

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Expressionsveränderungen plazentarer Transporter

nach simulierter Plazentainsuffizienz bei der Ratte

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Isabelle Swoboda

aus Loben/ Polen

promoviert am 6. September 2017

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2017

Druck und Bindung: DocuLounge Kiel, Westring 395, 24118 Kiel

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. B. Schermer

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Universitätsprofessor Dr. med. Jörg Dötsch und Frau Dr. med. Eva Nüsken.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (http://typo3-8169.rrz.uni-koeln.de/fileadmin/templates/uni/PDF/Ordnung_gute_wiss_Praxis.pdf) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 1.10.2016

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Tierexperiment wurde ohne meine Mithilfe in der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde der Universität Köln durchgeführt. Die RNA-Isolation aus Gewebe, Konzentrationsbestimmung der extrahierten Ribonukleinsäuren, sowie die Reverse Transkription und die Proteinisolation und Proteinbestimmung sind von mir mit Unterstützung von Maria Wohlfahrt durchgeführt worden. Die Real-Time-PCR und Westernblots wurden von mir nach entsprechender Anleitung durch Maria Wohlfahrt selbstständig durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde von mir nach entsprechender Anleitung durch Dr. Eva Nüsken ebenfalls selbstständig durchgeführt.

Danksagung

Ich danke herzlich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Jörg Dötsch, Leiter der Arbeitsgruppe „Fetale Programmierung“ der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die Möglichkeit der intensiven Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Mein ganz außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. med. Eva Nüsken, für die hervorragende, vorbildliche und kontinuierliche Betreuung, sowie für Hilfestellungen und Anregungen bei der Durchführung und Auswertung der experimentellen Versuche.

Nicht minder danke ich Maria Wohlfahrt für Ihre Unterstützung und Betreuung der experimentellen Untersuchungen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	10-12
1 Einleitung	13
1.1 Ein geringes Gewicht bzw. eine geringe Größe sind nicht immer pathologisch	14
1.2 Das Wachstum wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst	15
1.3 Die Plazenta reguliert das fetale Wachstum	16
1.3.1 Aminosäuren- Bedeutung und Transport	17-18
1.3.2 Glucose- Bedeutung und Transport	18
1.3.3 Fettsäuren- Bedeutung und Transport	19-20
1.3.4 Prostaglandin- Bedeutung und Transport	20
1.3.5 Monocarboxylate- Bedeutung und Transport	20-21
1.4 Uteroplazentare Insuffizienz führt zur IUGR	22
1.5 Pränatale Wachstumsrestriktion ist postnatal mit Erkrankungen assoziiert	23
1.6 Fetale Programmierung: Mehrere Erklärungsmodelle	24-25
1.7 Die Hypothese	26
2. Methodik	27
2.1 Der Tierversuch	28-30
2.2 Quantifizierung der Genexpression	31
2.2.1 RNA-Isolation aus Gewebe	31
2.2.2 Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten Ribonukleinsäure	32
2.2.3 Reverse Transkription	33
2.2.4 Taq-Man-Realtime-PCR	34-36
2.3 Quantifizierung der Proteinexpression	37

2.3.1	Proteinisolation	37
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	37-38
2.3.3	Western Blot	38-40
2.4	Statistische Datenauswertung	41
2.4.1	Auswertung der Real-time-PCR	41-42
2.4.2	Auswertung der Western Blots	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Aminosäuretransporter	45
3.1.1	SNAT1 wird genetisch durch SLC38A1 codiert	46
3.1.1.1	24h nach Ligatur ist die Expression von SLC38A1 vermindert	46-47
3.1.1.2	SLC38A1: Expressionszunahme ist kurz nach LIG und SOP gehemmt	47
3.1.1.3	SNAT1-Expression 4h nach Ligatur vs. SOP vermindert, nach 24h vs. K	48-49
3.1.2	SNAT2 wird genetisch durch SLC38A2 codiert	50
3.1.2.1	SLC38A2 Expression ist 4h und 24h nach Ligatur vs. K vermindert	50-51
3.1.2.2	SLC38A2-Expressionsabnahme zwischen den Zeitpunkten 4h und 24h	52
3.1.2.3	Keine signifikanten SNAT2-Expressionsunterschiede auf Proteinebene	52-53
3.1.3	SNAT4 wird genetisch durch SLC38A4 codiert	54
3.1.3.1	SLC38A4-Expressionszunahme 72h nach Scheinoperation vs. Kontrolle	54-55
3.1.3.2	SLC38A4-Expressionszunahme im longitudinalen Verlauf	56
3.1.4	Aminosäuretransporter werden nach Ligatur zunächst herunterreguliert	57
3.1.5	Genexpression steigt bei SLC38A1 und SLC38A4 und sinkt bei SLC38A2	57
3.2	Glucosetransporter	58
3.2.1	GLUT1 wird genetisch durch SLC2A1 codiert	59

3.2.1.1	SLC2A1-Expression ist 72h nach Scheinoperation vs. K und LIG erhöht	60
3.2.1.2	SLC2A1-Expressionszunahme zwischen Zeitpunkt 24h und 72h	61
3.2.1.3	GLUT1 ist 72h nach Ligatur vermindert	62-63
3.2.2	GLUT3 wird durch SLC2A3 codiert	64
3.2.2.1	SLC2A3-Expression unterscheidet sich nicht innerhalb der Gruppen	65
3.2.2.2	SLC2A3-Expressionsabnahme zwischen den Zeitpunkten 4h und 24h	65-66
3.2.2.3	Keine Unterschiede der GLUT 3-Expression zwischen den Gruppen	66-67
3.2.3	Keine Gruppenunterschiede bei GLUT3, jedoch bei GLUT1	68
3.2.4	Expression steigt bei SLC2A1 und sinkt bei SLC2A3	68
3.3	Fettsäuretransporter	69
3.3.1	FAT wird genetisch durch CD36 codiert	70
3.3.1.1	CD36 wird nach 4h bei SOP mehr exprimiert als in der Kontrollgruppe	70-71
3.3.1.2	Genexpression nimmt bis zum Tag 20 bei LIG zu, dann in allen Gruppen ab	71
3.3.1.3	FAT-Expression steigt erst bei SOP, dann in LIG gegenüber K an	72-73
3.3.2	H-FABP wird genetisch durch FABP3 codiert	74
3.3.2.1	FABP3 Expression ist nach 72h bei SOP gegenüber K und LIG erhöht	74-75
3.3.2.2	FABP3 Expression nimmt 24h nach Scheinoperation zu	75
3.3.2.3	H-FABP-Expression ist ab Tag 20 nach Ligatur erhöht	76-77
3.3.3	FATP1 wird genetisch durch SLC27A1 codiert	78
3.3.3.1	Die Expression von SLC27A1 bleibt auch nach einem Eingriff gleich	79
3.3.3.2	SLC27A1-Expression nimmt zunächst ab und dann wieder zu	80
3.3.4	FATP4 wird genetisch durch SLC27A4 codiert	81
3.3.4.1	SLC27A4-Expression ist 72h nach Ligatur niedriger als bei SOP oder K	82

3.3.4.2	SLC27A4-Expression ist 24h nach Eingriff vermindert	83
3.3.5	SLC27A4 Expression verhält sich gegensätzlich	84
3.3.6	Gegensätzliche Tendenz bei CD36 nach 24h vs. SLC27A1 und SLC27A4	85
3.4	PGT wird genetisch durch SLCO2A1 codiert	86
3.4.1	SLCO2A1-Expression 72h nach SOP erhöht	87
3.4.2	SLCO2A1 Expression ist in allen Gruppen am Tag 22 höher als am Tag 20	88
3.5	MCT4 wird genetisch durch SLC16A4 codiert	89
3.5.1	SLC16A4-Expression ist 24h nach Eingriff vermindert	90
3.5.2	SLC16A4 Expression steigt bei SOP zwischen Tag19 und 20 an	91
4.0	Diskussion	92
4.1	Aminosäuretransporter	93-96
4.2	Glucosetransporter	96-98
4.3	Fettsäuretransporter	98-100
4.4	Prostaglandintransporter	100
4.5	Monocarboxylattransporter	100
4.6	Die Folgen einer Ligatur versus einer Scheinoperation unterscheiden sich	101
4.7	Experimentelle Plazentainsuffizienz verändert Transporterexpressionen	102-105
4.8	Ist eine Reprogrammierung möglich?	106-107
5.0	Zusammenfassung	108
6.0	Literaturverzeichnis	109-116
7.0	Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	117
8.0	Anhang	118-133
9.0	Lebenslauf	134

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGA	Appropriate for gestational age
BM	Basalmembran
CD36	Cluster of differentiation 36
cDNA	Complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAT	Fatty acid Translocase
FABP3	Fatty acid binding Protein 3
FATP1	Fatty acid Transport Protein 1
FATP4	Fatty acid Transport Protein 4
GLUT1	Glucosetransporter 1
GLUT3	Glucosetransporter 3
IUGR	Intrauterine Wachstumsrestriktion
hFABP	Heart-type fatty acid binding protein
K	Kontrollgruppe
K4	Kontrollgruppe mit Plazentaentnahme zum Zeitpunkt 4h
K24	Kontrollgruppe mit Plazentaentnahme zum Zeitpunkt 24h
K72	Kontrollgruppe mit Plazentaentnahme zum Zeitpunkt 72h
LBW	Low birth weight
LIG	Ligaturgruppe
LIG4	Gruppe mit Plazentenentnahme 4h nach Ligatur
LIG24	Gruppe mit Plazentenentnahme 24 nach Ligatur

LIG72	Gruppe mit Plazentenentnahme 72h nach Ligatur
MCT4	Monocarboxylattransporter 4
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MVM	Mikrovillöse Membran
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PGT	Prostaglandintransporter
SLC16A4	Solute carrier family 16 member 4
SLC2A1	Solute carrier family 2 member 1
SLC2A3	Solute carrier family 2 member 3
SLC27A1	Solute carrier family 27 member 1
SLC27A4	Solute carrier family 27 member 4
SLC38A1	Solute carrier family 38 member 1
SLC38A2	Solute carrier family 38 member 2
SLC38A4	Solute carrier family 38 member 4
SLCO2A1	Solute carrier organic anion transporter family member1
SNAT1	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1
SNAT2	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2
SNAT4	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 4
SGA	Small for gestational age
SOP	Scheinoperationsgruppe
SOP4	Gruppe mit Plazentenentnahme 4h nach Scheinoperation
SOP24	Gruppe mit Plazentenentnahme 24 nach Scheinoperation
SOP72	Gruppe mit Plazentenentnahme 72h nach Scheinoperation

Tab.	Tabelle
Tag 19	Entspricht Zeitpunkt 4h
Tag 20	Entspricht Zeitpunkt 24h
Tag 22	Entspricht Zeitpunkt 72h
vs.	versus
Zeitpunkt 4h	4h nach Intervention, im Sinne einer Ligatur oder Scheinoperation
Zeitpunkt 24h	24h nach Intervention, im Sinne einer Ligatur oder Scheinoperation
Zeitpunkt 72h	72h nach Intervention, im Sinne einer Ligatur oder Scheinoperation

1. Einleitung

Zahlreiche Studien zeigen, dass eine fetale Wachstumsrestriktion mit der Entwicklung von Erkrankungen wie Adipositas, kardiovaskulären Krankheiten, Diabetes Typ II sowie Nierenerkrankungen im postnatalen Leben assoziiert ist [9,18,41,98]. Obwohl Studien bereits seit den siebziger Jahren auf diesen Zusammenhang hinweisen [30], konnte der Pathomechanismus bis heute nicht vollständig erfasst werden. Bei einer Prävalenz der Wachstumsrestriktion von etwa 8% aller Schwangerschaften in den westlichen Ländern [70] und in Anbetracht der gravierenden Langzeitfolgen für den Fötus ist es auch von gesellschaftlichem Interesse auf diesem Gebiet zu forschen. Da die uteroplazentare Insuffizienz in den Industrieländern die häufigste Ursache für eine intrauterine Wachstumsrestriktion darstellt, wird diese im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit im Tiermodel simuliert, um die Expressionsveränderung der plazentaren Transporter sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene zu untersuchen.

1.1 Ein geringes Gewicht bzw. eine geringe Größe sind nicht immer pathologisch

Das Geburtsgewicht wird postnatal innerhalb der ersten Stunden bestimmt, bevor ein physiologischer postnataler Gewichtsverlust beginnt. Sofern das Gewicht unabhängig von Ursache oder Alter unter 2500g liegt, sind die Kriterien für ein „low birth weigh“ erfüllt. „LBW“ kann weiter in „very low birth weight“ (1000-1499g) und „extremely low birth weight“ (500-999g) unterteilt werden [95].

Im Gegensatz dazu bezieht die Bezeichnung „small for gestational age“ das Gestationsalter mit ein. Im Jahr 2001 definierte das International Advisory Board Panel, bestehend aus 42 führenden Experten aus der Geburtshilfe, der perinatalen und postnatalen Medizin, Pädiatrie, Endokrinologie, Pharmakologie und Epidemiologie, SGA als Geburtsgröße und/ oder Geburtsgewicht, die geringer als die 2. Standardabweichung unterhalb des Mittelwertes für das entsprechende Gestationsalter sind/ ist [64]. Einige Autoren verwenden allerdings alternativ die 10., 5. oder 3. Perzentile als Grenzwert. Sowohl bei SGA, als auch LBW liegt keine grundsätzliche Pathologie vor, da Faktoren, wie die mütterliche Größe, die ethnische Herkunft oder die Parität, physiologisch zu geringer Größe oder geringem Gewicht führen können.

Das Vorliegen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion („Intrauterine growth restriction“= IUGR) impliziert eine Verminderung des Gewichts, beziehungsweise der Größe aufgrund eines pathologischen Einflusses während der Gestation. Folglich kann der Fetus sein Wachstumspotential nicht voll ausschöpfen und das Geburtsgewicht, beziehungsweise die Größe sind vermindert [2,95]. Eine häufig verwendete Definition ist ein sonographisch bestimmtes fetales Gewicht unterhalb der 10. Perzentile, jedoch gibt es keine einheitliche internationale Definition. Als Pathologiehinweis gilt ein Perzentilenknick, wohingegen eine von Schwangerschaftsbeginn an vorliegende, sowohl Größe, Kopfumfang, als auch Gewicht betreffende physiologische Wachstumsminde rung entsprechend perzentilenkonformes Wachstum zeigt.

1.2 Das Wachstum wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst

Das fetale Wachstum hängt von einem genetisch determinierten Wachstumspotenzial ab, das durch fetale, plazentare, maternale und externe Faktoren moduliert wird [5], welche stimulierend oder inhibierend wirken können. Zu den wachstumsfördernden Faktoren während der Schwangerschaft gehören unter anderen die Gesundheit der Mutter, die Bereitstellung eines physiologischen endokrinen Milieus und von ausreichend Nährstoffen, sowie die Sauerstoffzufuhr durch die ausreichend perfundierte Plazenta. Ebenso regulieren Hormone das Wachstum. Die Steuerungsprozesse dieser vielseitigen Wachstumsdeterminanten können allerdings auch durch vielfältige Einflüsse gestört werden und zu pathologischem Wachstum führen. Einerseits kann es zu erhöhtem, andererseits zu verminderten Wachstum kommen.

1.3 Die Plazenta reguliert das fetale Wachstum

Die Plazenta spielt aufgrund ihrer Funktionsvielfalt eine zentrale Rolle für die fetale Entwicklung. Der Aufbau und die Funktion der Plazenta verändern sich in der Schwangerschaft entsprechend des heranwachsenden Feten. Die Plazentafunktionen umfassen neben dem Aufbau der mütterlichen und kindlichen Schranke, der Synthese von Hormonen und Wachstumsfaktoren, immunologischen Funktionen auch den Austausch von Gasen, Nährstoffen und Abfallprodukte zwischen Mutter und Fetus. Die Plazentaschranke ist hochpermeabel für Atemgase, so kann Sauerstoff schnell vom mütterlichen ins fetale Blut und Kohlendioxid andersherum übertreten [22,45]. Die Hauptnährstoffe des Feten sind Glucose, Aminosäuren sowie Fettsäuren und werden über plazentare Transporter von der Mutter zum Fetus transportiert.

Sowohl die menschliche als auch die Plazenta der Ratte sind hämochorial, d.h. die Trophoblastenzellen sind im direkten Kontakt mit mütterlichem Blut. Die menschliche Plazenta ist allerdings hämomonochorial, während die Plazenta der Ratte hämotrichorial ist. Diese Einteilung bezieht sich auf die Anzahl der Gewebeschichten der materno-embryofetalen Barriere. Beim Menschen liegt eine Schicht aus Syncytiotrophoblasten vor, während die Ratte über eine Cytotrophoblastenschicht, sowie zwei Syncytiotrophoblastenschichten, die durch Connexin 26/gap junctions verbunden sind, verfügt.

Die humane Syncytiotrophoblastenschicht besteht aus zwei polarisierten Membranen. Es gibt zum einen die mikrovillöse Membran (MVM) auf der Seite der mütterlichen Zirkulation und zum anderen die Basalmembran (BM) seitens der fetalen Gefäße. Damit Stoffe in die fetale Zirkulation gelangen, müssen sie, nachdem die Syncytiotrophoblastenschicht überquert haben, das fetale Kapillarendothel durchqueren.

1.3.1 Aminosäuren- Bedeutung und Transport

Aminosäuren werden neben der Proteinsynthese für den Energiemetabolismus und als biosynthetische Vorstufe für zahlreiche metabolische Pathways, wie die Synthese von Nukleotiden und Haem [22,44] verwendet. Zwanzig bis Vierzig Prozent der Energie, die dem Fetus zugeführt wird, besteht aus Aminosäuren, so dass eine adäquate Zufuhr essentiell ist [7,24]. Bislang sind über 20 Aminosäuren im Plasma gefunden worden, wovon einige, sogenannte essentielle Aminosäuren, nicht im menschlichen Gewebe hergestellt werden können. Andere wiederum werden z. B. aus Citratzyklus-Zwischenprodukten synthetisiert. Der plazentare Transport erfolgt mittels Aminosäurentransporter.

Aminosäurentransporter sind auch an dem plazentaren Transport von anderen Schlüsselmolekülen wie den Schilddrüsenhormonen T3 und T4 beteiligt. Zusätzlich sind System L, A, und y+L am plazentaren Homocysteintransport beteiligt. Es gibt viele Transporterisoformen, die sich über 10 verschiedenen Transporterfamilie zuordnen lassen.

System A und X-AG vermitteln die Aufnahme von spezifischen Aminosäuren in die Szyncytiotrophoblasten und gehören zu den akkumulativen Aminosäurentransporter. LAT1, LAT2, y+LAT1, yLAT2 und ASC lassen sich den Aminosäurenaustauschern zuzuordnen, sie tauschen eine Aminosäure von den Szyncytiotrophoblasten gegen eine aus dem fetalen oder mütterlichen Blutkreislauf ein, das ändert zwar die Zusammensetzung allerdings nicht die Quantität der transportierten Aminosäuren [22]. Aminosäuren efflux carrier übertragen Aminosäuren vom Plazentazytosol in die fetale Zirkulation [87].

Das Transportersystem A wird von den Transporterisoformen SNAT1, SNAT2 und SNAT4 gebildet, welche entsprechend durch SLC38A1, SLC38A2 und SLC38A4 genetisch codiert werden. Die Transporter wurden neben der Plazenta, aber auch in anderen Geweben gefunden. SNAT1 ist allgegenwärtig im Gewebe von Säugetieren zu finden. SNAT2 wird in Herz, Gehirn und Plazenta exprimiert und SNAT 4 ist neben der Plazenta auch in der Leber zu finden [44].

Die Aufgabe vom System A ist die natriumabhängige erleichterte Aufnahme von kleinen, nicht-essentiellen, neutralen Aminosäuren, wie Alanin, Glycin und Serin [44,53]. Dabei werden die Aminosäuren gegen ihren Konzentrationsgradienten aufgenommen und Natrium dafür in die Zelle transportiert [62]. Es ist aber auch für den Transport von essentiellen Aminosäuren bedeutend, da es zu hohen intrazellulären Konzentrationen von Aminosäuren wie Glycin führt, welche durch das System L gegen extrazelluläre essentielle Aminosäuren ausgetauscht werden [53,62]. Eine Aktivität der Systems A und L ist in beiden

Plasmamembranen gemessen worden, wobei sie in der Mikrovillösen Membran allerdings höher war, als in der basalen Membrane der Syncytiotrophoblasten [57].

1.3.2 Glucose- Bedeutung und Transport

Glucose ist der Hauptenergielieferant für den Fetus und die Plazenta. Die plazentare Glucosenutzung ist größer als die fetale [13]. Da die fetale Glucoseproduktion minimal ist, hängt der Fetus von der Glucoseversorgung der Mutter ab [14,60]. Die Glucoseaufnahme erfolgt durch die mikrovillöse Membran der Syncytiotrophoblasten. Von dort kann sie durch die Basalmembran und das fetale Kapillarendothel die fetale Zirkulation erreichen. In dem Syncytiotrophoblasten kann die Glucose allerdings auch verstoffwechselt werden. Sie kann in Glucose-6-Phosphat oder plazentares Glykogen umgewandelt werden. Der menschliche Glucosetransport ist stereo-selektiv für d-glucose und der plazentare Transport von Fructose erfolgt im viel geringeren Maße als der von Glucose. Der Glucosetransport erfolgt durch spezifische Glukosetransportproteine, die sogenannten GLUTs. Sie werden von Genen der SLC2A-Familie codiert. Es sind bislang 14 Isoformen bekannt [93]. Studien benennen GLUT1 und GLUT3 als Haupt-Glucosetransporter in der Ratte [100]. Beide Transporter sind für die intrauterine Entwicklung wichtig, wie Gendelektionsversuche zeigten [36,96]. Folglich untersuchten wir in unserer Arbeit sowohl GLUT1, als auch GLUT3.

GLUT1 ist in beiden Membranen lokalisiert worden, allerdings mit einer dreifach höheren Expression in der humanen MVM [56]. Die hohe Dichte von GLUTs in der Mikrovillösen Membran und der großen Oberfläche ermöglichen eine schnelle Glucoseaufnahme der Syncytiotrophoblasten. Die hohe Kapazität der MVM für den Glucosetransport bietet ausreichend Glucose für den plazentaren Verbrauch unter Beibehaltung eines Gradienten zwischen dem Zellinneren der Syncytiotrophoblasten und den fetalen Kapillaren, welcher für den Nettotransfer zum Fetus notwendig ist [62]. Aufgrund der Flächendifferenz und der geringeren GLUT1 Expression auf der Basalmembran lässt sich vermuten, dass es der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Glucosetransfer ist [8].

GLUT3 scheint durch seine Lokalisation am vaskulären Endothel für den Transport von Plazenta zu Fetus verantwortlich zu sein. Er wurde aber auch in der MVM beschrieben. GLUT3 hat eine höhere Affinität für Glucose und eine größere Transportkapazität als GLUT1 [58].

1.3.3 Fettsäuren- Bedeutung und Transport

Fettsäuren dienen nicht nur als wichtige Energiequelle, sondern sind auch als Strukturelemente in der Zellmembran zu finden und sind Vorläufer für wichtige bioaktive Verbindungen, wie Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxan und Leukotrien [46]. Sie sind insofern essentiell für die Entwicklung von spezifischen Geweben und Organen, insbesondere für die Gehirnentwicklung.

Einige gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren kann der Fetus selbst herstellen. Aus der Korrelation der neonatalen Konzentrationen von essentiellen Fettsäuren mit zirkulierenden mütterlichen Fettsäurekonzentrationen [1,50] wurde geschlossen, dass die fetale Versorgung mit essentiellen Fettsäuren von mütterlichen Faktoren abhängt. Nur 1–3% der Fettsäuren zirkulieren frei im mütterlichen Blut. Die meisten Fettsäuren sind in der mütterlichen Zirkulation verestert in Triglyzeriden, Phospholipiden und mit Cholesterin und diese sind wiederum Bestandteile von Lipoproteinen.

Zur Überquerung der Synziotrophoblastenzellschicht müssen die Triglyceride durch Lipasen hydrolysiert werden. Die freien Fettsäuren können die Plazenta überqueren [32]. Bislang sind zwei Lipasen identifiziert worden, sie werden als Lipoproteinlipase und endotheliale Lipase bezeichnet. Sie sind beide an der MVM lokalisiert. Die endotheliale Lipase kann außerdem HDL, LDL und VLDL metabolisieren [59,72]. Der weitere Transport ist zwar auch durch freie Diffusion möglich, kann aber auch durch die folgenden Transportproteine vermittelt werden: fatty acid transport protein (FATP), fatty acid translocase (FAT/CD36), plasma membrane fatty acid binding protein (FABPpm) und fatty acid binding protein (FABP). Die Überquerung der MVM erfolgt durch FATPs, FAT [48] und FABPpm. Der Transport durch das Zytosol wird durch die FABPs gewährleistet, um anschließend die Basalmembran mit Hilfe von FATPs und FAT zu passieren. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir aufgrund der Relevanz der Fettsäurenbereitstellung insgesamt vier Fettsäuretransporter. Es wurden FAT, hFABP, FATP1 und FATP4 ausgewählt.

Die beiden Letzteren gehören zu den fatty acid transport proteins (FATPs). Es sind sechs Mitglieder der FATP-Familie bekannt, wovon außer FATP5 alle in den Trophoblasten nachgewiesen werden konnten [89]. FATP1 und FATP4 wurden in Plazentagewebe untersucht und es wurde eine Korrelation zwischen der Expression und der Höhe von Docosahexaensäure, welches eine Omega-3 langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäure ist, im mütterlichen Plasma und Nabelschnurblut gesehen. Den Transportern wird daher eine

wichtige Rolle im Transfer von langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren zugeordnet [63]. Ebenso wie die FATPs ist auch FAT auf der MWM und der BM lokalisiert. Das Transporterprotein hFABP wird durch FABP3 genetisch codiert und gehört somit zur FABP Familie. Insgesamt wurden fünf Mitglieder in den Trophoblasten nachgewiesen und befinden sich im Cytosol der Synzitiotrophoblasten [25].

1.3.4 Prostaglandine- Bedeutung und Transport

Prostaglandine werden durch die enzymatische Wirkung von Cyclooxygenase 1 und 2 gebildet. Aus der Vorstufe Arachidonsäuren entsteht zunächst Prostaglandin H₂, welches weiter in Prostaglandin E₂, Prostaglandin D₂, Prostaglandin F_{2α} und Prostaglandin I₂ umgewandelt wird [88].

Da Prostaglandine die Plasmamembran nur schlecht überqueren können, wird ein Transporter benötigt [90]. Es wurde entsprechend sowohl bei Menschen, in Mäusen, als auch Ratten ein Prostaglandintransporter (PGT) identifiziert, welcher durch das Gen SLCO2A1 codiert wird. Letzteres wird auch als OATP2A1 bezeichnet und gehört zu der solute-carrier organic anion transporter 2A1 family [90]. Der Prostaglandintransporter vermittelt nicht nur den Transport der Vorstufe Prostaglandin H₂, sondern auch von wie Prostaglandin E und Prostaglandin F_{2α} [91]. Das codierte Transportprotein kann in Abhängigkeit von der Laktatkonzentration entweder den Einstrom oder Ausstrom der neusynthetisierten Prostaglandine fördern [20,21]. Der Prostaglandintransporter tauscht als Antiporter Laktat gegen Prostaglandin aus.

1.3.5 Monocarboxylat- Bedeutung und Transport

Zwischenprodukte wie Laktat, Ketonkörper oder Pyruvate fungieren in den meisten Zellen als gebrauchsfertige Energiereserven, die entweder durch Gluconeogenese in Glucose oder Lipogenese in Fettsäuren umgewandelt werden. So können sie bei Glucosemangel als Energiereserve eingesetzt werden. Bei Menschen und anderen Säugetieren ist die Konzentration von Laktat im fetalen Kreislauf höher als im mütterlichen Kreislauf. Laktat entsteht im fetalen Kreislauf am ehesten aus der Glykolyse, da die fetale Blutsauerstoffkonzentration gering ist und somit ein anaerober Stoffwechsel vorliegt [76].

Der Transport der Monocarboxylate erfolgt durch Monocarboxylattransporter (MCT), welche von der SLC16 Gen-Familie codiert werden. In unsere Studie untersuchten wir SLC16A4, welches den Monocarboxylattransporter 4 codiert.

Die Monocarboxylattransporter sind H^+ gekoppelt, elektronenneutral und bidirektional. Bisher wurden 14 MCT-Isoformen bei Säugetieren identifiziert, wobei nur für die Transporter MCT 1-4 gezeigt werden konnte, dass sie Monocarboxylate transportieren [56]. Northern Blots und quantitative PCR-Analysen haben signifikante mRNA Expression von MCT1, MCT4, MCT5, MCT6, MCT8 und MCT10 in der menschlichen Plazenta gezeigt [60].

Die Arbeitsgruppe um Settle zeigte, dass MCT1 und MCT4 sowohl auf der MVM als auch der BM der humanen Synzytiotrophoblasten lokalisiert sind, wobei MCT1 vorwiegend in der BM und MCT4 in der MVM vorkommt [92]. In einer Studie an der hemochorialen Plazenta von Mäusen zeigte die Arbeitsgruppe von Nagai eine gegensätzliche Anordnung.

In der Immunhistologischen Untersuchung am Elektronenmikroskop fanden sich Goldpartikel, welche die Immunreaktivität für MCT1 anzeigen, entlang der apikalen Plasmamembran der Synzytiotrophoblast I und die Goldpartikel für MCT4 auf der basalen Plasmamembran von Synzytiotrophoblastenzellen II in Richtung der fetalen Blutgefäße. Nagai vermutete, dass diese gegensätzliche Beobachtung zur menschlichen Plazenta auf den unterschiedlichen Plazentaufbau beruht [75].

1.4 Uteroplazentare Insuffizienz führt zur IUGR

Die bereits erwähnte Vielfalt der Wachstumsdeterminanten verdeutlicht, dass intrauterin viele Störfaktoren denkbar sind, welche zu einer pathologischen Wachstumsrestriktion im Sinne einer IUGR führen können. Hierbei ist entsprechend der kindlichen Proportionierung von Kopf zu Körper eine Unterteilung in die asymmetrische Typ 1 IUGR und die symmetrische oder hypoplastische Typ 2 IUGR sinnvoll. Der Typ 1 entsteht vorwiegend in der späten Phase der Schwangerschaft, während der Typ 2 sich eher in der frühen Phase manifestiert [66]. Für eine symmetrische Wachstumsrestriktion können unter anderen chromosomale Aberrationen und kongenitale Fehlbildungen, aber auch Infektionen, besonders virale, wie Röteln oder Herpes, und Toxoplasmose verantwortlich sein, wohingegen Medikamente, insbesondere Antikoagulantien und Antikonvulsiva, Drogen, Alkohol, Toxine und Nikotin zu einer asymmetrischen Wachstumsrestriktion führen. Weitere maternale Risikofaktoren für den Typ 1 sind unter anderem Hypertension, Präeklampsie, Glomerulonephritis, Kollagenosen, Uterus- und Plazentafehlbildungen, chronische Hypoxie bei Asthma, zyanotischen Herzfehlern oder Cystischer Fibrose [74,95,99]. Tabelle 1.1 bietet einen Vergleich zwischen IUGR Typ 1 und Typ 2.

Tabelle 1.1: Vergleich zwischen IUGR Typ 1 und Typ2		
	IUGR Typ 1	IUGR TYP 2
Symmetrie	asymmetrisch	symmetrisch
Auftreten	späte Phase der Schwangerschaft	frühe Phase der Schwangerschaft
Ursachen	- Medikamente - Nikotin - Mangelernährung Uteroplazentare Insuffizienz	- chromosomale Aberrationen - kongenitale Fehlbildungen - Infektionen (insbesondere virale, wie Herpes, Toxoplasmose, Röteln)

Während in Entwicklungsländern besonders eine Fehl- oder Mangelernährung zu einer IUGR führt [44], ist die Hauptursache in industriellen Ländern die uteroplazentare Insuffizienz. Diese ist durch eine chronische Störung des Blutflusses zwischen Mutter und Fötus gekennzeichnet, welche zu einer eingeschränkten Übertragung von Nährstoffen und Sauerstoff führt [5].

1.5 Pränatale Wachstumsrestriktion ist postnatal mit Erkrankungen assoziiert

Die IUGR ist einerseits die zweit häufigste perinatale Todesursache [35], andererseits wird in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen durch IUGR erniedrigtem Geburtsgewicht und zahlreichen Erkrankungen beschrieben.

Bereits zu Beginn der 90er Jahre erweckten die Arbeitsgruppen um Hales und Barker weltweites Interesse, indem sie unter dem Begriffen des „small baby syndrome“ und der „thrifty phenotype hypothesis“ einen Zusammenhang zwischen verminderten Geburtsgewicht und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus und assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen im Sinne des metabolischen Syndroms im adulten Alter herstellten [4,47]. Mehrere Studien zeigten auch erhöhte Anfälligkeit für Hypertonie [9,40,71], erhöhte LDL-Cholesterinspiegel, sowie pulmonale Folgen, die sich beispielsweise durch ein erhöhtes Risiko für Bronchopulmonale Dysplasien [42] äußern. Außerdem zeigten Studien auch renale Auswirkungen der IUGR. Einerseits begünstigt die bereits belegte Prädisposition von Hypertonie und Diabetes mellitus vom Typ 2 bereits die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz, andererseits werden auch primär renale prädisponierende Veränderungen benannt. Es wurde gezeigt, dass die Anzahl funktionsfähiger Nephronen reduziert ist und so vorzeitigen renalen Funktionsverlust fördert. Nach der Geburt ist kein Aufholwachstum der reduzierten Zellanzahl möglich [31]. Neben einer Reduktion der Nephrone kann IUGR auch zum Verlust von weiteren Funktionen und strukturellen Einheiten führen, Studien zeigen diesen Zusammenhang bei pankreatischen Zellen und Kardiomyozyten [11]. Die IUGR kann sich folglich auf diverse Organe auswirken, allerdings erstreckt sich die Wachstumsrestriktion nicht auf alle Organe gleichermaßen. Der Zeitpunkt des Stimulus, der die IUGR bestimmt, entscheidet über die Dimension der Konsequenzen. Die sogenannte kritische Periode umschreibt die spezifische Phase, in der ein Organ oder Gewebe gekennzeichnet durch hohe Zellteilung und Zelldifferenzierung einem erhöhten Risiko ausgesetzt ist, Schaden zu erleiden [3]. Als besonders kritische Phase wird die 3. bis 8. Schwangerschaftswoche angesehen, da sich in diesem Zeitraum die meisten Organe entwickeln und es bei Störungen zu schweren Fehlbildungen kommen kann. Sofern die Exposition gegenüber dem Stimulus erst später erfolgt, treten anstatt kompletter Aplasien eher Funktionsstörungen auf.

1.6 Fetale Programmierung: Mehrere Erklärungsmodelle

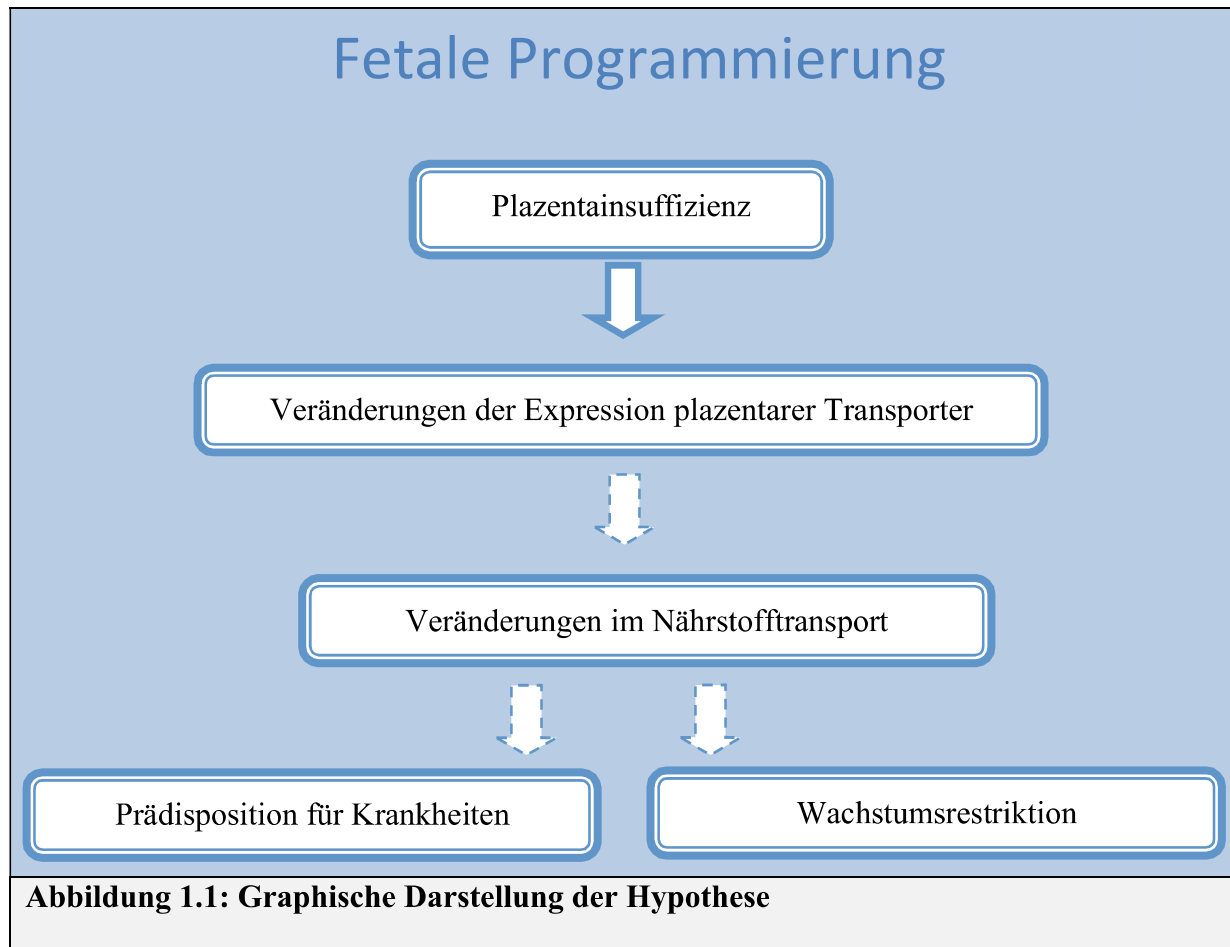
Die Erklärungsansätze für die Beobachtungen zahlreicher Studien, die einen Zusammenhang zwischen Wachstumsrestriktion und der Entwicklung von Krankheiten herstellen, werden unter dem Begriff der fetalen Programmierung zusammengefasst. Der Begriff Programmierung umschreibt dabei allgemein eine dauerhafte Veränderung von Organen, der Funktion von Organsystemen, sowie Störungen der Regelkreisläufe, die durch Stimuli in einer kritischen Periode entstehen und für Krankheit prädisponieren [83]. Bereits im Jahr 1970 führte Dörner den Begriff „intrauterine Programmierung“ ein, mit dem er den Zusammenhang zwischen einer fetalen Exposition gegenüber einem alterierten Intrauterinmilieu und dessen Langzeiteffekten beschrieb [30]. Weitere Aufmerksamkeit erlangte dieser Zusammenhang durch die Arbeiten der Arbeitsgruppe um Hales und Barker unter dem Begriff „small Baby Syndrom“ bzw. der „thrifty phenotype hypothesis“ [4,47]. Das „small Baby Syndrom“ beschreibt die Prädisposition von Kindern mit einem verringerten Geburtsgewicht für die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms. Für die Erklärung dieses Zusammenhangs bestehen mehrere Hypothesen. Die „thrifty phenotype hypothesis“ besagt, dass ein verändertes intrauterines Milieu, insbesondere ein vermindertes Nährstoffangebot für den Fetus durch mütterliche Unterernährung während der Gestation, den zugrunde liegenden Mechanismus darstellt. Die Arbeitsgruppe um Hales und Barker nahm an, dass es durch den Nährstoffmangel zu einer Wachstumsrestriktion bezüglich der Körpergröße, aber auch zu einer gestörten Entwicklung einzelner Organe, wie z.B. des Pankreas oder der Nieren komme und diese Veränderungen lebenslang anhaltende Stoffwechseländerungen bewirken. Die Änderungen sollen zu einer besseren Anpassung an ein vermindertes Nährstoffangebot führen, jedoch können sie postnatal auch zu Erkrankungen führen [4,47]. Gluckman und Hanson entwickelten das Erklärungsmodell weiter. Sie postulierten, dass sich der Fetus an das intrauterine Milieu, das unter anderen durch Nährstoffversorgung und Plazentafunktion determiniert wird, anpasst, weil er gleichwertige Lebensbedingungen postnatal, also extrauterin erwartet. Der Hypothese zufolge soll durch Anpassungsvorgänge postnatal ein Überlebensvorteil geschaffen werden. Je größer die Diskrepanz ist, umso höher ist das Risiko für Erkrankungen [6]. In diesem Zusammenhang wird auch oft von Aufholwachstum gesprochen. Studien zeigten nämlich, dass Kinder nach einer Zeit von Wachstumsverminderung oder Wachstumsstillstand zu ihrer genetisch determinierten Größe zurückkehren wollen. Es kann in jedem Alter auftreten, aber am häufigsten wird es im 2. Lebensjahr beschrieben. Studien zeigten, dass das Aufholwachstum oft in Überkompensation resultiert und der Organismus das Normalgewicht übersteigt und es

zu übermäßigen Fetteinlagerungen führt. Dieses rasche und übermäßige Wachstum wird mit der Entwicklung von Adipositas und metabolischen Syndrom assoziiert [82].

Es lässt sich zusammenfassen, dass zahlreiche Studien einen Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Geburtsgewicht und Krankheiten gezeigt haben und diese Beobachtungen durch fetale Programmierung zwar erklärt werden, der genaue Pathomechanismus allerdings noch ungeklärt ist.

1.7 Die Hypothese

Wir postulieren, dass eine experimentelle uteroplazentare Insuffizienz zu einer veränderten Expression plazentarer Transporter führt. Ein in der Folge verändertes intrauterines Nährstoffangebot könnte ein wichtiger Mechanismus sein, der sowohl eine Wachstumsrestriktion, als auch Programmierung von Erkrankungen bedingt (Abb. 1.1).



Folgende Fragen sollten daher im Einzelnen geklärt werden:

1. Führt eine experimentelle Plazentainsuffizienz zu einer veränderten Expression wichtiger Transporter auf Gen- oder Proteinebene 4h, 24h oder 72h nach Intervention?
2. Lässt sich eine zeitliche Dynamik der Transporterexpression im longitudinalen Verlauf beobachten und unterscheidet sich diese nach Intervention?

2. Methodik

Wir simulierten am Tag 19 der Gestation an trächtigen Ratten eine uteroplazentare Insuffizienz durch bilaterale Ligatur der Arteriae und Venae uterinae. Bei einer weiteren Rattengruppe wurde die Ligatur angedeutet, jedoch nicht zugezogen oder fixiert (Scheinoperation). Eine dritte Gruppe erhielt keinen Eingriff und diente als Kontrollgruppe. Anschließend wurden 4, 24 bzw. 72 Stunden nach dem Eingriff durch Sectio die föto-plazentaren Einheiten entnommen und aus dem Plazentagewebe Protein und RNA isoliert und dessen Konzentration bestimmt. Von der RNA wurde im Anschluss eine reverse Transkription durchgeführt. Zur Expressionsquantifizierung der plazentaren Transportproteine und deren codierenden Gene wurden Western Blots und Real-Time-PCR durchgeführt und die Daten mit der Software Graphpad Prism analysiert.

Da Hauptnährstoffe des Feten Glucose, Aminosäuren und Fettsäuren sind, untersuchten wir die Expression codierender Gene für drei Aminosäuretransporter, zwei Glucosetransporter und fünf Fettsäuretransporter, sowie zusätzlich für einen Monocarboxylattransporter und einen Prostaglandintransporter. Zusätzlich quantifizierten wir die Proteinexpression von je zwei Aminosäuretransportern, Glucosetransportern und Fettsäuretransportern. Tabelle 2.1 bietet eine Übersicht der ausgewählten Transporter und legt des Weiteren dar, inwiefern sich die Genbezeichnungen von den Bezeichnungen der Transportproteine unterscheiden.

Tabelle 2.1 Auswahl der plazentaren Transporter				
Gen	Protein		Real-Time-PCR	Western Blot
SLC38A1	SNAT1	Aminosäuretransporter	☑	☑
SLC38A2	SNAT2	Aminosäuretransporter	☑	☑
SLC38A4	SNAT4	Aminosäuretransporter	☑	
SLC2A1	GLUT1	Glucosetransporter	☑	☑
SLC2A3	GLUT3	Glucosetransporter	☑	☑
CD36	FAT	Fettsäuretransporter	☑	☑
FABP3	hFABP	Fettsäuretransporter	☑	☑
SLC27A1	FATP1	Fettsäuretransporter	☑	
SLC27A4	FATP4	Fettsäuretransporter	☑	
SLC16A4	MCT 5	Monocarboxylattransporter	☑	
SLCO2A1	PGT	Prostaglandintransporter	☑	

2.1 Der Tierversuch

Zur Simulation einer uteroplazentaren Insuffizienz wurde das Modell der Arteria uterina Ligatur durchgeführt. Dieses Modell wurde 1964 erstmals von Wigglesworth [97] publiziert und ist heute sehr verbreitet. Es wurde allerdings teilweise modifiziert, so dass für diese Versuchsreihe nicht mehr eine unilaterale, sondern eine bilaterale Ligatur durchgeführt wurde. Als Versuchstier wurde die Wistar-Ratte verwendet. Sie hat einen Uterus bicornus. Die Blutversorgung gewährleisten die Arteria uterina aus der Arteria iliaca interna und die Arteria ovarica aus der Aorta, die beidseits anastomosieren [34]. Ziel einer Ligatur der Arteria Uterina ist es, dass die Feten nur noch über die Arteria ovarica versorgt werden und es somit zu einer verminderten Blutversorgung der Feten kommt.

Basierend auf dem genannten Modell wurde ein experimentelles Protokoll konzipiert, nach welchem trächtige Wistar-Ratten an Tag 19 der Schwangerschaft entweder einer Ligatur-Operation nach etablierter Methode, einer Schein-Operation oder keiner Operation unterzogen worden sind. Anschließend wurden nach 4, 24 und 72 Stunden die Feten und Plazenten mittels Sectio caesarea nach ebenfalls etablierter Methode entnommen. Alle Tierversuche wurden gemäß der deutschen Vorschriften und gesetzlichen Anforderungen durchgeführt. Das experimentelle Protokoll wurde von den entsprechenden institutionellen und staatlichen Prüfungskommissionen zugelassen. Die verwendeten Materialien sind Tabelle 8.0 zu entnehmen.

Versuchsablauf

Für die Versuchsdurchführung wurden 52 trächtige Wistar-Ratten bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C, konstanter Luftfeuchtigkeit von 55% und einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden einzeln gehalten. Es bestand freier Zugang zu Wasser und Standardrattenfutter.

An Tag 19 post coitum erfolgte eine zufällige Einteilung in 3 Gruppen. Einer Gruppe (LIG) mit 20 Muttertieren wurde einer bilateralen Ligatur der Arteriae und Venae uterinae unterzogen, weitere 17 Tieren einer Scheinoperation (SOP) und die dritte Gruppe mit 15 Tieren diente als Kontrollgruppe (K), daher wurde an ihr kein Eingriff durchgeführt.

Die Ligatur-Tiere wurden für die Operation durch intramuskuläre Injektion von Midazolam (5 mg/kg) und Ketamin (100 mg/kg) anästhesiert. Teils musste ein Drittel der Dosis nachgegeben werden. Nach der Rasur des Bauches wurde eine mediane Laparotomie vorgenommen. Der Bauch wurde mit einem Lochtuch steril abgedeckt und die Uterushörner aus der Bauchhöhle gezogen. Von diesem Zeitpunkt an wurde der Uterus durchgehend mit lauwarmer, isotonischer Kochsalzlösung beträufelt. Es wurden die Arteriae und Venae

uterinae dargestellt und die fötoplazentaren Einheiten gezählt und protokolliert. Anschließend wurde an beiden Gefäßen soweit kaudal wie möglich eine Ligatur mit 6-0 Prolene Nahtmaterial angebracht (LIG). Der Verschluss der muskulären Bauchwand und der Haut erfolgte nacheinander mit 4-0 Vicryl Nahtmaterial. Bei den 11 Scheinoperation-Tieren wurde nach identischer Anästhesie und chirurgischen Verfahren das Nahtmaterial nach kurzzeitigem Anbringen direkt wieder entfernt, bevor die Bauchwand verschlossen wurde.

Innerhalb der drei Gruppen erfolgte anschließend eine erneute Einteilung. Diese bezog sich auf den Zeitpunkt, wann unter gleicher Anästhesie, wie bei der Ligatur, eine Sectio caesare durchgeführt und dabei die Feten und die Plazenta entnommen wurden. Die erste Entnahme erfolgte noch am Tag 19 post coitum und zwar 4h nach dem Eingriff. Weitere Entnahmezeitpunkte waren Tag 20, also 24 Stunden nach dem Eingriff und Tag 22 und somit entsprechend 72h nach der Operation. Der letzte Entnahmezeitpunkt entspricht mit 22 Tagen nach Befruchtung dem regulären Ende der Schwangerschaft einer Ratte.

Nach Entfernung der Eihäute wurden die Föten und die Plazenta jeweils gewogen. Die so gewonnen Daten wurden dieser Forschungsarbeit zur Verfügung gestellt. Die Plazenta wurde anschließend in der Mitte geteilt und zur Hälfte in flüssigem Stickstoff bei -80°C tiefgefroren bzw. in Formalin gelegt. Es wurden nur dann Plazenten entnommen, sofern das Muttertiere in dem betreffenden Horn mindestens 5 Feten und insgesamt mindestens sieben Feten hatte. Des

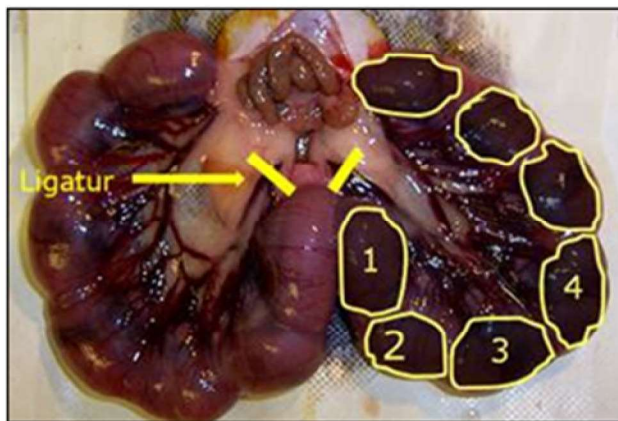


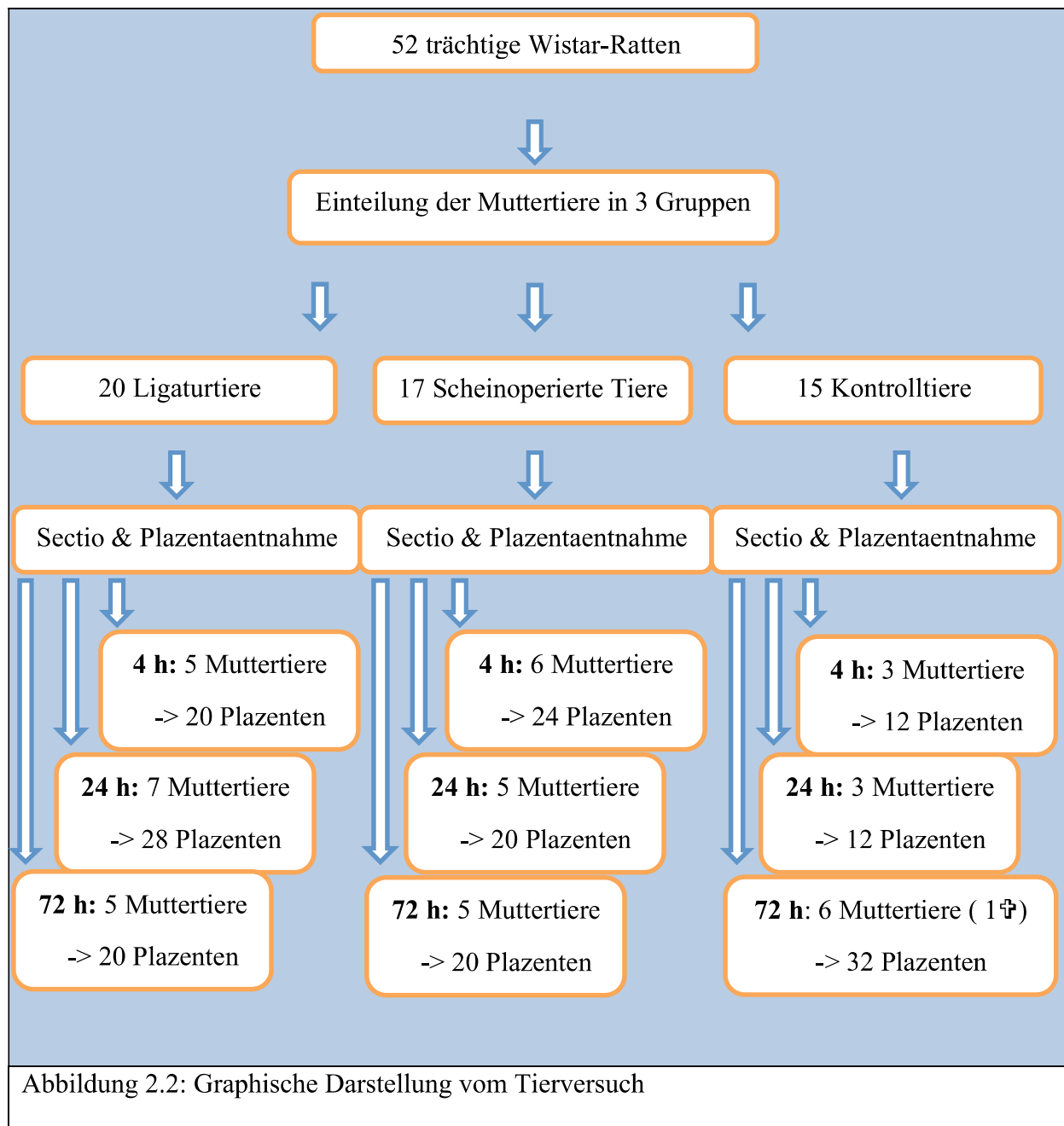
Abbildung 2.1: Darstellung beider Uterushörner mit beispielhafter Nummerierung der Föten im linken Horn, bearbeitet nach Vorlage von Nüsken et al., Endocrinology, 2008; Nüsken et al., unpublished.

Weiteren wurden nur die vier der Ligaturstelle am nächsten liegenden Feten und deren Plazenta betrachtet. Sie wurden von 1 (an Ligatur angrenzend, also kaudal) bis 4 (kranialster Fötus) durchnummeriert (siehe Abb. 2.1). Die Markierung der Position ist wichtig, weil gezeigt wurde, dass verstärkt Feten in kaudaler Position von IUGR betroffen sind [73], weil sich nach Ligatur der Vasae uterinae Kompensationsmechanismen entwickeln

und dazu führen können, dass die Feten, die entfernt von der Ligatur liegen eine verbesserte Blutversorgung haben und somit eine im Modell unerwünschte Wachstumsförderung erhalten können [75]. Die Entnahme dauerte etwa 30 Sekunden. Die Gewebequalität ließ somit sowohl eine Analyse der Proteinkonzentration der plazentaren Transporter als auch eine Messung der Expression von Zielgenen (nach RNA-Extraktion) durch quantitative RT-PCR zu. Parallel zu

der Verarbeitung der Plazenta wurde der Fetus durch Dekapitation getötet. Die Abb. 2.2 zeigt eine graphische Darstellung vom Tierversuchsablauf.

Durch die Selektion der Muttertiere nach den genannten Kriterien wurden drei Ligaturtiere, ein Scheinoperationstier und drei Kontrolltiere expliziert. Insgesamt konnten für die Versuchsdurchführung somit 188 Plazenten verwendet werden. Bei der Entnahme der Feten ist ein Muttertier der Kontrollgruppe am Tag 72 verstorben, die Plazenten verwendeten wir dennoch.



2.2 Quantifizierung der Genexpression

Zur Quantifizierung der Genexpression der plazentaren Transporter wurde die Real-Time-PCR gewählt. Um die benötigte DNA zu erhalten, wurde die aus dem Gewebe isolierte RNA nach Konzentrationsbestimmung mittels reverser Transkription umgeschrieben. Die genaue Versuchsdurchführung, sowie die theoretischen Hintergründe sind im Folgenden dargelegt. Alle für die Versuche zur Quantifizierung der Gen- und Proteinexpression verwendeten Geräte und Materialien sind im Anhang in Tabelle 8.1 aufgelistet. Chemikalien sowie speziell für einen spezifischen Versuchsteil benötigte Geräte sind gesondert aufgeführt.

2.2.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Zunächst werden Gewebestücke mit einem Gewicht von etwa 50 mg abgewonnen und in 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Gewebestücke werden mit je 1ml TRIzol Reagent versetzt und unter Zugabe von 2 Stahlkugeln für 1min bei 30 Hz in der Gewebemühle homogenisiert und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. TRIzol enthält Guanidiniumthiocyanat, dieses lysiert die Zellen und inaktiviert Enzyme und RNAsen, sowie Phenol, in welchen sich die RNA löst.

Im Folgenden wird je 100µl Chloroform zugegeben, kurz vermischt und für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Chloroform ermöglicht eine Trennung der RNA von weiteren Zellbestandteilen [24]. Die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 12000U/min und 4°C führt zur Phasentrennung. Die obere wässrige Phase enthält RNA, die Mittlere DNA und die untere Phase beinhaltet Chloroform und Proteine. Der RNA enthaltende Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250µl Isopropanol versetzt und gut gemischt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis und 15 minütiger Zentrifugation bei 4°C wird das RNA-haltige Präzipitat als Pellet sichtbar. Nach Beendigung der Zentrifugation kann die gesamte Lösung abgegossen werden. Verbleibende Reste werden abgesaugt. Das Pellet wird mit 500µl 75%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 15000U/min und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Ethanolüberstandes wird das RNA-haltige Pellet für 30-60 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend je nach Größe in 20-300µl DEPC-Wasser (Diethylenpyrocarbonat in Aqua dest.) gelöst. Die Konzentration der so gewonnenen RNA kann mit dem Tecan Nano Quant infinite M200 PRO bestimmt werden.

Die für die RNA-Isolation verwendeten Chemikalien fasst Tabelle 8.2 zusammen.

2.2.2 Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten Ribonukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten Ribonukleinsäuren mittels Photometrie dient als Grundlage für eine exakte Berechnung der einzusetzenden Menge an Nukleinsäurelösung bei der reversen Transkription.

Nukleinsäuren absorbieren in Abhängigkeit von ihrer Konzentration ultraviolettes Licht der Wellenlänge 250 – 270nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 260nm liegt. Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz weisen Nukleinsäuregemische bei der Wellenlänge 260nm eine der Nukleinsäurekonzentration proportionale Extinktion (A) auf. Einer Absorption bei 260nm (A_{260}) von 1,0 entspricht eine Konzentration von 40µg/ml RNA. Anhand dieser Gesetzmäßigkeit lässt sich dementsprechend durch die Absorption die RNA-Konzentration bestimmen. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei $\lambda=280\text{nm}$. Der Quotient der Extinktion $A(260\text{nm}) / A(280\text{nm})$ ist somit ein Maß der Reinheit eines Nukleinsäuregemisches und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte unterhalb von 1,8 deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin [73].

Versuchsablauf:

Zur Messung der RNA wird das Gerät Nano Quant infinite M200 PRO von Tecan verwendet, welches zunächst mit 2µl DEPC Wasser geeicht wird, sogenanntes Blanking. Anschließend werden je 2µl der RNA-Proben auf die Quarz-Probenhalterung aufgetragen und die optische Dichte bei $\lambda=260\text{nm}$ (OD_{260}) und $\lambda=280\text{nm}$ (OD_{280}) gemessen. Die für die RNA-Konzentrationsbestimmung verwendeten Materialien und Geräte fasst Tabelle 8.3 zusammen.

2.2.3 Reverse Transkription

Zur Herstellung einer für die PCR verwendbaren DNA aus messenger RNA (mRNA) ist es die Durchführung einer reversen Transkription nötig. Durch eine semikonservative Replikation entsteht ein RNA-DNA Hybrid. Die so erzeugte DNA wird als complementary DNA (cDNA) bezeichnet und dient als Matrize für die PCR.

Versuchsablauf:

Abhängig vom vorher photometrisch bestimmten RNA-Gehalt wird entsprechend DEPC-Wasser zugegeben, um eine Konzentration von 1 µg RNA/26 µl Probe zu erreichen.

Für die weitere Durchführung werden zunächst 4 Ansätze, bestehend aus einem DNase-Verdau, Stopsolution und 2 Mastermixen hergestellt. Die verwendeten Reagenzien fasst Tabelle 8.4 zusammen und Tabelle 8.5 zeigt die genauen Mengenangaben, um die Ansätze für 1 µg RNA herzustellen.

Als Erstes wird noch vor der reversen Transkription ein DNase-Verdau zur RNA hinzugefügt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine eventuelle Kontamination mit DNA zu verhindern. Der Verdau wird durch die Zugabe von EDTA und einer 15 minütigen Inkubation im Heizblock bei 65°C gestoppt. Anschließend wird die Probe mit dem Mastermix A versetzt und für fünf Minuten bei 70°C inkubiert. Die im Mastermix enthaltenden Random- und Oligo(dT)Primer dienen als Startpunkt für die Polymerase. Randomprimer haben eine zufällige Sequenz und lagern damit an einer zufälligen Stelle der RNA an. Oligo(dT)Primer enthalten Thymidin-Nukleotide und hybridisieren am polyadenylierten 3'-Ende der mRNA. Nach der Inkubation des Mastermix A folgt eine einminütige Abkühlung auf Eis bevor der Mastermix B hinzugefügt wird. In dem Mastermix B befindet sich das Enzym Reverse Transkriptase aus dem „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MMLV RT) [73]. Es ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die durch den Einbau von Desoxynukleosid-Triphosphaten die Synthese von cDNA ermöglicht. Nach einer erneuten Inkubation bei diesmal 37°C für 1 Stunde und einer Kühlung für eine Minute auf Eis ist die Reverse Transkription beendet. Die gebildete äquimolare Menge der cDNA wird anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

2.2.4 TaqMan-Real-Time-PCR

Als Ergebnis der reversen Transkription erhält man eine Vielzahl an überwiegend doppelsträngig vorliegenden DNA-Fragmenten. Von Interesse sind allerdings nur die Genabschnitte, welche für die auserwählten plazentaren Transporter codieren. Eine Vervielfältigung dieser Zielsequenz ermöglicht die Polymerasenkettenreaktion (PCR), da sie ein semikonservatives in-vitro DNA Amplifikationsverfahren ist. Zusätzlich basiert die Real-time-PCR nicht wie die klassische PCR auf Endpunktmessung, sondern zeigt den Amplifikationsverlauf in Echtzeit auf und bildet somit die Grundlage für die Quantifizierung der gesuchten Frequenz. Wir verwenden das 7500 Real time PCR System von Applied Biosystems. Alle verwendeten Geräte sind in Tabelle 8.6 dargestellt.

Für die Durchführung der Real-time-PCR werden Forward Primer, Reverse Primer und Sonde benötigt. Letzteres wird bei der klassischen PCR nicht gebraucht. Die drei Oligonukleotide lassen sich entsprechend der gesuchten Zielsequenz von verschiedenen Anbietern käuflich erwerben. Unsere Auswahl ist der Tabelle 8.7 zu entnehmen. Die Primer sind komplementär zu den 3'-Enden der spezifischen DNA-Sequenzen und haben eine Länge von etwa 16-30 Basen. Sie dienen als Ansatzpunkt für die zugegebene DNA-Polymerase, welche von da aus DNA-Abschnitte in 5'Richtung des Ursprungstranges amplifiziert. Entsprechend des Anlagerungsortes unterscheidet man den forward Primer, welcher von 3' Ende des zur RNA-Matrize komplementären cDNA-Stranges hybridisiert, von dem reverse Primer, der die Synthese eines komplementären DNA-Stranges in entgegengesetzter Richtung zur ursprünglichen RNA-Matrize veranlasst. Die Sonde unterscheidet sich von den Primern. Sie wird so gewählt, dass sie zur Zielsequenz komplementär ist und so zwischen den beiden Primer hybridisiert und am 3'Ende phosphoryliert ist, damit sie nicht selbst durch die Polymerase verlängert werden kann. Des Weiteren hat die Sonde zwei Farbstoffe. Sie trägt am 5'Ende den sogenannten Reporter, der ein Fluoreszein-Derivat ist und am 3'Ende den Quencher, ein Rhodamin-Derivat. In der vorliegenden Arbeit wurden 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporter und 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) als Quencher gewählt.

Zusätzlich zu den Primern und den Sonden muss für die Durchführung des Taqman ein Mastermix zusammengestellt werden. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 8.8 dargestellt. Tabelle 8.9 gibt die Mengenangaben an, um aus Mastermix, Sonde sowie den Primern und der cDNA ein Gesamtvolumen von 25 µl zu erreichen.

Der Mastermix wird aus 10-fachen Taq-Buffer, Rox, dNTP-Mix, MgCl, AmpliTaqgold, AmperaseUNG und H2O hergestellt. ROX ist ein passiver Referenzfarbstoff, der störende

Fluktuationen der Fluoreszenz ausgleicht. Durch Zusatz der Amperase UNG (Uracil-N-Glykosylase) zu den PCR-Ansätzen wird eine Kontamination mit PCR-Produkten aus vorherigen Aufarbeitungen vermieden. In den für die Real Time-PCR eingesetzten dNTPs (Nukleotidtriphosphaten) wird Uracil (dUTP) statt Thymin (dTTP) verwendet, so dass die Uracil-N-Glykosylase die Uracil-enthaltenden Produkte abbaut, während Thymin enthaltende cDNAs nicht angegriffen werden. AmpliTaq Gold ist eine hitzestabile DNA Polymerase. Das $MgCl_2$ dient der AmpliTaq Gold-Polymerase als Cofaktor und stabilisiert die Bindung der Sonde. Die ideale $MgCl_2$ -Konzentration muss für alle Primer ausgetestet werden, indem Messungen mit den Magnesium-Konzentrationen von 2,5 μM bis 5,0 μM durchgeführt werden. Die Konzentration, welche in der Messung den niedrigsten Ct-Wert ergibt, wird für den Mastermix gewählt.

Des Weiteren wird zur absoluten Quantifizierung die Standardkurvenmethode verwendet. Der Standard wird einmalig vor dem Beginn der TaqMan-Versuchsreihen hergestellt. Er besteht zu gleichen Anteilen aus allen cDNA-Proben, und wird im Verhältnis von 1:1 mit HPLC Wasser gemischt. Es wird eine 1:2 Verdünnungsreihe erstellt, so dass man Verdünnungen von 1:1 bis 1:128 erhält.

Für die weitere Durchführung der Real-time-PCR wird eine 96-Well Reaction Plate verwendet. In jedes Well werden 22,5 μl Mastermix und 2,5 μl der vorgesehenen cDNA bzw. 2,5 μl der Verdünnungsreihe pipettiert. Für jede Verdünnung wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Well Reaction Plate wird anschließend mit Optical Adhesive Covers gut verschlossen, so dass die Messung im 7500 Real time PCR System von Applied Biosystems beginnen kann.

Der Thermocycler durchläuft folgende Zyklen: 2 Minuten bei 50°C, 10 Minuten bei 95°C und anschließend 40 Zyklen mit 10 Sekunden lang 95°C und dann 60°C für 1 Minute. Bei 50°C wird die Uracil-N-Glykosylase und bei 95°C die AmpliTaq Gold aktiviert. Während der 40 Zyklen findet die eigentliche Polymerasenkettenreaktion statt. Bei 95°C erfolgt das sogenannte Melting, wobei die DNA durch Temperaturerhöhung denaturiert wird. In der Annealing-Phase kühlt das Reaktionsgemisch auf 60°C ab, so dass die zu den 3'-Enden der beiden DNA-Einzelstränge komplementären Primer auf den jeweiligen Matrizen hybridisieren und somit den Startpunkt für die DNA-Synthese festlegen. Im darauffolgenden Schritt (Extension) bei weiterhin 60°C verknüpft die DNA-Polymerase in 3' $\rightarrow$ 5' Richtung die einzelsträngige DNA mit den vorliegenden Desoxyribonukleosid-Triphosphaten zu einem Doppelstrang. Vom forward-Primer aus wird so ein zur RNA-Matrize identischer, vom reverse-Primer aus ein zur RNA-Matrize komplementärer Strang synthetisiert. Diese Schritte

werden vielfach wiederholt, wodurch sich eine Verdopplung der Ausgangs-DNA (Template) in „n“ Zyklen eine exponentielle Vermehrung mit einem Faktor von theoretisch 2^n ergibt. Allerdings begrenzt zu Beginn der PCR die geringe Menge und am Ende unter anderem die abnehmende Enzymaktivität und eine geringe Menge an verfügbaren Nukleotiden die Arbeit der Polymerasen, so dass der Multiplikationsfaktor schwankt.

Zur Detektion der amplifizierten DNA-Abschnitte wird, wie bereits erwähnt, eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt. Diese hat am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff und einen Quencher am 3'-Ende. Solange die Sonde intakt ist wird die Fluoreszenz des Reporters durch die Nähe zum Quencher aufgrund des sogenannten Fluoreszenzresonanzenergietransfers unterdrückt. Wenn die Zielgensequenz in der cDNA vorhanden ist, bindet die Sonde während des Annealings und wird während der Extension durch die 5'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase gespalten. Durch die Trennung von Reporter und Quencher steigt das Fluoreszenzsignal des Reporters. Je höher die Kopienanzahl des Zielgens zu Beginn ist, desto früher ist eine signifikante Fluoreszenzverstärkung festzustellen.

Der sogenannte Threshold Cycle drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird, weil bis zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung noch exponentiell wird, bevor es durch obengenannte Faktoren wie abnehmende Enzymaktivität zu einem linearen Wachstum kommt. Um auf die ursprüngliche Templatmenge zurückzuschließen wird die Standardreihe genutzt. Die parallele Amplifikation dieser bekannten Templatmengen ermöglicht durch deren Ct-Werte die Erstellung einer Standardkurve. Aus dieser Standardkurve lässt sich dann umgekehrt aus einem Ct-Wert auf die Templatmenge schließen.

2.3 Quantifizierung der Proteinexpression

Auserwählte Transporterexpressionen untersuchten wir zusätzlich zur Genebene auch auf Proteinebene. Die Proteine werden aus dem Gewebe isoliert, deren Konzentration bestimmt und anschließend mittels Western Blot quantifiziert.

2.3.1 Proteinisolation

Die dafür verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 8.10 aufgelistet. Zunächst wird ein Proteinextraktions- (PE-)Puffer hergestellt. Der Proteinextraktions- (PE-)Puffer besteht aus 6,65M Urea, 10% Glycerol, 1%SDS und 10mM Tris pH 6,8. Dann werden zu 5ml PE-Puffer 50µl 0,5M DTT und 50µl 50mM PMSF zugegeben, so dass ein PE-PIC-Puffer entsteht. Jeweils 200 µl Proteinextraktions-PIC-Puffer werden mit etwa 40mg von dem Gewebe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mithilfe von Minimörsern homogenisiert. Nach dieser groben Zerkleinerung folgt bei 50%Energie eine Sonifizierung mit 3 mal 10 Zyklen für je 10 Sekunden, um die Zellwände und Membranen zu zerstören und die Proteine freizusetzen. Daraufhin werden die Proben für 60 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 15 Minuten bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert. Danach werden die Proben nochmals bei 50% Energie dreimal 10 Zyklen für 10 Sekunden sonifiziert und für 1h auf Eis inkubiert. Anschließend können sie bei -80°C eingefroren werden.

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Messung der Proteinkonzentration wird ebenso wie bei der RNA-Konzentrationsbestimmung der Tecan Nano Quant infinite M200 PRO verwendet. Die Bestimmung ist für die Durchführung eines Western Blots essentiell. Alle verwendeten Reagenzien und Geräte sind in Tabelle 8.11 gelistet.

Die Proteinbestimmung wird nach der kalorimetrischen BCA-Methode mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{+2} zu Cu^{+1} durch Proteine in einem alkalischen Medium (Biuret-Reaktion) [85]. Die dabei entstehenden Cu-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, der bei 562nm photometrisch messbar ist. Dieser Komplex zeigt eine Absorption des UV-Lichts bei 562nm, die über einen weiten Arbeitsbereich nahezu linear mit

steigender Proteinkonzentration zunimmt. Über die lineare Regression lässt sich so relativ zu einer BSA-Eichkurve die Proteinkonzentration ermitteln.

Für die Probenpipettierung wird eine 96-well-Platte genutzt. In das erste Well wird nur 1:10 in Aqua dest. verdünnter PE Puffer pipettiert, der hier gemessene Wert wird als Blank bezeichnet. In das Zweite werden 25µl Bovine Serum Albumin aus dem KIT mit der gleichen Menge ,1:10 mit VE-Wasser verdünnten, PE+PIC-Puffer zusammenpipettiert. Davon wurden wiederum 25µl in das nächste Well pipetiert. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt, so dass am Ende die Verdünnungsreihe bis 1:32 reichte. Aus den mit diesen Gemischen gemessenen Werten kann die Eichgrade erstellt werden. Sowohl für die Eichwerte als auch für die Proben werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde alle im Verhältnis 1:10 mit dem bereits 1:10 in Aqua dest. verdünnten PE-Puffer verdünnt. In jedes Well wurde zunächst 10µl Probe und dann 200µl working reagent hinzugefügt. Dieses wird aus den zwei im KIT enthaltenden Reagenzien im Verhältnis von 1:50 hergestellt. Sobald alle Proben und die Eichwerte pipettiert sind erfolgt bei 37°C ein 30 minütige Inkubation im Tecan Nano Quant infinite M200 PRO und eine Messung der Extinktion bei 562 nm.

Zur Auswertung wird aus allen Doppelbestimmungen zunächst der Mittelwert gebildet. Aus der Eichkurve lässt sich nun eine Funktion erstellen, in welche die Messwerte nach Subtraktion des Blank-Wertes eingesetzt werden können. Mit dieser Funktion lässt sich aus der optischen Dichte die Konzentration berechnen, allerdings muss diese anschließend noch mit zehn multipliziert werden, da die Proben zuvor verdünnt worden sind.

2.3.3 Western Blot

Die vorrangegangene Proteinisolation aus dem Gewebe ermöglicht es auserwählte Transporter zusätzlich zur Genebene mittels Western Blot auch auf Proteinebene nachzuweisen. Die Transporterauswahl ist Tabelle 2.1 zu entnehmen. Es wurden Proben von fetoplazentaren Einheiten von der Position 2 verwendet. Die Nummerierung erfolgte nach dem in Abbildung 2.1 dargestellten Prinzip. Nach der Auftrennung der Proteingemische mittels Gelelektrophorese, ermöglicht der Western Blot den Nachweis des gesuchten Proteins. Beim Blotten werden die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran übertragen und es kann anschließend ein Nachweis mittels Antikörpern erfolgen. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind Tabelle 8.12 zu entnehmen. Zunächst werden die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen, die nicht von Antikörpern erkannt werden können, mit Bovinen Serumalbumin blockiert. Dann wird die Membran mit einem

spezifischen Primärantikörper gegen das nachzuweisende Protein inkubiert. Die Detektion des gebundenen Primärantikörpers erfolgt in einem zweiten Schritt mit einem Sekundärantikörper, der an Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase = HRP) konjugiert ist und welcher spezifisch den bereits gebundenen Erstantikörper erkennt. Um anschließend das Protein mit den daran gebundenen Primär- und Sekundärantikörpern zu detektieren wird die Membran mit einem Substrat für die HRP versetzt (ECL-Lösung), welches durch enzymatische Umsetzung eine Lichtreaktion verursacht. Die abgegebene Chemilumineszenz wird im ChemiDoc XRS+ gemessen und kann mit der Image Lab Software ausgewertet werden. Die genaue Durchführung des Proteinnachweises ist im Folgenden dargelegt.

Gelelektrophorese

Wir verwenden SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach Lämmli. Hierbei handelt es sich um ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen, einem Trenngel (feinporig, unten) und einem Sammelgel (grobporig, oben), die sich beide im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden.

Als erstes wird zwischen zwei, in einem Gelgießstand vertikal ausgerichtete, abgedichtete Glasplatten Trenngel (10% bzw. 12%) und oben darüber nach Aushärtung Sammelgel gegossen. In letzteres werden mit Hilfe eines Kamms Taschen zur Probenbefüllung eingesetzt. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wird der Rahmen in eine Elektrophoresekammer überführt und das fertige Gel mit Lämmli-Puffer überschichtet. Der Probenkamm wird entfernt und die Taschen mit demselben Puffer gut durchgespült. In die erste Tasche werden 25µl Größenmarker und in die nächsten Taschen werden je 25µl Probe pipettiert. Die Proben bestehen aus 80µg Protein in 20µl PE-Puffer mit 5µl 5-fachen Probenpuffer. Die Kammer wird anschließend verschlossen und das Sammelgel bei 80Volt durchlaufen, dann das Trenngel bei 120Volt. Die Proteine trennen sich so nach Größe bzw. Molekulargewicht auf. Tabelle 8.13 bietet eine Übersicht über die Bestandteile der Gele und Puffer und listet alle für die Gelelektrophorese verwendeten Geräte und Reagenzien auf.

Der Blot

Die aufgetrennten Proteine werden mittels Semidry-Verfahren in einer Blotkammer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen [68]. Alle verwendeten Reagenzien und Geräte sind

Tabelle 8.14 zu entnehmen. Die Bestandteile der Puffer sind in Tabelle 8.15 dargelegt. Die Nitrocellulosemembran wird zuerst 1 min in VE Wasser und dann zusammen mit Papierfiltern für 1 Stunde bei 4°C in 20% Methanol in einfach konzentriertem Towbin Puffer equilibriert. Bei der Anordnung des Gels und der Membran in der Blotkammer muss beachtet werden, dass die Proteine in dem SDS-Polyacrylamidgel durch das SDS negativ geladen sind und daher in Richtung Anode wandern. Im Boden des Blotters befindet sich die Anode, daher folgt auf zwei Whatmanpaper zunächst die Membran und dann das Gel, das von zwei weiteren Whatmanpapern bedeckt ist. Ist das Gelsandwich komplett zusammengesetzt, kann der Sicherheitsdeckel mit Kathodenplatte aufgesetzt werden und die Blotkammer mit einer Spannungsquelle verbunden werden. Es wird für zwei Stunden bei 1,2mA/cm² geblottet. Zur Kontrolle des Transfers werden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen nach dem Western Blot für 2 min. mit Ponceau Färbelösung angefärbt. Der Farbstoff lässt sich mit Wasser abwaschen. Dann werden die Membran für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit 5% Milch in TBST und 2% BSA blockiert. Anschließend wird die Membran zusammen mit dem ersten Antikörper zur Inkubation in einen zurechtgeschnittenen Gefrierbeutel gefüllt und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Am nächsten Morgen wird der Beutel zunächst 30 min weiter bei Raumtemperatur geschwenkt, bevor die Membran entnommen und Membran 3-mal für je 10 min mit TBST gewaschen wird. Danach wird der Blot mit dem Zweit-Antikörper in Folie eingeschweißt und schwenkend für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Antikörperentfernung aus der Folie und erneutem 3-maligen Waschen mit TBST für je 10 min, wird die Membran durch Abziehen der Flüssigkeit an einer Folie nach Möglichkeit getrocknet. Entwickelt werden die Blots mit ECL (12,5µl Solution B und 987,5µl Solution A). Auf jeden Blot wird 1ml ECL verteilt und dieser eine Minute damit inkubiert. Danach wird das ECL abgestreift und der Blot in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die abgegebene Chemilumineszenz wird im ChemiDoc XRS+ gemessen. Die Belichtungszeit unterscheidet sich je nach Antikörper. Sofern der Blot für den Nachweis eines weiteren Transportproteins verwendet werden soll, ist es möglich den Blot zu strippen, das heißt alle auf der Membran gebundenen Antikörper zu entfernen, um einen neuen Erst-Antikörper aufzutragen. Dafür wird die Membran mit dem Strippingpuffer in Folie eingeschweißt und für 50 Minuten bei 56°C in ein Wasserbad gelegt. Nach dreimaligen Waschen mit TBST für je 10 Minuten, wird die Membran erneut für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit 5% Milch in TBST und 2% BSA blockiert. Danach kann sie wieder erneut mit einem 1. Antikörper über Nacht inkubiert werden.

2.4. Statistische Datenauswertung

Die Quantifizierung der Expression der Transporter auf Gen- und Proteinebene mit anschließender Durchführung statistischer Testverfahren ermöglicht die Prüfung unserer Hypothese, dass eine experimentelle uteroplazentare Insuffizienz zu einer veränderten Expression plazentarer Transporter führt.

Folgende Fragen sollten anhand der statistischen Auswertung geklärt werden:

1. Führt eine experimentelle Plazentainsuffizienz zu einer veränderten Expression wichtiger Transporter auf Gen- oder Proteinebene 4h, 24h oder 72h nach Intervention?
2. Lässt sich eine zeitliche Dynamik der Transporterexpression im longitudinalen Verlauf beobachten und unterscheidet sich diese nach Intervention?

Zur Prüfung der ersten Fragestellung werden die Interventionsgruppen innerhalb eines Zeitpunktes verglichen, um so veränderte Expressionen in Abhängigkeit der Intervention erkennen zu können.

Die zeitliche Dynamik der Transporterexpression im longitudinalen Verlauf wird analysiert, indem die Genexpression je Interventionsgruppe zu dem Zeitpunkt 4h und 24, so wie 24h mit 72h verglichen wird.

2.4.1 Auswertung der Realtime-PCR

Zur Datenauswertung der Realtime-PCR werden die CT-Werte der Amplifikation der Verdünnungsreihe verwendet und daraus eine Standardkurve erstellt. Diese ermöglicht es, aus den CT-Werten der zu untersuchten Proben auf die ursprünglich vorhandene DNA-Menge zurück zu rechnen.

Zusätzlich wird aus dem gleichen Gewebe eine Realtime-PCR-Messung von einem Housekeepinggen durchgeführt. Darunter versteht man Gene, deren Produkte für den Zellerhalt grundsätzlich notwendig sind. Da deren Genprodukte ständig in gleichbleibender Menge bereitgestellt werden müssen, werden die entsprechenden Gene weitgehend unabhängig von anderen Einflüssen auf relativ konstantem Niveau transkribiert. Für die Auswertung der vorliegenden Daten wurde das Porphobilinogen-deaminase-Gen (PBGD) gewählt. Durch die absolute Quantifizierung sowohl eines Ziel- als auch eines Housekeepinggenes, kann durch Bildung des Quotienten der beiden Startkopienzahlen eine relative Quantifizierung erfolgen.

Diese Quotienten werden als Daten für die weitere Auswertung verwendet. Zur Identifizierung möglicher Ausreißer wird der Grubbs'-test verwendet, welcher auf der Webseite von Graphpad.com angeboten wird. Als Signifikanzlevel wird 0,05 gewählt. Die meisten Datensätze dieser vorliegenden Arbeiten enthalten keine Ausreißer. Die weitere Auswertung erfolgt mit der Statistiksoftware GraphPad Prism.

Zunächst werden in das Statistikprogramm GraphPad Prism die entsprechenden Datensätze, nach Gen, Interventionsgruppe (LIG, SOP, K) und Entnahmezeitpunkt (4h, 24h, 72h) geordnet, eingegeben.

Beschreibende Statistik und die Frage nach der Normalverteilung

Als erstes wird für jede Gruppe das Minimum, der Median, das Maximum, der Mittelwert, die Standardabweichung und das 95%ige Konfidenzintervall des Mittelwertes bestimmt. Im Anschluss wird mittels Kolmogorov-Smirnov Test die Nullhypothese, dass der Datensatz einer Gauß'schen Normalverteilung entspricht, geprüft. Die weitere statistische Auswertung hängt davon ab, ob es sich um einen normalverteilten Datensatz handelt oder nicht.

Normalverteilte Datensätze

Sofern alle drei zu vergleichenden Datensätze normalverteilt sind, wird eine one-way-ANOVA (One way analysis of variance) durchgeführt. Die Null-Hypothese ist hierbei, dass es keinen Genexpressionsunterschied zwischen den Gruppen gibt. Als Signifikanzniveau wird 0,05 festgelegt. Bei signifikantem Unterschied wird als post-test ein Bonferroni's multiple comparisons test durchgeführt. Bei signifikantem Unterschied im ANOVA mit post-test wird noch ergänzend ein ungepaarter t-test durchgeführt.

Nicht normalverteilte Datensätze

Sofern nicht alle Datensätze normalverteilt sind, wird ein Kruskal-Wallis Test angewendet. Bei Signifikanz folgt als post-test ein Dunn's multiple comparisons test. Bei signifikantem Unterschied im Kruskal-Wallis Test mit post-test wird noch ergänzend ein Mann-Whitney-test durchgeführt.

Graphische Darstellung

Die Datensätze aller Gruppe zu allen 3 Zeitpunkten eines Gens werden abschließend in einer Abbildung als Boxplots graphisch dargestellt. Zusätzlich werden die signifikanten p-Werte des ungepaarten t-tests bzw. Mann-Whitney-tests in die graphische Darstellung eingefügt.

2.4.2 Auswertung der Western Blots

Zur Auswertung der Blots wird die Image Lab Software genutzt. Sie ermöglicht es, aus der mit dem ChemiDoc XRS+ gemessenen Chemilumineszenz die Quantität zu bestimmen. Zusätzlich zum Transporterprotein wird auf jedem Blot auch ein von einem Housekeepinggen codiertes Protein quantifiziert. Für die vorliegende Arbeit wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Der Quotient aus der Quantität des Transportproteins und der GAPDH wird für die Auswertung mittels GraphPad Prism verwendet. Aufgrund der geringeren Probenanzahl wird auf einen Grubbs' test verzichtet.

Wie bei der Auswertung der Realtime-PCR erfolgt zunächst für jede Gruppe die Bestimmung von Minimum, Median, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung und dem 95%igen Konfidenzintervall des Mittelwertes. Im Anschluss wird mittels Kolmogorov-Smirnov Test die Nullhypothese, dass der Datensatz einer Gauschen Normalverteilung entspricht, geprüft.

Bei normalverteilten Datensätzen erfolgt auch hier ein ANOVA mit bei Signifikanz folgendem Bonferroni's multiple comparisons test und ungepaartem t-test.

Entsprechend wird bei nicht normalverteilten Datensätzen ein Kruskal-Wallis Test mit bei Signifikanz folgendem Dunn's multiple comparisons test und Mann-Whitney-test durchgeführt. Zur Graphischen Darstellung wird ein Streudiagramm mit eingezeichnetem Mittelwert verwendet. Auch hier werden die signifikanten p-Werte des ungepaarten t-tests bzw. Mann-Whitney-tests in die graphische Darstellung eingefügt.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden elf Transporter untersucht. Zum quantitativen Nachweis der codierenden Gene wurde eine Real-Time PCR durchgeführt, zusätzlich wurden sechs der codierten Transportproteine mittels Western Blot untersucht. Eine genaue Übersicht bietet Tabelle 2.1.

3.1 Aminosäurentransporter

Aminosäuren sind für den Feten nicht nur für die Proteinsynthese von Bedeutung, sondern unter anderen auch für den Energiemetabolismus. Aufgrund der vielfältigen Relevanz haben wir drei Aminosäurentransporter untersucht. Wir betrachteten die Genexpression von SLC38A1, SLC38A2 und SLC38A4, welche entsprechend für die Transporter SNAT1, SNAT2 und SNAT4 codieren. Zu den beiden Erstgenannten wurden zusätzlich Western Blots durchgeführt.

3.1.1 SNAT1 wird genetisch durch SLC38A1 codiert

Auf Genebene wird SNAT1 durch SLC38A1 codiert, dessen Expression wurde mittels Real-time-PCR quantifiziert. Die Durchführung verlief komplikationslos, so dass die Genexpression in 188 Plazenten quantifiziert werden konnte. Durch die Anwendung des „Grubbs’ test“ wurde je ein Ausreißer der Gruppen SOP 24h, K 24h, LIG 72h, SOP 72h, und K 72h eliminiert. Da der „Kolmogorov-Smirnov test“ eine Normalverteilung für alle Datensätze ergab, erfolgte sowohl der Vergleich der Gruppen innerhalb eines Zeitpunktes, als auch der longitudinale Vergleich, mittels „one-way ANOVA“ mit „Bonferroni’s multiple comparisons test“ als Post-hoc-test. Bei Signifikanz folgte ein ungepaarter t-test.

3.1.1.1 24h nach Ligatur ist die Expression von SLC38A1 vermindert

Die „one-way ANOVA“ mit Post-hoc-test ergab einen signifikanten Expressionsunterschied zwischen den Tieren der Gruppen LIG 24h und K 24h. Im ungepaarten t-Test wurde ein P-Wert von 0,0029 bezüglich der geringeren Expression in der Gruppe LIG 24h gegenüber K 24h ermittelt (Tabelle 3.1, Abb. 3.1).

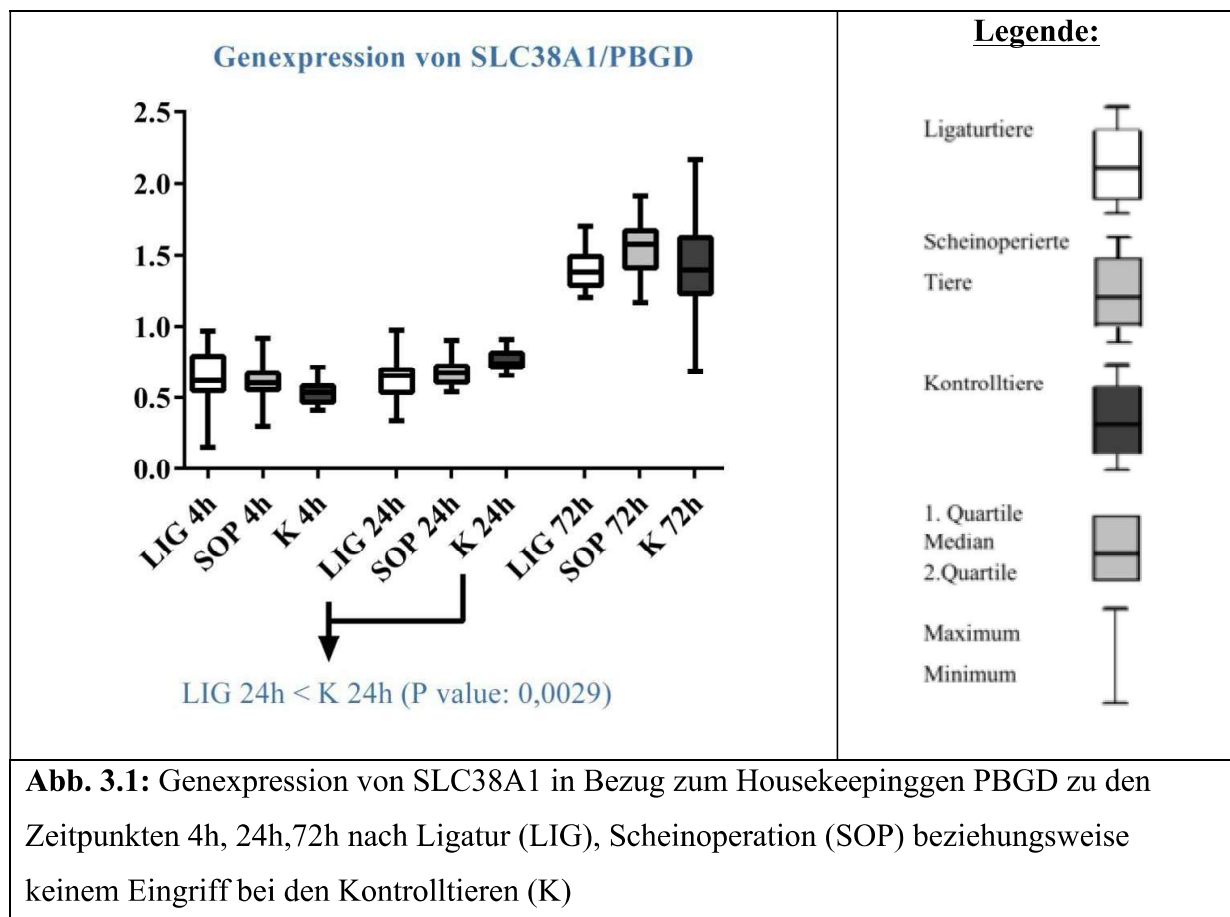


Tabelle 3.1. Expressionsvergleich von SLC38A1 zwischen LIG, SOP und K									
	LIG 4h	SOP 4h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	20	24	12	28	19	11	19	19	31
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Nicht signifikant			0,0055 Ja			Nicht signifikant		
Bonferronis multiple comparsions test				LIG vs. K= **					
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)				LIG < K 0,0029					

3.1.1.2 SLC38A1 Expressionzunahme ist kurz nach LIG und SOP gehemmt

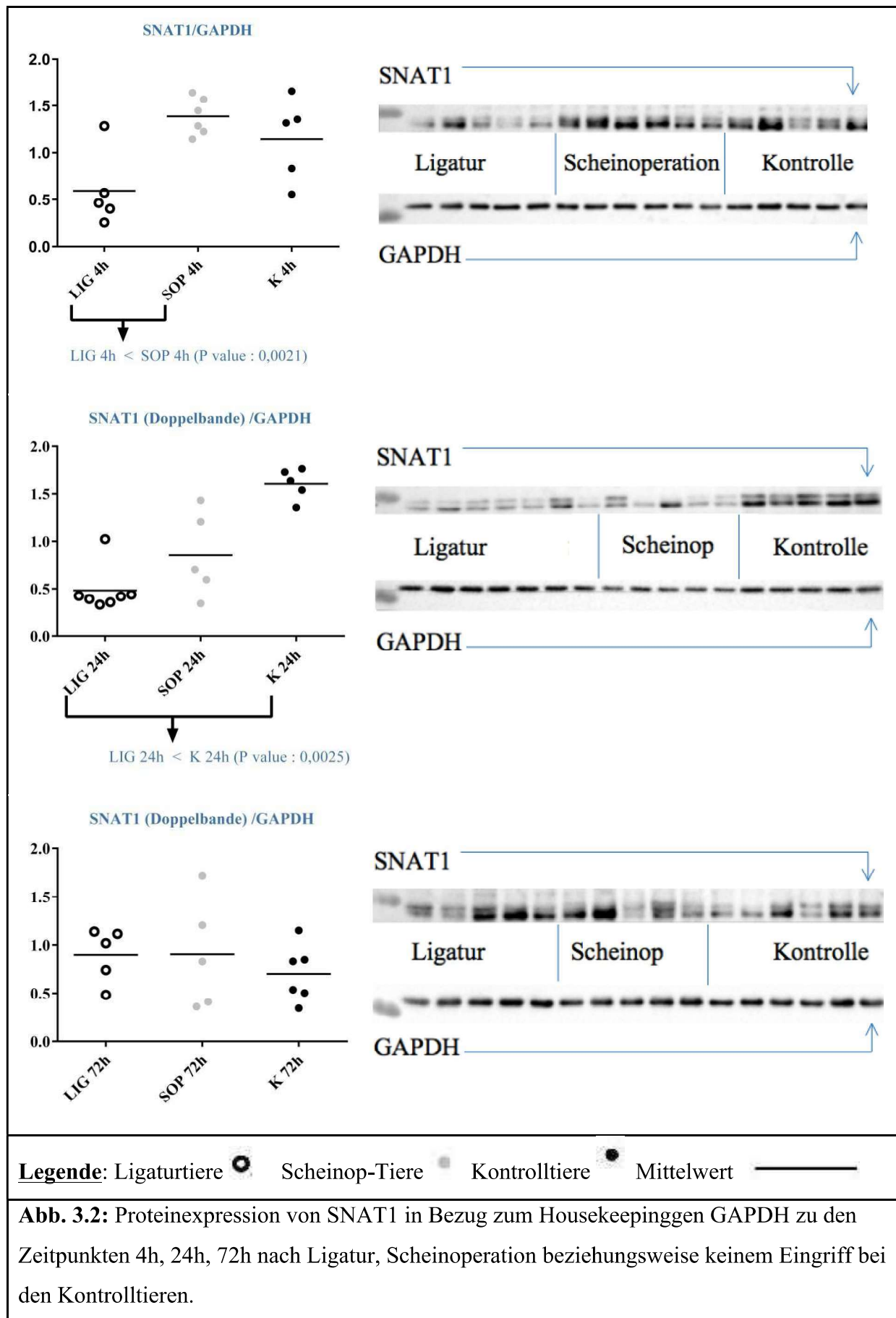
Während die Expression in allen Gruppen am Tag 22 höher als am Tag 20 war, konnte eine signifikante Zunahme der Genexpression zwischen den Zeitpunkten 4h und 24h lediglich bei den Kontrolltieren festgestellt werden (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2. SLC38A1: LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturgruppe	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	< 0,0001 Ja	< 0,0001 Ja	<0,0001 Ja
Bonferronis multiple comparsions test	24h vs. 72h=****	24h vs. 72h= ****	4h vs. 24h= * 24h v s. 72h= ****
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	24h<72h <0,0001	24h < 72h < 0,0001	4h < 24h < 0,0001 24h < 72h <0,0001

3.1.1.3 SNAT1-Expression 4h nach Ligatur vs. SOP vermindert, nach 24h vs. K

Das Molekulargewicht von SNAT1 beträgt 55kDa. Der Western Blot zeigt entsprechend eine Doppelbande knapp unterhalb der Markierung für 55kDa. Die weitere Auswertung bezieht sich auf den Datenvergleich von beiden Banden. Eine zum Vergleich durchgeführte Einzelauswertung der Banden ergab die gleichen signifikanten Unterschiede. Bei Normalverteilung der Datensätze der Zeitpunkte 4h und 72h wurde „one-way ANOVA“ mit „Bonferronis multiple comparisons test“ genutzt (Tab. 3.3). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen LIG 4h und SOP 4h. Der ungepaarte t-Test ergab für die im Vergleich verminderte Expression der Ligaturgruppe einen P-Wert von 0,0021 (Abb. 3.2). Wegen fehlender Normalverteilung der Gruppe LIG 24h, wurden die Gruppen zu diesem Zeitpunkt mit nicht parametrischen Testverfahren verglichen. Der „Kruskal-Wallis test“ mit „Dunn’s multiple comparisons test“ als Post-hoc-test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen LIG 24h und K 24h. Der „Mann-Whitney-test“ ergab einen P-Wert von 0,0025 bezüglich der verminderten Expression nach Ligatur (Tabelle 3.3, Abb. 3.2).

Tabelle 3.3 Expressionsvergleich von SNAT1 zwischen LIG, SOP und K									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	5	6	5	7	5	5	5	5	6
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0,05$	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	0,0085 Ja						Nein		
Bonferronis multiple comparisons test	LIG vs. SOP= **								
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	LIG < SOP= ** 0,0021								
Kruskal-Wallis test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)				0,0007 Ja					
Dunn’s multiple comparisons test				LIG vs. K= **					
Mann-Whitney test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)				LIG < K 0,0025					



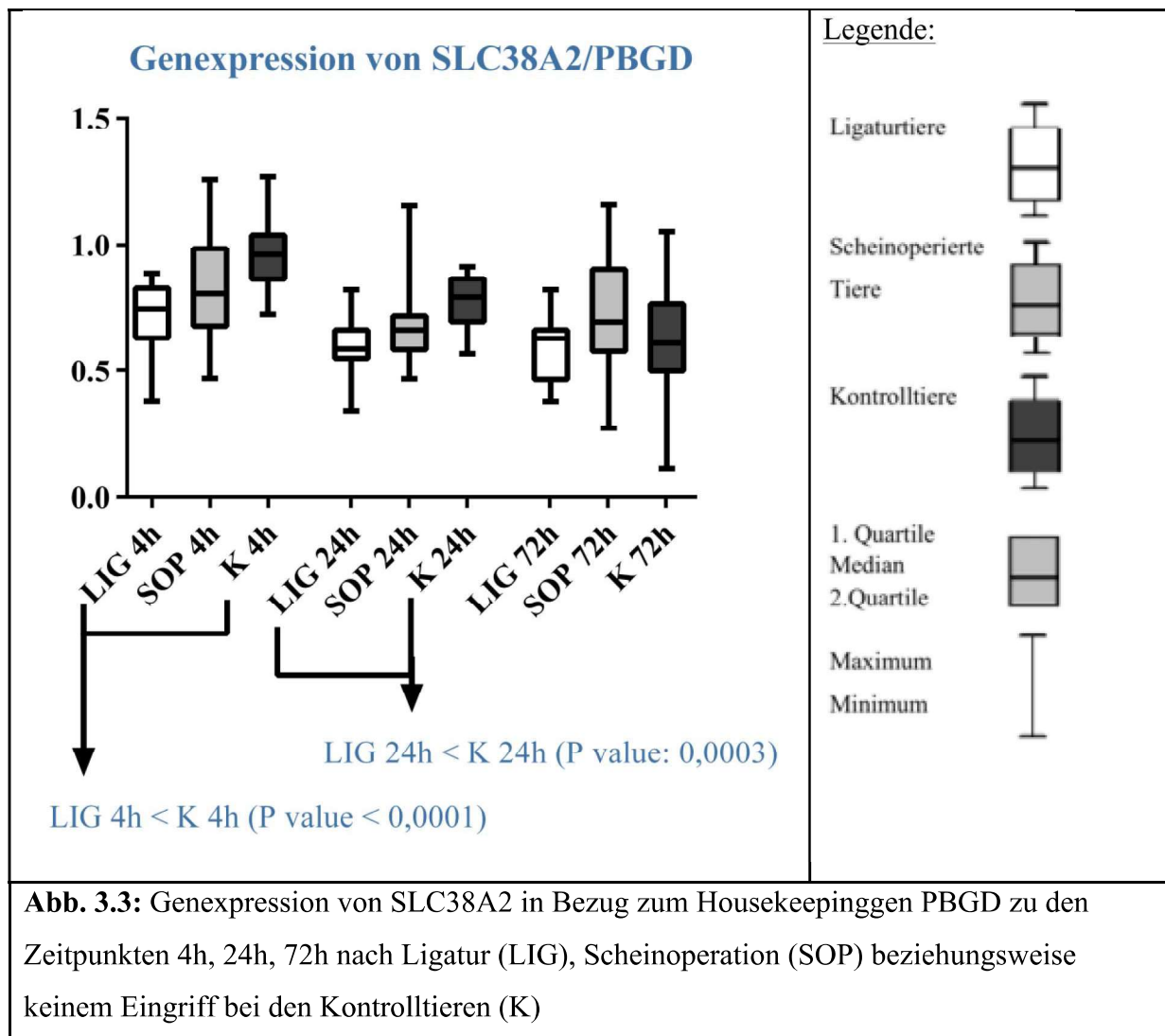
3.1.2 SNAT2 wird genetisch durch SLC38A2 codiert

Der Transporter SNAT2 wird durch SLC38A2 genetisch codiert. Bei der Quantifizierung der Genexpression mittels Real-time-PCR zu den Zeitpunkten 24h und 72h ergab sich ein technisches Problem bei der Messung, welches dazu führte, dass einige Daten nicht verwertet werden konnten. Durch die Anwendung des „Grubbs’ test“ wurde zusätzlich je ein Ausreißer der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 4h und der Scheinoperationsgruppe zum Zeitpunkt 24h entfernt. Insgesamt konnten somit 172 Daten verwendet werden, welche nach „Kolmogorov-Smirnov“ normalverteilt waren. Entsprechend erfolgte die weitere statistische Auswertung mit „one-way ANOVA“, sowie „Bonferroni’s multiple comparisons test“ als Post-hoc-test.

3.1.2.1 SLC38A2 Expression ist 4h und 24h nach Ligatur vs. K vermindert

Der Vergleich der Gruppen innerhalb der Zeitpunkte, zeigte sowohl an Tag 19, als auch Tag 20 in der Ligaturgruppe gegenüber der Kontrollgruppe eine verminderte Expression von SLC38A2 (entsprechend SNAT2 auf Genebene). Im ungepaarten t-test ergab sich für den Unterschied zum Zeitpunkt 4h ein P-Wert von <0,0001 und zum Zeitpunkt 24h ein P-Wert von 0,0003 (Tabelle 3.4, Abb. 3.3).

Tabelle 3.4 Expressionsvergleich von SLC38A2 zwischen LIG, SOP und K									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	20	24	11	25	17	11	19	17	28
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha = 0,05$	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	0,0007 Ja			0,0023 Ja			Nein		
Bonferronis multiple comparisons test	LIG vs. K= ***			LIG vs. K= **					
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	LIG < K <0,0001			LIG < K 0,0003					



3.1.2.2 SLC38A2-Expressionsabnahme zwischen den Zeitpunkten 4h und 24h

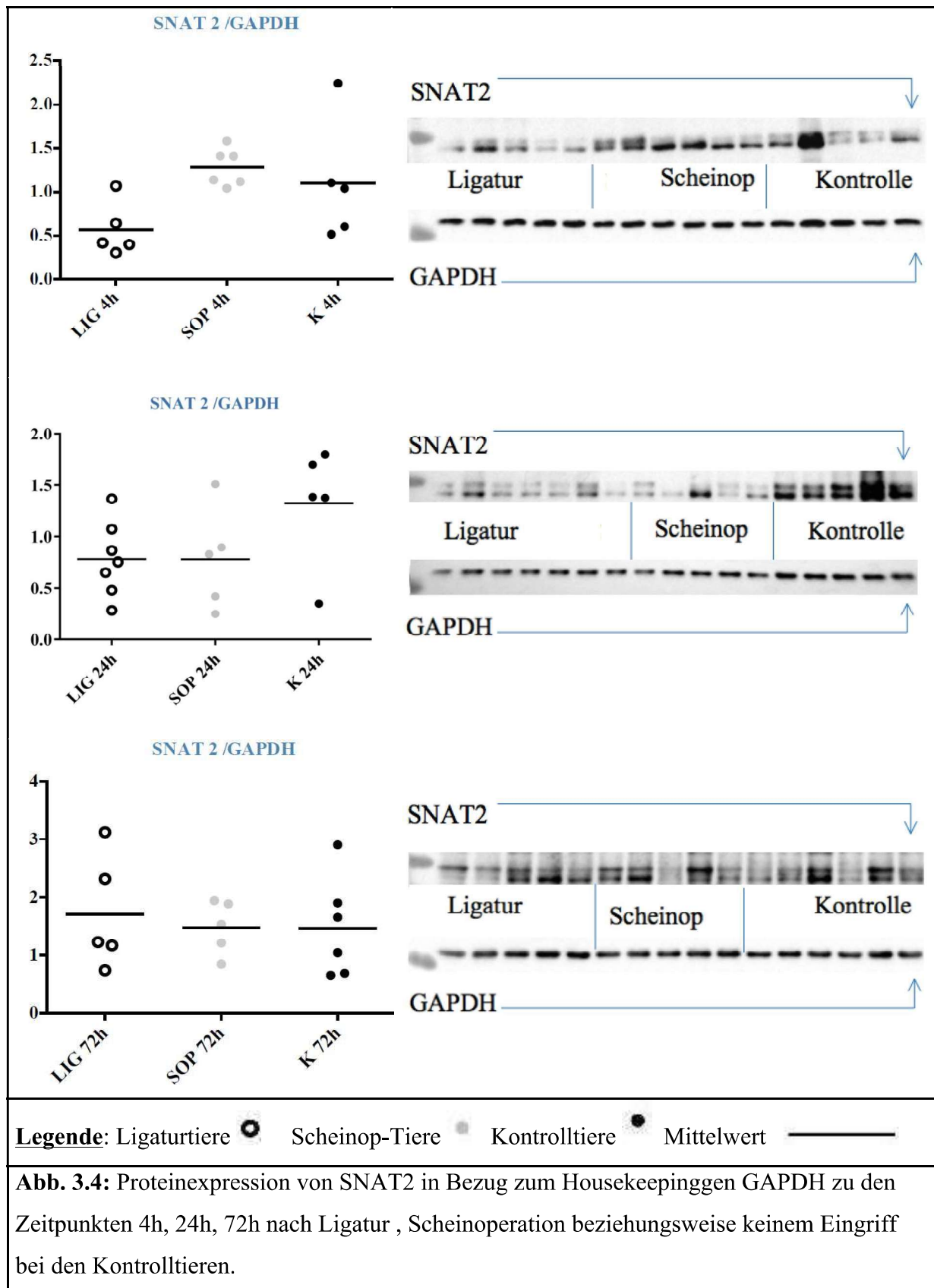
Die Datenauswertung im longitudinalen Verlauf mit „one-way ANOVA“ und Post-hoc-test zeigte, dass die Expression an Tag 20 in jeder Gruppe geringer als an Tag 19 war (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5. SLC38A2: LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturgruppe	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
ANOVA	0,0015	0,0218	<0,0001
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Ja	Ja	Ja
Bonferronis multiple comparsions test	4h vs.24h= **	4h vs.24h= *	4h vs.24h= *
Ungepaarter t-test	4h > 24h < 0,0012	4h > 24h < 0,0049	4h > 24h < 0,0012
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)			

3.1.2.3 Keine signifikanten SNAT2-Expressionunterschiede auf Proteinebene

Das Molekulargewicht von SNAT2 beträgt 60 kDa. Der Western Blot zeigte eine Doppelbande, welche sich knapp unterhalb der Markierung für 55 kDa darstellte (Abb. 3.4). Die weitere Auswertung bezog sich auf den Datenvergleich von beiden Banden. Eine zum Vergleich durchgeführte Einzelauswertung der Banden ergab die gleichen Ergebnisse. Bei den normalverteilten Datensätzen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der „one-way ANOVA“, welcher jedoch die Kriterien des Post-hoc-tests nicht erfüllen konnte (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6 Übersicht der Statistischen Auswertung der Expression von SNAT 2									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	5	6	5	7	5	5	5	5	6
Kolmogorov-Smirnov test	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Normalverteilung? $\alpha =0,05$									
ANOVA	0,0493								
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Ja			Nein			Nein		
Bonferronis multiple comparsions test	Keine Signifikanz								



3.1.3 SNAT4 wird genetisch durch SLC38A4 codiert

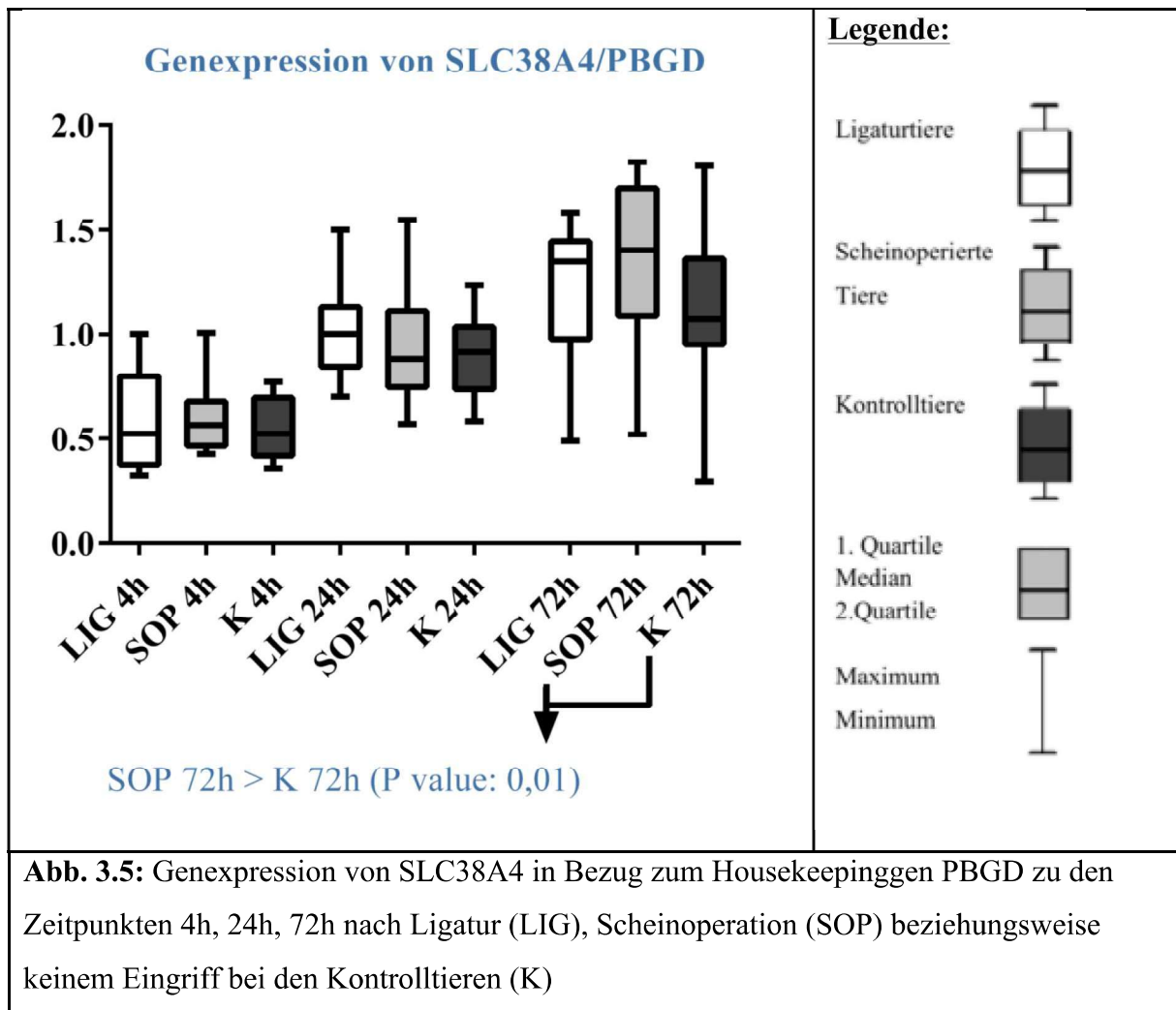
SNAT4 wird durch SLC38A4 genetisch codiert. Durch die Anwendung der „Grubbs´test“ wurde je ein Wert aus folgenden Gruppen ausgeschlossen: LIG 4h, K4h, LIG 24h, SOP 24h, SOP 72h und K 72h. Weitere Daten mussten aufgrund technischer Probleme bei der Real-time-PCR zum Zeitpunkt 4h eliminiert werden. Insgesamt wurden 168 Daten ausgewertet.

Bei den durch Realtime-PCR erhaltenen Datensätzen bestanden die Expressionsergebnisse von SOP 24h nicht den Normalitätstest nach „Kolgomorov Smirnov“, so dass für diesen Zeitpunkt ein nicht-parametrisches Testverfahren genutzt wurde. Die anderen Gruppen hatten alle einen normalverteilten Datensatz.

3.1.3.1 SLC38A4-Expressionszunahme 72h nach Scheinoperation vs. Kontrolle

Sowohl die „one-way ANOVA“, als auch der Post-Hoc-Test zeigte einen Unterschied zwischen SOP 72h und K 72h. Auch im ungepaarten t-test zeigte sich ein P-Wert von 0,01 für die signifikant höhere Expression von SLC38A4 nach Scheinoperation (Abbildung 3.5, Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 Statistischen Auswertung der Expression von SLC38A4									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	17	17	6	27	19	12	20	19	31
Kolmogorov-Smirnov test									
Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA				Nein			0,0290		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							Ja		
Bonferronis multiple comparsions test							SOP vs. K= *		
Ungepaarter t-test							SOP > K		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							0,01		
Kruskal-Wallis test	Nein								
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)									



3.1.3.2 SLC38A4-Expressionszunahme im longitudinalen Verlauf

Die Expression von SLC38A4 ist bei allen Gruppen im longitudinalen Verlauf signifikant zunehmend. Am Tag 20 ist die Expression entsprechend signifikant kleiner als am Tag 22 und signifikant größer als am Tag 19. Bei der Scheinopgruppe wurde aufgrund fehlender Normalverteilung im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen ein nicht parametrisches Testverfahren zur Auswertung genutzt (Tab. 3.8).

Tabelle 3.8 SLC38A4: LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturgruppe	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Normalverteilt	Nicht normalverteilt	Normalverteilt
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	<0,0001 Ja		<0,0001 Ja
Bonferronis multiple comparsions test	4h v. 24h = **** 24h vs. 72h = **		4h vs. 24h * 24h vs. 72h *
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	4h < 24h < 0,0001 24h < 72h < 0,0045		4h < 24h = 0,0009 24h < 72h = 0,015
Kruskal-Wallis test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		<0,0001 Ja	
Dunn's multiple comparsions test		4h vs. 24h = ** 24h vs. 72h = *	
Mann Whitey test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		4h < 24h < 0,0001 24h < 72h = 0,0001	

3.1.4 Aminosäurentransporter werden nach Ligatur zunächst herunterreguliert

In der Zusammenschau der untersuchten Aminosäurentransporter zeigte sich eine verminderte Expression nach Ligatur (Tab. 3.9). Während SNAT1 sowohl auf Gen- als auch Proteinebene 24h nach Ligatur geringer exprimiert wurde, zeigte SNAT2 nur auf Genebene (SLC38A2)

Tabelle 3.9 Übersicht der signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen			
	4h	24h	72h
SLC38A1	-	LIG < K	-
SNAT1	LIG < SOP	LIG < K	-
SLC38A2	LIG < K	LIG < K	-
SNAT2	-	-	-
SLC38A4	-	-	SOP > K

eine Herunterregulation. Im Übrigen war SNAT1 (Proteinebene) 4h nach Ligatur signifikant weniger exprimiert als bei SOP. Hingegen war SNAT4 auf Genebene (SLC38A4) 72h nach SOP signifikant höher exprimiert als bei K.

3.1.5 Expression steigt bei SLC38A1 und SLC38A4 und sinkt bei SLC38A2

Die Expression von SNAT4 auf Genebene (SLC38A4) ist im longitudinalen Verlauf bei allen Gruppen ansteigend (Tab.3.10). Bei SNAT1 ist die Genexpression (SLC38A1) zum Zeitpunkt 72h bei allen Gruppen signifikant höher als am Tag 20. Eine signifikante Expressionssteigerung zwischen den Zeitpunkten 4h und 24 ist nur bei den Kontrolltieren zu

Tabelle 3.10 Übersicht der AS-Transporter-Expression im longitudinalen Verlauf			
	4h	24h	72h
SLC38 A1	K 4h < K 24h		K 24h < K 72h SOP 24h < SOP 72h LIG 24h < LIG 72h
SLC38A2	K 4h > K 24h SOP 4h > SOP 24h LIG 4h > LIG 24h		
SLC38A4	K 4h < K 24h SOP 4h < SOP 24h LIG 4h < LIG 24h		K 24h < K 72h SOP 24h < SOP 72h LIG 24h < LIG 72h

erkennen. Die Expressionszunahme ist nach einem Eingriff also gehemmt. Im Gegensatz zu SNAT1 (SLC38A1) und SNAT4 (SLC38A4) ist die SNAT2-Genexpression (SLC38A2) zum Zeitpunkt 4h in allen Gruppen signifikant höher als zum Zeitpunkt 24h.

3.2 Glucosetransporter

Glucose ist eine sehr wichtige Energiequelle für den Fetus. Aufgrund der Relevanz untersuchten wir zwei Glucosetransporter und zwar GLUT1 und GLUT3. Es wurde mittels Western Blot die Proteinexpression bestimmt und zusätzlich die entsprechende Genexpression von SLC2A1 und SLC2A3.

3.2.1 GLUT1 wird genetisch durch SLC2A1 codiert

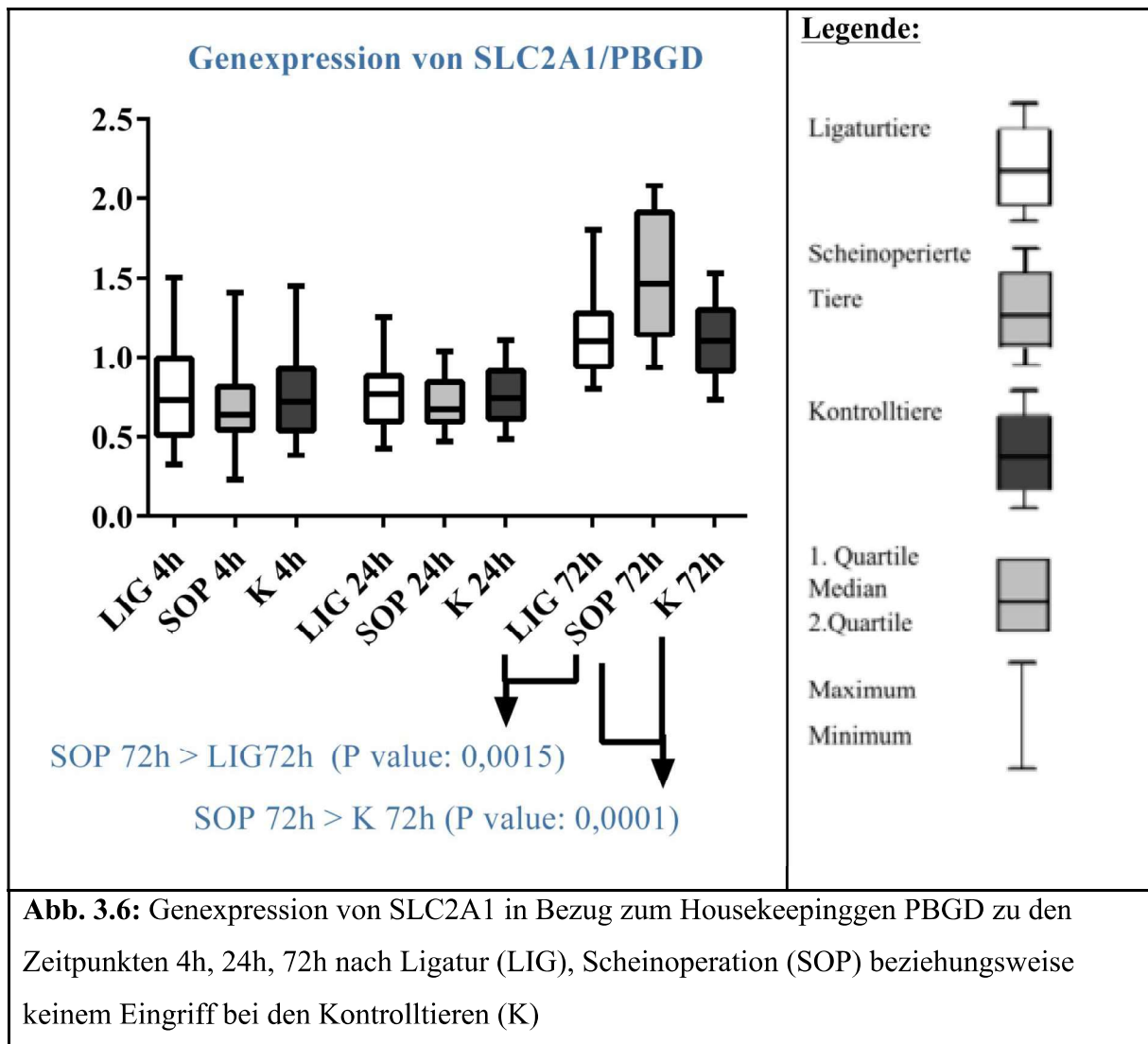
Der Glucosetransporter GLUT1 wird durch das Gen SLC2A1 codiert. Die Quantifizierung der Genexpression mittels Real-time-PCR verlief komplikationslos, so dass 188 Expressionswerte ermittelt werden konnten, allerdings wurde im Folgenden durch Anwendung des „Grubbs’ test“ je ein Ausreißer der Gruppen K 24h und SOP 72h eliminiert (Tabelle 3.11).

Da der Datensatz der Ligaturgruppe vom Tag 22 nicht normalverteilt war, wurde der „Kruskal-Wallis test“ mit „Dunns multiple comparisons test“ als Post-hoc-Test gewählt um die Gruppen untereinander am Tag 22 und die Ligaturgruppen im longitudinalen Verlauf zu vergleichen. Bei Signifikanz folgte ein „Mann-Whitney test“ (Tab. 3.11).

Tabelle 3.11 Statistischen Auswertung der Expression von SLC2A1									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
Probenanzahl	20	24	12	28	20	11	20	19	32
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	0,5675 Nein			0,6055 Nein					
Kruskal-Wallis test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							$\approx 0,0005$ Ja		
Dunn’s multiple comparisons test							LIG vs. SOP= ** SOP vs. K= ***		
Mann-Whitney test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							SOP > LIG 0,0015 SOP > K 0,0001		

3.2.1.1 SLC2A1-Expression ist 72h nach Scheinoperation vs. K und LIG erhöht

Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe SOP 72h mit beiden anderen Gruppen. Der „Mann-Whitney test“ ergab für die gesteigerte Genexpression von SOP 72h gegenüber LIG 72h einen P-Wert von 0,0015 und gegenüber K 72h einen P-Wert von 0,0001 (Abbildung 3.6, Tabelle 3.11).



3.2.1.2 SLC2A1-Expressionszunahme zwischen Zeitpunkt 24h und 72h

Die Expression von SLC2A1 ist bei allen Gruppen am Tag 22 signifikant höher als am Tag 20. Die P-Werte betrugen weniger als 0,0001 (Tabelle 3.12).

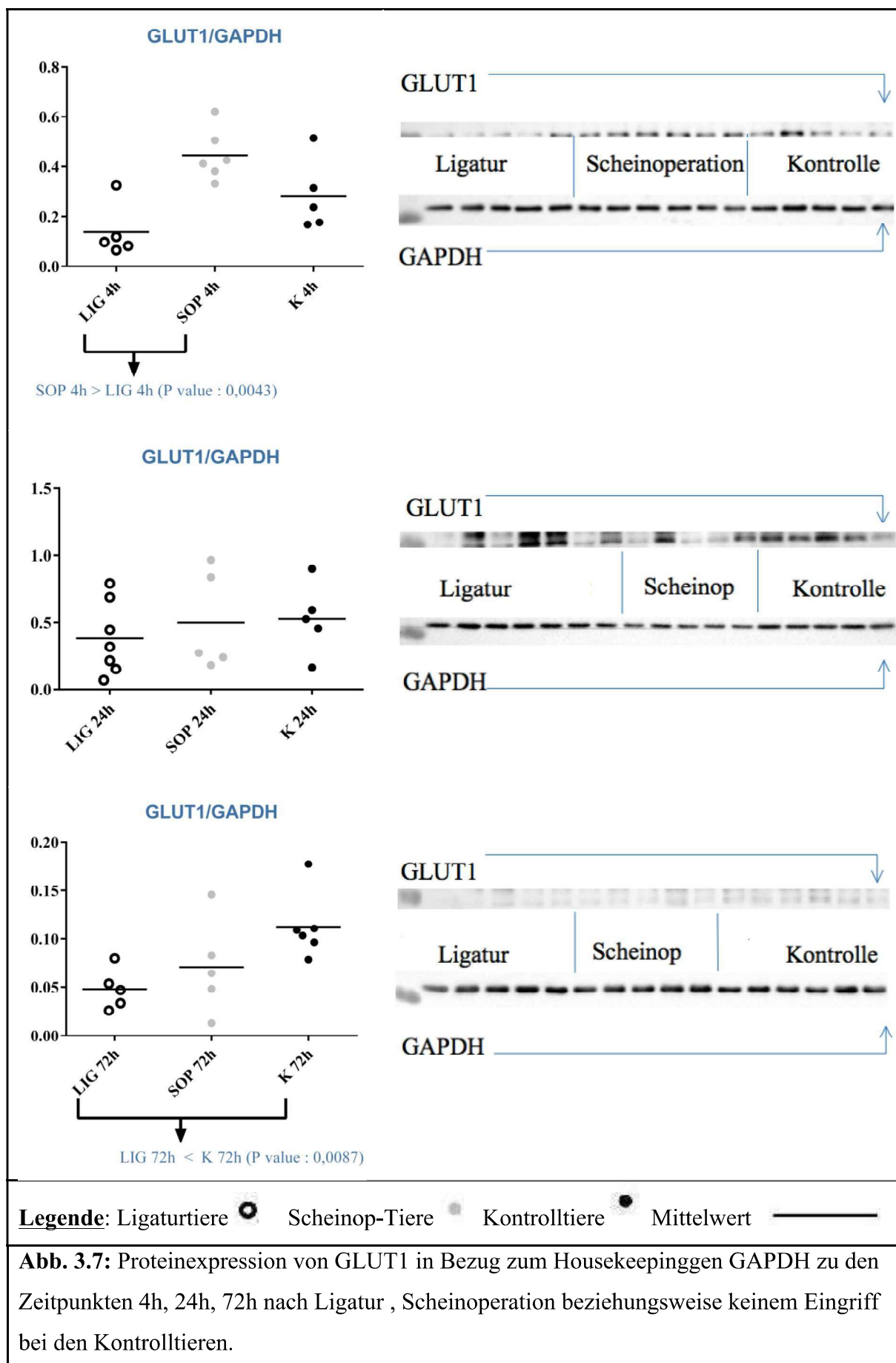
Tabelle 3.12 SLC2A1: LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturtiere	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? ($\alpha=0.05$)	Nicht normalverteilt	Normalverteilt	Normalverteilt
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		< 0,0001 Ja	< 0,0001 Ja
Bonferronis multiple comparsions test		24h vs. 72h ****	24h vs. 72h ***
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		24h < 72h < 0,0001	24h < 72h < 0,0001
Kruskal-Wallis test Signifikanz?($\alpha=0.05$)	< 0,0001 Ja		
Dunn´s multiple comparsions test	24h vs. 72h ****		
Mann Whitey test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	24h < 72h <0,0001		

3.2.1.3 GLUT1-Expression ist 72h nach Ligatur vermindert

GLUT1 hat ein Molekulargewicht von 55kDa. Bei unserem Western Blot zeigte sich eine Bande auf Höhe der 70kDa Markierung.

Da die Datensätze der Proteinexpression von LIG 4h und K 72h nicht normalverteilt sind, wird entsprechend ein „Kruskal-Wallis test“ mit entsprechendem „Dunn’s multiple comparisons test“ als Post-hoc-Test durchgeführt. Zum Zeitpunkt 4h gab es eine signifikant erhöhte Expression von GLUT1 in der Gruppe der scheinoperierten Tiere im Vergleich zu den Ligaturtieren. Der P-Wert im Mann-Whitney-test betrug 0,0043. Zum Zeitpunkt 72h war die Expression bei den Ligaturtieren hingegen signifikant gegenüber den Kontrolltieren reduziert. Der P-Wert im Mann-Whitney-test betrug 0,0087 (Tabelle 3.13, Abbildung 3.7).

Tabelle 3.13 Statistischen Auswertung der Expression von GLUT1									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
Probenanzahl	5	6	5	7	5	5	5	5	6
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Ja			Nein			Ja		
Kruskal-Wallis test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	0,0027 Ja						0,0208 Ja		
Dunn’s multiple comparsions test	LIG vs. SOP= **						LIG vs. K= *		
Mann-Whitey-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	SOP > LIG 0,0043						LIG < K 0,0087		



3.2.2 GLUT3 wird genetisch durch SLC2A3 codiert

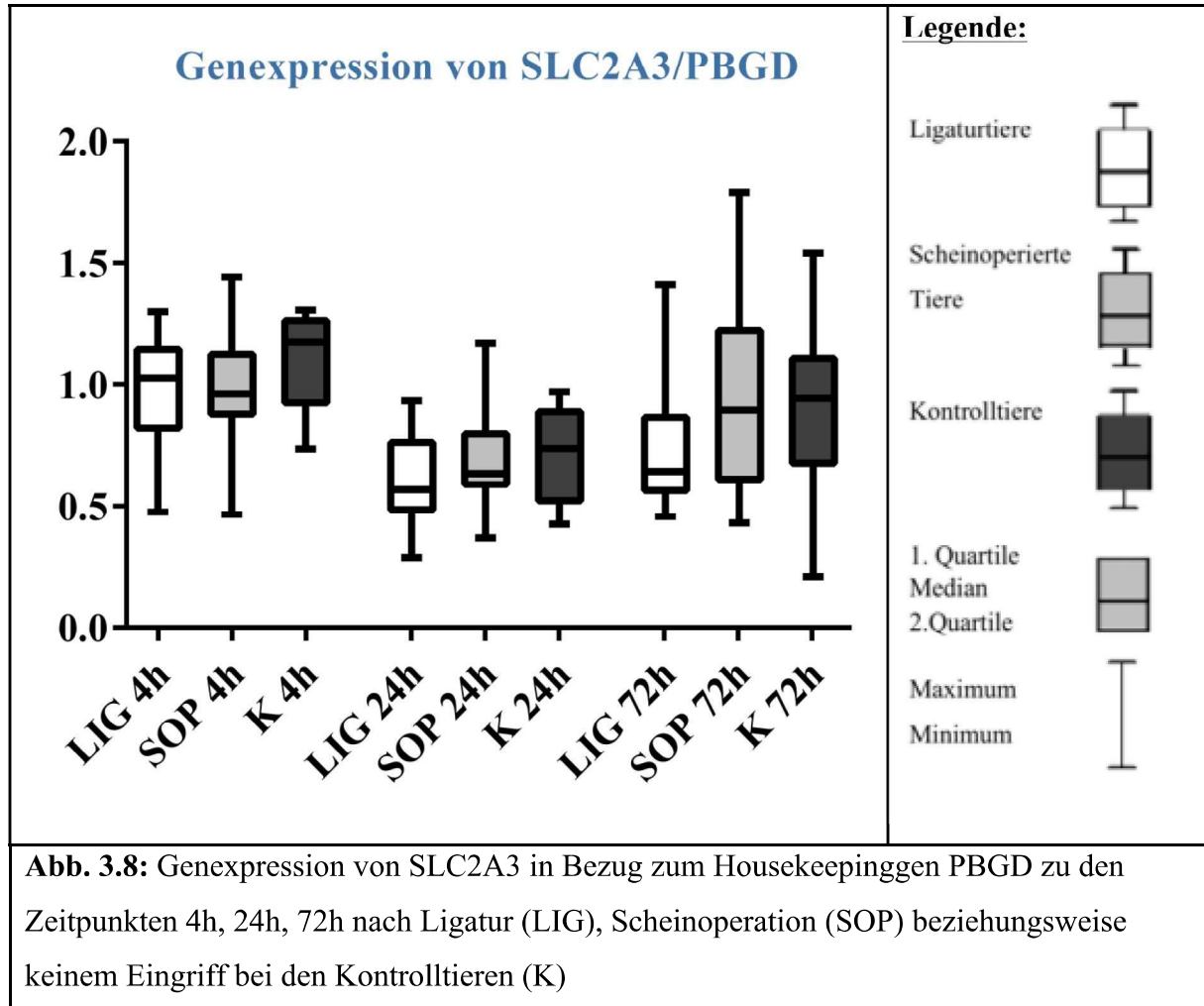
Der Glucosetransporter GLUT3 wird durch das Gen SLC2A3 codiert. Die Quantifizierung der Expression von SLC2A3 mittels Real-time-PCR verlief komplikationslos, so dass 188 Expressionswerte ermittelt werden konnten, allerdings wurde im Anschluss durch Anwendung des „Grubbs’ test“ je ein Ausreißer der Gruppen K 4h, SOP 4h und LIG 72h eliminiert. Folglich wurden 185 Expressionsdaten verglichen (Tabelle 3.14).

Da der Datensatz der Scheinoperationsgruppe vom Tag 20 nicht normalverteilt war, wurde der „Kruskal-Wallis test“ mit „Dunns multiple comparisons test“ als Post-hoc-Test gewählt um die Gruppen untereinander am Tag 20 und die Scheinopgruppen im longitudinalen Verlauf zu vergleichen (Tabelle 3.14).

Tabelle 3.14 Statistischen Auswertung der Expression von SLC2A3									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
Probenanzahl	19	23	12	28	20	12	19	20	32
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Nein						Nein		
Kruskal-Wallis test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)				Nein					

3.2.2.1 SLC2A3-Expression unterscheidet sich nicht innerhalb der Gruppen

Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Genexpressionsunterschied zwischen den Gruppen (Tab. 3.14, Abb. 3.8).



3.2.2.2 SLC2A3-Expressionsabnahme zwischen den Zeitpunkt 4h und 24h

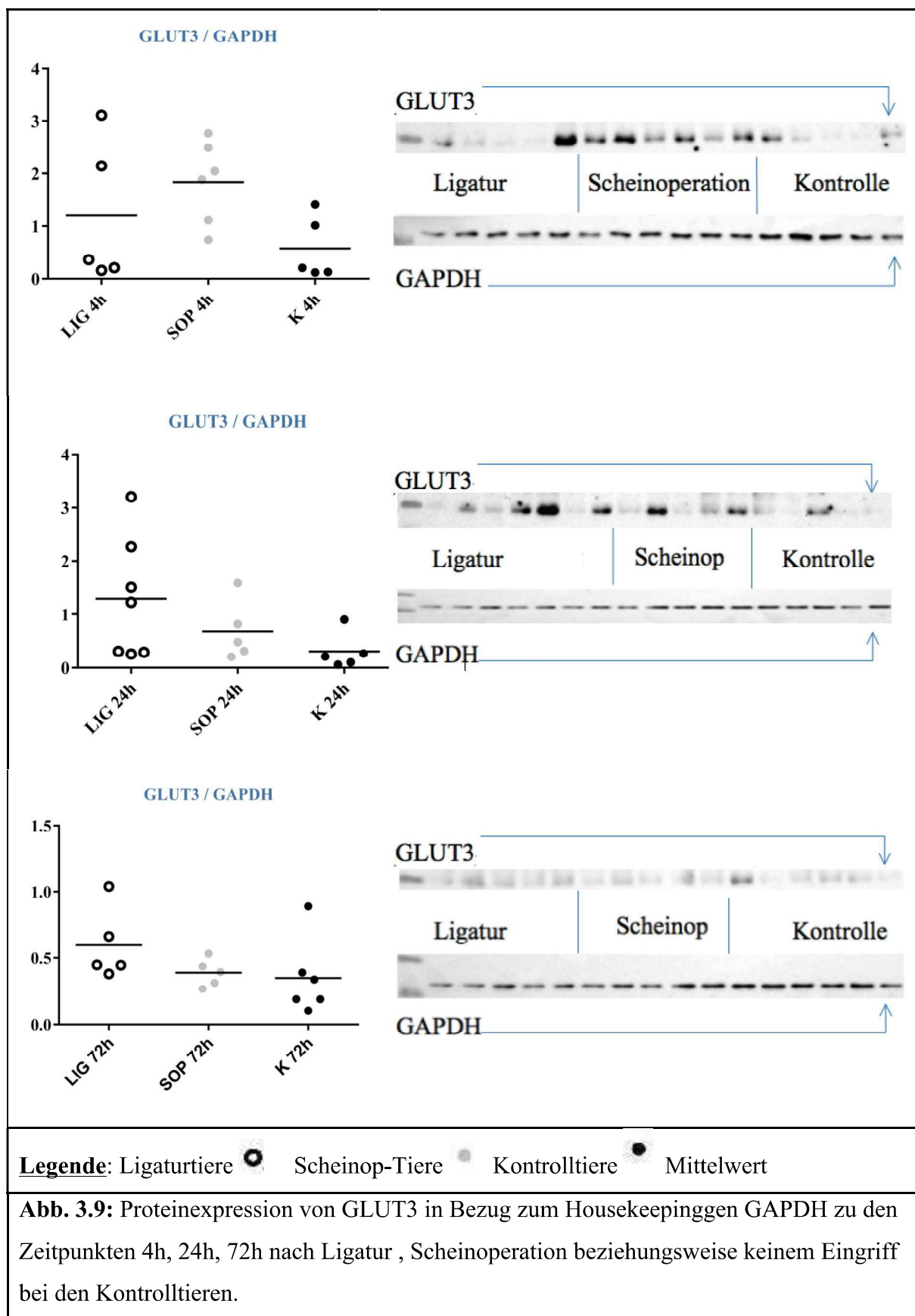
Bezüglich der Expressionsentwicklung zwischen den Zeitpunkten zeigt sich, dass die Expression von SLC2A3 bei allen Gruppen an Tag 19 signifikant höher als an Tag 20 ist (Tab. 3.15).

Tabelle 3.15 SLC2A3 LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturgruppe	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
Kolmogorov-Smirnov test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Normalverteilt	Nicht normalverteilt	Normalverteilt
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	<0,0001 Ja		0,0012 Ja
Bonferronis multiple comparsions test	4h vs. 24h ****		4 h vs. 24 h ***
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	4h >24h <0,0001		4 h >24 h<0,0001
Kruskal-Wallis test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		0,0008 Ja	
Dunn´s multiple comparsions test		4 h vs. 24h *** 24h vs. 72h *	
Mann Whitey test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		4h >24h <0,0001	

3.2.2.3 Keine Unterschiede der GLUT3-Expression zwischen den Gruppen

Dem Datenblatt war zu entnehmen, dass sich im Western Blot für GLUT3 eine Bande zwischen 45-47 zeigen sollte. Bei unserem Western Blot zeigte sich eine Bande auf Höhe der 40kDa Markierung. Alle Datensätze waren normalverteilt. Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Tab. 3.16, Abb. 3.9).

Tabelle 3.16 Übersicht der Statistischen Auswertung der Expression von GLUT3									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	5	6	5	7	5	5	5	5	6
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	0,1293 Nein			0,1453 Nein			0,2380 Nein		



3.2.3 Keine Gruppenunterschiede bei GLUT3, jedoch bei GLUT1

Tabelle 3.17 Übersicht der signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen			
	4h	24h	72h
SLC2A1	-	-	SOP > LIG SOP > K
GLUT1	SOP > LIG	-	LIG < K
SLC2A3	-	-	-
GLUT3	-	-	-

In der Zusammenschau der untersuchten Glucosetransporter zeigte sich, dass die Expression von GLUT3 im Gegensatz zu GLUT1 weder auf Genebene noch Proteinebene verändert ist (Tab. 3.17). GLUT 1 (Proteinebene) ist 4h nach Ligatur gegenüber SOP und 72h danach gegenüber der Kontrollgruppe vermindert. Auf Genebene zeigt sich am

Tag 22 eine signifikant höhere Expression von GLUT1 (SLC2A1) in der Scheinopgruppe gegenüber den beiden anderen Gruppen.

3.2.4 Expression steigt bei SLC2A1 und sinkt bei SLC2A3

Tabelle 3.18 Übersicht der Glucose-Transporter-Expression im longitudinalen Verlauf			
	4h	24h	72h
SLC2A1	-	K 24h < K 72h SOP 24h < SOP 72h LIG 24h < LIG 72h	
SLC2A3	K 4h > K 24h SOP 4h > SOP 24h LIG 4h > LIG 24h		-

Bei GLUT1 ist die Genexpression (SLC2A1) am Tag 22 bei allen Gruppen signifikant höher als am Tag 20. Zwischen Tag 19 und 20 besteht kein signifikanter Unterschied. Im Gegensatz dazu, liegt bei GLUT3 eine signifikante Genexpressionsabnahme (SLC2A3) zwischen

den Zeitpunkten 4h und 24h vor. Die Expression am Tag 20 unterscheidet sich allerdings nicht signifikant von Tag 22 (Tab. 3.18).

3.3.Fettsäuretransporter

Fettsäuren sind nicht nur für die fetale Ernährung wichtig, sondern sind auch Bestandteile von Zellmembranen. Aufgrund der Relevanz für den Feten zeigt diese Arbeit die Untersuchungsergebnisse von vier Fettsäuretransportern. Während SLC27A1 und SLC27A4 nur auf Genebene untersucht wurden, wurde bei CD36 und FABP3 zusätzlich die Expression ihrer Proteine FAT und hFABp untersucht.

3.3.1 FAT wird genetisch durch CD36 codiert

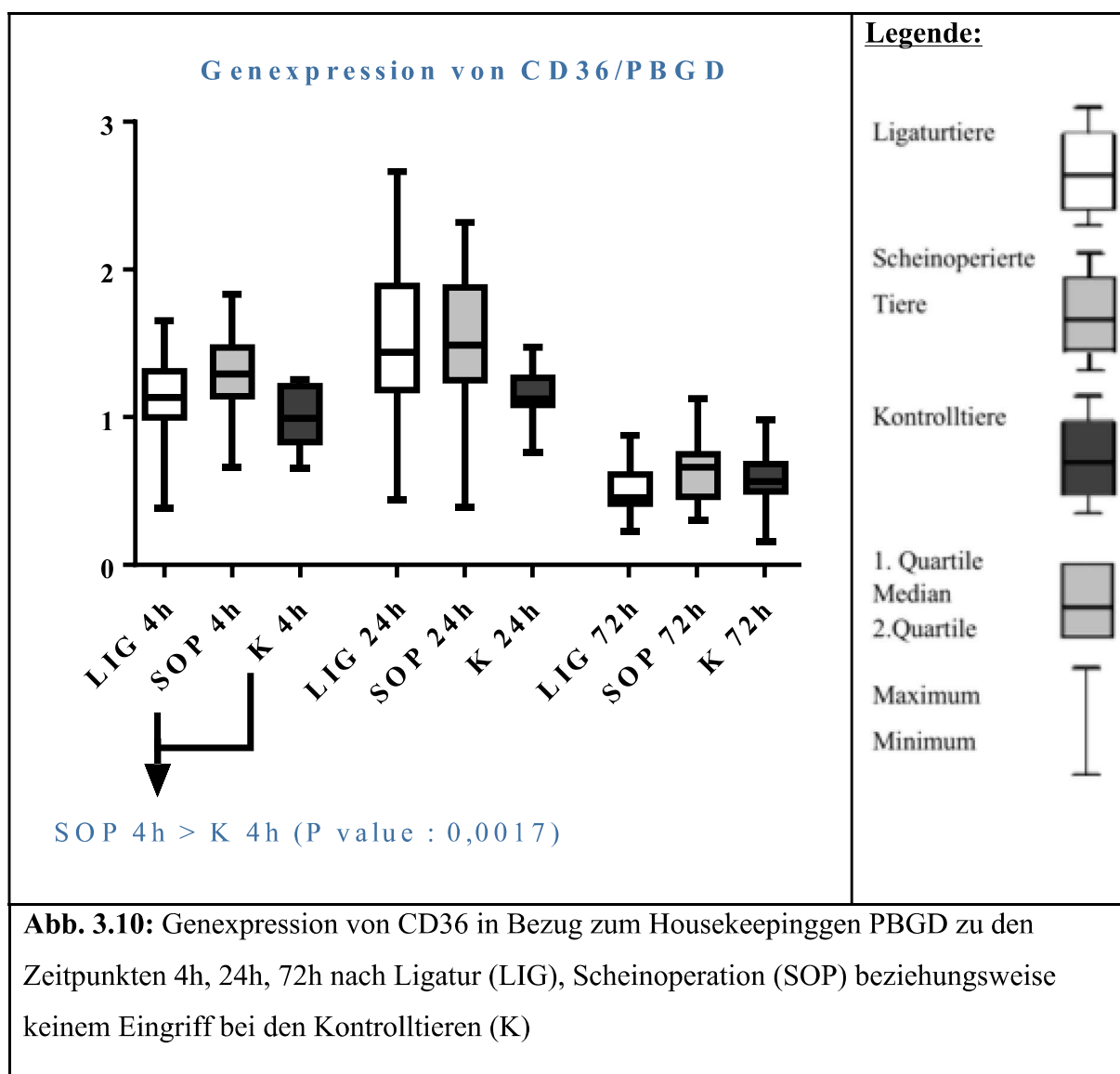
Die „fatty acid translocase“, kurz FAT wird durch CD36 codiert. Die Quantifizierung der Genexpression mittels Real-time-PCR verlief komplikationslos, so dass 188 Expressionswerte ermittelt werden konnten, allerdings wurde im Folgenden durch Anwendung des „Grubbs’ test“ je ein Ausreißer der Gruppen LIG 4h, SOP 4h, LIG 24h, SOP 72h und K 72h eliminiert (Tabelle 3.19).

Bei kontinuierlich normalverteilten Datensätzen konnte sowohl für den Vergleich innerhalb eines Zeitpunktes, als auch im longitudinalen Vergleich, die „one-way ANOVA“ mit „Bonferronis multiple comparisons test“ als Post-hoc-Test gewählt werden. Bei Signifikanz folgte ein „ungepaarter t-Test“ (Tab. 3.19).

Tabelle 3.19 Statistischen Auswertung der Expression von CD36									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	19	23	12	28	20	11	20	19	31
Kolmogorov-Smirnov test									
Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA	0,0075			0,0500			Nein		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Ja			Ja					
Bonferronis multiple comparsions test	SOP vs. K= **			Keine Signifikanz					
Ungepaarter t-test	SOP > K								
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	0,0017								

3.3.1.1 CD36 wird nach 4h bei SOP mehr exprimiert als in der Kontrollgruppe

Die „one-way ANOVA“ ergab bezüglich der Genexpression von FAT (CD36) signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen zu den Zeitpunkten 4h und 24h. Allerdings konnte die Signifikanz von Post-hoc-Test nur am Tag 19 bestätigt werden. Der „ungepaarten t-Test“ ergab für die höhere Expression in der Scheinopgruppe gegenüber der Kontrollgruppe einen P-Wert von 0,0017 (Abb. 3.10, Tab. 3.19).



3.3.1.2 Expression nimmt bis zum Tag 20 bei LIG zu, dann in allen Gruppen ab

Die Expression von CD36 (Genexpression von FAT) nahm bei allen Gruppen von Tag 20 auf Tag 22 ab. In der Ligaturgruppe erfolgte zuvor zwischen Tag 19 und 20 eine Expressionszunahme (Tab. 3.20).

Tabelle 3.20 CD-36: LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturgruppe	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	<0,0001 Ja	<0,0001 Ja	<0,0001 Ja
Bonferronis multiple comparsions test	4h v. 24h = ** 24h vs. 72h = ****	24h vs. 72h = ****	24h vs. 72h = ****
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	4h < 24h < 0,0042 24h > 72h < 0,0001	24h > 72h < 0,0001	24h > 72h < 0,0001

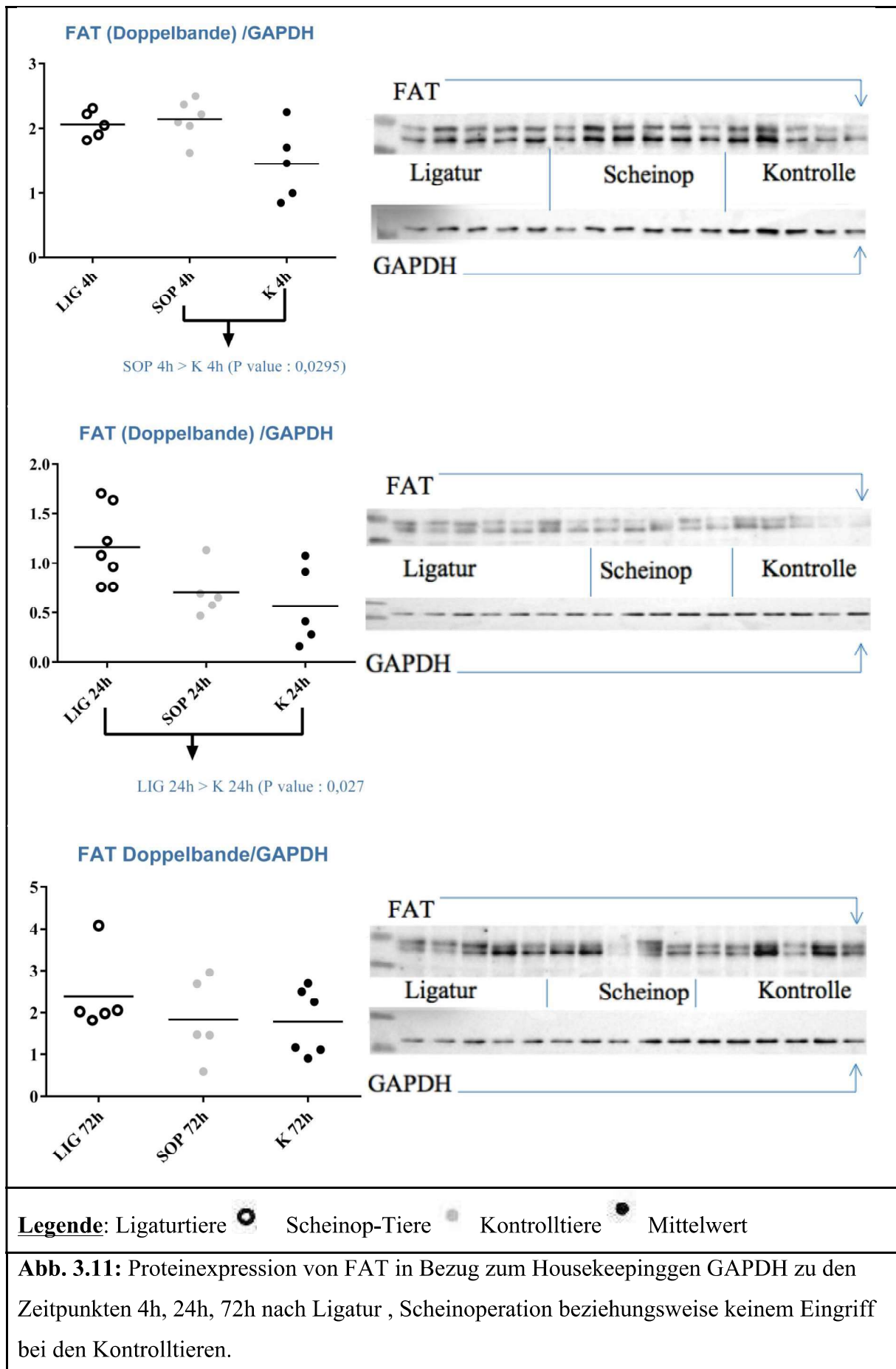
3.3.1.3 FAT- Expression steigt erst bei SOP, dann in LIG gegenüber K an

Das Molekulargewicht von CD36 beträgt 53 kDa. Da der Western Blot eine Doppelbande auf entsprechender Höhe zeigte, wurden beide Banden einzeln und zusammen ausgewertet, allerdings stimmte das Ergebnis bezüglich signifikanter Veränderungen überein.

Bei den normalverteilten Datensätzen am Tag 19 und 20 wurde „one-way ANOVA“ mit Post-hoc-Test durchgeführt und am Tag 22 bei fehlender Normalverteilung ein Kruskal-Wallis test.

Wie auch auf Genebene, zeigte sich auch auf Proteinebene eine erhöhte Expression von FAT zum Zeitpunkt 4h in der Gruppe der Scheinoperiertentiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Expression von letzteren war am Tag 20 wiederum signifikant niedriger als bei den Ligaturtieren (Abb. 3.11, Tab. 3.21).

Tabelle 3.21 Expressionsvergleich von FAT zwischen LIG, SOP und K									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	5	6	5	7	5	5	5	5	6
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0,05$	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	0,0242 Ja			0,0293 Ja					
Bonferronis multiple comparsions test	SOP vs. K=*			LIG vs. K= *					
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	SOP > K 0,0295			LIG > K 0,0275					
Kruskal-Wallis test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							0,7246 Nein		



3.3.2 H-Fabp wird genetisch durch FAPB3 codiert

Der Fettsäuretransporter h-Fabp wird durch FAPB3 codiert. Die Quantifizierung der Genexpression mittels Real-time-PCR verlief komplikationslos, so dass 188 Expressionswerte ermittelt werden konnten, allerdings wurde im Folgenden durch Anwendung des „Grubbs’ test“ je ein Ausreißer der Gruppen LIG 4h, LIG 24h und LIG 72h eliminiert.

Bei kontinuierlich normalverteilten Datensätzen konnte sowohl für den Vergleich innerhalb eines Zeitpunktes, als auch im longitudinalen Vergleich, die „one-way AOVA“ mit „Bonferronis multiple comparisons test“ als Post-hoc-Test gewählt werden. Bei Signifikanz folgte ein „ungepaarter t-Test“ (Tab. 3.22).

Tabelle 3.22 Statistischen Auswertung der Expression von FABP3									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	19	24	12	27	20	12	19	20	32
Kolmogorov-Smirnov test									
Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA	Nein						<0,0001		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							Ja		
Bonferronis multiple comparisons test							LIG vs. SOP= *		
							SOP vs. K=***		
Ungepaarter t-test							SOP > LIG=0,0276		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							SOP > K <0,0001		

3.3.2.1 FABP3 Expression ist nach 72h bei SOP gegenüber K und LIG erhöht

Die „one-way ANOVA“ bezüglich FABP3 (Genexpression von h-Fabp) ergab signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen am Tag 22. Dem „Bonferronis multiple comparisons test“ lässt sich entnehmen, dass SOP sich zum Zeitpunkt 72h signifikant von beiden anderen Gruppen unterscheidet. Der „ungepaarten t-Test“ ergab für die höhere Expression in der Scheinopgruppe gegenüber der Kontrollgruppe einen P-Wert von <0,0001 und von 0,0276 gegenüber der Ligaturgruppe (Abb. 3.12).

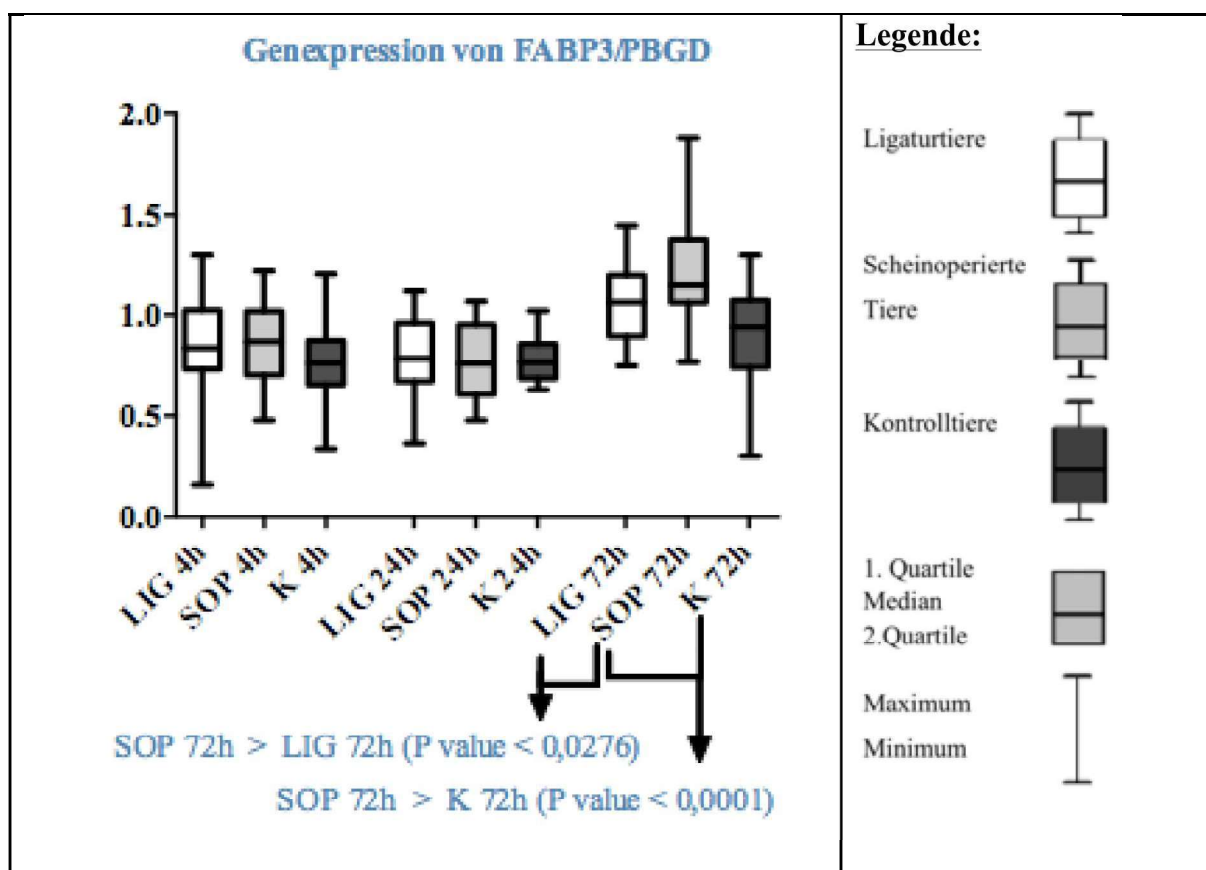


Abb. 3.12: Genexpression von FABP3 in Bezug zum Housekeepinggen PBGD zu den Zeitpunkten 4h, 24h, 72h nach Ligatur (LIG), Scheinoperation (SOP) beziehungsweise keinem Eingriff bei den Kontrolltieren (K)

3.3.2.2 FABP3 Expression nimmt 24 nach Scheinop zu

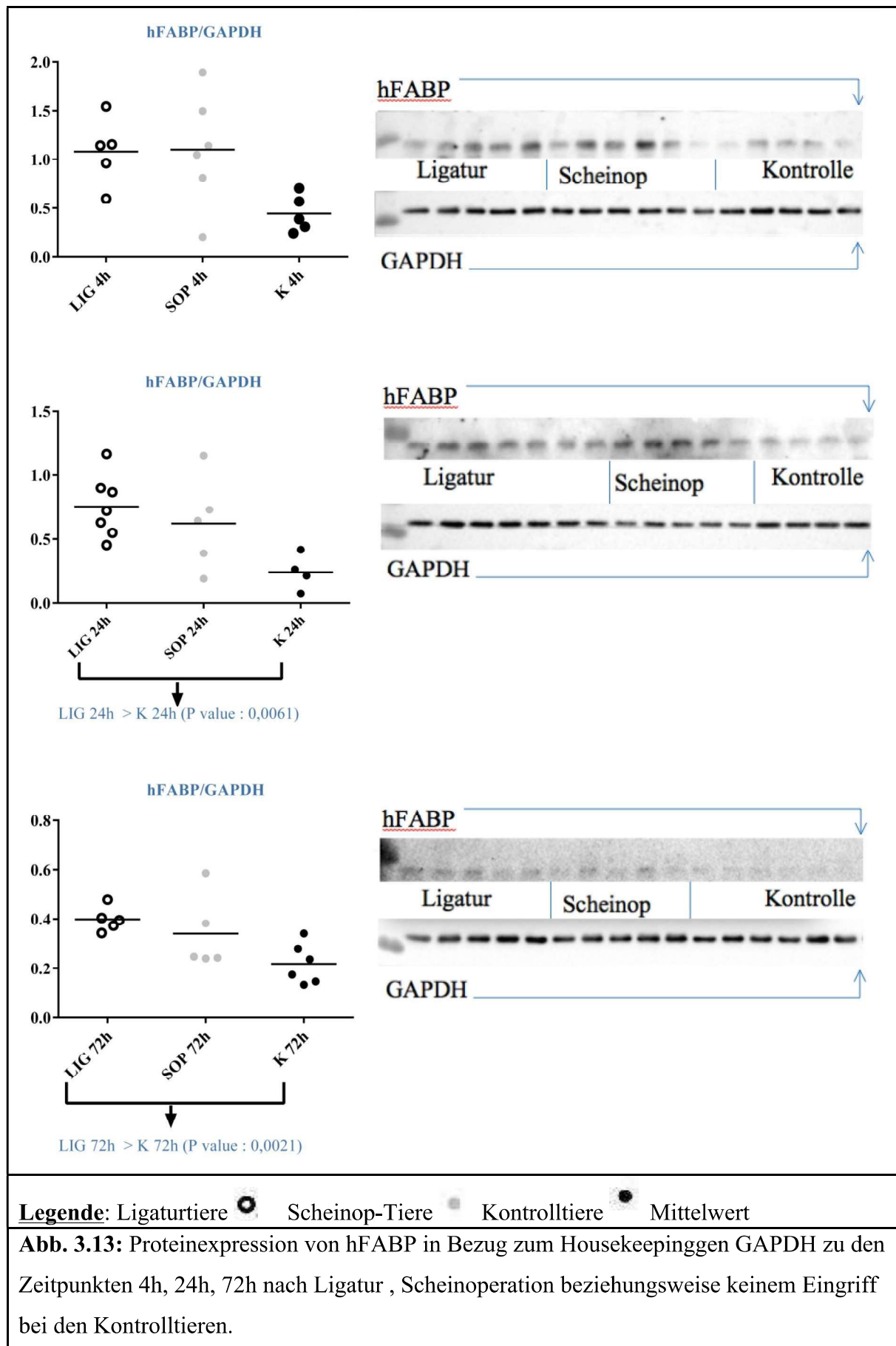
Die FABP3 Expression (Genexpression von h-Fabp) in der Kontrollgruppe oder nach Ligatur unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Zeitpunkten 4h, 24h und 72h. Allerdings ist die Expression 72h nach Scheinoperation signifikant höher als 24h danach (Tab. 3.23).

Tabelle 3.23 FABP3: LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturtiere	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	<0,0009 Ja	<0,0001 Ja	0,0253 Ja
Bonferronis multiple comparisons test	24h vs. 72h= ***	24h vs. 72h= ****	Keine Signifikanz
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Keine Signifikanz	24h < 72h < 0,0001	

3.3.2.3 H-Fabp-Expression ist ab Tag 20 nach Ligatur erhöht

Das Molekulargewicht von h-Fabp beträgt 15 kDa und es zeigte sich entsprechend eine Bande unterhalb der Markierung (Abb. 3.13). An Tag 20 gab es beim Blotten ein technisches Problem, so dass die letzte Bande nicht verwertet werden konnte. Entsprechend gab es nur vier Plazenten in der Kontrolltiergruppe an Tag 20. Aufgrund einer zu kleinen Probenanzahl wurde hier im Gegensatz zu den anderen Zeitpunkten ein nicht parametrisches Testverfahren genutzt, da keine Aussage bezüglich der Normalverteilung möglich war (Tab. 3.24). Sowohl 24h als auch 72h nach der Ligatur ist die h-FABP-Proteinexpression gegenüber den Kontrolltieren erhöht.

Tabelle 3.24 Expressionsvergleich von h-Fabp zwischen LIG, SOP und K									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	5	6	5	7	5	4	5	5	6
ANOVA	0,0417						0,0317		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Ja						Ja		
Bonferronis multiple comparsions test	Keine Signifikanz						LIG vs. K= *		
Ungepaarter t-test							LIG > K		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							0,0021		
Kruskal-Wallis test				0,0281					
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)				Ja					
Dunn's multiple comparsions test				LIG vs. K= *					
Mann-Whitney test				LIG > K					
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)				0,0061					



3.3.3 FATP1 wird genetisch durch SLC27A1 codiert

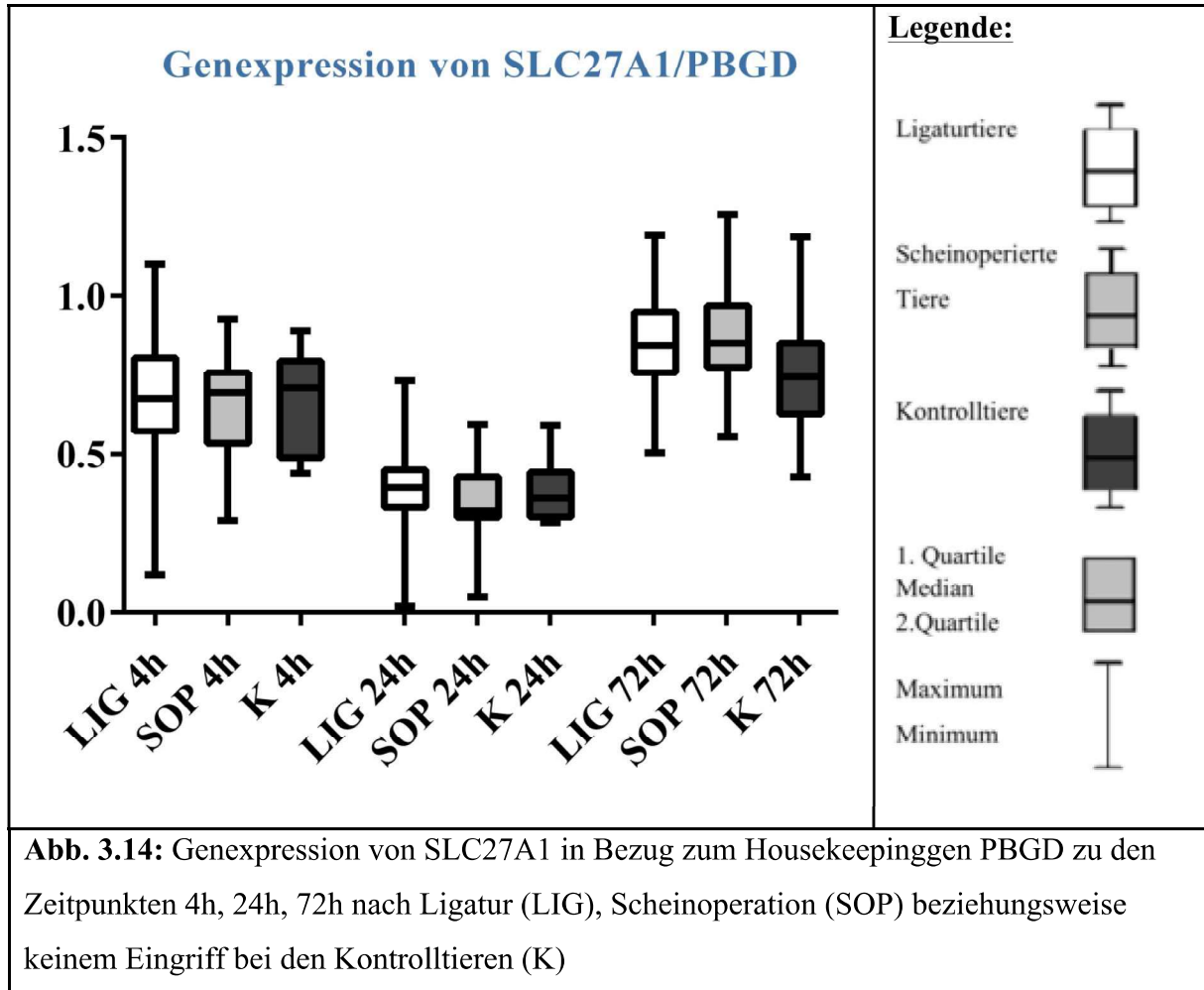
Der Fettsäuretransporter FATP1 wird durch das Gen SLC27A1 codiert. Die Quantifizierung der Genexpression mittels Real-time-PCR verlief komplikationslos, so dass 188 Expressionswerte ermittelt werden konnten, allerdings wurde im Folgenden durch Anwendung des „Grubbs’ test“ je ein Ausreißer der Gruppen LIG 24h und SOP 72h eliminiert.

Da der Datensatz der Scheinopgruppe vom Tag 20 nicht normalverteilt gewesen war, wurde der „Kruskal-Wallis test“ gewählt um die Gruppen untereinander am Tag 20 und die Scheinoperationsgruppen im longitudinalen Verlauf zu vergleichen (Tab. 3.25).

Tabelle 3.25 Statistischen Auswertung der Expression von SLC27A1									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0.05$	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Probenanzahl	20	24	12	27	19	12	20	20	32
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Nein						Nein		
Kruskal-Wallis test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)				Nein					

3.3.3.1 Die Expression von SLC27A1 bleibt auch nach einem Eingriff gleich

Es zeigten sich bezüglich der SLC27A1 Expression (FATP1 Genexpression) innerhalb der Zeitpunkte zwischen den Gruppen keine Expressionsunterschiede (Abb. 3.14).



3.3.3.2 SLC27A1-Expression nimmt zunächst ab und dann wieder zu

Der longitudinale Vergleich zeigte, dass die SLC27A1-Expression (Genexpression von FATP1) am Tag 20 in allen Gruppen signifikant niedriger war als am Tag 19 und am Tag 22 (Tab. 3.26).

Tabelle 3.26 SLC27A1: LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturtiere	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
Kolmogorov-Smirnov test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Normalverteilt	Nicht normalverteilt	Normalverteilt
ANOVA Signifikanz? ($\alpha =0,05$)	<0,0001 Ja		<0,0001 Ja
Bonferronis multiple comparsions test	4h vs. 24h **** 24h vs 72h ****		4h vs. 24h **** 24h vs 72h ****
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	4h >24h <0,0001 24h< 72h<0,0001		4h >24h <0,0001 24h< 72h<0,0001
Kruskal-Wallis test Signifikanz?($\alpha=0.05$)		<0,0001 Ja	
Dunn´s multiple comparsions test		4h vs. 24h **** 24h vs 72h ****	
Mann Whitey test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		4h >24h <0,0001 24h< 72h<0,0001	

3.3.4 FATP4 wird genetisch durch SLC27A4 codiert

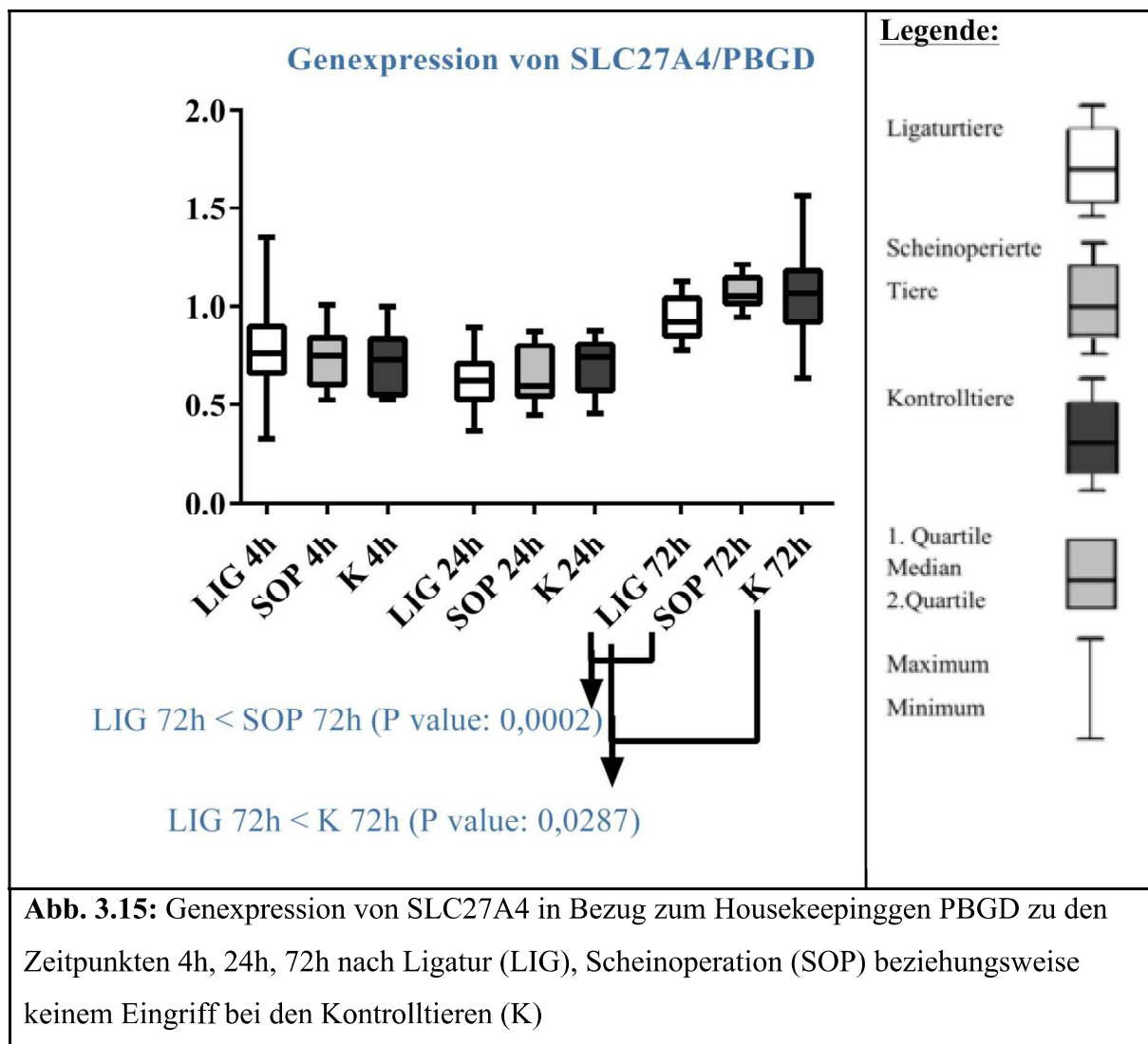
Der Fettsäuretransporter FATP4 wird durch das Gen SLC27A4 codiert. Die Quantifizierung der Genexpression mittels Real-time-PCR verlief komplikationslos, so dass 188 Expressionswerte ermittelt werden konnten. Durch die Anwendung des „Grubbs’ test“ wurden je ein Ausreißer der Gruppen LIG 4h und SOP 4h eliminiert.

Da der Datensatz der Ligaturgruppe vom Tag 19 nicht normalverteilt gewesen war, wurde der „Kruskal-Wallis test“ mit Post-hoc-Test gewählt, um die Gruppen untereinander am Tag 19 und die Ligaturgruppen im longitudinalen Verlauf zu vergleichen (Tab. 3.27).

Tabelle 3.27 Expressionsvergleich von SLC27A4 zwischen LIG, SOP und K									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	19	23	12	28	20	12	20	20	32
Kolmogorov-Smirnov test									
Normalverteilung? $\alpha=0,05$	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA				Nein			0,0155		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							Ja		
Bonferronis multiple comparsions test							LIG vs. K= *		
							LIG vs. SOP= *		
Ungepaarter t-test							LIG < K= 0,0287		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							LIG < SOP=0,0002		
Kruskal-Wallis test	Nein								
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)									

3.3.4.1 SLC27A4 –Expression ist 72h nach Ligatur niedriger als bei SOP oder K

Die statistische Auswertung ergab, dass die Expression von SLC27A4 (Genexpression von FATP4) in der Ligaturgruppe 72h nach dem Eingriff signifikant geringer ist als nach einer Scheinoperation oder keinem Eingriff. Der „ungepaarte t-Test“ ergab gegenüber den Kontrolltieren den P-Wert von 0,0287 und gegenüber der Scheinopgruppe 0,0002 (Abb. 3.15).



3.3.4.2 SLC27A4 Expression ist 24h nach Eingriff vermindert

Die Analyse des longitudinalen Verlaufs zeigte, dass die SLC27A4 Expression Genexpression von FATP4) in allen Gruppen am Tag 22 höher war als am Tag 20. Während die Expression in der Kontrollgruppe am Tag 20 konstant zu Tag 19 blieb, war sie in der Scheinopgruppe und Ligaturgruppe im Vergleich zum Tag 19 vermindert (Tab. 3.28).

Tabelle 3.28 SLC27A4: LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturtiere	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
Kolmogorov-Smirnov test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Nicht normalverteilt	Normalverteilt	Normalverteilt
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		<0,0001 Ja	<0,0001 Ja
Bonferronis multiple comparsions test		4h vs. 24h * 24h vs 72h ****	24h vs 72h ****
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		4h >24h = 0,0355 24h < 72h <0,0001	24h < 72h <0,0001
Kruskal-Wallis test Signifikanz?($\alpha=0.05$)	<0,0001 Ja		
Dunn's multiple comparsions test	4h vs. 24h ** 24h vs 72h ****		
Mann Whitey test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	4h >24h = 0,0004 24h < 72h <0,0001		

3.3.5 SLC27A4 verhält sich gegensätzlich

In der Zusammenschau der untersuchten Fettsäuretransporter zeigte sich, dass auf

Tabelle 3.29 Übersicht der signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen			
	4h	24h	72h
CD 36	SOP > K		
FAT	SOP > K	LIG > K	
FABP3			SOP > LIG SOP > K
hFABP		LIG > K	LIG > K
SLC27A1	-	-	-
SLC27A4			LIG < K LIG < SOP

Proteinebene sowohl FAT, als auch hFABP 24h nach Ligatur erhöht exprimiert sind. Bei hFABP (Proteinebene) gilt gleiches für 72h nach Eingriff. Interessanterweise zeigte sich bei FAT 4h nach Scheinoperation eine erhöhte Expression gegenüber den Kontrolltieren sowohl auf Genebene (CD36) als auch Proteinebene. Bei SLC27A1 (codiert genetisch für FATP1) fand man zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede, wohingegen 72 nach Ligatur die Expression von

SLC27A4 (codiert genetisch für FATP4) versus SOP und K erniedrigt war (Tabelle 3.29).

3.3.6 Gegensätzliche Tendenz bei CD36 nach 24h vs. SLC27A1 und SLC27A4

In der Zusammenschau der Ontogenese der Fettsäuretransporter zeigt sich, dass die Expression in allen Gruppen bei SLC27A1 (codiert genetisch für FATP1) und SLC27A4 (codiert genetisch für FATP4) zwischen dem Zeitpunkt 24h und 72h zunimmt, während sie bei CD36 (codiert genetisch für FAT) abnimmt. Bei FABP3 (codiert genetisch für h-Fabp)

Tabelle 3.30 Übersicht der FS-Transporter-Expression im longitudinalen Verlauf			
	4h	24h	72h
CD36	LIG 4h < LIG 24h	K 24h > K 72h SOP 24h > SOP 72h LIG 24h > LIG 72h	
FABP3		SOP 24h < SOP 72h	
SLC27A1	K 4h > K 24h SOP 4h > SOP 24h LIG 4h > LIG 24h	K 24h < K 72h SOP 24h < SOP 72h LIG 24h < LIG 72h	
SLC27A4	LIG 4h > LIG 24h SOP 4h > SOP 24h	LIG 24h < LIG 72h SOP 24h < SOP 72h K 24h < K 72h	

sieht man in diesem Zeitraum nur eine Zunahme bei den scheinoperierten Tieren (Tab. 3.30). Zwischen den Zeitpunkten 4h und 24h erkennt man bei SLC27A1 (codiert genetisch für FATP1) in allen Gruppen eine Abnahme der Expression, bei SLC27A4 (codiert genetisch für FATP4) nur bei LIG und SOP. Bei CD36 (codiert genetisch für FAT) zeigt sich hingegen bei der Ligaturgruppe eine Expressionszunahme.

3.4 PGT wird genetisch durch SLCO2A1 codiert

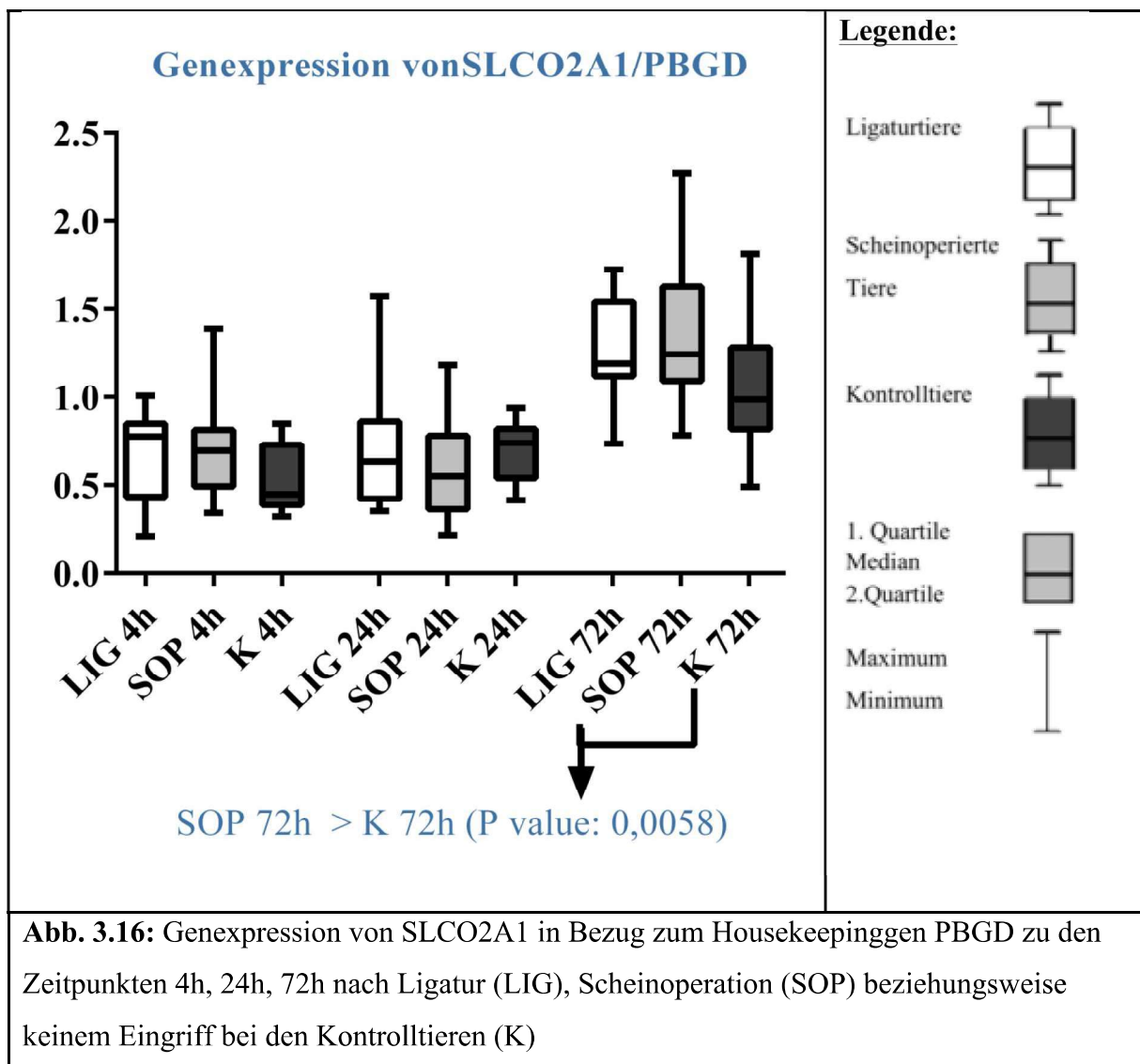
Der Prostaglandintransporter wird durch das Gen SLCO2A1 codiert. Die Quantifizierung der Genexpression mittels Real-time-PCR verlief komplikationslos, so dass 188 Expressionswerte ermittelt werden konnten, allerdings wurde im Folgenden durch Anwendung des „Grubbs’ test“ je ein Ausreißer der Gruppen LIG 4h, K 4h, SOP 4h und K 24h eliminiert.

Da der Datensatz der Ligaturgruppe vom Tag 19 nicht normalverteilt gewesen war, wurde der „Kruskal-Wallis test“ mit Post-hoc-Test gewählt, um die Gruppen untereinander am Tag 19 und die Ligaturtiere im longitudinalen Verlauf zu vergleichen (Tab. 3.31).

Tabelle 3.31 Expressionsvergleich von SLCO2A1 zwischen LIG, SOP und K									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	19	23	11	28	20	11	20	20	32
Kolmogorov-Smirnov test Normalverteilung? $\alpha=0,05$	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)				Nein			0,0095 Ja		
Bonferronis multiple comparsions test							SOP vs. K= *		
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)							SOP > K 0,0058		
Kruskal-Wallis test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Nein								

3.4.1 SLCO2A1 Expression ist 72h nach SOP erhöht

Die statistische Datenauswertung zeigte, dass die Genexpression von SLCO2A1 (codiert für PGT) am Tag 22 bei SOP signifikant höher ist als bei K. Der „ungepaarte t-Test“ ergab diesbezüglich einen P-Wert von 0,0058 (Abb. 3.16, Tab. 3.31).



3.4.2 SLCO2A1 Expression ist in allen Gruppen am Tag 22 höher als am Tag 20

Die Auswertung der Daten im longitudinalen Verlauf ergab, dass die Expression von SLCO2A1 (codiert für PGT) in allen Gruppen am Tag 22 höher ist als am Tag 20 (Tab. 3.32).

Tabelle 3.32 LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturtiere	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
Kolmogorov-Smirnov test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Nicht normalverteilt	Normalverteilt	Normalverteilt
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		<0,0001 Ja	<0,0001 Ja
Bonferronis multiple comparsions test		24h vs. 72h ****	24h vs. 72h ***
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		24h< 72h<0,0001	24h< 72h =0,0009
Kruskal-Wallis test Signifikanz?($\alpha=0.05$)	<0,0001 Ja		
Dunn´s multiple comparsions test	24h vs 72h ***		
Mann Whitey test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	24h< 72h<0,0001		

3.5 MCT4 wird genetisch durch SLC16A4 codiert

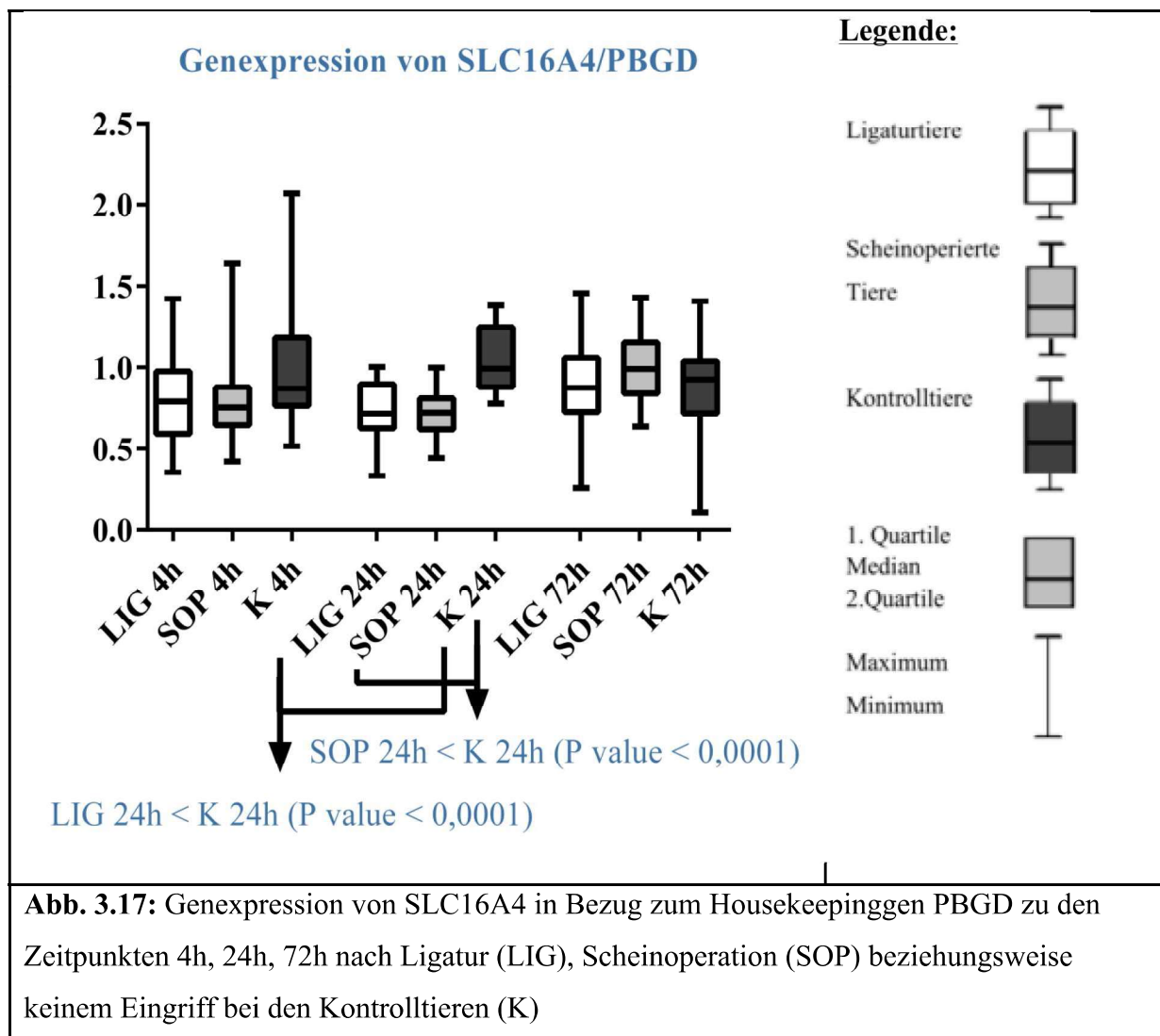
Das Gen SLC16A4 codiert den Monocarboxylattransporter MCT4. Die Quantifizierung der Genexpression mittels Real-time-PCR verlief komplikationslos, so dass 188 Expressionswerte ermittelt werden konnten. Es wurde im Folgenden durch Anwendung des „Grubbs’ test“ je ein Ausreißer der Gruppen SOP 4h, SOP 24h, K 24h und K 72h eliminiert.

Da der Datensatz der Ligaturgruppe vom Tag 20 nicht normalverteilt gewesen war, wurde der „Kruskal-Wallis test“ mit Post-hoc-Test gewählt, um die Gruppen untereinander am Tag 20 und die Ligaturtiere im longitudinalen Verlauf zu vergleichen (Tab. 3.33). Aufgrund der fehlenden Normalverteilung von LIG 24h wurden die Gruppen vom Tag 20 mittels Kruskal-Wallis test verglichen.

Tabelle 3.33 Expressionsvergleich von SLC16A4 zwischen LIG, SOP und K									
	LIG 4h	SOP 4 h	K 4 h	LIG 24h	SOP 24h	K 24h	LIG 72h	SOP 72h	K 72h
Probenanzahl	20	23	12	28	19	11	20	20	31
Kolmogorov-Smirnov test									
Normalverteilung? $\alpha=0,05$	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ANOVA	Nein						Nein		
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)									
Kruskal-Wallis test				<0.0001					
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)				Ja					
Dunn’s multiple comparsions test				LIG vs. K= *** SOP vs. K= ***					
Mann-Whitey-test	Nein			LIG < K <0.0001 SOP < K <0.0001					
Signifikanz? ($\alpha=0.05$)									

3.5.1 SLC16A4 Expression ist 24h nach Eingriff vermindert

Es zeigte sich bezüglich der Genexpression von SLC16A4 (codiert für MCT4), dass sich die Gruppen an Tag 20 voneinander unterscheiden und auch der „Dunn’s multiple comparisons test“ bestätigte diese Annahme. Der “Mann-Whitney-test ergab sowohl für den Unterschied zwischen der Ligaturgruppe und Kontrollgruppe, als auch Letzterer und Scheinopgruppe einen P-Wert von kleiner 0,0001 (Abb. 3.17, Tab. 3.33).



3.5.2 SLC16A4 Expression steigt bei SOP zwischen Tag 19 und 20 an

Die Auswertung der Daten im longitudinalen Verlauf ergab, dass lediglich die Expression der Scheinoperierten Tiere am Tag 20 höher war als am Tag 19. Weitere Unterschiede gab es nicht (Tab. 3.34).

Tabelle 3.34 SLC16A4: LIG, SOP und K im longitudinalen Verlauf			
	Ligaturgruppe	Scheinopgruppe	Kontrollgruppe
Kolmogorov-Smirnov test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)	Nicht normalverteilt	Normalverteilt	Normalverteilt
ANOVA Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		0,0002 Ja	
Bonferronis multiple comparsions test		24h vs. 72h ****	
Ungepaarter t-test Signifikanz? ($\alpha=0.05$)		24h< 72h<0,0001	
Kruskal-Wallis test Signifikanz?($\alpha=0.05$)	Nein		Nein

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob eine experimentelle Plazentainsuffizienz zu einer veränderten Expression wichtiger Transporter führt und ob sich die zeitliche Dynamik der Transporterexpression im longitudinalen Verlauf unterscheidet.

Beide Arbeitshypothesen konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, eine Einordnung der Ergebnisse wird im Folgenden zunächst substratspezifisch dargelegt.

Ergänzend zu den vorliegenden Studienergebnissen wurden die Feten und Plazenten gewogen, um die Auswirkung der Intervention auf das Wachstum zu quantifizieren. Während die Feten nach Ligatur zu allen drei Entnahmezeitpunkten ein vermindertes Geburtsgewicht aufwiesen, war nach Scheinoperation lediglich zu den Zeitpunkten 4h und 24h eine signifikante Differenz vorliegend [79]. Dieser Unterschied betont die Relevanz des Versuchsaufbaus mit drei Vergleichsgruppen. Nach der Erholung von der kurzzeitigen Ligatur konnten die scheinoperierten Feten also entsprechend ein Aufholwachstum zeigen. Diese Möglichkeit haben die Feten der Ligaturgruppe aufgrund einer dauerhaft simulierten Plazentainsuffizienz nicht.

4.1 Aminosäuretransporter

In Aminosäuretransporter lassen sich in über 10 verschiedene Transportsysteme einteilen. Zahlreiche Studien zeigten, dass eine IUGR mit verminderter Aktivität von System L [55,88] und System A verbunden ist, wohingegen die Aktivität des Systems y⁺, das kationische Aminosäuren transportiert, nicht verändert ist [84].

Zudem wird eine Korrelation zwischen der Schwere der IUGR [38] und der Reduktion der Aktivität vom System A in der MVM in Schwangerschaft mit IUGR beschrieben [54,57].

Die Arbeitsgruppe um Jansson postuliert, dass die Aktivität von System A in der Mikrovillösen Membran nur bei IUGR-Plazenten von Frühgeborenen verändert sei [57].

Grundsätzlich erläutert der Zusammenhang zwischen IUGR und verminderter System A Aktivität allerdings nicht, ob reduzierter Aminosäuretransport zur IUGR führt oder ob verminderte fetale Bedürfnisse zur Transportabnahme führen. Zahlreiche Tierexperimente mit resultierender Wachstumsrestriktion identifizierten allerdings eine Verminderung in der System A Aktivität als Prädiktor für ein beeinträchtigtes fetales Wachstum [52,88]. Cramer zeigte in einer Studie, dass die Hemmung von System A in schwangeren Ratten zu einer IUGR führt [24].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transporter SNAT 1, SNAT2 und SNAT4 gehören zum Aminosäuresystem A, welches den überwiegenden plazentaren Transport von neutralen Aminosäuren in Nagetieren regelt [24,77,78].

Zu beachten ist, dass wir nicht die Transporteraktivität untersuchten, sondern die Expression der Transportproteine, sowie der codierenden Gene. Die Arbeitsgruppe um Malandro stellte allerdings bereits 1996 einen Zusammenhang zwischen der Transporteraktivität und Expression auf [69].

Passend zu dem vorbeschriebenen Zusammenhang zwischen System A und IUGR zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass die plazentare Genexpression von SLC38A1 und die Proteinexpression von SNAT1 24h nach Ligatur gegenüber der Kontrollgruppe vermindert war. Es wurde gezeigt, dass SNAT1 in der fortgeschrittenen Schwangerschaft in kultivierten primären Trophoblastenzellen den Hauptanteil von System A ausmacht [29].

Gegenüber den scheinoperierten Tieren, war die SNAT1-Expression lediglich 4h nach Ligatur vermindert. Diese Ergebnisse betonen die Relevanz eines Vergleiches von Ligaturgruppe, Scheinopgruppe und Kontrollgruppe. Eine vorrangegangene Studie, welche nur eine Ligaturgruppe mit einer Scheinopgruppe verglich, zeigte nämlich keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der System A Aktivität. Eine Kontrollgruppe war allerdings nicht eingeschlossen [39].

Obwohl die Auswertung des SNAT2 Blots augenscheinlich den Eindruck vermittelt, dass die Expression 24h nach einem Eingriff im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich vermindert ist, ließ sich dieser Zusammenhang aufgrund unserer strengen Signifikanzrichtlinien statistisch nicht bestätigen. Allerdings zeigte sich bezüglich SLC38A2 sowohl 4h als auch 24h nach der Ligatur eine verminderte Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zu SLC38A1 und SLC38A2 zeigt SLC38A4 keine Expressionsunterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Ligaturgruppe, jedoch ist die Expression in der Scheinoperationsgruppe am Tag 22 signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Die scheinoperierten Tiere haben bei kurzfristiger Ligatur nur einen zeitlich begrenzten Nährstoffmangel, daher ist es denkbar, dass eine anschließende Aktivitäts- bzw. Expressionssteigerung der Transporter zum Defizit ausgleich dient. Passend dazu zeigte die Gewichtsbestimmung unserer verwendeten Feten, dass die scheinoperierten Tiere zwar an Tag 19 und 22 ein vermindertes Gewicht zeigten, jedoch nicht mehr an Tag 22.

Die fehlende Expressionsveränderung von SLC38A4 in der Ligaturgruppe bestätigt die Beobachtung der Arbeitsgruppe um Li. Sie verglichen humane Plazenten von Kindern mit Normalgewicht, Low birth weight und Makrosomie. Bei den Makrosomie-Plazenten war die System A Aktivität und die Expression von SLC38a4 und SNAT4 gegenüber den Normalgewicht-Plazenten erhöht. Bei den LBW-Plazenten zeigte sich zwar eine verminderte System A Aktivität, allerdings bezüglich SNAT4 weder auf Gen- noch Proteinebene eine Veränderung [65].

Möglicherweise hängt die Sonderstellung von SNAT4 damit zusammen, dass die Expression und Funktion von SNAT4 am Geburtstermin im Gegensatz zum ersten Trimenon erniedrigt ist, was darauf hindeutet, dass die Bedeutung dieses Transporters im Laufe der Schwangerschaft abnimmt [28].

Zusätzlich zu Daten bezüglich veränderter Transporteraktivitäten findet man Studien, welche die Aminosäurenkonzentration bei IUGR betrachten.

Bei gesunden Feten sind die Nabelschnurblutkonzentrationen der meisten Aminosäuren im zweiten Trimenon und am Ende der Schwangerschaft außer bei Aspartat und Glutamat signifikant höher als die mütterlichen Konzentrationen [17]. Schwangere Frauen haben wiederum im zweiten und letzten Trimenon eine signifikant niedrigere Aminosäurenkonzentration als nicht schwangere Frauen. In IUGR-Schwangerschaften ist die mütterliche Aminosäurenkonzentration im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen nicht so stark vermindert. Die Betroffenen Mütter haben im Vergleich zur normalen Schwangerschaft bezüglich der meisten Aminosäuren also deutlich erhöhte Konzentrationen. Gleichzeitig sind

die fetalen Aminosäurenkonzentrationen bei den IUGR-Feten niedriger, so dass der Aminosäurenkonzentrationsunterschied zwischen Fetus und Mutter bei IUGR deutlich geringer ist [76]. LBW-Feten haben insbesondere eine deutlich geringere Konzentration der essentiellen verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin [19]. Die Konzentration der Aminosäuren korreliert allerdings nicht mit der Schwere der IUGR [16].

Eine IUGR konnte in experimentellen Studien nicht nur durch die Simulation einer Plazentainsuffizienz hervorgerufen werden, sondern auch durch die Anwendung einer Low Protein Diät. Die Arbeitsgruppe um Bhasin zeigte, dass eine Nahrungsumstellung von trächtigen Mäusen auf Low-Protein-Diät zu reduzierter Aminosäurezirkulation in der Mutter führt [10]. In einer Studie der Arbeitsgruppe um Coan wurde einer Gruppe von schwangeren Mäusen ab dem 3. Tag der Schwangerschaft nur 80% der Nahrung wie der Vergleichsgruppe zugeführt. Es zeigte sich bereits am Tag 19 ein reduziertes fetales und plazentares Gewicht. Die Expression von SLC38A2 war gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht, wohingegen SLC38A1 keinen Unterschied zeigte und SLC38A4 sogar erniedrigt war [23]. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu unseren Studienergebnissen und bestätigen die Annahme von Nüsken, dass Low Protein Diät und Plazentainsuffizienzsimulation zwar einen ähnlichen Wachstumsphänotyp allerdings unterschiedliche metabolische Phänotypen aufweisen [81].

Weitere Studien belegen, dass es in Abhängigkeit von der Ursache der IUGR unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression der Aminosäuretransporter gibt. So wurde drei Monate alten Ratten vier Wochen vor der Paarung und während der Schwangerschaft eine faserarme und fettarme Diät zugeführt. Die Feten wiesen ein reduziertes Gewicht auf und die Genexpression von SLC38a4 mRNA war erhöht, wohingegen Slc38a1 und SLC38a2 mRNA keinen Unterschied zeigte [67]. Auch die Arbeitsgruppe um Jansson setzte trächtigen Ratten ab dem 2. Tag der Schwangerschaft entweder einer Low Protein Diät oder isokalorischen Kontrolldiät aus. Der Geburtstermin war Tag 22. Ab dem 21. Schwangerschaftstag war das fetale und plazentare Gewicht reduziert und es zeigte sich eine verminderte Proteinexpression von SNAT2. Bereits zwei Tage zuvor war eine verminderte System A Aktivität festzustellen [52]. In einer weiteren Studie wurden trächtige Ratten entweder mit einer isokalorischen low Protein Nahrung oder einer normal eiweißhaltigen Nahrung gefüttert. An den Tagen 15,19 und 21 wurden die microvillösen Plasmamembranen isoliert und untersucht und es zeigte sich ab dem 19. Tag eine verminderte System A Aktivität in der MVM. Während die SNAT4 Expression zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied zwischen den Gruppen zeigte, wurde ab

Tag 19 eine Expressionsreduktion von SNAT 2 gezeigt. Bezüglich SNAT1 war die Proteinexpression lediglich zwei Tage vor dem Geburtstermin, also an Tag 21 vermindert [88].

Expressionsveränderungen während der Schwangerschaft

Die untersuchten Transporter werden im 1. Und 3. Trimenon in der menschlichen Plazenta exprimiert, wobei die relativen Anteile während der Schwangerschaft variieren können [27]. Während der normalen Schwangerschaft einer Ratte steigt die mRNA Expression von SLC38A1 und SLC38A2 zwischen Tag 14 und 20 an [77]. Es gibt jedoch auch widersprüchliche Studien [33]. Der Grund für die widersprüchlichen Beobachtungen könnte die Größe der untersuchten Fragmente sein oder die Tatsache, dass Messdaten aus zwei verschiedenen Versuchsreihen miteinander verglichen worden sind [43].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Expression von SLC38A1 zwischen den Meßpunkten 24h und 72h zunimmt. Eine Expressionszunahme zwischen den Zeitpunkten 4h und 24 liegt lediglich bei den Kontrolltieren vor. Nach Intervention wird die Expressionszunahme gehemmt. Im Gegensatz dazu weisen unsere Ergebnisse aller Gruppen signifikant niedrigere SLC38A2 Expressionen zum Zeitpunkt 24h als 4h auf. Bis zum Zeitpunkt 72h findet keine weitere Abnahme statt. Die Beobachtungen passen zu der Annahme, dass SNAT1 am Ende der Schwangerschaft den größten Teil von System A ausmacht. Die mRNA Expression von SLC38A4 nimmt in unserer Versuchsreihe im longitudinalen Verlauf ebenso zu. Es zeigen Studien allerdings, dass beim Menschen die Expression und Funktion von SNAT4 am Geburtstermin im Gegensatz zum ersten Trimenon erniedrigt ist, was darauf hindeutet, dass die Bedeutung dieses Transporters im Laufe der Schwangerschaft abnimmt [28]. Die abnehmende Bedeutung von SLC38A4 könnte erklären, warum sich die Expression im Gegensatz zu den anderen Transporterisoformen des Systems A nach Ligatur nicht unterscheidet.

4.2 Glucosetransporter

In der vorliegenden Arbeit wurden die Hauptglucosetransporter GLUT1 und GLUT3 untersucht. Da Glucose der Hauptenergielieferant des Feten ist, gibt es zahlreiche Studien, welche die Rolle von GLUT1 und GLUT3 im Zusammenhang mit intrauteriner Wachstumsrestriktion untersucht haben. Jedoch sind die Ergebnisse nicht übereinstimmend.

Die Arbeitsgruppe um Reid führte eine bilaterale Arteria uterina Ligatur am Tag 19 bei trächtigen Ratten durch und verglich sie mit scheinoperierten Tieren. Es zeigte sich weder auf Genebene noch auf Proteinebene ein Unterschied zwischen den Gruppen [86].

Eine vorherige Studie zeigte allerdings, dass Nachkommen von ligitierten Tieren am Tag 21 eine 50-prozentige Herunterregulation in plazentarer GLUT1-Proteinexpression sowie eine erniedrigte fetale Glukosekonzentration im Vergleich zu scheinoperierten Tieren aufweisen [26]. Auch in unserer Arbeit konnten wir durch Auswertung des Western Blots zeigen, dass die GLUT1 Proteinexpression 72h nach Ligatur gegenüber den Kontrolltieren vermindert ist.

Auf Genebene konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Ligaturgruppe zeigen, lediglich die Expression nach Scheinoperation war gegenüber Ligatur und Kontrolle nach 72h erhöht.

Neben dem Ligaturmodell wurden in weiteren Studien auch bezüglich der Glucosetransporter Diätmodelle genutzt um eine intrauterine Wachstumsrestriktion zu erzeugen. Die Arbeitsgruppe um Coan, welche trächtigen Mäusen ab dem 3. Tag der Schwangerschaft nur 80% der Nahrung zuführte, untersuchte neben den bereits berichteten Aminosäuretransportern auch Glucosetransporter. Während am Tag 16 die Expression von SLC2a1 erniedrigt war, zeigte sie sich am Tag 19 gegenüber der Kontrollgruppe hochreguliert. Der Wechsel von einer Herunterregulierung zu einer Hochregulierung wird durch einen Anpassungsmechanismus an das Schwangerschaftsalter mit veränderten Bedürfnissen erklärt. Die Expression von SLC2A3 war an beiden Tagen nicht verändert [23]. Auch in unserer Arbeit konnten keine Veränderungen bezüglich der Expression von SLC2A3 beziehungsweise GLUT3 gezeigt werden. Im Gegensatz dazu berichtete jedoch die Arbeitsgruppe um Janzen, dass es im Vergleich von Plazenten bei late-term IUGR versus normalen Schwangerschaften bei GLUT1 keinen Unterschied gab, während die Expression von GLUT3 hochreguliert war [58]. Auch die bereits im Zusammenhang mit den Aminosäuren beschriebene Studie der Arbeitsgruppe um Lin, welche trächtigen Ratten eine faserarme und fettarme Diät zuführte, untersuchte die Genexpression für die Transporter GLUT1 und GLUT3. Sie zeigten eine Hochregulation der Genexpression von SLC2A1 an Tag 13,5 und 17,5 gegenüber der Kontrollgruppe, während in unserer Studie nur auf Proteinebene eine Herunterregulation nach 72 Stunden zu erkennen war. Interessanterweise zeigten sie des Weiteren eine Herunterregulation der Genexpression von SLC2A3 am Tag 17,5 [67]. Bezüglich SLC2A3 wurde in weiteren Studien also sowohl von Hochregulation, als auch Herunterregulation berichtet, während in unserer Studie interessanterweise keine Veränderung zu erkennen war.

Expressionsveränderungen während der Schwangerschaft

Es wird angenommen, dass GLUT1 der primäre Glucosetransporter in der menschlichen Plazenta am Ende der Schwangerschaft ist und seine Expression im Laufe der Schwangerschaft zunimmt [49]. GLUT3 Expression nimmt im Laufe der Schwangerschaft hingegen ab [13] und scheint daher eher zu Beginn der Schwangerschaft eine größere Rolle zu spielen. Auch unsere Auswertung des longitudinalen Expressionsverlaufs passt dazu. Bei SLC2A1 ist die Expression am Tag 22 bei allen Gruppen signifikant höher als am Tag 20. Zwischen Tag 19 und 20 besteht kein signifikanter Unterschied. Im Gegensatz dazu, liegt bei SLC2A3 eine signifikante Expressionsabnahme zwischen den Zeitpunkten 4h und 24 vor. Die Expression am Tag 20 unterscheidet sich allerdings nicht signifikant von Tag 22 (Tab. 3.18).

4.3 Fettsäuretransporter

Fettsäuren dienen nicht nur als wichtige Energiequelle, sondern sind als Vorläufer für wichtige bioaktive Verbindungen essentiell für die Entwicklung von Geweben und Organen. Insbesondere langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind für die Entwicklung des Gehirns relevant [51]. Aufgrund dieser Relevanz für die fetale Entwicklung untersuchten wir vier Fettsäuretransporter. Diese Fettsäuretransporter sind für den Transport von freien Fettsäuren zuständig. Die Lipoproteinlipase und endotheliale Lipase hydrolysieren die Triglyceride zuvor. Die Arbeitsgruppe um Gauster zeigte, dass die Genexpression der Lipoproteinlipase 2,4 mal so hoch bei IUGR im Vergleich zu Plazenten von nicht wachstumsrestriktierten Feten war, während die Expression der endothelialen Lipase um 30% reduziert war [37].

In unserer Arbeit untersuchten wir zunächst FAT (fatty acid translocase), welches aufgrund seiner Lokalisation sowohl den Transport durch die MVM, als auch BM gewährleistet. Während 4h nach Intervention sowohl die Proteinexpression, als auch die entsprechende Genexpression durch CD36 in der Scheinoperationsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war, war dieser Unterschied im Verlauf nicht mehr zu sehen. Jedoch zeigte sich 24h nach Ligatur eine signifikante Hochregulation der Proteinexpression gegenüber den Kontrolltieren. Während FAT den Transport durch die MVM und BM vermittelt, ist hFABP als Vertreter der fatty acid transport proteins für die Überquerung des Zytosols zuständig [25]. Auch hier zeigt sich eine Hochregulation der Proteinexpression in der Ligaturgruppe sowohl 24, als auch 72h nach Ligatur. Es sind nach Ligatur also sowohl Transporter für den Transport durch die BM und MVM als auch durch das Zytosol hochreguliert.

Zusätzlich untersuchten wir noch die Genexpression von SLC27A1 und SLC27A4, welche für die fatty acid transport proteins 1 und 4 codieren. Interessanterweise war hierbei die Expression von SLC27A4 72h nach Ligatur gegenüber den Kontrolltieren und Scheinoperationstieren erniedrigt, während die Expression von SLC27A1 innerhalb der Gruppen nicht verändert war. Die FATPs sind, sowie auch FAT, auf der MWM und der BM lokalisiert [13]. FATP und FAT verhalten sich nach Ligatur also gegensätzlich. Eine Erklärung könnte die Spezifität des Fettsäuretransports sein. FATP1 und FATP4 wird nämlich eine wichtige Rolle im Transfer von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere der Docosahexaensäure zugeordnet [63]. Der Fetus ist auf die plazentare Zufuhr von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren angewiesen [61], denn Docosahexaensäure hat eine wichtige Bedeutung für die visuelle und neurologische Entwicklung. Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang in Anbetracht unserer Ergebnisse die Studie der Arbeitsgruppe um Cetin. Es wurde intrauterin durch die Entnahme von fetalen Blutprobe das Fettsäureverhältnis vom Feten zur Mutter bei AGA und IUGR verglichen. Bei IUGR zeigte sich eine signifikant höheres Verhältnis für Linolsäure und ein signifikant niedrigeres für Docosahexaensäure und Arachidonsäure [18]. Diese Beobachtung können unsere Ergebnisse unterstützen, indem die Genexpression des FATP4 Transporters nach Ligatur herunterreguliert ist, während die FAT und hFABP Expression hochreguliert ist.

Expressionsveränderungen während der Schwangerschaft

Auch im Vergleich der longitudinalen Genexpressionsentwicklung zeigte sich eine gegenläufige Entwicklung der Fettsäuretransporter codierenden Gene. In allen Gruppen wird die Expression bei CD36 zwischen Tag 20 und 22 herunterreguliert und im Gegensatz dazu bei SLC27A4 und SLC27A1 hochreguliert. Zwischen den Zeitpunkten 4h und 24h gab es bei CD36 zuvor lediglich eine Hochregulation in der Ligaturgruppe. Interessanterweise zeigte sich auf Proteinebene bezüglich FAT am Tag 20 eine signifikante Hochregulation der Ligaturgruppe gegenüber der Kontrollellgruppe.

SLC27A1 und SLC27A4 zeigten auf Genebene im Gegensatz zu CD36 zwischen Tag 19 und 20 ein Herunterregulation, wobei bei Letzterem nur die Interventionsgruppen betroffen waren. Zwar gab es zwischen den Gruppen am Tag 20 bei SLC27A4 keinen Expressionsunterschied, jedoch eine Herunterregulation der Ligaturgruppe gegenüber der Kontrollgruppe, obwohl die Expression in allen Gruppen zwischen Tag 20 und 22 angestiegen ist. Bei der Gruppe mit Scheinoperation gab es keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Hierbei zeigt sich nochmals die Relevanz der Unterscheidung zwischen Ligatur und Scheinoperation. Es lässt sich

vermuten, dass nach kurzzeitiger Ligatur während der Scheinoperation durch Hochregulation die gleiche Genexpression wie bei der Kontrollgruppe erreicht werden konnte, während die Gegenregulation bei persistierender Ligatur scheiterte. FABP3 wies keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Tag 19 und 20 auf, jedoch zeigte sich eine Expressionszunahme in der Scheinoperationsgruppe zwischen Tag 20 und 22.

4.4 Prostaglandintransporter

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde PGT, ein durch das Gen *SLCO2A1* codierter Prostaglandintransporter untersucht. Prostaglandine werden durch die enzymatische Wirkung von Cyclooxygenase 1 und 2 gebildet. Aus Arachidonsäuren entsteht zunächst Prostaglandin H₂, welches weiter in Prostaglandin E₂, Prostaglandin D₂, Prostaglandin F_{2α} und Prostaglandin I₂ umgewandelt wird [94]. Der Prostaglandintransporter tauscht als Antiporter Laktat gegen Prostaglandin aus. Es zeigte sich in unserer Arbeit auf Genebene kein Unterschied zwischen den Ligaturtieren und Kontrolltieren. Allerdings war die Genexpression bei den scheinoperierten Tieren 72h nach Intervention gegenüber den Kontrolltieren erhöht, dies kann als eine Auswirkung einer Stressreaktion gedeutet werden. Des Weiteren ergab sich auch innerhalb der Gruppen kein Unterschied bezüglich des longitudinalen Expressionsverhaltens, denn in allen Gruppen stieg die Expression von Tag 20 bis 22.

4.5 Monocarboxylattransporter

Wir untersuchten des Weiteren in der vorliegenden Arbeit die Genexpression von *SLC16A4* nach A. uterina Ligatur bei der Ratte. *SLC16A4* codiert für den humanen Monocarboxylattransporter 4. Die Expression war 24h nach Ligatur, aber auch nach Scheinoperation gegenüber der Kontrollgruppe vermindert.

Im longitudinalen Expressionsvergleich zwischen den Tagen 19 bis 22 zeigte sich des Weiteren nur bei den scheinoperierten Tieren ein Expressionsanstieg zwischen Tag 20 und Tag 22. Die weiteren Gruppen zeigten keinen Unterschied.

Die Arbeitsgruppe um Settle konnte zwar zeigen, dass die Laktattransportkapazität in der Basalmembran bei IUGR vermindert ist [92], jedoch gab es keinen Expressionsunterschied bezüglich MCT1 und MCT4 zwischen IUGR im Vergleich zur AGA-Gruppe.

4.6 Die Folgen einer Ligatur versus einer Scheinoperation unterscheiden sich

Zahlreiche Arbeitsgruppen verwenden das A.uterina Ligatur- Modell, der Versuchsaufbau unterscheidet sich allerdings zwischen den Arbeitsgruppen. So wird teils nur eine Arteria uterina ligiert und bzw. oder es werden ligierte Tiere nur mit Scheinoperationstieren verglichen [39]. Unsere Ergebnisse zeigen im Vergleich zur unoperierten Kontrollgruppe, dass die Ligatur zu den Zeitpunkten 4h, 24h und 72h zu einem verminderten Geburtsgewicht führte. Bei der Scheinoperationsgruppe war am letzten Entnahmepunkt keine signifikante Gewichtsveränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe vorliegend [79]. Eine nur angedeutete Ligatur führt also zunächst zwar auch zur Wachstumsinderung, wobei es jedoch aufgrund des nur kurzzeitigen Stimulus zum Aufholwachstum kommen kann. Diese Ergebnisse betonen die Relevanz der Durchführung des A.uterina Models mit drei Versuchsgruppen. Die Beobachtung lässt vermuten, dass die Dauer eines Störfaktors und der Zeitpunkt Einfluss auf die Ausprägung der Wachstumsrestriktion und das Ausmaß der postnatalen Komplikationen hat.

Es zeigte sich entsprechend lediglich bezüglich SLC16A4 sowohl bei LIG als auch SOP nach 24h eine verminderte Genexpression, sonst ergaben sich keine Übereinstimmung der Signifikanzergebnisse. Interessanterweise handelte es sich bei allen weiteren signifikanten Unterschieden von SOP gegenüber K um eine Hochregulation (Zeitpunkt 72h: SLC38A4, SLC2A1, FABP3, SLCO2A1 und Zeitpunkt 4h: CD36, FAT). Möglicherweise ist die Hochregulation der Transporterexpression ein Anpassungsversuch, um das Wachstum aufzuholen. Auch zeigten sich bezüglich der Transporterexpression signifikante Unterschiede zwischen der Ligatur und Scheinoperationsgruppe. SOP zeigte gegenüber LIG an Tag 19 eine erhöhte Proteinexpression von SNAT1 sowie GLUT1 und an Tag 22 eine erhöhte Genexpression von SLC2A1, FABP3 sowie Slc27A4. Insgesamt betonen die vorliegenden Ergebnisse also die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung der Ergebnisse einer scheinoperierten Vergleichsgruppe und einer unoperierten Vergleichsgruppe.

4.7 Experimentelle Plazentainsuffizienz verändert Transporterexpression

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob eine experimentelle Plazentainsuffizienz zu einer veränderten Expression wichtiger Transporter führt und ob sich die zeitliche Dynamik der Transporterexpression im longitudinalen Verlauf unterscheidet.

Wir konnten durch die statistische Auswertung beide Annahmen bestätigen (Tabelle 4.0). Diese Veränderungen auf Gen- und Proteinebene können einen Beitrag zur Klärung des Phänotyps eines IUGR-Feten leisten und wichtige Hinweise in Bezug auf die Erklärungsmodelle der fetalen Programmierung liefern.

Aminosäuren werden neben der Proteinsynthese für den Energiemetabolismus und als biosynthetische Vorstufe für zahlreiche metabolische Pathways [22,44] verwendet. Zwanzig bis Vierzig Prozent der Energie, die dem Fetus zugeführt wird, besteht aus Aminosäuren, so dass eine adäquate Zufuhr essentiell ist [7,24]. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Aminosäuretransporter SNAT1 und SNAT2, welche für den Transport der kleinen, nicht-essentiellen, neutralen Aminosäuren zuständig sind, nach Ligatur herunterreguliert sind. Wir untersuchten im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht die Transporteraktivität, sondern die Expression des Transportproteins, sowie der codierenden Gene, allerdings stellte die Arbeitsgruppe um Malandro bereits 1996 einen Zusammenhang zwischen der Transporteraktivität und Expression auf [69]. Unsere Ergebnisse passen somit zu der Beobachtung, dass fetale Aminosäurenkonzentrationen bei IUGR erniedrigt sind [76]. Die verminderte Aminosäurezufuhr führt zu Substratmangel für die Proteinsynthese, den Energiemetabolismus, sowie die Produktion von biosynthetischen Vorstufen. Folglich sind Störungen im fetalen Metabolismus und der fetalen Entwicklung denkbar.

Ebenso relevant für den Energiemetabolismus sind erniedrigte fetale Glukosekonzentrationen bei IUGR [26]. Auch unsere Studie zeigt eine Herunterregulation des GLUT1 Transporters. Aufgrund der vorwiegenden Lokalisation in der MVM, ist GLUT1 für den Transport der Glukose zum Feten verantwortlich [56].

Laktat entsteht im fetalen Kreislauf am ehesten aus der Glykolyse, da die fetale Blutsauerstoffkonzentration gering ist und somit ein anaerober Stoffwechsel vorliegt [75]. Weil die Glukosekonzentration vermindert ist, lässt sich konsekutiv eine niedrigere Laktatkonzentration erwarten. Eine vorrangegangene Studie zeigte eine verminderte Laktattransportkapazität bei IUGR [92], jedoch ohne Expressionsunterschiede bezüglich der

Monocarboxylattransporter. In unserer Studie war MCT1 auf Genebene allerdings herunterreguliert.

Der Phänotyp von IUGR betroffener Feten ist durch wenig Unterhautfettgewebe gekennzeichnet. Während die Fettsäuretransporter FAT und hFABP nach Ligatur hochreguliert waren, zeigte SLC27A4 hingegen eine Herunterregulation. Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung der Arbeitsgruppe um Cetin. Sie zeigten nämlich, dass die fetale Fettsäurezusammensetzung insofern bei IUGR verändert sei, dass mehr Linolsäure vorliegt, während Docosahexaensäure und Arachidonsäure vermindert sind [18]. SLC27A4 wird insbesondere der Transport von Docosahexaensäure zugesprochen, so dass eine Herunterregulation die verminderte Konzentration erklären kann. Docosahexaensäure ist essentiell für die neurokognitive und visuelle Entwicklung des Feten, so dass durch einen Mangel Pathologien bedingt werden können.

Des Weiteren konnten wir in der vorliegenden Arbeit nicht nur zeigen, wie sich die Genexpression der Transporter im longitudinalen Verlauf zwischen den Tagen 19 und 20 und 20 und 22 ändert, sondern auch dass es gruppenspezifische Unterschiede gibt. Während es bei SLC38A1 zwischen Tag 19 und 20 zu einer Hemmung der Expressionszunahme nach Intervention kam, zeigte SLC27A4 lediglich in den Interventionsgruppen eine Expressionsabnahme und eine stabil bleibende Expression in der Kontrollgruppe. CD36 zeigte in diesem Zeitraum interessanterweise nur einen Expressionsanstieg in der Ligaturgruppe, anschließend folgt eine Expressionsabnahme in allen Gruppen. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bei CD36 findet man allerdings nur zwischen der Kontrollgruppe und der Scheinoperationsgruppe an Tag 19. SLC38A1 ist an Tag 20 nach Ligatur geringer exprimiert als in der Kontrollgruppe. Nach folgender Expressionszunahme zwischen Tag 20 und 22 in allen Gruppen zeigt sich auch hier auf Genebene kein Unterschied mehr. Bei SLC27A4 zeigt sich an Tag 22 die Expression nur nach Ligatur in der Kontrollgruppe vermindert, obwohl es auch in der Scheinoperationsgruppe zwischen Tag 19 und 20 zur Expressionsabnahme kam, bevor sich eine Zunahme in allen Gruppen zeigte.

Außerdem wurde auch bei der Analyse des longitudinalen Expressionsverlaufes die Sonderstellung der SOP-Gruppe deutlich. Bei FABP3 kam es lediglich bei den scheinoperierten Tieren zur Expressionszunahme zwischen den Tagen 20 und 22 und bei SLC16A4 zwischen Tag 19 und 20. SOP zeigte folglich 72h nach Intervention eine Hochregulation der FABP3-Expression gegenüber den beiden anderen Gruppen und bei

SLCO2A1 gegenüber der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit der Beobachtung vereinen, dass scheinoperierte Tiere ein Aufholwachstum zeigen.

Zusammenfassend legt die vorliegende Arbeit dar, inwiefern sich die Transporterexpression zwischen den Tagen 19 und 22 der Schwangerschaft einer Ratte verhält, zeigt Expressionsunterschiede nach Intervention und betont die Relevanz des Versuchsaufbaus mit der Differenzierung eines scheinoperierten und ligierten, sowie einer nicht operierten Gruppe.

Tabelle 4.0 Expressionsergebnisübersicht								
Transporter	Substrat	Lokalisation	Konzentrationsveränderungen bei IUGR	Expressionsunterschiede (in dieser Arbeit)				
				LIG vs. K		SOP vs. K		Ontogeneseunterschiede
				Gen	Protein	Gen	Protein	
SLC38A1/ SNAT1	kleine, nicht-essentielle, neutrale Aminosäuren	SNAT-Expression MVM > BM [76]	Fetale Aminosäurenkonzentration ist erniedrigt [76]	↓	↓	↔	↔	4→24h K↑ LIG ↔ SOP ↔
SLC38A2/ SNAT2				↓	↔	↔	↔	↔
SLC38A4/ SNAT4				↔		↑		↔
SLC2A1/ GLUT1	Glucose	MVM > BM [56]	Fetale Glucosekonzentration ist vermindert [26]	↔	↓	↑	↔	↔
SLC2A3/ GLUT3	Glucose	MVM, vaskuläres Endothel [58]		↔	↔	↔	↔	↔

CD36/ FAT	Ungesättigte Fettsäuren	BM, MVM [15]	Mehr Linol-säure, weniger Docosa-hexaen-& Arach-idon-säure	↔	↑	↑	↑	<u>4→24h</u> K↔ LIG ↑ SOP ↔
FABP3/ hFABP		Zytosol [12]		↔	↑	↑	↔	<u>24→72h</u> K ↔ LIG ↔ SOP ↑
SLC27A1/ FATP1	Ungesättigte Fettsäuren, v.a. Docosa-hexaensäure	BM, MVM [12]	[18]	↔		↔		↔
SLC27A4/ FATP4				↓		↔		<u>4→24h</u> K ↔ LIG ↓ SOP ↓
SLCO2A1/ PGT1	Prosta-glandin			↔		↑		↔
SLC16A4/ MCT4	Monocarboxylate	BM, MVM [92]	Ver-minderte Laktat-transport kapazität [92]	↓		↓		<u>24→72h</u> K ↔ LIG ↔ SOP ↑

Legende

↑ Hochregulation der Expression

↓ Herunterregulation der Expression

↔ keine Expressionsunterschiede

4h→24h Expressionsunterschiede innerhalb der Gruppen zwischen den Zeitpunkten 4h und 72h

24h→72h Expressionsunterschiede innerhalb der Gruppen zwischen den Zeitpunkten 4h und 72h

4.7 Ist eine „Reprogrammierung“ möglich?

Zahlreiche Studien haben bereits den Zusammenhang zwischen durch IUGR erniedrigtem Geburtsgewicht und Erkrankungen beschrieben. Die vorliegenden Forschungsergebnisse leisten nicht nur einen Beitrag zur wissenschaftlichen Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der fetalen Programmierung, sondern könnten zur Entwicklung präventionsorientierter Konzepte beitragen. Es stellt sich die Frage, ob der klinisch tätige Pädiater auf Basis der wissenschaftlich gewonnen Erkenntnisse der fetalen Programmierung durch Prävention eine „Reprogrammierung“ erreichen kann.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass eine experimentell erzeugte Plazentainsuffizienz zur Veränderung der Gen- und Proteinexpression wichtiger plazentarer Nährstofftransporter führt. Interessant wäre in Ergänzung zu unseren Ergebnissen die Messung der Transportaktivität und der fetalen Substratkonzentrationen im Blut. Als präventiver Ansatz ist in diesem Zusammenhang die adaptierte postnatale ernährungstherapeutische Versorgung mit Nährstoffen denkbar. Die Komplexität der Anpassung der Glucosemenge, des Proteingehaltes und der Fettsäurezusammensetzung an den Bedarf wird jedoch durch die Problematik des Aufholwachstums verdeutlicht. Studien zeigen, dass das Aufholwachstum oft in Überkompensation resultiert und der Organismus das Normalgewicht übersteigt und es zu übermäßigen Fetteinlagerungen führt. Dieses rasche und übermäßige Wachstum wird mit der Entwicklung von Adipositas und metabolischen Syndrom assoziiert [80,82]. Des Weiteren sollte sich die postnatale Nahrungsanpassung an der Ursache der IUGR orientieren, denn Nüsken konnte zeigen, dass Low Protein Diät und Plazentainsuffizienzsimulation zwar einen ähnlichen Wachstumsphänotyp, allerdings unterschiedliche metabolische Phänotypen aufweisen [81]. Diese Erkenntnis betont die Relevanz experimenteller Modelle, da sich in klinischen Studien intrauterine Pathologien meist multifaktoriell begründet darstellen und die Möglichkeiten der gezielten Intervention zur Aufdeckung pathophysiologischer Zusammenhänge begrenzt sind.

Die vorliegende Arbeit betont des Weiteren die Wichtigkeit des Studienaufbaus. Während zahlreiche Arbeitsgruppen lediglich ligierte Tieren mit Scheinoperierten als Kontrollgruppe verglichen [39], ergänzten wir den Versuchsaufbau um eine unoperierte Gruppe. Es zeigte sich Expressionsunterschiede zwischen den scheinoperierten und unoperierten Tieren. Die Ergebnisse vorrangegangener Studien mit zwei Vergleichsgruppen sind folglich erneut zu evaluieren. Wir konnten des Weiteren zeigen, dass die Ligatur zu den Zeitpunkten 4h, 24h und 72h zu einem verminderten Geburtsgewicht führte. Im Vergleich dazu war bei der Scheinoperationsgruppe am letzten Entnahmepunkt keine signifikante Veränderung

vorliegend. Dementsprechend könnten Neugeborene also auch mit einem normalen Geburtsgewicht zur Welt kommen, obwohl das intrauterine Wachstum durch Störfaktoren, welche im Tierexperiment durch die Scheinoperation simuliert werden, gestört worden war. Unsere Studienergebnisse zeigen, dass es auch nach einem kurzfristigen intrauterinen Stimulus zu Expressionsveränderungen plazentarer Transporter kommen kann. Hierdurch wird die Relevanz von dopplersonografischen Untersuchungen der fetoplazentaren Blutverhältnisse während der Schwangerschaft betont.

Weiterhin haben wir den ontogenetischen Verlauf der Protein- und Genexpression aller Gruppen zu den Zeitpunkten 4h, 24h und 72h verglichen, um beispielsweise eine Hemmung der Expressionszunahme nach Ligatur zu erkennen. Andererseits liefern die Ergebnisse der Kontrollgruppe wichtige Ergebnisse über den physiologischen ontogenetischen Expressionsverlauf. Denkbar wäre eine Studie, in dessen Rahmen die Transporterexpression an mehreren Schwangerschaftstagen bestimmt wird. In Ergänzung mit der Bestimmung der Transportaktivität könnten so wichtige Informationen bezüglich der Transporterrelevanz in Abhängigkeit des Schwangerschaftsalters gewonnen werden.

Zusammenfassend bietet das Forschungsgebiet zur fetalen Programmierung weiterhin zahlreiche experimentelle Ansätze, um den zugrundeliegenden Mechanismus verstehen zu lernen und ermöglicht es gleichzeitig auf der Basis der bereits gewonnen Erkenntnisse präventive Konzepte zu entwickeln.

5. Kurzfassung der Dissertationsschrift

„Expressionsveränderungen plazentarer Transporter nach simulierter Plazentainsuffizienz bei der Ratte“

von Isabelle Swoboda

aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Jörg Dötsch

Hintergrund: Zahlreiche Studien haben eine Prädisposition wachstumsretardierter Neugeborener für vielseitige Erkrankungen gezeigt. Die genauen mechanistischen Zusammenhänge dieser pränatalen Programmierung sind weitgehend unerforscht.

Hypothese: Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass eine experimentelle uteroplazentare Insuffizienz zu einer veränderten Expression plazentarer Transporter führt. Ein in der Folge verändertes intrauterines Nährstoffangebot könnte ein wichtiger Mechanismus sein, der sowohl eine Wachstumsrestriktion, als auch Programmierung von Erkrankungen bedingt.

Methodik: Trächtige Ratten wurden einer bilateralen Ligatur der Arteriae und Venae uterinae (LIG), einer Scheinoperation (SOP) oder keiner Operation (K) an Tag 19 unterzogen. Die Plazenten wurden nach Kaiserschnitt zu den Zeitpunkten 4h, 24h und 72h nach Intervention entnommen. Gen- und teils auch Proteinexpression der plazentaren Transporter für Aminosäuren (SNAT1, 2, 4), Glucose (GLUT1, 3), Fettsäuren (FAT, h-FABP, FABP1, FABP4), Prostaglandine (PGT) und Monocarboxylate (MCT4) wurden durch Real-time-PCR und Western Blot quantifiziert.

Ergebnisse: Als wichtigste Ergebnisse konnten wir zeigen, dass eine bilaterale Ligatur der Uteringefäße zu einer verminderten Expression von Aminosäuretransportern (SNAT1 (Gen- und Proteinebene: 24h), SNAT2 (Genebene: 4h, 24h)), einer verminderten Proteinexpression des Glucosetransporters GLUT1 (72h) und einer differentiellen Veränderung von Fettsäuretransportern (Proteinexpression vom FAT (24h), sowie hFABP (24h, 72h) erhöht, aber Genexpression von FATP4 (72h) erniedrigt), sowie einer verminderten Genexpression des Monocarboxylattransporters MCT4 (24h) führte. Des Weiteren zeigt sich nach Scheinoperation eine erhöhte Expression des Prostaglandintransporters PGT1 (72h).

Diskussion: Diese experimentell gewonnen Erkenntnisse können Hinweise auf pränatale Veränderungen im Nährstofftransport geben und zusammen mit weiteren Folgestudien helfen Folgeerkrankungen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion zu verstehen und präventive Ansätze zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

1. Al MD, Hornstra G, van der Schouw YT, Bulstra-Ramakers MT, Huisjes HJ (1990). Biochemical EFA status of mothers and their neonates after normal pregnancy. *Early Hum Dev* 24(3): 239–248
2. Bakketeig LS (1998). Current growth standards, definitions, diagnosis and classification of fetal growth retardation. *Eur J Clin Nutr* 52 Suppl 1: S1-4
3. Barker DJ (1998). In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 95(2): 115–128
4. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark, PM (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36(1): 62–67
5. Baschat AA, Hecher K (2004). Fetal growth restriction due to placental disease. *Semin Perinatol* 28:67–80
6. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE (2004). Developmental plasticity and human health. *Nature* 430(6998): 419–421
7. Bauer MK, Harding JE, Bassett NS, Breier BH, Oliver MH, Gallaher BH, Evans PC, Woodall SM, Gluckman PD (1998). Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol* 140(1-2): 115–120
8. Baumann MU, Deborde S, Illsley, Nicholas P (2002). Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 19(1): 13–22
9. Beall MH, El Haddad M, Gayle D, Desai M, Ross, Michael G (2004). Adult obesity as a consequence of in utero programming. *Clin Obstet Gynecol* 47(4): 957-66; discussion 980-1
10. Bhasin KKS, van Nas A, Martin LJ, Davis RC, Devaskar SU, Lusi, Aldons J (2009). Maternal low-protein diet or hypercholesterolemia reduces circulating essential amino acids and leads to intrauterine growth restriction. *Diabetes* 58(3): 559–566
11. Brenseke B, Prater M R, Bahamonde J, Gutierrez JC (2013). Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. *J Pregnancy* 2013: 368461
12. Brett KE, Ferraro ZM, Yockell-Lelievre J, Gruslin A, Adamo KB (2014). Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int J Mol Sci* 15(9): 16153–16185

13. Brown K, Heller DS, Zamudio S, Illsley NP (2011). Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. *Placenta* 32(12): 1041–1049
14. Burton GJ, Fowden AL (2012). Review: The placenta and developmental programming: balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. *Placenta* 33 Suppl: S23-7
15. Campbell FM, Bush PG, Veerkamp JH, Dutta-Roy AK (1998). Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta. *Placenta* 19(5-6): 409–415
16. Cetin I, Alvino G (2009). Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta* 30 Suppl A: S77-82
17. Cetin I, Corbetta C, Sereni LP, Marconi AM, Bozzetti P, Pardi G, Battaglia FC (1990). Umbilical amino acid concentrations in normal and growth-retarded fetuses sampled in utero by cordocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 162(1): 253–261
18. Cetin I, Giovannini N, Alvino G, Agostoni C, Riva E, Giovannini M, Pardi G (2002). Intrauterine growth restriction is associated with changes in polyunsaturated fatty acid fetal-maternal relationships. *Pediatr Res* 52(5): 750–755
19. Cetin I, Marconi AM, Bozzetti P, Sereni LP, Corbetta C, Pardi G, Battaglia FC (1988). Umbilical amino acid concentrations in appropriate and small for gestational age infants: a biochemical difference present in utero. *Am J Obstet Gynecol* 158(1): 120–126
20. Chan BS, Endo S, Kanai N, Schuster VL (2002). Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT. *Am J Physiol Renal Physiol* 282(6): F1097-102
21. Chi Y, Khersonsky S M, Chang Y-T, Schuster VL (2006). Identification of a new class of prostaglandin transporter inhibitors and characterization of their biological effects on prostaglandin E2 transport. *J Pharmacol Exp Ther* 316(3): 1346–1350
22. Cleal JK, Lewis RM (2008). The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human foetus. *J Neuroendocrinol* 20(4): 419–426
23. Coan PM, Vaughan OR, Sekita Y, Finn SL, Burton GJ, Constancia M, Fowden AL (2010). Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. *J Physiol (Lond)* 588 (Pt 3): 527–538
24. Cramer S, Beveridge M, Kilberg M, Novak D (2002). Physiological importance of system A-mediated amino acid transport to rat fetal development. *Am J Physiol, Cell Physiol* 282(1): C153-60

25. Cunningham P, McDermott L (2009). Long chain PUFA transport in human term placenta. *J Nutr* 139(4): 636–639
26. Das UG, Sadiq HF, Soares MJ, Hay WW, Devaskar SU (1998). Time-dependent physiological regulation of rodent and ovine placental glucose transporter (GLUT-1) protein. *Am J Physiol* 274(2 Pt 2): R339-47
27. Desforges M, Lacey HA, Glazier JD, Greenwood SL, Mynett KJ, Speake PF, Sibley CP (2006). SNAT4 isoform of system A amino acid transporter is expressed in human placenta. *Am J Physiol, Cell Physiol* 290(1): C305-12
28. Desforges M, Mynett KJ, Jones RL, Greenwood SL, Westwood M, Sibley CP, Glazier JD (2009). The SNAT4 isoform of the system A amino acid transporter is functional in human placental microvillous plasma membrane. *J Physiol (Lond)* 587(Pt 1): 61–72
29. Desforges M, Sibley, Colin P (2010). Placental nutrient supply and fetal growth. *Int J Dev Biol* 54(2-3): 377–390
30. Dörner G (1975). Problems and terminology of functional teratology. *Acta Biol Med Ger* 34(6): 1093–1095
31. Dötsch J, Plank C, Amann K, Ingelfinger J (2009). The implications of fetal programming of glomerular number and renal function. *J Mol Med* (9): 841–848
32. Duttaroy AK (2009). Transport of fatty acids across the human placenta: a review. *Prog Lipid Res* 48(1): 52–61
33. Ericsson A, Hamark B, Jansson N, Johansson BR, Powell TL, Jansson T (2005). Hormonal regulation of glucose and system A amino acid transport in first trimester placental villous fragments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(3): R656-62
34. Even MD, Laughlin MH, Krause GF, Vom Saal FS (19). Differences in blood flow to uterine segments and placentae in relation to sex, intrauterine location and side in pregnant rats. *J Reprod Fertil* 102(1): 245–252
35. Gagnon R (2003). Placental insufficiency and its consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1: S99-107
36. Ganguly A, McKnight RA, Raychaudhuri S, Shin B-C, Ma Z, Moley K, Devaskar SU (2007). Glucose transporter isoform-3 mutations cause early pregnancy loss and fetal growth restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(5): E1241-55
37. Gauster M, Hiden U, Blaschitz A, Frank S, Lang U, Alvino G, Cetin I, Desoye G, Wadsack C (2007). Dysregulation of placental endothelial lipase and lipoprotein lipase in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 92(6): 2256–2263

38. Glazier JD, Cetin I, Perugino G, Ronzoni S, Grey AM, Mahendran D, Marconi AM, Pardi G, Sibley CP (1997). Association between the activity of the system A amino acid transporter in the microvillous plasma membrane of the human placenta and severity of fetal compromise in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 42(4): 514–519
39. Glazier JD, Sibley CP, Carter AM (1996). Effect of fetal growth restriction on system A amino acid transporter activity in the maternal facing plasma membrane of rat syncytiotrophoblast. *Pediatr Res* 40(2): 325–329
40. Godfrey KM, Barker DJ (2000). Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 71(5 Suppl): 1344S–1352
41. Godfrey KM, Barker DJ. (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* 4(2B): 611–624
42. Gortner L, Hilgendorff A, Böhner T, Ebsen M, Reiss I, Rudloff S (2005). Hypoxia-induced intrauterine growth retardation: effects on pulmonary development and surfactant protein transcription. *Biol Neonate* 88(2): 129–135
43. Greenwood SL, Sibley Colin P (2006). In vitro methods for studying human placental amino acid transport placental villous fragments. *Methods Mol Med* 122: 253–264
44. Grillo MA, Lanza A, Colombatto S (2008). Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids* 34(4): 517–523
45. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 114(5-6): 397–407
46. Haggarty P (2004). Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. *Eur J Clin Nutr* 58(12): 1559–1570
47. Hales CN, Barker DJ (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60: 5–20
48. Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P, Abumrad NA (1996). Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2646–2651
49. Illsley NP (2000). Glucose transporters in the human placenta. *Placenta* 21(1): 14–22
50. Innis SM (2005). Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 26 Suppl A: S70-5
51. Janssen CIF, Zerbi V, Mutsaers MPC, de Jong BS, Wiesmann M, Arnoldussen IA, Geenen B, Heerschap A, Muskiet FA, Jouni ZE, van Tol EA, Gross G, Homberg JR, Berg BM, Kiliaan AJ (2015). Impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on cognition, motor skills and hippocampal neurogenesis in developing C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem* 26(1): 24–35

52. Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, Ericsson A, Palmberg I, Tranberg M, Ganapathy V, Powell TL, Jansson T (2006). Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J Physiol (Lond)* 576(Pt 3): 935–946
53. Jansson T (2001). Amino acid transporters in the human placenta. *Pediatr Res* 49(2): 141–147
54. Jansson T, Powell T (2006). IFPA 2005 Award in Placentology Lecture. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? -- a review. *Placenta* 27 Suppl A: S91-7
55. Jansson T, Scholtbach V, Powell TL (1998). Placental transport of leucine and lysine is reduced in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 44(4): 532–537
56. Jansson T, Wennergren M, Illsley NP (1993). Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 77(6): 1554–1562
57. Jansson T, Ylvén K, Wennergren M, Powell TL (2002). Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction. *Placenta* 23(5): 392–399
58. Janzen C, Lei MYY, Cho J, Sullivan P, Shin B-C, Devaskar SU (2013). Placental glucose transporter 3 (GLUT3) is up-regulated in human pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction. *Placenta* 34(11): 1072–1078
59. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ (1999). A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 21(4): 424–428
60. Kalhan S, Parimi P (2000). Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Semin Perinatol* 24(2): 94–106
61. Koletzko B, Larqué E, Demmelmair H (2007). Placental transfer of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). *J Perinat Med* 35 Suppl 1: S5-11
62. Lager S, Powell TL (2012). Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy* 2012: 179827
63. Larqué E, Demmelmair H, Klingler M, De Jonge S, Bondy B, Koletzko B (2006). Expression pattern of fatty acid transport protein-1 (FATP-1), FATP-4 and heart-fatty acid binding protein (H-FABP) genes in human term placenta. *Early Hum Dev* 82(10): 697–701

64. Lee PA, Chernausk SD, Hokken-Koelega ACS, Czernichow P (2003). International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics* 111(6 Pt 1): 1253–1261
65. Li Z, Lai G, Deng L, Han Y, Zheng D, Song W (2012). Association of SLC38A4 and system A with abnormal fetal birth weight. *Exp Ther Med* 3(2): 309–313
66. Lin CC, Su SJ, River LP (1991). Comparison of associated high-risk factors and perinatal outcome between symmetric and asymmetric fetal intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 164(6 Pt 1): 1535-41; discussion 1541-2
67. Yan Lin Ph.D., Yong Zhuo M.D., Zheng-feng Fang Ph.D., Lian-qiang Che Ph.D., De Wu Ph.D. (2012). Effect of maternal dietary energy types on placenta nutrient transporter gene expressions and intrauterine fetal growth in rats. *Nutrition* 28 1037–1043
68. Luttmann W (2009). *Der Experimentator: Immunologie*, 3. Aufl. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
69. Malandro MS, Beveridge MJ, Kilberg MS, Novak DA (1996). Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placental amino acid transport. *Am J Physiol* 271(1 Pt 1): C295-303
70. Mamelle N, Boniol M, Rivière O, Joly MO, Mellier G, Maria B, Rousset B, Claris O (2006). Identification of newborns with Fetal Growth Restriction (FGR) in weight and/or length based on constitutional growth potential. *Eur J Pediatr* 165(10): 717–725
71. Manning J, Vehaskari VM (2001). Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol* 16(5): 417–422
72. McCoy MG, Sun G-S, Marchadier D, Maugeais C, Glick JM, Rader DJ (2002). Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res* 43(6): 921–929
73. Mühlhardt C (2013) *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, 7. Aufl. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l.
74. Myatt L (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol (Lond)* 572(Pt 1): 25–30
75. Nagai A, Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T (2010). Cellular expression of the monocarboxylate transporter (MCT) family in the placenta of mice. *Placenta* 31(2): 126–133
76. Nelson DM, Smith SD, Furesz TC, Sadovsky Y, Ganapathy V, Parvin C A, Smith CH (2003). Hypoxia reduces expression and function of system A amino acid transporters in cultured term human trophoblasts. *Am J Physiol, Cell Physiol* 284(2): C310-5

77. Novak D, Lehman M, Bernstein H, Beveridge M, Cramer S (2006). SNAT expression in rat placenta. *Placenta* 27(4-5): 510–516
78. Novak DA, Beveridge MJ, Malandro M, Seo J (1996). Ontogeny of amino acid transport system A in rat placenta. *Placenta* 17(8): 643–651
79. Nüsken E, Gellhaus A, Kühnel E, Swoboda I, Wohlfarth M, Vohlen C, Schneider H, Dötsch J, Nüsken K-D Nüsken (2015). Increased Rat Placental Fatty Acid, But Decreased Amino Acid and Glucose Transporters Potentially Modify Intrauterine Programming. *J Cell Biochem*
80. Nüsken K-D, Dötsch J, Rauh M, Rascher W, Schneider H (2008). Uteroplacental insufficiency after bilateral uterine artery ligation in the rat: impact on postnatal glucose and lipid metabolism and evidence for metabolic programming of the offspring by sham operation. *Endocrinology* 149(3): 1056–1063
81. Nüsken K-D, Schneider H, Plank C, Trollmann R, Nüsken E, Rascher W, Dötsch J (2011). Fetal programming of gene expression in growth-restricted rats depends on the cause of low birth weight. *Endocrinology* 152(4): 1327–1335
82. Ong KK, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB (2000). Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ* 320(7240): 967–971
83. Plagemann A, Harder T, Schellong K, Rodekamp E, Dudenhausen JW (2008). Fetale Programmierung bei intrauteriner Milieustörung - grundlegende Mechanismen am Beispiel der Körpergewichts- und Stoffwechselregulation. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 48(4): 215–224
84. Radaelli T, Cetin I, Ayuk PT-Y, Glazier JD, Pardi G, Sibley CP (2002). Cationic amino acid transporter activity in the syncytiotrophoblast microvillous plasma membrane and oxygenation of the uteroplacental unit. *Placenta* 23 Suppl A: S69-74
85. Rehm H (2007). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 5. Aufl. Elsevier Spektrum Akad. Verl., München
86. Reid GJ, Lane RH, Flozak AS, Simmons RA (1999). Placental expression of glucose transporter proteins 1 and 3 in growth-restricted fetal rats. *Am J Obstet Gynecol* 180(4): 1017–1023
87. Roos S, Kanai Y, Prasad PD, Powell TL, Jansson T (2009). Regulation of placental amino acid transporter activity by mammalian target of rapamycin. *Am J Physiol, Cell Physiol* 296(1): C142-50

88. Rosario F J, Jansson N, Kanai Y, Prasad PD, Powell TL, Jansson T (2011). Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. *Endocrinology* 152(3): 1119–1129
89. Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM, Sadovsky Y (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 90(7): 4267–4275
90. Schuster VL (1998). Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* 60: 221–242
91. Schuster VL (2002). Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 633–647
92. Settle P, Sibley CP, Doughty IM, Johnston T, Glazier JD, Powell TL, Jansson T, D'Souza SW (2006). Placental lactate transporter activity and expression in intrauterine growth restriction. *J Soc Gynecol Investig.* 13(5):357-63.
93. Simpson IA, Dwyer D, Malide D, Moley KH, Travis A, Vannucci SJ (2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(2): E242-53
94. Smith W L, Dewitt DL (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 62: 167–215
95. Valero De Bernabé J, Soriano T, Albaladejo R, Juarranz M, Calle ME, Martínez D, Domínguez-Rojas V (2004). Risk factors for low birth weight: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 116(1): 3–15
96. Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Mao X, Cheng J, Yoo J, Noebels JL, DeVivo DC (2006). A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum Mol Genet* 15(7): 1169–1179
97. Wigglesworth JS (1964). Experimental growth retardation in the foetal rat. *J Pathol Bacteriol* 88: 1–13
98. Wlodek ME, Westcott K, Siebel AL, Owens JA, Moritz KM (2008). Growth restriction before or after birth reduces nephron number and increases blood pressure in male rats. *Kidney Int* 74(2): 187–195
99. Wollmann (1998). Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Horm Res* 49(Suppl 2): 1–6
100. Zhou J, Bondy CA (1993). Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. *J Clin Invest* 91(3): 845–852

7. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

1. Journal: Journal of cellular biochemistry
Erscheinungsjahr: 2015
Autoren: Nüsken, Eva; Gellhaus, Alexandra; Kühnel, Elisabeth; Swoboda, Isabelle;
Wohlfarth, Maria; Vohlen, Christina; Schneider, Holm; Dötsch, Jörg;
Nüsken, Kai- Dietrich
Titel: Increased Rat Placental Fatty Acid, But Decreased Amino Acid and Glucose
Transporters Potentially Modify Intrauterine Programming
2. Journal: Monatszeitschrift für Kinderheilkunde
Erscheinungsjahr: 2012
Autorin: Swoboda, Isabelle
Titel: „Genexpression plazentarer Transporter nach bilateraler Arteria uterina Ligatur
bei der Ratte“

Abstractveröffentlichung anlässlich der Posterpräsentation auf der Jahrestagung der
Deutschen Gesellschaft für Kinderendokrinologie und –diabetologie e.V. und der
Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Diabetologie e.V. im November 2012.
3. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Kinderendokrinologie und –diabetologie e.V. und der Arbeitsgemeinschaft für
Pädiatrische Diabetologie e.V. im November 2012

Titel: „Genexpression plazentarer Transporter nach bilateraler Arteria uterina Ligatur
bei der Ratte“
4. Posterpräsentation auf der IFPA-Tagung im September 2014 in Paris -
Titel: „Altered placental expression levels of nutrient transporters after bilateral uterine
artery ligation in the rat“
Autoren:Alexandra Gellhaus, Elisabeth Kühnel, Eva Nüsken, Isabelle Swoboda,
Maria Wohlfarth, Jörg Dötsch, Kai-Dietrich Nüsken
Abstract: www.placentajournal.org/article/S0143-4004%2814%2900361-0/abstract

8. Anhang

Tabelle 8.0 Tierversuch	
Flüssiges Stickstoff	Linde
Formalin	Linde
Isotonische Kochsalzlösung	Berlin Chemie AG, 12474 Berlin
Midazolam	Best.-Nr.: C148.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
4-0 Vicryl Nahtmaterial	Best.-Nr.: 1677H, Ethicon; Johnson & Johnson Medical GmbH, 22851 Norderstedt
6-0 Prolene Nahtmaterial	Best.-Nr.: EH7830H, Ethicon; Johnson & Johnson Medical GmbH, 22851 Norderstedt
Skalpell	
Wistar-Ratten	Charles River Laboratories, Sulzfeld
Erlenmeyerkolben Weithals 250 ml	Best.-Nr.: C148.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe

Tabelle 8.1 Materialien und Geräte zur Gen- und Proteinexpressionsquantifizierung	
Bechergläser 100 ml	Best.-Nr.: X689.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Bechergläser 1000ml (niedrig)	Best.-Nr.: C118.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Bechergläser 250 ml (niedrig)	Best.-Nr.: X704.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Bechergläser 600 ml (hoch)	Best.-Nr.: X706.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Bechergläser 600 ml (niedrig)	Best.-Nr.: X693.1; Carl Roth GmbH & Co. KG,

	76185 Karlsruhe
Erlenmeyerkolben Weithals 100 ml	Best.-Nr.: C146.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Erlenmeyerkolben Weithals 250 ml	Best.-Nr.: C148.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Erlenmeyerkolben Weithals 50 ml	Best.-Nr.: C145.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Falcons (15 ml)	Best.-Nr.: 62.554.512; Sarstedt, 51582 Nümbrecht
Falcons (50 ml)	Best.-Nr.: 62.547.254; Sarstedt, 51582 Nümbrecht
Gewindeflasche 1000ml	Best.-Nr.: A361.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Gewindeflasche 2000ml	Best.-Nr.: A362.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Gewindeflasche 250ml	Best.-Nr.: A359.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Gewindeflasche 500ml	Best.-Nr.: A360.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Kapillarspitzen 200µl (für Westernblot)	Best.-Nr.: 729011; BIOZYM Gesellschaft für Enzymtechnologie mbH, D-22113 Hamburg
Kugeln	rostfreier Stahl, Durchmesser: 5mm; Retsch, 42781 Haan, Germany
Magnetrührstab 15 mm	Best.-Nr.: Y823.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Magnetrührstab 29 mm	Best.-Nr.: Y824.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Meßzylinder (hoch) 100 ml	Best.-Nr.: C177.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe

Meßzylinder (hoch) 1000 ml	Best.-Nr.: C180.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Meßzylinder (hoch) 250 ml	Best.-Nr.: C178.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Meßzylinder (hoch) 50 ml	Best.-Nr.: C176.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Meßzylinder (hoch) 500 ml	Best.-Nr.: C179.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Meßzylinder (niedrig) 100 ml	Best.-Nr.: K258.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Meßzylinder (niedrig) 250 ml	Best.-Nr.: K259.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Meßzylinder (niedrig) 50 ml	Best.-Nr.: K257.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Meßzylinder (niedrig) 500 ml	Best.-Nr.: K260.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Minimörser	PP-Pistill, Best.-Nr.: P987.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Mörser, Pistill	Haldenwanger
Paraffin- Papier	Parafilm M, Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
PCR- Tubes	PCR-Tubes (0,2 ml), Best.-Nr.: 82-0620-A, PeqLab, D-91052 Erlangen
Pipette	Multipipette Eppendorf; Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipette (elektrisch)	Easypet 4421, mit Steckernetzteil 230V/50Hz, Eppendorf GmbH, Hamburg

Pipetten	Eppendorf Reference, Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	0,1-10 µl epT.I.P.S. LoRetention Dualfilter, Racks, Best.-Nr.: 0030 077.610, Eppendorf GmbH, Hamburg 20 µl nicht gestopft, Best.-Nr.: 70.1116, Sarstedt, 51582 Nümbrecht 200 µl nicht gestopft, Best.-Nr.: 70.760.002, Sarstedt, 51582 Nümbrecht 1000 µl nicht gestopft, Best.-Nr.: 70.762, Sarstedt, 51582 Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Reaktionsgefäße 0,5ml, Best.-Nr.: 72.699, Sarstedt, 51582 Nümbrecht Reaktionsgefäße 1,5ml, Best.-Nr.: 72.706, Sarstedt, 51582 Nümbrecht Reaktionsgefäße, 2ml, Best.-Nr.: 72.695.500, Sarstedt, 51582 Nümbrecht
Reaktionsgefäßständer	Rotilabo [®] -Reaktionsgefäßständer 2 in 1 (0,5-1,7 ml), Best.-Nr.: E816.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Rotilabo [®] -PCR-Racks	Best.-Nr.: HX25.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Rotilabo [®] -Reaktionsgefäßständer 2 in 1 (0,5-1,7 ml)	Best.-Nr.: E816.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Rotilabo [®] -Reaktionsgefäßständer 80 x 1,5/2 ml	Best.-Nr.: C771.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Schraubröhre	(8 ml), Best.-Nr.: 60.542.024, Sarstedt, 51582 Nümbrecht
Skalpell	Einmal Skalpelle, Best.-Nr.: T998.1; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe

Sonifizierer	Bandelin Sonopuls HD2070; BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, D-12207 Berlin
Stabpipette 10ml	Best.-Nr.: 86.1254.001; Sarstedt, 51582 Nümbrecht
Stabpipette 25ml	Best.-Nr.: 861685001; Sarstedt, 51582 Nümbrecht
Stabpipette 5ml	Best.-Nr.: 861253001; Sarstedt, 51582 Nümbrecht
Thermomixer	Eppendorf Research; Eppendorf GmbH, Hamburg
Vortexer	MiniVortex L023, G. Kisker GbR, D-48565 Steinfurt
Wasserbad	WNB 7 – 45 , Memmert GmbH & Co. KG, D-91126 Schwabach
Zentrifuge	Centrifuge 5424R, Rotor: FA-45-24-11, Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge	Z216MK, Hermle Labortechnik GmbH
Zentrifuge (klein)	Micro Centrifuge SD 220V AC, Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe

Tabelle 8.2 Chemikalien für die RNA-Isolation	
Chloroform	Chloroform reinst, 1L, Best.-Nr.: 1.02431.1000, Merck, 64293 Darmstadt
DEPC-Wasser	DEPC-Wasser, 25ml, Best.-Nr.: D5758-25ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103
Ethanol, absolut	1L, Best.-Nr.: 1.00983.1000; Merck, 64293 Darmstadt
Isopropanol	Isopropanol, 2,5L, Best.-Nr.: 6752,4, Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
TRIzol	Tri Reagent, 200ml, Best.-Nr.: T9424-200ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103

Tabelle 8.3 Geräte und Materialien für die RNA-Konzentrationsbestimmung	
Platte:	Tecan 16 Flat Bottom black Quarz/Alu
Gerät:	Nano Quant infinite M200 pro, Tecan, Seriennummer: 1010003100
Programm:	Tecan i-control, Version 1.7.1.12
DEPC-Wasser:	25ml, Best.-Nr.: D5758-25ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103

Tabelle 8.4 Für die reverse Transkription verwendete Reagenzien und Materialien	
EDTA	Best.-Nr.: E6635-500G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103
DEPC-Wasser	DEPC-Wasser, 25ml, Best.-Nr.: D5758-25ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103
dNTP- Mix	dNTP- Mix (10 mM), 1ml 10mM, Best.-Nr.: R0193; Fermentas, Fisher Scientific, USA, Pittsburgh
Heiz-Blockthermostat	Modell TK23, HLC BioTech, D-37120 Boven
MMLV (reverse Transkriptase)	MMLV (reverse Transkriptase) inkl. Puffer, 50000 Units (200u/μl), Best.-Nr.: M1705, Promega, 68199 Mannheim
MMLV- Puffer	Pack, 2x 1ml, Best.-Nr.: M5313, Promega, 68199 Mannheim
OligodT-Primer	OligodT-Primer (5'TTTTTTTTTTTTTTTT3'), HPSF 0,2μm; MWG-Biotech AG, Alabama 35805, USA
Randomprimer	Randomprimer 1:4; 0,5 ug/ul, Best.-Nr.: 11034731001; Roche, 79639 Grenzach-Wyhlen
Rnase-free Dnase	Dnase I, Rnase free (inkl. Puffer und EDTA-Stopsolution 25mM), Best.-Nr.: M6101,1000U, Promega, 68199 Mannheim
Rnasin Ribonuclease Inhibitor	10000U (40U/μl), Best.-Nr.: N2515, Promega, 68199 Mannheim

Tabelle 8.5 Mengenangaben für die Durchführung einer Reversen Transkription		
DNase Verdau	10x Dnase I-Puffer (Promega)	1 μ l
	<u>RNase-free DNase I (Promega)</u>	1 μ l
		2 μl
Stop-Solution	25 mM EDTA	1 μl
Mastermix A:	Randomprimer (1:4; 0,5 μ g/ μ l)	0,6 μ l
	Oligo dt-Primer (0,5 μ g/ μ l)	0,4 μ l
	<u>DEPC A.d. (Sigma)</u>	4 μ l
		5 μl
Mastermix B:	MMLV-buffer 5x (Promega)	5 μ l
	dNTP-Mix (10 mM each) (Fermentas)	1,25 μ l
	Rnase-Inhibitor (40 U/ μ l) (Promega)	0,5 μ l
	MMLV (Promega: 200U/ μ l) (Promega)	1 μ l
	<u>DEPC A.d. (Sigma)</u>	2,25 μ l
		10 μl

Tabelle 8.6 Verwendete Geräte für die Realtime PCR	
PCR Thermocycler	7500 Real time PCR System, Applied Biosystems, CA
TaqMan real-time PCR:	
Primerdesign:	Primer Express Software™ (Applied Biosystems, Foster City, USA)
Computer (TaqMan):	Dell Optiplex 960, Windows XP
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Best.-Nr.: 4316813, Applied Biosystems, Foster City, USA
Optical Adhesive Covers:	Best.-Nr.: 4311971, Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp Adhesive Film Applicator	Best.-Nr.: 4333183, Applied Biosystems, Foster City, USA

Zentrifuge (groß):	Rotina 420R, Hettich Zentrifugen; D-78532 Tuttlingen / Germany
--------------------	--

Tabelle 8.7 Ausgewählte Sonden und Primer		
FAT/CD36	Sonde	CGCCTTTGCCTCCCCACTCCA
	Forward Primer	CAGTGCAGAAACAGTGGTTGTCT
	Reverse Primer	TGACATTTGCAGGTCCATCTATG
	Mg-Konzentration	3,5µM
hFAB	Sonde	TAGCATGACCAAGCCGACCACAATCATT
	Forward Primer	TCACTCGGTGTGGGCTTTG
	Reverse Primer	GGTGATGGTATCCCCATTCTTCT
	Mg-Konzentration	2,5µM
SLC27a1	Sonde	CGCCACCAACAAGAAGATTGCCCAC
	Forward Primer	GGCGCTTCGATGGCTATGT
	Reverse Primer	CACTAGCACGTCACCTGAAAGG
	Mg-Konzentration	4µM
SLC27a4	Sonde	TCTTCTATATCTACACGTCGGGCACCACG
	Forward Primer	GCATCCCAGACAAGGGTTTTAC
	Reverse Primer	GTAATACCTGCTGTGCACCACAA
	Mg-Konzentration	3µM
SLC38a1	Sonde	TGTTCTTCACAGTCCGGTCCTCGTTG
	Forward Primer	AGCACAGGCGACATTCTCATC
	Reverse Primer	ACAGGTGGAACCTTCGTCTTCTTG
	Mg-Konzentration	4 µM

SLC38a2	Sonde	TCCTTCTGGTGTCTTCGTGCTCATTCT
	Forward Primer	ACGAATGGGCTGTGGTATCTG
	Reverse Primer	CCTAGATTTCTCAGCAGTGACAATG
	Mg-Konzentration	3,5 µM
SLC38a4	Sonde	TGTTCTTCACAGTCCGGTCCTCGTTG
	Forward Primer	AGCACAGGCGACATTCTCATC
	Reverse Primer	ACAGGTGGA ACTTCGTCTTCTTG
	Mg-Konzentration	4 µM
SLC2a1	Sonde	CCATCGGCTCGGGTATCGTCAACA
	Forward Primer	GCATCAATGCTGTGTTCTACTACTCA
	Reverse Primer	GACGAACAGCGACACCACAGT
	Mg-Konzentration	3,5 µM
SLC2a3	Sonde	CCATCGGCTCGGGTATCGTCAACA
	Forward Primer	GCATCAATGCTGTGTTCTACTACTCA
	Reverse Primer	GACGAACAGCGACACCACAGT
	Mg-Konzentration	3 µM
SLC2a1	Sonde	TTTCCTTGCCACGCCGG
	Forward Primer	CTGTGGAGACAATGGAGTCGAGTA
	Reverse Primer	GCAGTTCAAGTAGATCGGTTCTTA
	Mg-Konzentration	3 µM
SLC16A4	Sonde	CATACGTGGGCTCTTTCTATTCTCTGGCA
	Forward Primer	CCAATAGCAGGCTGGATATACGAT
	Reverse Primer	TTCCATCTTTCAGCCAGTGGTA
	Mg-Konzentration	3µM

Tabelle 8.8 Verwendete Reagenzien für die Real time PCR	
dNTP- Mix	dNTP- Mix (10 mM), 1ml 10mM, Best.-Nr.: R0193; Fermentas, Fisher Scientific, USA, Pittsburgh
ROX passive reference	300µl, Best.-Nr.: RT-PARE-03, Eurogentec, 50667 Köln
TaqMan reaction kit	10x Taq-Buffer II, 5 mM dNTP- Mix (UTP), 50 mM MgCl ₂ , Best.-Nr.: 10-QP73-05 NR, Eurogentec, 50667 Köln
Enzym	AmpliTaq gold (Hot Gold Star), 500 U (5U/µl), Best.-Nr.: SAP-Nr. 770692, Eurogentec, 50667 Köln
Enzym	Uracil-N-Glycosylase UNG - Enzym, 300 Units, Best.-Nr.: RT 0610-03, Eurogentec, 50667 Köln
Sonde taq (2µM):	Eurofins MWG Operon; Alabama 35805, USA
Primer for:	Eurofins MWG Operon; Alabama 35805, USA
Primer rev:	Eurofins MWG Operon; Alabama 35805, USA

Tabelle 8.9 Mengenangaben für die Durchführung einer Taqman-Real-Time-PCR			
Mastermix	10x Taq-Buffer	2,50	µl
	ROX Passive (Eurogentec)	1,75	µl
	5 mM dNTP-Mix (UTP) (Eurogentec)	1,00	µl
	50 mM MgCl ₂ (X mM)		µl
	AmpliTaqqgold (Eurogentec)	0,13	µl
	AmpERaseUNg (Eurogentec)	0,25	µl
	H ₂ O	8,12	µl
	Summe	15,00	µl
Sonde taq (2µM)		2,50	µl
Primer forward		2,50	µl
Primer reverse		2,50	µl
Summe		22,50	µl
cDNA		2,50	µl
Summe		25,00	µl

Tabelle 8.10 Reagenzien für die Proteinisolation	
Glycerol	500ml, Best.-Nr.: G5516-500ML; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103
Harnstoff, p.a., > 99,5% (Urea)	500g, Best.-Nr.: 3941.3; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
SDS	500g, Best.-Nr.: 2326.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Tris	Best.-Nr.: 5429.3, Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Dithiothreitol	DTT (1,4-Dithiothreitol), 10g, Best.-Nr.: 6908.3, Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl Fluoride(PMSF)	Best.-Nr.: P7626-5G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103

Tabelle 8.11 Reagenzien und Geräte für die Proteinkonzentrationsbestimmung	
Probenplatte	96 MicroWell™ Plates Non-treated - Pinchbar Design, Best.-Nr.: 269620, Nuncbrand
Gerät	Nano Quant infinite M200 pro, Tecan, Seriennummer: 1010003100
PC	Dell
Software	Tecan i-control, Version 1.7.1.12
BCA Protein Assay Kit	Pierce Protein Biology Products, Best.-Nr.: 23225, Pierce / Thermo scientific, Rockford, IL USA 61101

Tabelle 8.12 Für den Western Blot verwendete Antikörper			
1. Antikörper	Bestelldaten	2. Antikörper	Bestelldaten
SNAT1 1:500 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: sc-137032, Santa Cruz Biotechnology, USA	Anti-Mouse 1:2000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: #7076; Cell Signaling, Danvers
GAPDH 1:10000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: #2118; Cell Signaling, Danvers	Anti-Rabbit 1:3000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: #7074; Cell Signaling, Danvers
hFABP 1:3000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: ab133585, Abcam , Cambridge, USA	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: #7074; Cell Signaling, Danvers
GLUT1 1:2000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: NB110- 39113, Novus Biologicals, USA	Anti-Rabbit 1:2000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: #7074; Cell Signaling, Danvers
SNAT2 1:1000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: sc-166366, Santa Cruz Biotechnology, USA	Anti-Mouse 1:2000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: #7076; Cell Signaling, Danvers
CD36 1:500 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: NB110- 59724, Novus Biologicals, USA	Anti-Mouse 1:2000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: #7076; Cell Signaling, Danvers
GLUT3 1:2000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: ab41525, Abcam , Cambridge, USA	Anti-rabbit 1:2000 in 5% Milch/TBST	Best.-Nr.: #7074; Cell Signaling, Danvers

Tabelle 8.13 Reagenzien, Geräte sowie Gel- und Pufferherstellung für die Gelelektrophorese	
Thermomixer	Eppendorf Research, Eppendorf GmbH, Hamburg
Acrylamide Mix Gel 30	11, Best.-Nr.: 3029,1; Carl Roth GmbH & Co.-KG, Art.- Nr. K928.4

Tris	Best.-Nr.: 5429.3, Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
SDS	500g, Best.-Nr.: 2326.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
TEMED	25ml, Best.-Nr.:T9281-25ML; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103
Bromphenolblau	10g, Best.-Nr.: A512.1; Carl Roth GmbH & Co.-KG, Art.- Nr. K928.4
Glycin, Elphograde	Best.-Nr.: 3908.3; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	β -ME, 2- Mercaptoethanol 99%, p.a.; Carl Roth GmbH & Co.-KG, Art.- Nr. K928.4
Marker	Proteinmarker IV (10-170kD), Best.-Nr.: 27-2111, PeqLab, D-91052 Erlangen
Acrylamidgel Sammelgel (8ml)	5,44ml VE Wasser 1,36ml 30% Acrylamidmix 1,04 ml 0,5M Tris pH 6,8 (Sammelgelpuffer) 0,08ml10% SDS 0,08ml 10% APS 0,008ml TEMED
Acrylamidgel Trenngel (10%) (25ml):	10ml VE Wasser 8,25ml 30% Acrylamidmix 6,25ml 1,5M Tris pH 8,8 (Trenngelpuffer) 0,25ml 10% SDS 0,25ml 10% APS 0,01ml TEMED

Acrylamidgel	8,25ml VE Wasser
Trenngel (12%) (25ml):	10ml 30% Acrylamidmix 6,25ml 1,5M Tris pH 8,8 (Trenngelpuffer) 0,25ml 10% SDS 0,25ml 10% APS 0,01ml TEMED
5x Probenpuffer (50ml):	8,2ml Sammelgelpuffer 10,3ml 10% SDS 1,3ml Bromphenolblau 5ml Glycerin 12,5 ml b-Mercaptoethanol
10x Lämmli- Puffer	0,25M Tris 2M Glycin 1% SDS
Ammoniumpersulfat (APS)	Best.-Nr.: A3678-25G; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103
Gelelektrophorese	PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S Best.-Nr.: 45-1614-C; PeqLab, D-91052 Erlangen
Gelgießstand	Cast-it, Gelgießstand, Best.-Nr.: 45-1614-CU; PeqLab, D-91052 Erlangen
Transformator	Power Supply EV231; PeqLab, D-91052 Erlangen

Tabelle 8.14 Reagenzien und Geräte für den Western Blot	
Tris	Best.-Nr.: 5429.3, Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Glycin, Elphograde	Best.-Nr.: 3908.3; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Wasserbad	WNB 7 – 45, Memmert GmbH & Co. KG, D-91126 Schwabach

SDS	500g, Best.-Nr.: 2326.2; Carl Roth GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
TEMED	25ml, Best.-Nr.:T9281-25ML; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103
Tween	Tween 20 / Polyethylensorbitmonolaurate, 500ml, Best.-Nr.: P1379-500ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103
β-Mercaptoethanol	β-ME, 2- Mercaptoethanol 99%, p.a.; Carl Roth GmbH & Co.-KG, Art.- Nr. K928.4
Whatmanpapier	Whatman- Paper, dick, 25 St. 580 x 580 mm, Best.-Nr.: 10 426 994; Whatman, GE Healthcare, 80807 München
Nitrocellulose	Nitrozellulose (Transfermembran) Protran BA 85, Best.-Nr.: 10401197; Wagner und Munz, D-81829 München
Thermomixer	Eppendorf Research, Eppendorf GmbH, Hamburg
Transformator	Power Supply EV231; PeqLab, D-91052 Erlangen
Blot Kammer	PerfectBlue Semi-Dry Electro Blotter, Best.-Nr.: 52-2020, PeqLab, D-91052 Erlangen
Folienschweißgerät	Severin
Schüttler	Duomax 1030, Best.-Nr.: 5433221000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D-91126 Schwabach
Entwickler	Molecular Imager, ChemiDoc XRS+, Best.-Nr.: #1708265; BioRad, CA 94547, USA
Auswertungssoftware	Image Lab, Version 4.0.1 build 6, Dec 08/2011, Copyright 2011 Bio-Rad Laboratories
Western Blot Enhancer	Pierce Western blot signal enhancer, 500ml, Best.-Nr.: 21050; Pierce / Thermo scientific, Rockford, IL USA 61101

Tabelle 8.15 Für den Western Blot verwendete Puffer	
10x Lämmli- Puffer	0,25M Tris 2M Glycin 1% SDS
10x Towbin Puffer	0,25M Tris 2M Glycin
10x TBS:	0,1M Tris 1M NaCL pH 7,5 mit HCL einstellen
TBST:	1x TBS + 0,01% Tween 20
Blockpuffer:	5% Milch in TBST und 2% BSA
Stripping Puffer:	0,05M Tris 2% SDS pro 10ml Puffer 70µl β-Mercaptoethanol

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.