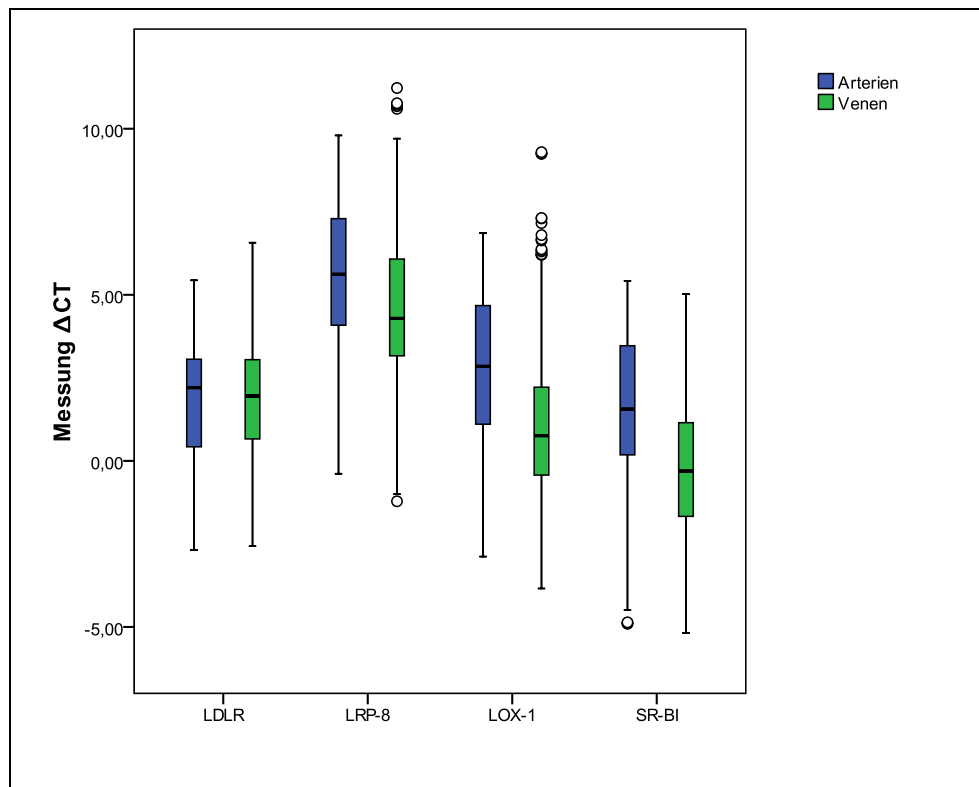


Abbildung 16: Boxplots der Arterien und Venen unabhängig von Normierung und Pathologie

Der Vergleich der Δ CT-Werte von Arterien und Venen der einzelnen Rezeptoren zeigt, dass LRP8, LOX-1 und SR-BI unabhängig von der Normierung und der Pathologie eine erhöhte Expression in den Venen zeigen ($p < 0,001$). Es zeigt sich kein Unterschied zwischen Arterien und Venen bezüglich der Expression des LDLR ($p = 0,593$). Tendenziell finden sich in den Venen mehr Ausreißer (Abbildung 16).

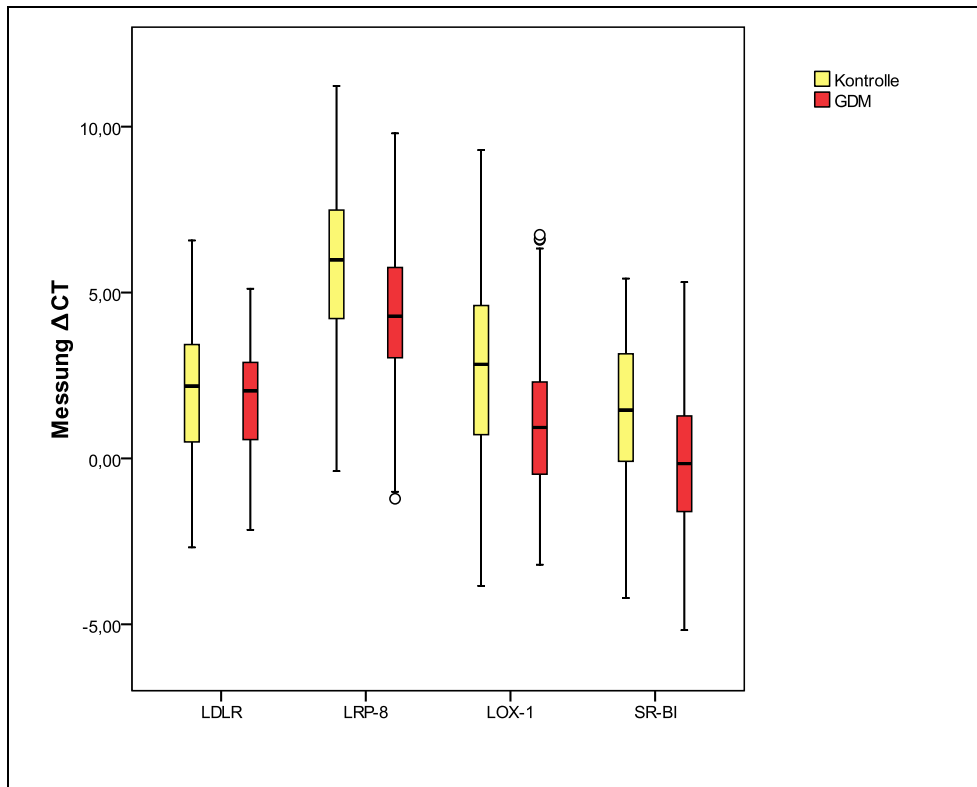


Abbildung 17: Boxplots der Kontroll- und der GDM-Gruppe unabhängig von der Gefäßart und der Normierungen

Der Vergleich der ΔCT -Werte von Kontroll- und GDM-Gruppe der einzelnen Rezeptoren zeigt, dass LRP8, LOX-1 und SR-BI unabhängig von der Normierung und vom Gefäßtyp eine vermehrte Expression in der GDM-Gruppe zeigen ($p < 0,001$). Es zeigt sich kein Unterschied zwischen Arterien und Venen bezüglich der Expression des LDLR ($p = 0,07$). Tendenziell finden sich in der GDM-Gruppe mehr Ausreißer (Abbildung 17).

4.3.2 Ergebnisse der univariaten Varianzanalyse

Die Tabellen 4-3, 4-4 und 4-5 zeigen, ob es einen Unterschied zwischen Arterien und Venen (unabhängig von der Kontroll- bzw. GDM-Gruppe), zwischen der Kontroll- und der GDM-Gruppe (unabhängig von Arterie bzw. Vene) gibt oder ob Wechselwirkungen (Abhängigkeiten) in bzw. zwischen diesen beiden Gruppen (Abbildung 18) bestehen. Jede Normierung wird mit den verschiedenen Lipoproteinrezeptoren getrennt besprochen.

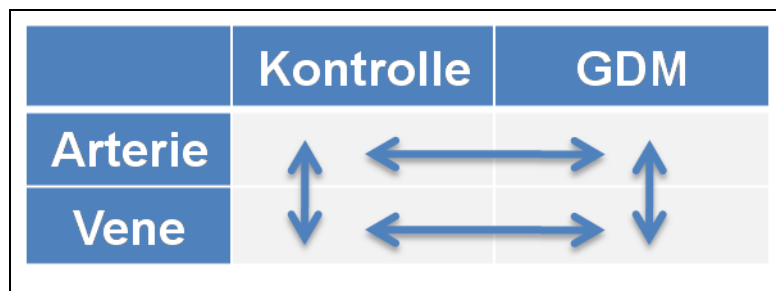


Abbildung 18: Mögliche Wechselwirkungen (Abhängigkeiten) in bzw. zwischen der Kontroll- und GDM-Gruppe

4.3.2.1 Normierung gegen das Ribosomale Protein L30

Bei der Normierung gegen L30 (Tabelle 4-3) war ein signifikanter Unterschied in der Expression von SR-BI zwischen Arterien und Venen erkennbar. Dabei war der Rezeptor in den Arterien um 50% runter reguliert. Im Vergleich zwischen der Kontroll- und der GDM-Gruppe war der Rezeptor um 16% vermindert in den Kontrollen exprimiert.

Der LDL-Rezeptor war in den Arterien um 32% vermehrt vorhanden verglichen zu den Venen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Kontrollgruppe zeigte ebenfalls einen um 70% (nicht signifikant) hochregulierten Rezeptor verglichen mit der GDM-Gruppe.

Der LOX-1 und der LRP-8 zeigten ein signifikantes, aber unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der Regulierung: In den Arterien war LRP-8 in Bezug zu den Venen um 4% hoch reguliert, dagegen war LOX-1 in den Arterien um 32% vermindert exprimiert. Die Kontrollgruppe zeigte bei dem LRP-8 eine um 16% verminderte Expression verglichen mit der GDM-Gruppe. Der LOX-1 war in der gesunden Kontrollgruppe um 3% hoch reguliert.

Während der LDLR und der LOX-1 keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen Arterien/Venen und Kontroll-/GDM-Gruppe zeigten, gab es signifikante

Wechselwirkungen bei SR-BI und bei LRP-8, was auf einen noch deutlicheren physiologischen Einfluss der Gene hinweist.

Tabelle 4-3: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen der Lipoproteinrezeptoren normiert gegen L30

L30	Arterie vs. Vene	Foldchange	Kontrolle vs. GDM	Foldchange	Wechselwirkung
SR-BI	***	↓ (0,49)	***	↓ (0,84)	***
LDLR	n. s.	↑ (1,32)	n. s.	↑ (1,71)	n. s.
LRP-8	***	↑ (1,04)	***	↓ (0,84)	***
LOX-1	***	↓ (0,68)	***	↑ (1,03)	n. s.

Legende: * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; n.s. = nicht signifikant

4.3.2.2 Normierung gegen von Willebrand Faktor

Bei der Normierung gegen vWF (Tabelle 4-4) war der SR-BI in den Arterien verglichen mit den Venen signifikant um 28% runter reguliert. Vergleicht man die Kontrollgruppe mit der GDM-Gruppe, zeigte sich, dass dieser Rezeptor in der Kontrollgruppe um 59% runter reguliert war.

Der LDL-Rezeptor war in den Arterien verglichen mit den Venen signifikant um 41% hoch reguliert. Die Kontrollgruppe zeigte eine signifikant verminderte Expression vom LDLR um 5 % im Vergleich zu der GDM-Gruppe.

Der LOX-1 (um 15%) sowie der LRP-8 (um 51%) waren in den Arterien im Vergleich zu den Venen hoch reguliert. Weiters konnte eine verringerte Expression (um 43% bzw. 40%) beider Rezeptoren in der Kontroll-Gruppe festgestellt werden.

Eine Signifikanz bei der Wechselwirkung zwischen Arterien und Venen sowie zwischen Kontroll-/GDM-Gruppe zeigte sich bei allen untersuchten Rezeptoren.

Tabelle 4-4: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen der Lipoproteinrezeptoren normiert gegen vWF

vWF	Arterie vs. Vene	Foldchange	Kontrolle vs. GDM	Foldchange	Wechselwirkung
SR-BI	***	↓ (0,72)	***	↓ (0,41)	***
LDLR	**	↑ (1,41)	***	↓ (0,95)	*
LRP-8	***	↑ (1,51)	***	↓ (0,60)	***
LOX-1	***	↑ (1,15)	***	↓ (0,57)	***
Legende: *= p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; n.s.=nicht signifikant					

4.3.2.3 Normierung gegen Cluster of Differentiation Molecule 34

Bei der Normierung gegen CD34 (Tabelle 4-5) zeigte SR-BI in den Arterien im Vergleich zu den Venen eine um 58% signifikant verminderte Expression. Dasselbe Bild zeigte sich im Vergleich von Kontroll- und GDM-Gruppe. Hier wies der Rezeptor in der Kontrollgruppe eine um 58% geringere Expression auf.

Der LDL-Rezeptor war in den Arterien signifikant um 16% runter reguliert. Die Kontrollgruppe zeigte eine um 28% erhöhte, aber nicht signifikante Expression im Vergleich zu der GDM-Gruppe.

Der LRP-8 wurde in den Arterien im Vergleich zu den Venen signifikant um 17% vermindert exprimiert. Die Kontrollgruppe zeigte ebenfalls eine signifikant verminderte Expression dieses Rezeptors um 28% im Vergleich zur GDM-Gruppe.

Bei Betrachtung des LOX-1 war der Rezeptor in den Arterien im Vergleich zu den Venen signifikant um 33% runter reguliert. Vergleicht man die Kontrollgruppe mit der GDM-Gruppe, zeigte sich, dass dieser Rezeptor in der Kontrollgruppe signifikant um 20% runter reguliert war.

Signifikante Wechselwirkungen zwischen Arterien und Venen und Kontroll- und GDM-Gruppe konnten beim LRP-8 und beim LOX-1 beobachtet werden. Beim SR-BI sowie beim LDLR konnten keine signifikanten Wechselwirkungen nachgewiesen werden.

Tabelle 4-5: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen der Lipoproteinrezeptoren normiert gegen CD34

CD34	Arterie vs. Vene	Foldchange	Kontrolle vs. GDM	Foldchange	Wechselwirkung
SR-BI	***	↓ (0,42)	***	↓ (0,58)	n. s.
LDLR	***	↓ (0,84)	n. s.	↑ (1,28)	n. s.
LRP-8	***	↓ (0,83)	***	↓ (0,72)	***
LOX-1	***	↓ (0,67)	***	↓ (0,80)	*
Legende: * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; n.s. = nicht signifikant					

4.3.3 Zusammenfassung

Bei der Betrachtung der Expression der Rezeptoren fällt zusammenfassend auf:

- SR-BI:
Es zeigte sich eine vermehrte Expression in den Venen sowie in der GDM-Gruppe und zwar gegen alle Normierungen. Dies spricht für eine von der Normierung unabhängig konsistente Expression.

- LDLR:
Mehrheitlich fand sich keine signifikante Regulation des Rezeptors. Lediglich gegen vWF zeigten sich ein hoch regulierter Rezeptor in den Arterien und ein runter regulierter Rezeptor in der GDM-Gruppe. Eine Vermutung könnte sein, dass der vWF durch Einfluss des Diabetes reguliert wird.

- LRP-8:
Es fand sich einheitlich gegen alle Normierungen eine erniedrigte Rezeptorexpression in der GDM-Gruppe. Beim Vergleich von Arterien und Venen zeigte sich zweimal ein hoch regulierter Rezeptor (bei Normierung von L30, vWF) und einmal ein runter regulierter Rezeptor (bei Normierung gegen CD34).

- LOX-1: In den Arterien konnte bei einer Normierung gegen L30 und CD34 eine erniedrigte LOX-1 Expression im Vergleich zu den Venen gemessen werden. Die Normierung gegen vWF zeigte umgekehrt eine erhöhte Expression in den Arterien. In der GDM-Gruppe war LOX-1 (bei Normierung gegen vWF und CD34) höher exprimiert als in der Kontrollgruppe. Die L30-Normierung zeigte wiederum ein umgekehrtes Bild. Auffallend ist, dass sich sowohl beim Arterie-Vene- als auch beim Kontrolle-GDM-Vergleich L30 als Normierungsgen anders verhält als CD34 und vWF.

4.3.4 Auswertung der einzelnen Lipoproteinrezeptoren (t-Test)

Die Lipoproteinrezeptoren wurden einzeln gegen die Normierungen ausgewertet und betrachtet.

Die Unterschiede zwischen Arterien und Venen in der Kontroll- und der GDM-Gruppe wurden zunächst untersucht. Weiters wurde die Expression der Rezeptoren in den Arterien (bzw. Venen) der Kontrollgruppe mit den Arterien (bzw. Venen) der GDM-Gruppe verglichen.

4.3.4.1 Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I

Tabelle 4-6: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen des SR-BI

SR-BI		L30	Foldchange	vWF	Foldchange	CD34	Foldchange
Arterie vs. Vene	Kontrolle	***	↓ (0,45)	***	↓ (0,74)	***	↓ (0,37)
	GDM	***	↓ (0,53)	***	↓ (0,69)	***	↓ (0,49)
Kontrolle vs. GDM	Arterie	***	↓ (0,91)	***	↓ (0,57)	***	↓ (0,66)
	Vene	***	↓ (0,97)	***	↓ (0,26)	***	↓ (0,50)

Legende: *= p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; n.s.=nicht signifikant

SR-BI zeigte deutlich signifikante Unterschiede im Arterie-Vene-Vergleich und im Kontrolle-GDM-Vergleich. Im Arterie-Vene-Vergleich ist der Unterschied über alle Normierungen gleich: eine signifikant erniedrigte Expression in den Arterien. Die GDM-Gruppe zeigte eine signifikant erhöhte SR-BI Genexpression. Die Unterschiede schienen unabhängig von der Normierung zu sein (Tabelle 4-6).

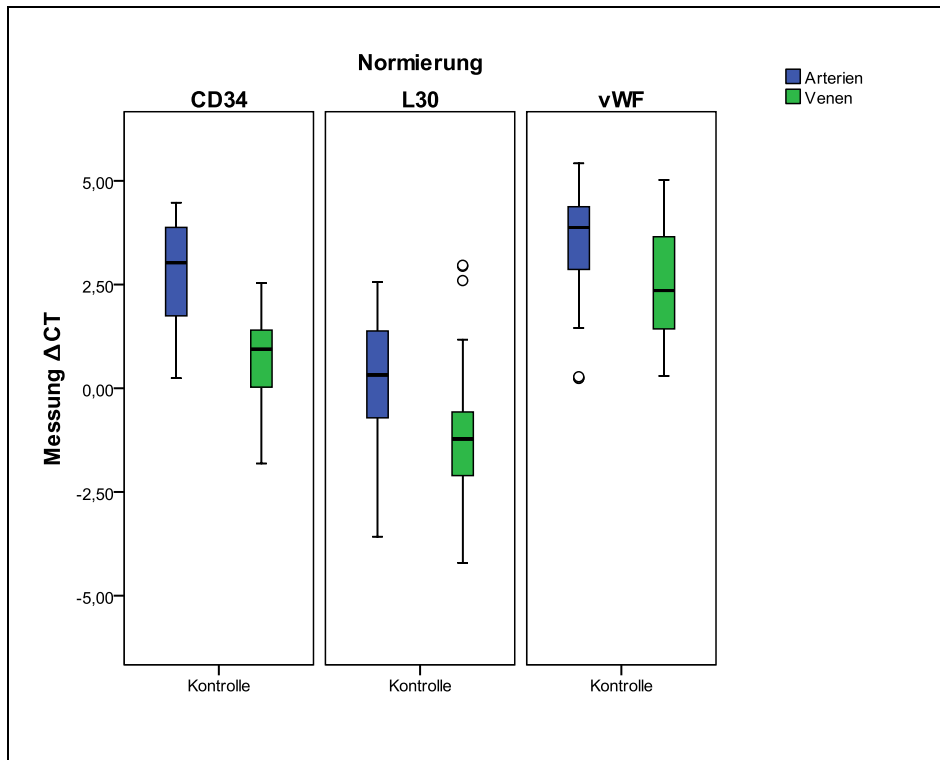


Abbildung 19: Boxplots der Expression des SR-BI in Arterien und Venen der Kontrollgruppe

Gegen alle drei Normierungen (L30 um 55%, vWF um 26%, CD34 um 63%) war der Rezeptor in der Kontrollgruppe in den Arterien im Vergleich zu den Venen eine niedrigere Genexpression festzustellen (Abbildung 19). Bei der Normierung gegen vWF war die erniedrigte SR-BI Expression um ca. 50% weniger ausgeprägt als im Vergleich zu L30 und CD34.

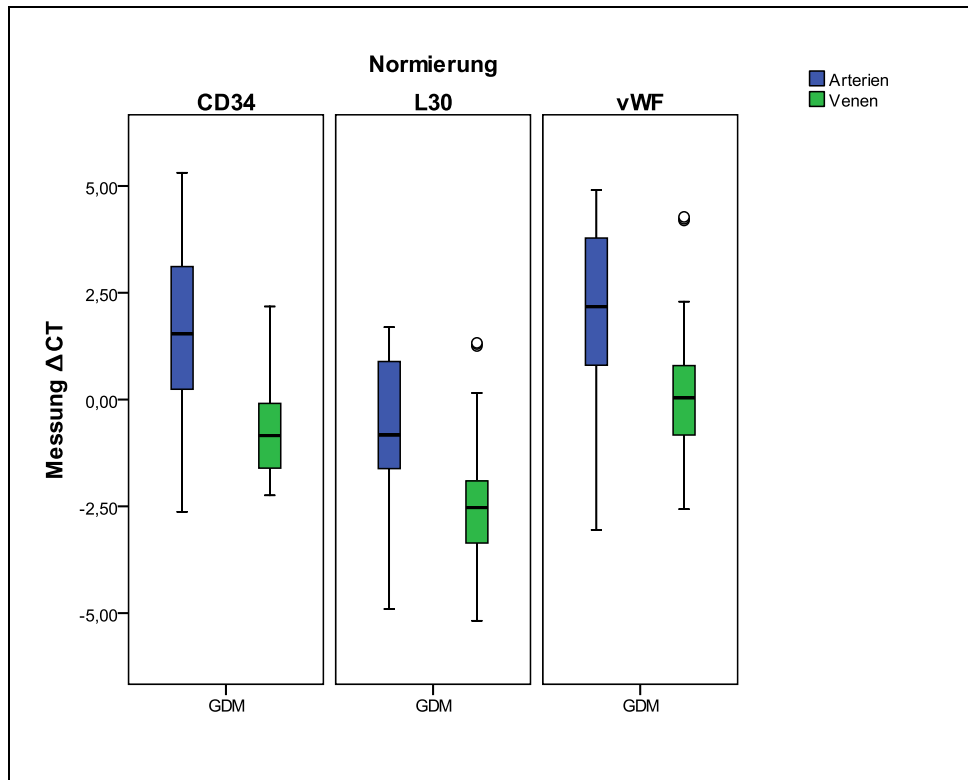


Abbildung 20: Boxplots der Expression des SR-BI in Arterien und Venen der GDM-Gruppe

Vergleicht man Arterien und Venen in der GDM-Gruppe (Abbildung 20), kommt man zu dem Ergebnis, dass auch hier der Rezeptor in den Arterien vermindert exprimiert wurde. Auch hier konnte der Unterschied bei der Normierung gegen L30 (um 47%) und CD34 (um 51%) deutlicher gezeigt werden als bei der Normierung gegen vWF (um 31%). Es kamen in den Venen mehr Ausreißer vor als in den Arterien.

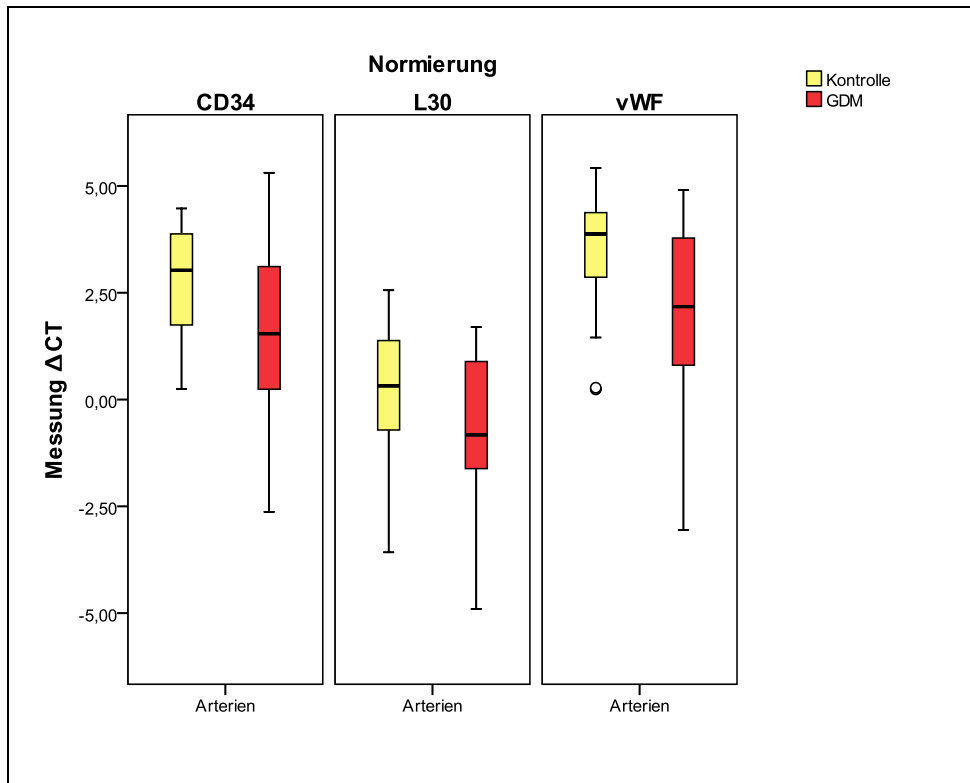


Abbildung 21: Boxplots der Expression des SR-BI in den Arterien der Kontroll- und der GDM-Gruppe

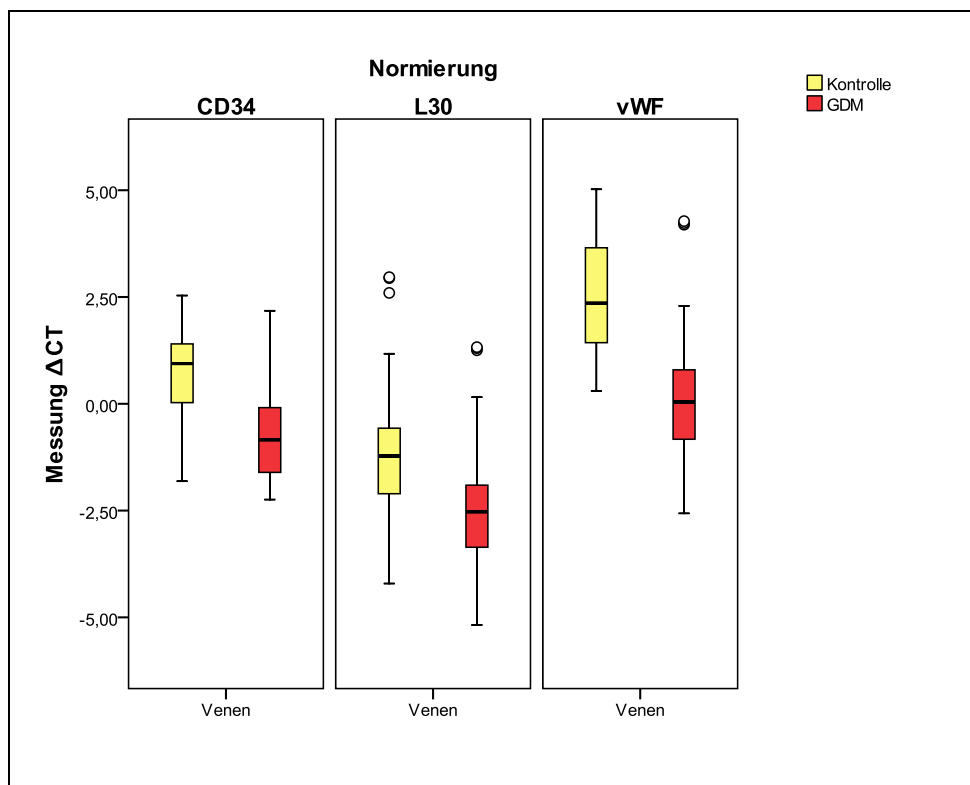


Abbildung 22: Boxplots der Expression des SR-BI in den Venen der Kontroll- und der GDM-Gruppe

Im Vergleich von Kontrolle- und GDM-Gruppe (Abbildung 21 und 22) zeigte sich, dass sowohl die Arterien als auch die Venen der Kontrollgruppe eine verminderte SR-BI Expression aufwiesen als die der GDM-Gruppe. Während der Unterschied bei der Normierung gegen vWF, im Unterschied zum Arterien-Venen-Vergleich (Arterien um 43%; Venen um 74%) am größten war, zeigte sich bei der Normierung gegen L30 (Arterien um 9%; Venen um 3%) nur ein geringer Unterschied und bei der Normierung gegen CD34 eine Differenz von 34% bei Arterien und um ca. 50% bei den Venen.

Dass der SR-BI bei allen Normierungen, sowohl in gesunden Plazenten als auch in GDM-Plazenten, in den Venen eine höhere Expression als in den Arterien zeigte, könnte durch eine Beobachtung von Spellacy und Ashbacher (69) erklärt werden, die eine höhere Cholesterinkonzentration in den Umbilicalvenen beschrieben. Über diese Venen wird der Fetus mit Sauerstoff, Nährstoffen und dem wichtigen Cholesterin versorgt. Daraus könnte sich schließen lassen, dass es eine Abhängigkeit zwischen der Cholesterinkonzentration und Expression des SR-BI in Plazentagefäßen gibt.

Dieser Zusammenhang zwischen fetaler Cholesterinkonzentration und Expression des Rezeptors konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden, weil keine fetalen Cholesterinkonzentrationen bestimmt wurden.

Darüber hinaus könnte Cholesterin über den SR-BI von cholesterinesterreichem HDL aufgenommen werden, um die Membranfluidität und die lipidreichen Mikrodomänen aufrechtzuerhalten (70). Als weitere Schutzfunktion vor dem vermehrten oxidativen Stress der Zellen in der Schwangerschaft könnte die Aufnahme von Vitamin E als Antioxidans eine wichtige Rolle spielen (37).

Weiters könnte die erhöhte SR-BI Expression in den Venen einen veränderten Cholesterinefflux aus den Zellen verursachen (34). Napoli et al. (14) zeigten einen Zusammenhang zwischen maternaler Hypercholesterinämie und „fatty streak“-Bildung in der fetalen Aorta. Eine vermehrte Expression von SR-BI in den Gefäßen der GDM-Plazenten könnte eine mögliche Prävention von Atherosklerose durch eine Verhinderung der Akkumulation von atherogenen Lipoproteinen, der Förderung des Effluxes von Cholesterin aus Makrophagen an HDL oder durch Aktivierung der HDL-abhängigen NO-Synthase sein (31).

Der Unterschied zwischen Kontroll- und GDM-Gefäßen könnte dadurch erklärt werden, dass es durch den Gestationsdiabetes zu einer Veränderung der

mütterlichen Lipidzusammensetzung („State of Dyslipidaemia“) in Form erhöhter Fettsäuren und TG kommt und der Fetus mit Blutfetten überversorgt wird. Eine höhere Konzentration an ungesättigten Fettsäuren könnte ein Grund für die vermehrte Expression in den Gefäßen der GDM-Gruppe sein. Ein anderer Grund ist, dass es beim Gestationsdiabetes zu vermehrtem oxidativem Stress kommt (26). Dadurch entsteht mehr ox-LDL, was deren Rezeptorexpression induzieren könnte, schließlich wurde der SR-BI ursprünglich als Rezeptor für modifiziertes LDL entdeckt.

SR-BI und LOX-1 (siehe unten) zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster in Plazentagefäßen. Da SR-BI in der eNOS-Aktivierung eine wichtige Funktion besitzt, könnte er kompensatorisch hochreguliert werden, wenn LOX-1 ebenfalls vermehrt exprimiert wird. Dadurch würde er mit einer Aktivierung der NO-Produktion der Kaskade der endothelialen Dysfunktion, welche durch Bindung von ox-LDL an LOX-1 (siehe unten) ausgelöst wird, entgegenwirken.

4.3.4.2 Low-Density-Lipoprotein Rezeptor

Tabelle 4-7: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen des LDLR

LDLR		L30	Foldchange	vWF	Foldchange	CD34	Foldchange
Arterie vs. Vene	Kontrolle	n. s.	↑ (1,18)	**	↑ (1,64)	**	↓ (0,71)
	GDM	**	↑ (1,46)	n. s.	↑ (1,19)	n. s.	↓ (0,98)
Kontrolle vs. GDM	Arterie	n. s.	↑ (1,37)	***	↑ (1,06)	n. s.	↑ (1,13)
	Vene	*	↑ (2,05)	***	↓ (0,86)	n. s.	↑ (1,42)

Legende: *= p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; n.s.=nicht signifikant

Bezüglich der Signifikanzen und der Regulierungen zeigte sich eine starke Variation des LDLR gegen die einzelnen Normierungen (Tabelle 4-7). Es ist eindeutig erkennbar, dass die Ergebnisse von den Normierungsgenen abhängen.

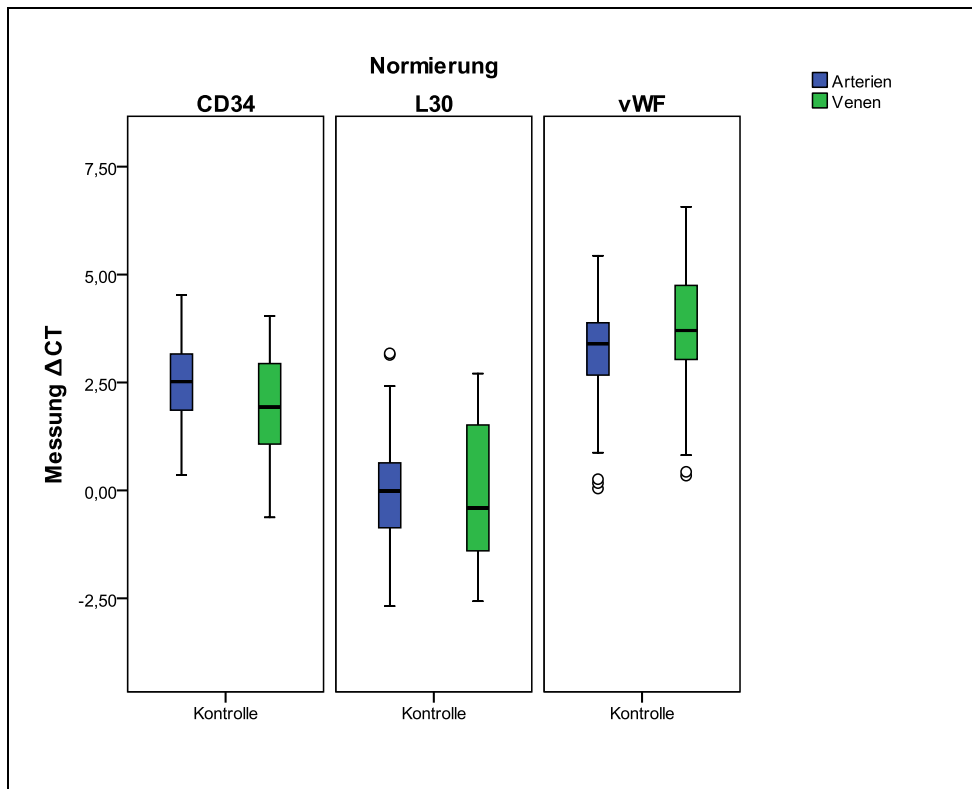


Abbildung 23: Boxplots der Expression des LDLR in Arterien und Venen der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe, normiert gegen L30 zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der LDLR-mRNA in den Arterien im Vergleich zu den Venen. Bei der Normierung gegen vWF zeigte sich eine signifikante Erhöhung des LDLR in den gesunden Arterien (um 64%). Bei der Normierung gegen CD34 ergab dieser Vergleich allerdings eine signifikante Reduktion um 29% desselben Rezeptors (Abbildung 23). Es finden sich Ausreißer in beiden Gefäßtypen, allerdings vermehrt bei der Normierung gegen vWF.

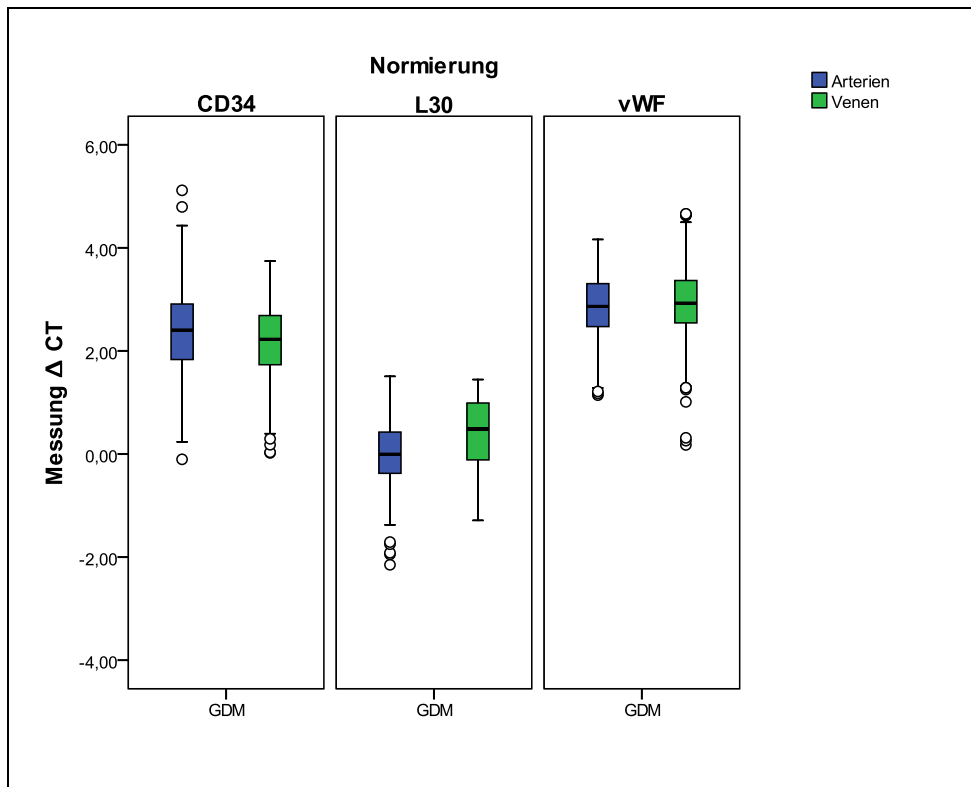


Abbildung 24: Boxplots der Expression des LDLR in Arterien und Venen der GDM-Gruppe

In der GDM-Gruppe war der LDLR, bei der Normierung gegen L30, signifikant um 46% höher exprimiert als in den Venen. Bei den anderen beiden Normierungen (vWF, CD34) gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Arterien und Venen (Abbildung 24). Bei allen Normierungen finden sich Ausreißer, sowohl in den Venen als auch in Arterien.

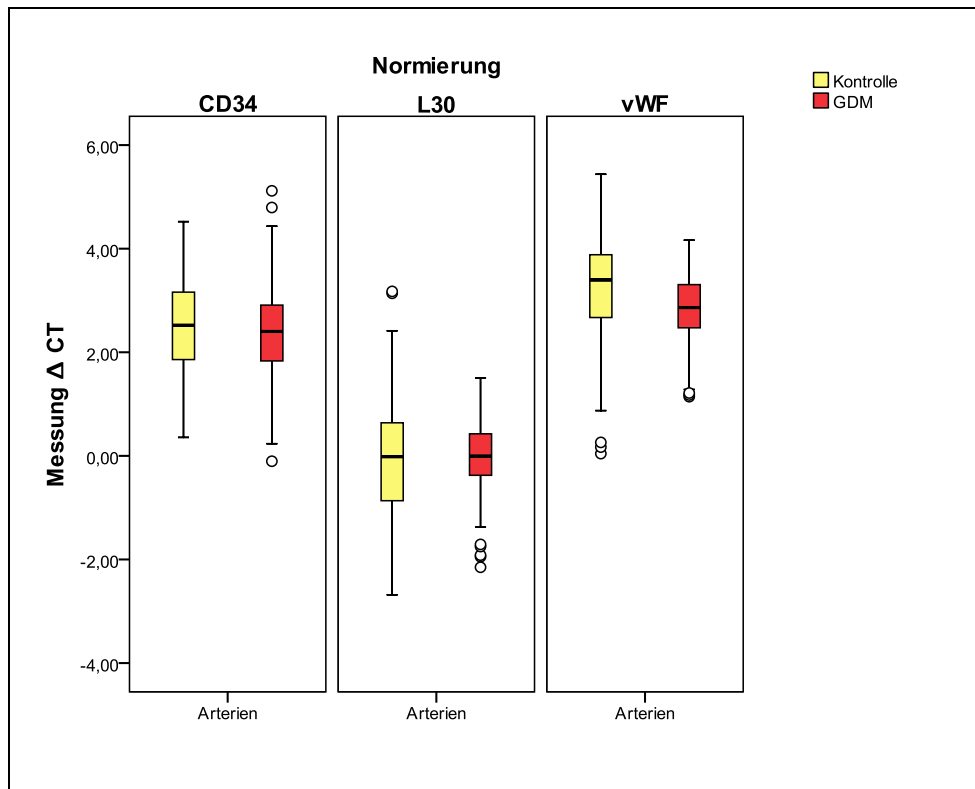


Abbildung 25: Boxplots der Expression des LDLR in Arterien der Kontroll- und der GDM-Gruppe

Verglich man nun die Expression des LDLR zwischen gesunden Arterien und den Arterien der GDM-Gruppe (Abbildung 25), dann stellte man fest, dass der Rezeptor unter allen Normierungsbedingungen in den gesunden Arterien vermehrt exprimiert war. Einen signifikanten Unterschied gab es allerdings nur bei der Normierung gegen vWF (um 6%). In der GDM-Gruppe fanden sich mehr Ausreißer als in der Kontrollgruppe.

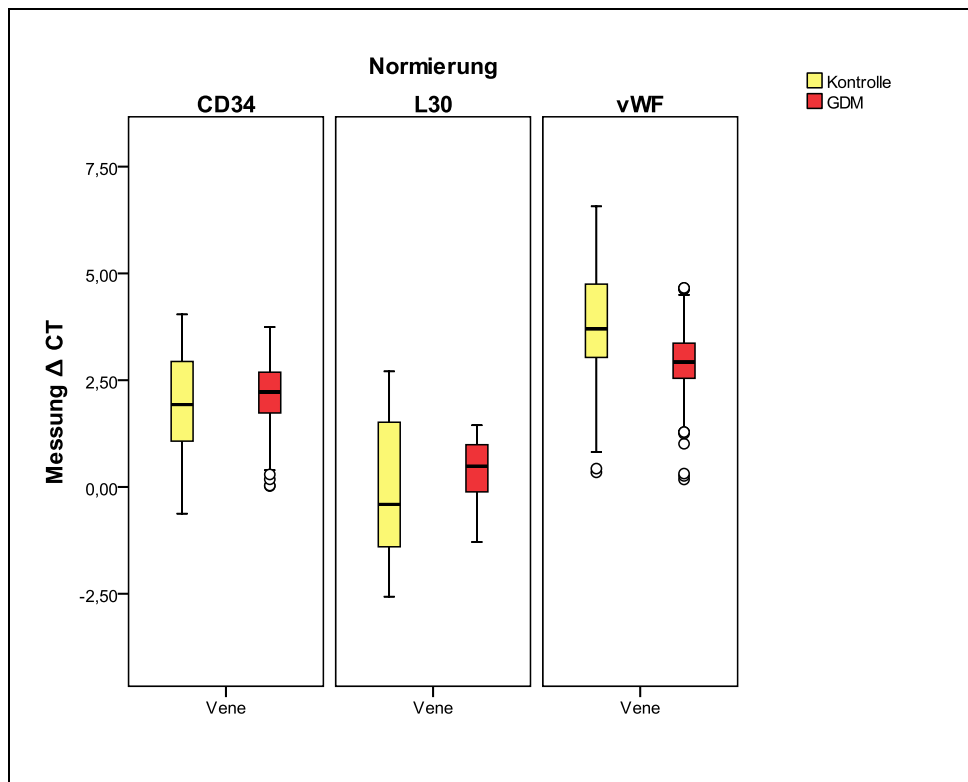


Abbildung 26: Boxplots der Expression des LDLR in Venen der Kontroll- und der GDM-Gruppe

Als letztes wurde das Expressionsmuster zwischen gesunden Venen und Venen der GDM-Gruppe verglichen (Abbildung 26). Der LDLR war signifikant erhöht in gesunden Venen bei der Normierung gegen L30 (um 105%), jedoch signifikant erniedrigt bei der Normierung gegen vWF (um 16%). Wurden die Werte gegen CD34 normiert, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Bei der Normierung gegen vWF gab es mehr Ausreißer als bei den anderen beiden Normierungen. Ebenfalls mehr Ausreißer gab es in der GDM-Gruppe.

LDLR zeigte in den gesunden Plazentagefäßen beim Vergleich von Arterien und Venen gegen drei verschiedene Normierungen drei unterschiedliche Ergebnisse: Kein Unterschied (L30), niedrigere Expression in den Venen (vWF) und erhöhte Expression in Arterien (CD34). In der GDM-Gruppe gab es in den Venen eine verminderte Expression im Vergleich zu den Arterien bei der Normierung gegen L30. Die anderen beiden Normierungen zeigten keinen Unterschied.

Vergleich man die Arterien der Kontrollgruppe mit denen der GDM-Gruppe, zeigte sich auch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Beim Vergleich der Venen zeigte sich nur beim vWF eine stark verminderte Expression in den Venen der GDM-Gruppe.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich beim LDLR lediglich Vermutungen anstellen lassen, da die Ergebnisse zu unterschiedlich und von der Normierung abhängig waren. Eindeutig signifikante Unterschiede zeigten sich nur bei Normierungen gegen vWF. Die vermehrten Ausreißer könnten das Ergebnis in diese Richtung verfälscht haben. Außerdem könnte es sich bei dem Referenzgen vWF um ein nicht kontinuierlich reguliertes Gen handeln, welches durch den GDM beeinflusst werden könnte.

Die LDLR Expression wird laut Ethier-Chiasson (39) in der Plazenta durch Cholesterin reguliert. Bei maternaler Hyperlipidämie wie z.B. beim GDM würde sich dies durch eine verminderte LDLR Expression in der Plazenta auswirken. Dann würde man eine erhöhte Genexpression des LDLR in den Arterien im Vergleich zu den Venen finden. Außerdem wäre der Rezeptor in den Gefäßen der Kontrollen höher exprimiert als in den GDM-Gefäßen.

Eine weitere Begründung für eine vermehrte Expression des LDLR in Arterien könnte der erhöhte tangential Druck gegen die Gefäßwand sein („shear stress“). Bereits Sprague et al. (73) sprachen über die Veränderungen des LDL-Rezeptors und des LDL-Metabolismus durch „shear stress“.

4.3.4.3 Low-Density-Lipoprotein Rezeptor related Protein 8

Tabelle 4-8: Übersicht der Signifikanzen und der Regulierungen des LRP-8

LRP8		L30 (p-Wert)	Regulierung (Foldchange)	vWF (p-Wert)	Regulierung (Foldchange)	CD34 (p-Wert)	Regulierung (Foldchange)
Arterie vs. Vene	Kontrolle	n.s.	↑ (1,40)	n. s.	↑ (2,30)	***	↑ (1,19)
	GDM	***	↓ (0,68)	***	↓ (0,73)	***	↓ (0,47)
Kontrolle vs. GDM	Arterie	*	↑ (1,23)	***	↓ (0,99)	***	↑ (1,02)
	Vene	***	↓ (0,45)	***	↓ (0,20)	***	↓ (0,40)

Legende: *= p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; n.s.=nicht signifikant

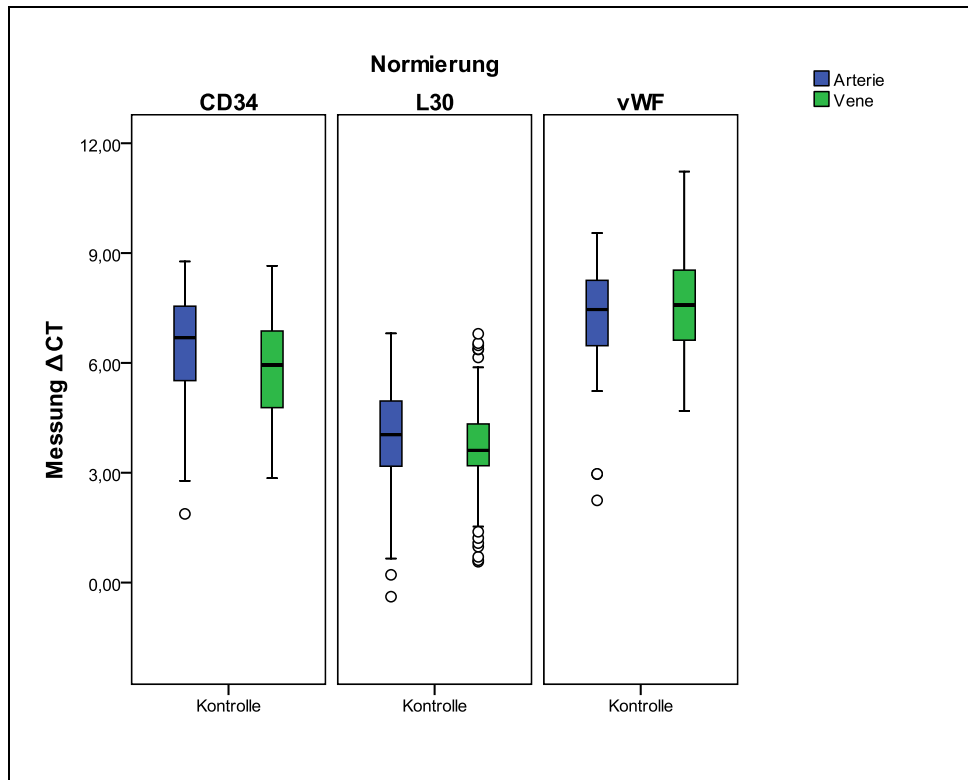


Abbildung 27: Boxplots der Expression des LRP-8 in Arterien und Venen der Kontrollgruppe

LRP-8 (Tabelle 4-8) war im Vergleich von Arterien und Venen (Abbildung 27) in der Kontrollgruppe bei allen Normierungen in den Arterien höher exprimiert, wobei lediglich das Ergebnis gegen CD34 signifikant war (um 19%). Bei den anderen Normierungen (L30, vWF) war der Unterschied nicht signifikant. Es fanden sich vermehrt Ausreißer in den Arterien sowie bei der Normierung gegen L30, bei der sich diese aber gegenseitig aufzuheben schienen.

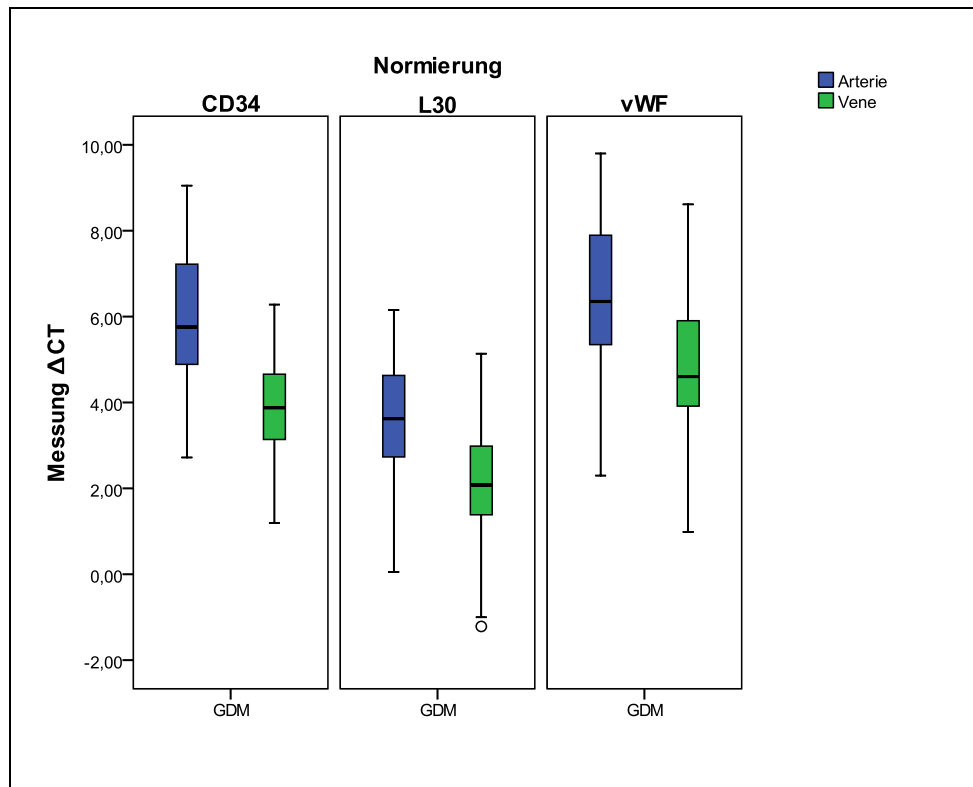


Abbildung 28: Boxplots der Expression des LRP-8 in Arterien und Venen der GDM-Gruppe

Dagegen zeigte sich in der GDM-Gruppe, dass es einen signifikanten Unterschied bei allen Normierungen gab. Es konnte eine Reduktion der LRP-8-mRNA in den Arterien verglichen mit den Venen (Abbildung 28) gefunden werden (gegen L30 um 32%, gegen vWF um 27%, gegen CD34 um 53%). Es gab einen Ausreißer in den Venen bei der Normierung gegen L30.

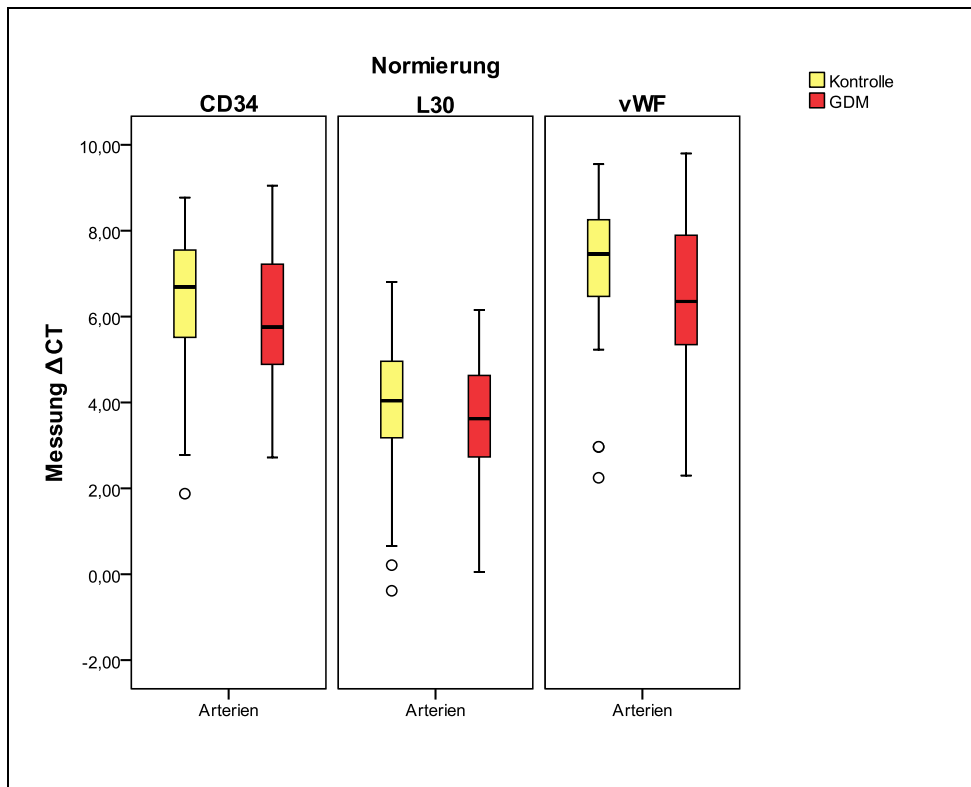


Abbildung 29: Darstellung der Expression des LRP-8 in Arterien der Kontroll- und der GDM-Gruppe

Vergleicht man die Arterien der Kontrollgruppe mit denen der GDM-Gruppe, zeigt LRP-8 in den Arterien der Kontrollgruppe bei einer Normierung gegen L30 (um 23%) und CD34 (um 2%) eine signifikant erhöhte Expression. Bei der Normierung gegen vWF konnte eine um 1% verminderte signifikante Genexpression des LRP-8 festgestellt werden (Abbildung 29). Es gab mehr Ausreißer in den Arterien der Kontrollgruppe.

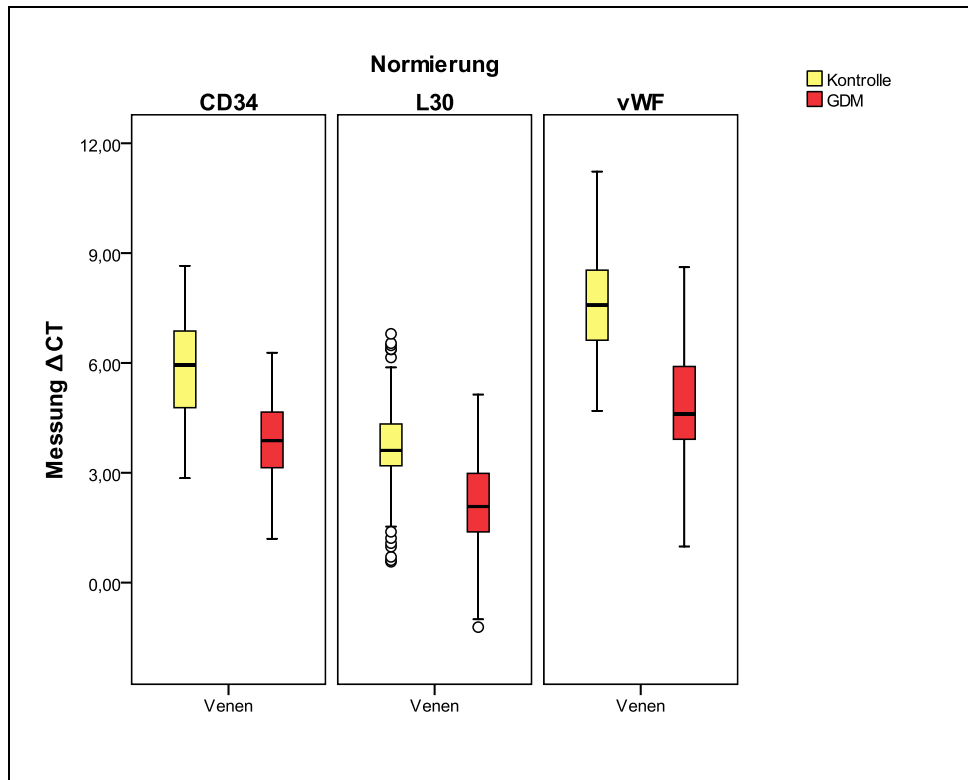


Abbildung 30: Darstellung der Expression des LRP-8 in Venen der Kontroll- und der GDM-Gruppe

Ein übereinstimmendes Ergebnis zeigte sich bei der Untersuchung der Venen der Kontrollgruppe im Vergleich mit denen der GDM-Gruppe (Abbildung 30). Der Rezeptor war signifikant gegen alle Normierungen in den Venen der Kontrollgruppe vermindert exprimiert (gegen L30 um 55%, gegen vWF um 80%, gegen CD34 um 60%). Vermehrte Ausreißer fanden sich bei der Normierung gegen L30 in der Kontrollgruppe.

LRP-8 zeigte in seiner Expression keinen Unterschied (L30, vWF) zwischen Arterien und Venen in gesunden Plazenten. LRP-8 war bei der Normierung gegen CD34 in den Arterien hoch reguliert. Wieder zeigte sich also eine Abhängigkeit von dem für die Normierung verwendeten Gen.

In der GDM-Gruppe zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den Venen, der durch eine erhöhte Expression des Rezeptors charakterisiert ist. Hier könnte sich vermuten lassen, dass die Veränderung der Konzentration der Blutfette durch den Gestationsdiabetes eine Ursache für die erhöhte Regulation des LRP-8 sein könnte. Schließlich kommt es durch die Insulinresistenz zur Lipolyse und damit zur vermehrten Produktion von VLDL, für das der LRP-8 ein hochaffiner Rezeptor ist.

Beim Vergleich der Arterien der Kontroll- und GDM-Gruppe zeigte sich sowohl eine vermehrte Expression in den Arterien der Kontrollgruppe (L30, CD34) als auch eine verminderte Expression (vWF). Für eine erhöhte Expression des LRP-8 in den Arterien könnte das „shear-stress“-Phänomen sprechen. Für das gegenteilige Ergebnis bei der Normierung gegen vWF wäre der Einfluss des GDMs auf die Regulation des vWF eine Erklärung.

Bei Vergleich der Venen der beiden Gruppen ist das Ergebnis eindeutig. Die Venen der GDM-Gruppe zeigten eine vermehrte Expression. Auch hier könnte der Grund wiederum erhöhte LDL-, VLDL- oder Cholesterinspiegel beim GDM sein. Eine ähnliche Entdeckung machten Argov et al. 2004 (71), die u.a. die LRP-8-mRNA-Expression in Rinderfollikeln untersuchten.

Weiters wird vermutet, dass der LRP-8 eine wichtige Funktion beim Cholesterintransport bei Störung der fetalen Cholesterinbiosynthese spielt (11). Welche Funktion LRP-8 aber in den fetalen Plazentagefäßen hat, ist unklar.

4.3.4.4 Lektin-like oxidized Low-Density-Lipoprotein Rezeptor

LOX-1 war signifikant in allen Gruppen gegenüber den verschiedenen Normierungsgenen reguliert (Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: Übersicht der Signifikanzen und Regulierungen des LOX-1

LOX-1		L30	Foldchange	vWF	Foldchange	CD34	Foldchange
Arterie vs. Vene	Kontrolle	***	↓ (0,89)	**	↑ (1,67)	***	↓ (0,83)
	GDM	***	↓ (0,48)	***	↓ (0,64)	***	↓ (0,50)
Kontrolle vs. GDM	Arterie	**	↑ (1,32)	***	↓ (0,83)	***	↓ (0,97)
	Vene	***	↓ (0,74)	***	↓ (0,31)	***	↓ (0,62)
Legende: *= p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; n.s.=nicht signifikant							

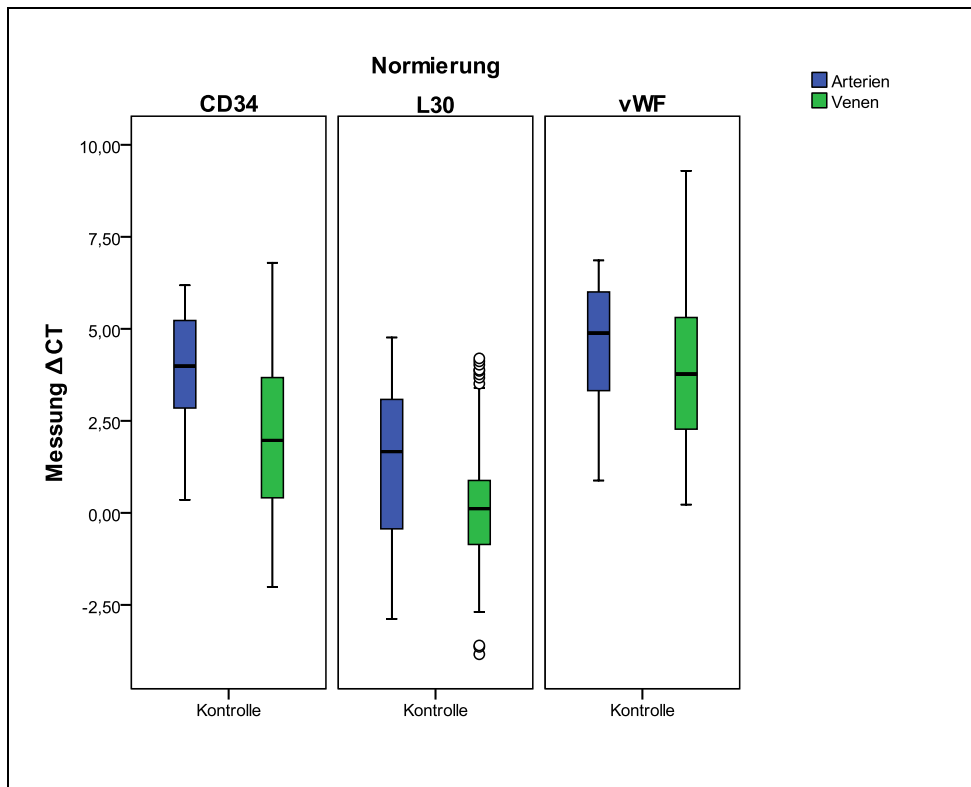


Abbildung 31: Boxplots der Expression des LOX-1 in Arterien und Venen der Kontrollgruppe

LOX-1 war beim Vergleich zwischen Arterien und Venen in der Kontrollgruppe (Abbildung 31) bei den Normierungen gegen L30 (um 11%) und CD34 (um 17%) in den Venen geringer exprimiert, bei der Normierung gegen vWF zeigte sich eine um 67% erhöhte Expression. Ausreißer gab es nur in den Venen bei der Normierung gegen L30, die sich aber gegenseitig aufzuheben schienen.

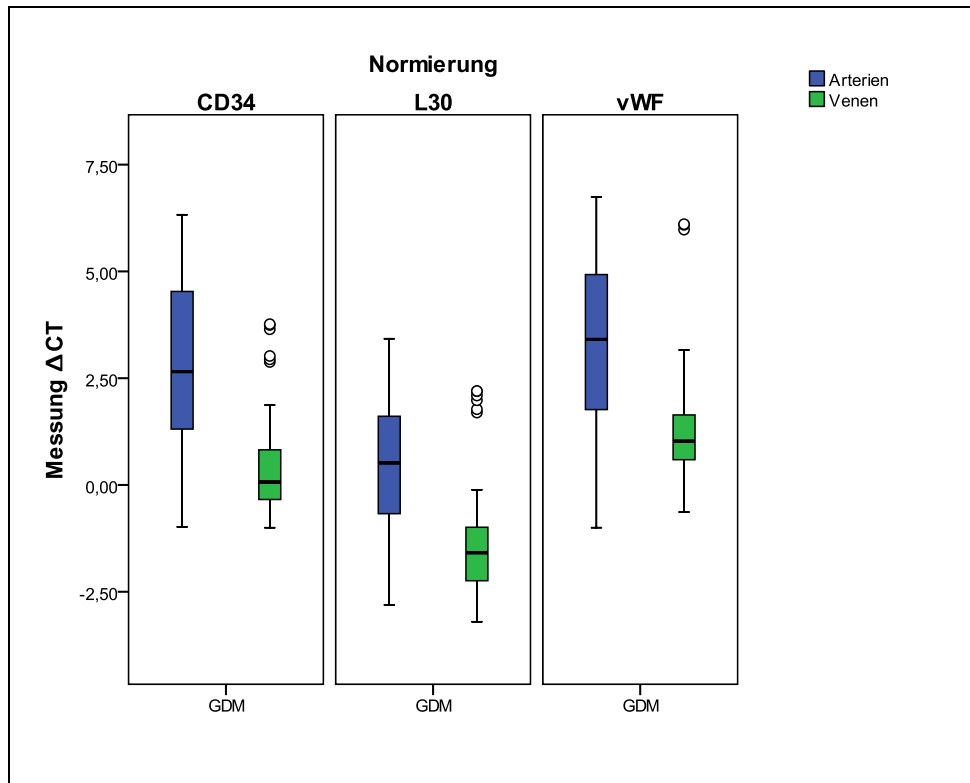


Abbildung 32: Boxplots der Expression des LOX-1 in Arterien und Venen der GDM-Gruppe

In der GDM-Gruppe ist LOX-1 gegen alle Normierungen in den Arterien niedriger als in den Venen (Abbildung 32) exprimiert (gegen L30 um 52%, gegen vWF um 36%, gegen CD34 um 50%). Ausreißer fanden sich vermehrt in den Venen.

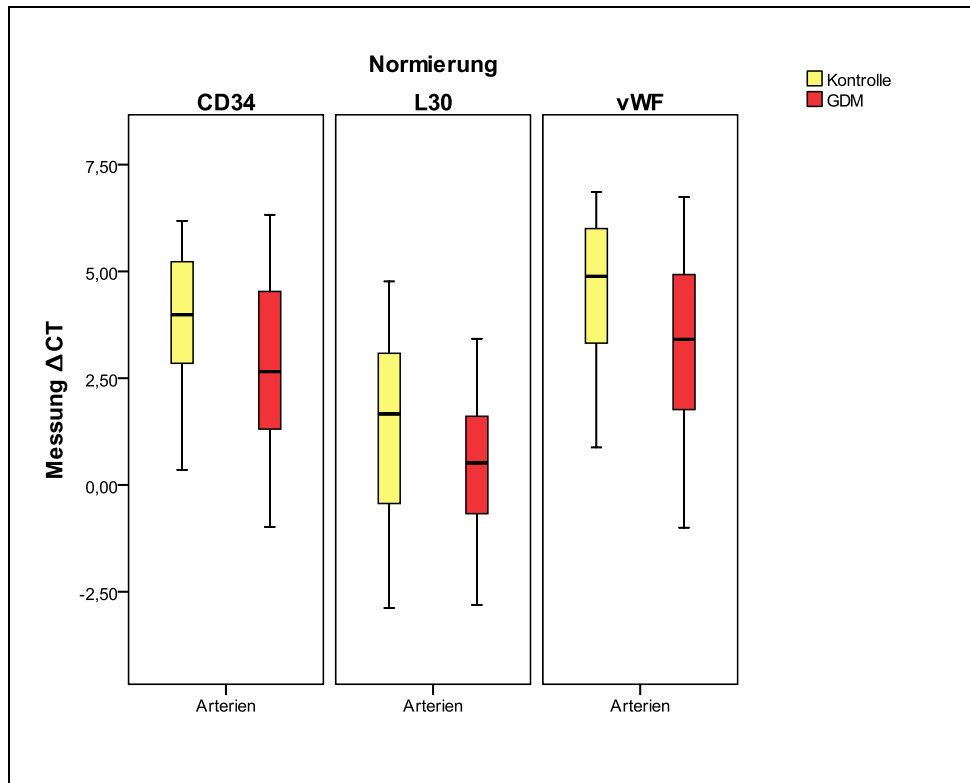


Abbildung 33: Boxplots der Expression des LOX-1 in Arterien der Kontroll- und der GDM-Gruppe

Betrachtete man die Arterien der Kontrollgruppe und verglich diese mit den Arterien der GDM-Gruppe (Abbildung 33), so wurde gezeigt, dass der Rezeptor in der Kontrollgruppe, normiert gegen L30, um 32% erhöht war. Dagegen zeigte sich bei den beiden anderen Normierungen (vWF um 17%, CD34 um 3%), verglichen zur GDM-Gruppe, eine Reduktion des LOX-1 in den Arterien der Kontrollgruppe.

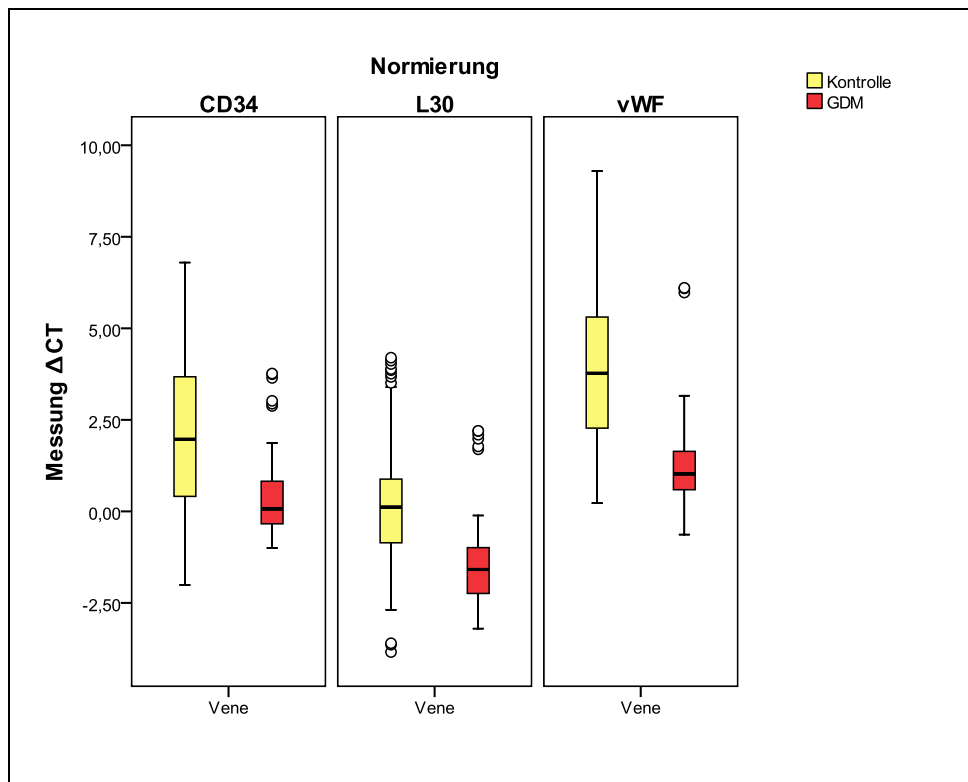


Abbildung 34: Boxplots der Expression des LOX-1 in Venen der Kontroll- und der GDM-Gruppe

Bei dem Vergleich der Venen von Kontroll- und GDM-Gruppe (Abbildung 34) zeigte sich ein einheitliches Verhalten bei allen Normierungen. In den Venen der Kontrollgruppe war LOX-1 im Vergleich zu den Venen der GDM-Gruppe vermindert exprimiert (gegen L30 um 26%, gegen vWF um 69%, gegen CD34 um 38%). Eine höhere Anzahl an Ausreißern fand sich in der GDM-Gruppe.

LOX-1 ist in den Venen der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Arterien erhöht exprimiert. Das gleiche Bild zeigte sich in der GDM-Gruppe.

Vergleich man die Kontrollen mit der GDM-Gruppe, zeigte sich eine vermehrte Expression in den Arterien der GDM-Gruppe (vWF, CD34) und einmal eine verminderte Expression (L30). In den Venen der GDM-Gruppe konnte ebenfalls eine erhöhte LOX-1 Genexpression gefunden werden, als in den Venen der Kontrollgruppe.

Das Ergebnis zeigte deutlich, dass dieser Rezeptor in Plazentagefäßen der GDM-Gruppe erhöht exprimiert wird. Durch den erhöhten oxidativen Stress, ausgelöst durch einen Diabetes, entsteht mehr oxidiertes LDL (ox-LDL). Die erhöhte Konzentration an ox-LDL erhöht die Expression der LOX-1 Rezeptoren, da so vermehrt ox-LDL abgefangen und der Fetus vor dem toxischen Effekt des ox-LDL

geschützt werden kann. Dadurch wäre die Konzentration an ox-LDL in den Arterien geringer, was die verminderte Expression des LOX-1 erklären könnte. Da der LOX-1 in gesundem Gewebe nur minimal exprimiert wird, ist auch der Unterschied der Gefäße zwischen Kontroll- und GDM-Gruppe erklärt.

Ob der BMI eine Rolle spielt, kann in dieser Studie nur vermutet werden, da leider nur bei 4 Proben der GDM-Gruppe der BMI errechnet werden konnte. Allerdings ist dieser signifikant höher als bei den Proben der Kontrollgruppe (Tabelle 4-1) (42).

Es ist beschrieben, dass die Expression von LOX-1 von einem erhöhtem „shear stress“ des Blutflusses induziert wird (72). Allerdings sollte die Expression dann in den Arterien erhöht sein, da dort ein höherer „shear stress“ gemessen wird, was in dieser Studie nicht gezeigt werden konnte.

Schaut man sich hier die Foldchangewerte an, kann man feststellen, dass die Ergebnisse gegen die Normierungen L30 und CD34 besser übereinstimmen als die gegen die Normierung vWF (Tabelle 4-9). Dies spricht wieder für den Verdacht, dass der vWF vielleicht doch abhängig von der Pathologie exprimiert wird.

4.3.5 Physiologische Relevanz

Beim Arterie-Vene-Vergleich in der Kontroll- bzw. GDM-Gruppe wurden alle arteriellen Proben (pro Plazenta 3 Arterien bei n=10) mit allen venösen Proben (pro Plazenta 3 Venen bei n=10) verglichen. Dieser Gesamtunterschied wurde bereits ausführlich beschrieben. Doch wie sieht es aus, wenn man Arterien und Venen innerhalb einer einzelnen Plazenta vergleicht? Es gilt zu klären, ob ein signifikanter Gesamtunterschied bedeutet, dass es mehrheitlich einen signifikanten Unterschied zwischen Arterien und Venen innerhalb einer Plazenta gibt. Diese Frage soll im folgenden Teil am Beispiel der LOX-1-Expression, normiert gegen L30, geklärt werden (Abbildung 35).

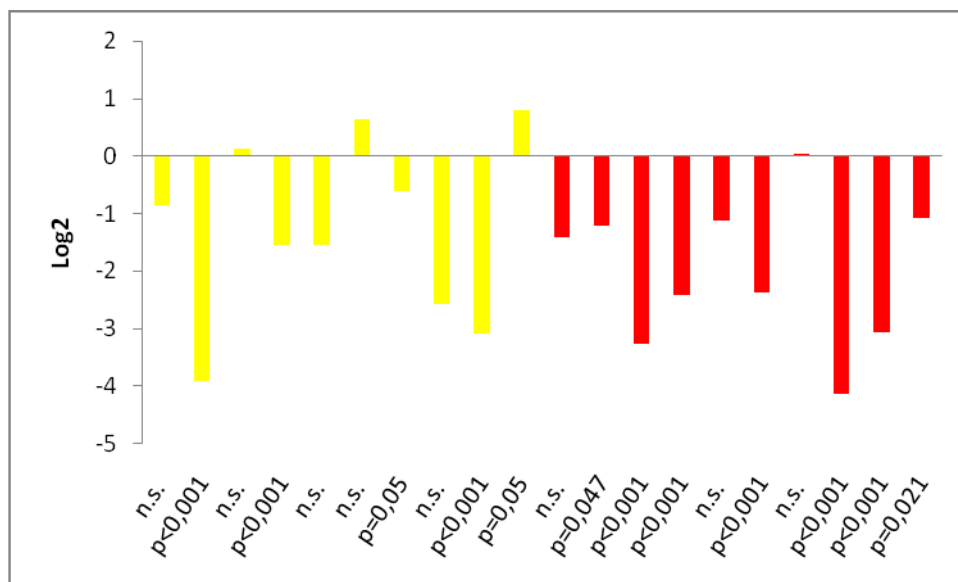


Abbildung 35: Logarithmische Darstellung der Expression des LOX-1 normiert gegen L30 in Arterien in Bezug zu den Venen in der Kontrollgruppe (gelb) und GDM-Gruppe (rot) inklusive Signifikanzen

LOX-1 konnte in nur fünf von zehn Plazenten in der Kontrollgruppe ein signifikantes Ergebnis erzielen. In diesen fünf Plazenten konnte vier Mal eine erniedrigte Expression in den Arterien verglichen zu den Venen festgestellt werden. Die fünfte Plazenta stellte eine höhere Expression in den Arterien im Vergleich zu den Venen dar. Die restlichen Plazenten wiesen kein signifikantes Ergebnis auf und daher wurde vermutet, dass es in diesen Fällen keinen Unterschied zwischen Arterien und Venen bezüglich ihres LOX-1-Expressionsverhaltens gab.

Betrachtet man das Ergebnis in Tabelle 4-9, wird deutlich, dass es einen sehr deutlich signifikanten Gesamtunterschied zwischen Arterien und Venen in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) gab. LOX-1 war bei der Normierung gegen L30 in den Arterien im Vergleich zu den Venen vermindert exprimiert.

Da nur vier von zehn Plazenten dieses Ergebnis aufwiesen, sollte durchaus hinterfragt werden, ob es tatsächlich einen Unterschied zwischen Arterien und Venen bei der Untersuchung von LOX-1 normiert gegen L30 gab.

Wenn man nun noch einen Schritt zurück geht und sich die technischen Triplikate der Arterien anschaut (exemplarisch an 3 Plazenten logarithmisch dargestellt), so stellt man fest, dass sich bereits Arterien innerhalb einer Plazenta unterscheiden (Abbildung 36). Diese Unterschiede können verschiedene Ursachen haben. Erstens könnte es während der Versuchsdurchführung zu Verunreinigungen gekommen sein. Zweitens wäre die Verwechslung einer Arterie mit einer Vene bzw. umgekehrt eine mögliche Erklärung. Hauptunterscheidungsmerkmal der Arterien ist die Lokalisation. Unterschiede innerhalb einer Plazenta lassen daher den Verdacht aufkommen, dass es eine Abhängigkeit zwischen Lokalisation und Expression von Lipoproteinrezeptoren gibt.

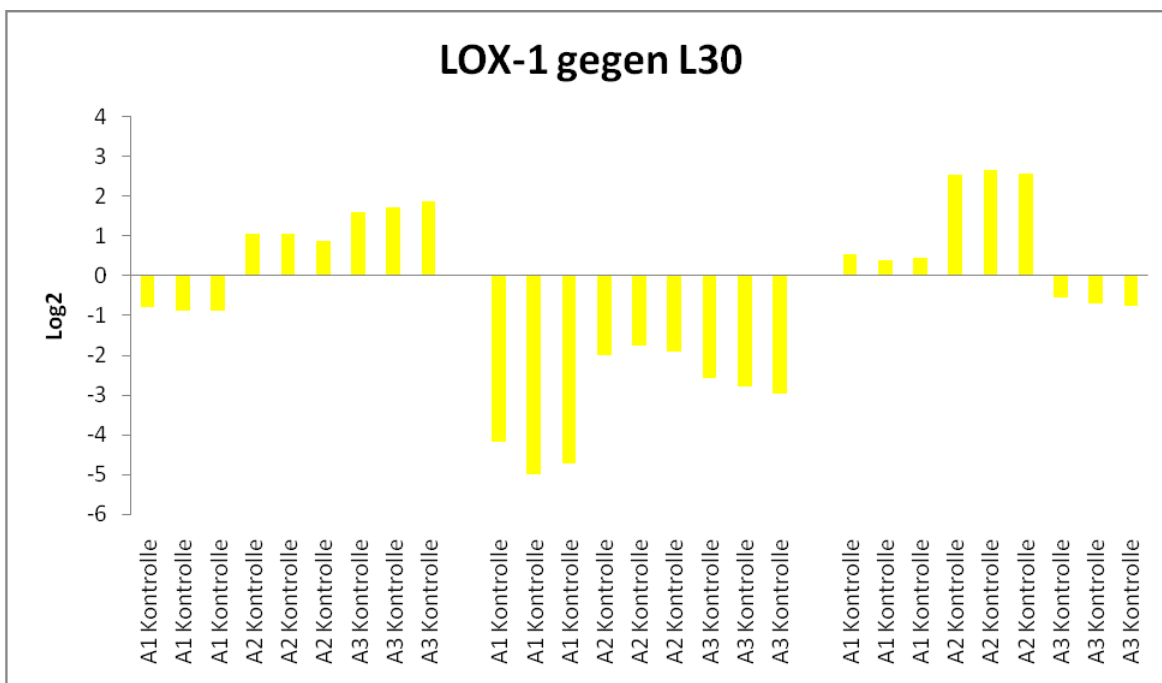


Abbildung 36: Triplikate von drei Arterien von Kontrollplazenten

Ob die Beobachtung einer mehrheitlich fehlenden Signifikanz innerhalb einer Plazenta auch bei anderen Rezeptoren (bzw. Normierungen) festgestellt werden konnte, ist in Tabelle 4-10 dargestellt.

Tabelle 4-10: Übersicht über Signifikanzen der Lipoproteinrezeptoren innerhalb der einzelnen Plazenten

	L30	vWF	CD34
SR-BI	Kontrolle: 7 von 10 Plazenten signifikant	Kontrolle: 7 von 10 Plazenten signifikant	Kontrolle: 9 von 10 Plazenten signifikant
	GDM: 7/10	GDM: 6/10	GDM: 7/10
LDLR	Kontrolle: 5/10	Kontrolle: 4/10	Kontrolle: 3/10
	GDM: 3/10	GDM: 3/10	GDM: 3/10
LRP-8	Kontrolle: 4/10	Kontrolle: 5/10	Kontrolle: 5/10
	GDM: 8/10	GDM: 8/10	GDM: 7 /10
LOX-1	Kontrolle: 5/10	Kontrolle: 5/10	Kontrolle: 5/10
	GDM: 7/10	GDM: 7/10	GDM: 9/10

Da insgesamt weniger als 50% der Plazenten signifikante Unterschiede zwischen Arterien und Venen aufwiesen, muss aus diesen Überlegungen der Schluss gezogen werden, dass eine Erhöhung der biologischen Replikate (Anzahl der Plazenten) notwendig ist, um eine größere Aussagekraft zu bekommen und um die Auswirkung von eventuellen Ausreißern zu minimieren.

4.3.6 Limitation der Studie

Nachdem nun die Expression der einzelnen Lipoproteinrezeptoren beschrieben und diskutiert worden sind, wird im folgenden Teil auf die Limitationen und die Aussagekraft der Studie eingegangen.

Zur Auswahl der Lipoproteinrezeptoren kann gesagt werden, dass die 4 wichtigsten Rezeptoren ausgewählt wurden, sodass die verschiedenen Lipoproteine an einem oder an mehreren dieser Rezeptoren binden können.

Als Normierung wurden das L30, vWF und CD34 verwendet. Das Ribosomale Protein ist eines der typischen Housekeeping-Gene. Die anderen beiden dagegen sind in die Gruppe der Endothelzellmarker einzuordnen. Die in den Tabellen 4-6 bis 4-9 dargestellten Foldchangewert zeigen, dass sich, unabhängig von der Signifikanz, die Ergebnisse gegen die Normierung L30 und gegen CD34 deutlich näher sind als die Ergebnisse gegen vWF. Auch die vermehrten Ausreißer bei der Normierung gegen vWF sprechen dafür, dass dieser durch endo- oder exogene Einflüsse reguliert wird. Das lässt den Schluss zu, dass vWF nicht als Referenzgen geeignet ist.

Eine weitere Ursache für die vielen Ausreißer könnte die Inhomogenität der Zellpopulation darstellen. Da ganze Gefäße untersucht wurden, handelte es sich nicht um bestimmte Zelllinien (z.B. Endothelzellen), sondern in den Proben sind Endothelzellen, Makrophagen und andere Blutzellen, Fibroblasten und Muskelzellen. Daher sind bei solchen Zellversuchen immer gewisse Unterschiede zu erwarten. Außerdem ist jede Plazenta ein Gewebe von unterschiedlichen Patientinnen und jede Patientin ist biologisch anders.

Auch die Gefäße selbst unterscheiden sich voneinander bezüglich Größe, Durchmesser und Lokalisation. In kleinen peripheren Gefäßen könnte die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes höher sein und durch den höheren sogenannten „shear-stress“ (tangentialer Druck durch den Blutfluss entlang der Gefäßwand) die Expression von Lipoproteinrezeptoren beeinflusst werden. Deshalb ist es wichtig zu wissen, ob die Gefäße zentral (nabelschnurnah) oder peripher (nabelschnurfern) aus der Plazenta entnommen wurden und ob es sich um gepaarte oder ungepaarte Gefäße handelt, um eine Abhängigkeit von der Lokalisation zu beurteilen.

Auffallend waren auch die vermehrten Ausreißer in den Venen und in den GDM-Gefäßen. Vielleicht sind Arterien resistenter gegen äußere Einflüsse (z.B.

mechanische Belastung) als Venen. Außerdem könnte der GDM die Expression von Lipoproteinrezeptoren in den Venen sehr unterschiedlich beeinflussen.

Der „shear-stress“ als Induktor für die Expression von Lipoproteinrezeptoren kommt bei den meisten Rezeptoren wohl nicht in Frage, da diese vermehrt in den Venen exprimiert waren und nicht in den Arterien.

Als weiterer Kritikpunkt ist anzubringen, dass die klinischen Daten sowohl von Seiten der Mutter als auch von Seiten des Feten unvollständig waren, sodass eine Interpretation bei solch kleinem Kollektiv schwierig ist. Außerdem wären Informationen über LDL-, HDL- und Gesamtcholesterinspiegel sowohl aus fetaler als auch aus der mütterlichen Zirkulation wünschenswert, um eventuelle Zusammenhänge zwischen Lipidkonzentrationen und Lipoproteinexpression zu erkennen. Außerdem ist es sinnvoll vorher weitere Ausschlusskriterien (Frühgeburten, anderen Erkrankungen der Mutter) zu definieren, um Ausreißer zu vermeiden.

Vielleicht ist aber auch eine derartige Anzahl an Plazenten bzw. Plazentagefäßen zu klein, um trotz eindeutiger Signifikanzen einen eindeutigen Schluss zuzulassen. Daher sollten die biologischen Replikate (Plazentagefäße) erhöht werden, um auf der einen Seite die Anzahl an signifikanten Ergebnissen zu erhöhen und auf der anderen Seite den Einfluss der Ausreißer zu minimieren. Die geringen Unterschiede zwischen Kontroll- und pathologischen Plazenten könnten durch einen gut eingestellten GDM bedingt sein. Um weitere Aussagen zum Einfluss eines GDM auf Lipoproteinrezeptoren in Plazenten zu treffen, könnte man die Plazenten mit schlechter eingestelltem bzw. höhergradigem GDM (z.B. insulinabhängigem GDM) untersuchen.

4.4 Zusammenfassung

Eine Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist nur unter Berücksichtigung der Studienlimitation erlaubt. Zwar zeigte sich in vielen Fragestellungen eine deutliche Signifikanz, aber die Unterschiede (im Foldchangewert betrachtet) waren nicht so groß und teilweise abhängig von der Normierung.

SR-BI ist sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der GDM-Gruppe im Vergleich zu den Arterien erhöht in den Venen exprimiert. Beim Vergleich der GDM- und der Kontrollgruppe ist SR-BI sowohl in den Arterien als auch in den Venen der GDM-

Gruppe erhöht exprimiert. Darüber hinaus konnte eine Wechselwirkung zwischen Gefäßtyp und Pathologie festgehalten werden.

Die LDLR-Expression ist beim Arterie-Vene-Vergleich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der GDM-Gruppe abhängig von der Normierung. Insgesamt zeigt sich eher kein Unterschied. Beim Vergleich der GDM- und der Kontrollgruppe ist die Expression abhängig von der Normierung. Auch hier geht die Tendenz in Richtung kein Unterschied.

Der Vergleich der Regulierung in Arterien und Venen von LRP-8 und LOX-1 ist in der Kontrollgruppe abhängig von der Normierung und bei der Betrachtung der biologischen Relevanz zu hinterfragen. In der GDM-Gruppe sind die beiden Rezeptoren eindeutig erhöht in den Venen exprimiert. Der Vergleich der Arterien von GDM- und Kontrollgruppe ist abhängig von der Normierung. Eindeutig erhöht exprimiert sind LRP-8 und LOX-1 in den Venen der GDM-Gruppe im Vergleich zu den Venen der Kontrollgruppe.

5 Literaturverzeichnis

1. Pschyrembel W. Klinisches Wörterbuch: Mit klinischen Syndromen. 252., durchgesehene und verb. Aufl. Berlin etc.: de Gruyter; 1975.
2. Pfeleiderer A, Breckwoldt M. Gynäkologie und Geburtshilfe: Sicher durch Studium und Praxis. 3., komplett überarb. und neu gestaltete Aufl. Stuttgart: Thieme; 2000.
3. 1. Datei:Plazenta.png – Wikipedia [zitiert am 20.03.2011]. URL: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Plazenta.png&filetimestamp=20070123210806>.
4. Schiebler T, Schmidt W, Arnold G, Hrsg. Anatomie: Limitierte Sonderausgabe 2002 /// Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 119 Tabellen. 8., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. limitierte Sonderausg. Berlin: Springer; 2002.
5. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. New York, NY: Springer Science+Business Media, Inc; 2006.
6. Petru E. Geburtshilfe: Zellbiologie, Histologie, Embryologie, Pathologie. 6. Auflage. Graz; 2007.
7. Welsch U. Lehrbuch Histologie: Zytologie Histologie mikroskopische Anatomie; mit ... 21 Tab. 2., völlig überarb. Aufl. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer; 2006.
8. Klink R, Pape H, Silbernagl S. Lehrbuch Physiologie; 2005.
9. Woollett LA. Where Does Fetal and Embryonic Cholesterol Originate and What Does It Do? Annual review of nutrition. 2008; 2008; VOL 28, 97-114.
10. Datei: Cholesterol.svg – Wikipedia [zitiert am 18.03.2011]. URL: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Cholesterol.svg&filetimestamp=20070214074434>.
11. Woollett LA. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. Am. J. Clin. Nutr. 2005; 82 (6): 1155–61.
12. Löffler G. Biochemie und Pathobiochemie: Mit 192 Tabellen. 8., völlig neu bearb. Aufl. Berlin u.a.: Springer; 2007.
13. McConihay JA, Horn PS, Woollett LA. Effect of maternal hypercholesterolemia on fetal sterol metabolism in the Golden Syrian hamster. J. Lipid Res. 2001; 42 (7): 1111–9.
14. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. J. Clin. Invest. 1997; 100 (11): 2680–90.
15. Panzenboeck U, Becker T, Hirschmugl B, Schweinzer C, Lang I et al. Human endothelial cells of the placental barrier efficiently deliver cholesterol to the fetal circulation via ABCA1 and ABCG1. Circ. Res. 2009; 104 (5): 600–8.

16. O'Connell BJ, Denis M, Genest J. Cellular physiology of cholesterol efflux in vascular endothelial cells. *Circulation*. 2004; 110 (18): 2881–8.
17. Hassan HH, Denis M, Krimbou L, Marcil M, Genest J. Cellular cholesterol homeostasis in vascular endothelial cells. *Can J Cardiol*. 2006; 22 Suppl B: 35B-40B.
18. Herrera E, Amusquivar E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab. Res. Rev*; 16 (3): 202–10.
19. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 71 (5 Suppl): 1256S-61S.
20. Herrera E, Amusquivar E, López-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm. Res.* 2006; 65 Suppl 3: 59–64.
21. Laufs U, Lammert F. [Lipid metabolism disorders in pregnancy]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2008; 133 (42): 2173–6.
22. Agata Bronisz MSMPRJ. An evaluation of selected lipid parameters in pregnancy complicated by gestational diabetes mellitus (Part 2): differences resulting from the method of treatment. *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2007, 7, 6, 296–299.
23. Hiden U DG. The Placenta in a Diabetic Pregnancy. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 2010; 7 (1), 27-33.
24. Horn F, Helferich S. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 3. grundlegend überarb. und erweiterte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2005.
25. Desoye G, Hauguel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care*. 2007; 30 Suppl 2: S120-6.
26. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Nightingale P, Kendall MJ, Brydon P et al. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin. Sci.* 2004; 106 (1): 93–8.
27. Soraya Salehi Gargari 1 M.D. SH2MDMJ2MDS. Plasma lipids relationship with results of Oral Glucose Challenge Test in pregnancy. *Journal of Family and Reproductive Health Summer* 2007;1(1):24-28.
28. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Häcker B. *Biochemie*. 6. Aufl. München: Elsevier Spektrum Akad. Verl; 2007.
29. Nelson DL. *Lehninger Biochemie: Mit 131 Tabellen*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl., Übers. der 5. amerikan. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009.
30. Adachi H, Tsujimoto M. Endothelial scavenger receptors. *Prog. Lipid Res.* 2006; 45 (5): 379–404.
31. Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23 (10): 1732–8.
32. Gillotte-Taylor K, Boullier A, Witztum JL, Steinberg D, Quehenberger O. Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 2001; 42 (9): 1474–82.

33. Barikbin P. Regulation der Expression von Scavenger-Receptor-BI (SR-BI) und des bidirektionalen Cholesterolflox durch den Cholesterol- und Vitamin-E-Gehalt in HepG2-Zellen und High-density-Lipoproteinen. Humboldt-Univ., Diss--Berlin, 2004; 2004.
34. Brundert M, Ewert A, Heeren J, Behrendt B, Ramakrishnan R, Greten H et al. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25 (1): 143–8.
35. Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J. Clin. Invest.* 2001; 108 (6): 793–7.
36. Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr. Rev.* 2003; 24 (3): 357–87.
37. Lopez D, McLean MP. Estrogen regulation of the scavenger receptor class B gene: Anti-atherogenic or steroidogenic, is there a priority? *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006; 247 (1-2): 22–33.
38. Wadsack C, Hammer A, Levak-Frank S, Desoye G, Kozarsky KF, Hirschmugl B et al. Selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein by human first trimester and term villous trophoblast cells. *Placenta*; 24 (2-3): 131–43.
39. Ethier-Chiasson M, Duchesne A, Forest J, Giguère Y, Masse A, Mounier C et al. Influence of maternal lipid profile on placental protein expression of LDLr and SR-BI. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 359 (1): 8–14.
40. Satoh H, Kiyota E, Terasaki Y, Sawamura T, Takagi K, Mizuta H et al. Expression and localization of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in murine and human placentas. *J. Histochem. Cytochem.* 2008; 56 (8): 773–84.
41. Chen X, DU G. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: protein, ligands, expression and pathophysiological significance. *Chin. Med. J.* 2007; 120 (5): 421–6.
42. Ethier-Chiasson M, Forest J, Giguère Y, Masse A, Marseille-Tremblay C, Lévy E et al. Modulation of placental protein expression of OLR1: implication in pregnancy-related disorders or pathologies. *Reproduction.* 2008; 136 (4): 491–502.
43. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979; 76 (7): 3330–7.
44. Rebeck GW, LaDu MJ, Estus S, Bu G, Weeber EJ. The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS. *Mol Neurodegener.* 2006; 1: 15.
45. Gent J. Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cellular and molecular life sciences.* 2004: 2004; VOL 61; NUMB 19/20, 2461-2470.
46. Kong W, Liu J, Jiang J. Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation. *J. Mol. Med.* 2006; 84 (1): 29–36.
47. UT Southwestern Medical Center, UT Southwestern Medical Center - Internet Services. Brown - Goldstein Laboratory [zitiert am 07.03.2011]. URL: <http://www.utsouthwestern.edu/utsw/cda/dept14857/files/114532.html>.

48. Furuhashi M, Seo H, Mizutani S, Narita O, Tomoda Y, Matsui N. Expression of low density lipoprotein receptor gene in human placenta during pregnancy. *Mol. Endocrinol.* 1989; 3 (8): 1252–6.
49. Kim DH, Magoori K, Inoue TR, Mao CC, Kim HJ, Suzuki H et al. Exon/intron organization, chromosome localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (13): 8498–504.
50. Wang L, Wang X, Laird N, Zuckerman B, Stubblefield P, Xu X. Polymorphism in maternal LRP8 gene is associated with fetal growth. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; 78 (5): 770–7.
51. Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ et al. Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (14): 8373–80.
52. Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF. Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J. Biol. Chem.* 2007; 282 (16): 12290–7.
53. Riddell DR, Vinogradov DV, Stannard AK, Chadwick N, Owen JS. Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *J. Lipid Res.* 1999; 40 (10): 1925–30.
54. Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N, Bielawski KP. [Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2007; 61: 500–10.
55. Glossar: House-keeping genes - Chemgapedia [zitiert am 07.03.2011]. URL: http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/h/ho/house_00045keeping_00032genes.glos.html.
56. RPL30 ribosomal protein L30 [Homo sapiens] - Gene result [zitiert am 07.03.2011]. URL: [http://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28rpl%2030\[gene\]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens\[orgn\]%29%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](http://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28rpl%2030[gene]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens[orgn]%29%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight).
57. Yoshihama M, Uechi T, Asakawa S, Kawasaki K, Kato S, Higa S et al. The human ribosomal protein genes: sequencing and comparative analysis of 73 genes. *Genome Res.* 2002; 12 (3): 379–90.
58. US National Library of Medicine, National Institutes of Health, Department of Health & Human Services. VWF - von Willebrand factor - Genetics Home Reference; 2011 27.02.2011 [zitiert am 07.03.2011]. URL: <http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene=VWF>.
59. Von Willebrand factor - Wikipedia, the free encyclopedia; 2011 04.03.2011 [zitiert am 07.03.2011]. URL: https://han.meduni-graz.at/han/pubmed/en.wikipedia.org/wiki/Von_Willebrand_factor.
60. VWF von Willebrand factor [Homo sapiens] - Gene result [zitiert am 07.03.2011]. URL: [https://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28vwf\[gene\]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens\[orgn\]%29%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28vwf[gene]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens[orgn]%29%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight).

61. Herold G. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Stichwortverzeichnis. Köln: Eigenverl; 2008.
62. Von Willebrand Factor – our top endothelial ... | Abcam; 2011 01.01.2011 [zitiert am 08.03.2011]. URL: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=10094&pid=10039>.
63. CD34 molecule [Homo sapiens] - Gene result [zitiert am 07.03.2011]. URL: [https://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28cd%2034\[gene\]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens\[orgn\]%29%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://han.meduni-graz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28cd%2034[gene]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens[orgn]%29%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight).
64. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J. Immunol.* 1992; 148 (1): 267–71.
65. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.* 1990; 75 (12): 2417–26.
66. Ethanol precipitation of nucleic acids - OpenWetWare; 2011 17.02.2011 [zitiert am 07.03.2011]. URL: http://openwetware.org/wiki/Ethanol_precipitation_of_nucleic_acids.
67. Real Time PCR; 2003 20.03.2003 [zitiert am 07.03.2011]. URL: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimemcr.htm>.
68. File:LightCycler Probes.jpg – Wikimedia Commons; 2010 20.10.2010 [zitiert am 07.03.2011]. URL: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:LightCycler_Probes.jpg?uselang=de.
69. Spellacy WN, Ashbacher LV, Harris GK, Buhi WC. Total cholesterol content in maternal and umbilical vessels in term pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1974; 44 (5): 661–5.
70. Peng Y, Akmentin W, Connelly MA, Lund-Katz S, Phillips MC, Williams DL. Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15 (1): 384–96.
71. Argov N, Sklan D. Expression of mRNA of lipoprotein receptor related protein 8, low density lipoprotein receptor, and very low density lipoprotein receptor in bovine ovarian cells during follicular development and corpus luteum formation and regression. *Mol. Reprod. Dev.* 2004; 68 (2): 169–75.
72. Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriwaki H, Murase T et al. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation.* 1999; 99 (24): 3110–7.
73. Sprague EA, Steinbach BL, Nerem RM, Schwartz CJ. Influence of a laminar steady-state fluid-imposed wall shear stress on the binding, internalization, and degradation of low-density lipoproteins by cultured arterial endothelium. *Circulation.* 1987; 76 (3): 648–56.

6 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Robert Kreysing	Nationalität: Deutsch
Heinrichstraße 3/1	Geburtsdatum: 21.03.1986
8010 Graz (Österreich)	Geburtsort: Münster
Tel.: 0043316907613	Email: rkreysing@web.de

Hochschulstudium

- Seit 2005: Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz

Famulaturen und Praktika

September 2006 Nottuln	Sankt-Gerburgis-Hospital Nottuln Innere Medizin (2 Wo)
August/September 2007 Nottuln	Sankt-Gerburgis-Hospital Nottuln Innere Medizin (4 Wo)
Februar 2008 Nottuln	Sankt-Gerburgis-Hospital Nottuln Innere Medizin (3 Wo)
Juli 2008 Graz	Krankenhaus der Elisabethinnen Radiologie (2 Wo)
August 2008 Münster	Raphaelsklinik Münster Unfallchirurgie/Orthopädie (3 Wo)
August/September 2008 Münster	Raphaelsklinik Münster Gynäkologie (2 Wo)
August 2009 Agogo (Ghana)	Presbyterian Hospital Agogo Innere Medizin (2 Wo)/ Pädiatrie (2 Wo)
August 2010 Penang (Malaysia)	Hospital Lam Wah EE Anästhesie (3 Wo)
Februar 2011 Neuruppin	Ruppiner Kliniken (3 Wo) Anästhesie und Intensivmedizin
Oktober 2010-März 2011 Graz	Universitätsklinikum 6. Studienjahr: Allgemeinmedizinpraxis (Dr. Höfler) (5 Wo) Kinderkardiologie (5 Wo) Unfallchirurgie (10 Wo)

Schulbildung/sonstige Ausbildung

- Grundschule: 1992 – 1996 St. Martinus Grundschule in Nottuln
- Weiterführende Schule: 1996 – 2005 Gymnasium Nottuln
- Abschluss: Abitur 2005
- Ausbildung zum Rettungssanitäter DRK Landesrettungsschule Münster
Juli-Oktober 2005

Fremdsprachenkenntnisse

- | | |
|---------------|-----------------------------|
| • Englisch | Fortgeschrittene Kenntnisse |
| • Französisch | Grundkenntnisse |
| • Spanisch | Grundkenntnisse |