

**Aus der Klinik für Geburtsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**Antenatale Glukokortikoidexposition –
Etablierung von Referenzgenen in der humanen Plazenta**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hanna Gütling
aus Würzburg

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
Zusammenfassung.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Interne Kontrollgene.....	1
1.1.1 Normalisierung von RT-qPCR-Daten.....	1
1.1.2 Notwendigkeit interner Kontrollgene für Expressionsstudien.....	2
1.1.3 Verfahren zur Bestimmung von internen Kontrollgenen.....	4
1.1.4 Interne Kontrollgene in der humanen Plazenta.....	7
1.1.5 Einfluss synthetischer Glukokortikoide auf interne Kontrollgene.....	10
1.2 Lungenreifeinduktion.....	10
1.2.1 Ein Blick in die Historie.....	10
1.2.2 Leitlinien zur Durchführung der Lungenreifeinduktion.....	11
1.2.3 Auswirkungen einer Glukokortikoidexposition auf das Neugeborene.....	11
1.2.4 Rolle der Plazenta für die fetale Programmierung.....	12
1.3 Fragestellung, Arbeitshypothesen und Ziel.....	14
2. Methodik.....	16
2.1 Studienkollektiv.....	16
2.2 Probengewinnung.....	17
2.3 RNA-Isolation.....	17
2.3.1 Etablierung der RNA-Isolation.....	17
2.3.2 Umschreiben der mRNA in cDNA.....	21
2.4 Literaturrecherche und Analyse interner Kontrollgene auf Ko-Regulation.....	21
2.4.1 Literaturrecherche.....	21
2.4.2 IPA-Analyse.....	22
2.5 Etablierung der Primersequenzen.....	22
2.5.1 Literaturrecherche nach Primersequenzen und Primerdesign.....	22
2.5.2 Etablierung der Primer.....	23
2.6 Messung der Genexpression mittels RT-qPCR.....	26

2.7 Berechnungen und statistische Auswertung.....	26
2.7.1 Berechnungen zur Quantifizierung der Genexpression	26
2.7.2 Software-Applikationen.....	27
2.7.3 Normalisierung des Zielgens	28
2.7.4 Statistische Auswertung	29
2.8 Reagenzien und Material.....	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Beschreibung des Studienkollektivs	32
3.2 Einfluss der Extraktionsmethode auf die RNA-Qualität	32
3.3 Beschreibung der internen Kontrollgene	33
3.3.1 Beurteilung von in der Literatur beschriebenen und in der humanen Plazenta verwendeten internen Kontrollgenen.....	33
3.3.2 Ko-Regulationen der internen Kontrollgene untereinander.....	40
3.3.3 Ergebnisse der Primeretablierung	44
3.4 Expressionsanalysen der internen Kontrollgene	46
3.4.1 „Klassische“ Analyse	46
3.4.2 Analyse mit Algorithmen	50
3.5 Einfluss des Normalisierungsverfahrens auf die Zielgenexpression.....	55
3.6 Einfluss der Ontogenese auf die Genexpression	58
4. Diskussion	61
4.1 Literaturrecherche und IPA-Analyse der Referenzgene	61
4.2 „Klassische“ Analyse der RT-qPCR-Ergebnisse	63
4.2.1 Einfluss der plazentaren Lokalisation auf die ICG-Expression	63
4.2.2 Einfluss des fetalen Geschlechts auf die ICG-Expression.....	65
4.2.3 Einfluss des Schwangerschaftsalters bei Geburt auf die ICG-Expression..	66
4.2.4 Einfluss der einmaligen Lungenreifeinduktion mit BET auf die ICG- Expression	67
4.3 Vergleich der Software-basierten Algorithmen zur ICG-Validierung.....	70
4.3.1 Vergleich von geNorm mit BestKeeper und NormFinder.....	71
4.3.2 Software-übergreifendes Ranking	73
4.3.3 Vergleich zentraler und peripherer Proben.....	74
4.3.4 Anzahl der ICG zur Normalisierung.....	74
4.3.5 Vergleich der geNorm-Ergebnisse mit der IPA-Analyse	75
4.3.6 Empfehlung für die Normalisierung von Zielgenen	76

4.4 Auswirkungen verschiedener Normalisierungsverfahren auf die Zielgenexpression	76
4.5 Limitationen der Studie.....	78
5. Schlussfolgerung	82
Literaturverzeichnis	84
Eidesstattliche Versicherung	93
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	94
Lebenslauf	95
Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACOG	American Congress of Obstetricians and Gynecologists
AG	Arbeitsgruppe
BET	Betamethason
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	„cycle threshold“
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DEX	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Primereffizienz
GC	Glukokortikoid
ICG	internes Kontrollgen
IPA	Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN)
k.A.	keine Angabe
m	männlich
M	Stabilitätskonstante (berechnet nach Vandesomepele et al. ¹⁰)
MANOVA	multivariate Varianzanalyse
max.	maximal
min.	minimal
MIQE	„Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NF	Normalisierungsfaktor
NIH	National Institute of Health
nQ	normalisierte, neu-skalierte Zielgenexpression
Q	relative Quantität
RT-qPCR	quantitative real-time reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
r	Pearson Korrelationskoeffizient
RCOG	Royal College of Obstetricians and Gynecologists
RIN	RNA-Integritäts-Nummer
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung

SE	Standardfehler
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
V	paarweise Variation (berechnet nach Vandesomepele et al. ¹⁰)
vs.	versus
w	weiblich

Abkürzungsverzeichnis der Gene, Enzyme und Proteine

11 β HSD2	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ACTB	Beta-Actin
ALAS1	5'-Aminolevulinat-Synthase 1
Ap1	Aktivatorprotein 1
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein
ATP5O	ATP-Synthase, F1-Komplex, Subeinheit O
ATP5B	ATP-Synthase, F1-Komplex, Beta-Polypeptid
ATP6	ATP-Synthase 6
B2M	Beta-2-Microglobulin
Brdt	Testes-spezifisches Protein der Bromodomäne
CCT4	Chaperonin-enthaltendes T-Komplex-Polypeptid-1, Delta-Untereinheit
CYC1	Cytochrom C1
EIF2S2	Eukaryotischer Translation-Initiationsfaktor 2, Subeinheit 2
EIF4A2	Eukaryotischer Translation-Initiationsfaktor 4, Subeinheit 2
EIF4G2	Eukaryotischer Translation-Initiationsfaktor 4, Gamma 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GH	Wachstumshormon
GLUT	Glukosetransporter
GTF2B	Transkriptionsfaktor IIB
HDAC1	Histon-Deacetylase 1
HIF1A	Hypoxie-induzierter Faktor 1, Alpha-Untereinheit
HLA-F	Haupthistokompatibilitätskomplex, Klasse I, F
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
HPRT1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1

HRAS	Harvey-Ratten-Sarkom-Virusonkogen
HSF1	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1
HTT	Huntingtin
IFNG	Interferon-gamma
INSR	Insulinrezeptor
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
JRK	Jrk helix-turn-helix Protein
MYC	virales Myelocytomatose-Onkogen
MYCN	virales Myelocytomatose-Onkogen, Neuroblastom-abgeleitetes Homolog
Nc2	Negativer Kofaktor 2
NEIL2	Nei-ähnliche DNA-Glycosylase 2
NFE2L2	NFE-ähnlicher Faktor 2
NR3C1	Glukokortikoidrezeptor α
PPIA	Cyclophilin A
PSMB6	Proteasom, Subeinheit Beta 6
RANBP9	RAN-bindendes Protein 9
RNA 18S	18S ribosomale RNA
RNA 28S	28S ribosomale RNA
RPL19	Ribosomales Protein L19
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Flavoprotein, Subeinheit A
SF3A1	Splicing-Faktor 3a, Subeinheit 1
SUPT16H	Chromatin-spezifischer Transkription-Elongationsfaktor, 140 KDa Untereinheit
TAF10	Tata-Box-Bindeprotein-assoziiertes-Faktor 10
TBP	Tata-Box-Bindeprotein
TERT	Telomerase-Reverse Transkriptase
TNF	Tumornekrosefaktor
TOP1	DNA Topoisomerase Typ I
TUBB	Beta-Tubulin
UBC	Ubiquitin C
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
YWHAZ	14-3-3 Protein Zeta/Delta

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarische Elektropherogramme von RNA-Proben in Abhängigkeit von der RNA-Integrität (RIN)	20
Abbildung 2: Exemplarische Amplifikationskurve (A) und Standardkurve (B) in der Real-time-PCR zur Effizienzmessung	25
Abbildung 3: Exemplarische Schmelzkurve ohne Nebenprodukte und mit negativen Wasserkontrollen.....	25
Abbildung 4: Ergebnisse der Literaturrecherche.....	34
Abbildung 5: Ko-Regulationen der 15 am besten bewerteten ICG	41
Abbildung 6: Ko-Regulationen der in GC-Studien in der humanen Plazenta verwendeten ICG	42
Abbildung 7: Ko-Regulationen der sieben getesteten ICG	43
Abbildung 8: „Klassische“ Analyse der Expressionswerte der ICG in zentralen Proben	48
Abbildung 9: „Klassische“ Analyse der Expressionswerte der ICG in peripheren Proben	49
Abbildung 10: geNorm-Analyse der sieben ausgewählten ICG	52
Abbildung 11: NormFinder-Analyse der sieben ICG	52
Abbildung 12: BestKeeper-Analyse der sieben ICG	53
Abbildung 13: Vergleich der Zielgenexpression in zentralen Proben nach Normalisierung mit verschiedenen ICG	57
Abbildung 14: Vergleich der Zielgenexpression in peripheren Proben nach Normalisierung mit verschiedenen ICG	58
Abbildung 15: Vergleich der totalen RNA-Konzentration, der mRNA- und rRNA-Expression zwischen früh- und reifgeborenen Plazenten.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien für Probandinnen	16
Tabelle 2: Optimale Eigenschaften der Primersequenzen.....	23
Tabelle 3: Protokoll für die quantitative Real-time-PCR.....	26
Tabelle 4: Reagenzien, Lösungsmittel und Material	31
Tabelle 5: Durchschnitt und Verteilung der Schwangerschaftsdauer der einzelnen Gruppen.....	32
Tabelle 6: Modifizierungen der RNA-Isolation und deren Einfluss auf die RNA-Qualität	33
Tabelle 7: Liste der in der humanen Plazenta evaluierten ICG.....	34
Tabelle 8: Bewertung der in der humanen Plazenta evaluierten ICG	36
Tabelle 9: Primerübersicht für die potenziellen Referenzgene, das Zielgen und ribosomale RNA in der humanen Plazenta	45
Tabelle 10: Unterschiede in der ICG-Expression nach plazentarer Lokalisation	46
Tabelle 11: Vergleich des geNorm-Rankings mit sechs ICG nach Ausschluss von PPIA oder RPL19	54
Tabelle 12: Vergleich der Expressionsstabilität der sieben Referenzgene in der humanen Plazenta, berechnet mit geNorm, NormFinder und BestKeeper ...	54
Tabelle 13: Pearson-Korrelationen zwischen der RNA-Konzentration und den RT- qPCR-Rohdaten aller ICG und des Zielgens.	60

Zusammenfassung

Einleitung. Die antenatale Glukokortikoidbehandlung mit Betamethason (BET) bei drohender Frühgeburt wird weltweit zur Lungenreifeinduktion durchgeführt und reduziert die neonatale Morbidität und Mortalität. Jedoch kann sie insbesondere bei hohen, repetitiven Dosen zu einem verminderten fetalen Wachstum, sowie zu einer negativen Beeinflussung des Gesundheitszustands der Neugeborenen bis ins Erwachsenenalter führen. Um die Mechanismen genauer zu verstehen, bedarf es Genexpressionsstudien an der humanen Plazenta, der als Schnittstelle zwischen Mutter und Kind eine besondere Rolle zukommt. Eine geläufige Methode ist die quantitative real-time reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR). Deren Verlässlichkeit ist jedoch stark abhängig von der Verwendung valider interner Kontrollgene (ICG) zur Normalisierung von Zielgenen.

Zielsetzung. Ziel dieser Studie war es, für Glukokortikoidstudien in der humanen Plazenta eine geeignete Gruppe aus ICG zur Validierung von RT-qPCR-Experimenten zu finden. Anhand des Glukokortikoidrezeptors (NR3C1) als Zielgen sollte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression alleine durch eine unterschiedliche und inadäquate Auswahl der ICG signifikant variieren kann.

Methodik. Sieben ICG (B2M, HMBS, HPRT1, PPIA, RPL19, SDHA und YWHAZ) wurden durch RT-qPCR-Versuche in der humanen Plazenta (n=96) auf ihre Expressionsstabilität bezüglich der Faktoren antenatale BET-Gabe, Schwangerschaftsalter bei Geburt, fetales Geschlecht und plazentare Lokalisation der Proben untersucht. Dafür wurden zwei Verfahren angewandt: (1) In einer „klassischen“ Analyse wurde jedes einzelne ICG statistisch ausgewertet und auf signifikante Gruppenunterschiede getestet. (2) Mithilfe der Software-basierten Algorithmen geNorm, NormFinder und BestKeeper wurde ein Ranking der ICG entsprechend ihrer Expressionsstabilität erstellt. Anschließend wurden die Rohdaten des Zielgens NR3C1 mit verschiedenen ICG beziehungsweise ICG-Kombinationen normalisiert und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Ergebnisse. Während in den peripheren Proben keine signifikanten Gruppenunterschiede nachweisbar waren, zeigten sich nach BET-Behandlung in den zentralen Proben bei fünf der sieben getesteten ICG signifikante Effekte, besonders in der Gruppe der weiblichen Neugeborenen. Zudem fand sich eine Herabregulation der HPRT1- und PPIA-

Expression bei fortschreitendem Schwangerschaftsalter. Demnach wären nach der „klassischen“ Analyse nur SDHA und YWHAZ zur Normalisierung geeignet. Die Software-basierte Analyse befand dagegen die Kombination aus HMBS, PPIA, RPL19 und SDHA als am besten geeignet. Je nachdem, welches ICG beziehungsweise welche ICG-Kombination zur Normalisierung des NR3C1-Gens eingesetzt wurde, lieferte die statistische Auswertung unterschiedliche Ergebnisse.

Schlussfolgerung. Die Verwendung verschiedener Normalisierungsverfahren kann die Ergebnisse von Genexpressionsstudien signifikant beeinflussen. Da die Auswahl der ICG einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse hat, sind die Evaluation und der Einsatz geeigneter ICG für eine akkurate und valide Normalisierung notwendig. Für Glukokortikoidstudien in der humanen Plazenta wird die Kombination aus HMBS, PPIA, RPL19 und SDHA zur Normalisierung empfohlen.

Abstract

Introduction. The antenatal glucocorticoid treatment betamethasone (BET) is applied worldwide to induce lung maturation in cases of imminent premature delivery, reducing neonatal morbidity and mortality. However, the treatment can reduce fetal growth as well as the neonate's state of health until adulthood, especially when given in high, repetitive doses. The placenta plays a special role during treatment as the interface between mother and child. For a better understanding of the underlying mechanisms, gene expression studies of the human placenta are needed. A common tool is quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR), though its reliability is strongly dependent on the use of valid internal control genes (ICGs) for the normalisation of target genes.

Objective. The aim of this study was to find a suitable set of ICGs for RT-qPCR assays in glucocorticoid studies of the human placenta. The glucocorticoid receptor (NR3C1) was used as a target gene to demonstrate that mRNA expression can vary significantly solely due to the selection of different and inadequate ICGs.

Methods. Seven ICGs (B2M, HMBS, HPRT1, PPIA, RPL19, SDHA and YWHAZ) were investigated in RT-qPCR experiments of the human placenta for their expression stability in relation to antenatal BET treatment, gestational age at birth, fetal sex and placental localisation of the samples. Two different procedures were applied: (1) In a "classical" analysis each single ICG was statistically investigated and tested for significant group differences. (2) Using the software-based algorithms geNorm, NormFinder and Best-Keeper a ranking of the ICGs was generated corresponding to their expression stability. Subsequently, the raw data of the target gene NR3C1 was normalised with different ICGs and ICG combinations respectively, and its results were compared.

Results. There were no significant group differences detected in the peripheral samples. However, BET treatment lead to significant effects in the central samples in five of the seven ICGs, especially in the female neonates. According to the "classical" analysis a downregulation of HPRT1 and PPIA expression was found with progressive gestational age indicating that only SDHA and YWHAZ would be suitable for normalisation. However,

the software-based analysis evaluated HMBS, PPIA, RPL19 and SDHA as the most appropriate combination of ICGs for normalisation. Depending on the selection of ICGs for the normalisation of NR3C1, different results were revealed by the statistical analyses.

Conclusion. The use of different methods for normalisation can significantly influence the results of gene expression studies. Since the selection of ICGs has an essential impact on the results, the evaluation and the use of suitable ICGs are necessary for an accurate and valid normalisation. The combination of HMBS, PPIA, RPL19 and SDHA is recommended for target gene normalisation in glucocorticoid studies of the human placenta.

1. Einleitung

1.1 Interne Kontrollgene

1.1.1 Normalisierung von RT-qPCR-Daten

Die quantitative real-time reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) ist eine weit verbreitete Methode zur Messung des Expressionsniveaus einzelner Gene über die Quantifizierung der entsprechenden messenger RNA (mRNA). Da durch die exponentielle Amplifikation der RT-qPCR bereits kleinste mRNA-Mengen erfasst werden können, liegen ihre Vorteile unter anderem in ihrer hohen Sensitivität und Spezifität.¹ Allerdings sind die Messergebnisse störanfällig für Faktoren, wie eine unterschiedliche RNA-Qualität der Proben, RNA-Verlust während der Probenaufbereitung, kinetische Schwankungen des reverse Transkriptase-Enzyms, Ungenauigkeiten bei der Versuchsdurchführung, sowie Unterschiede in den Primer-Effizienzen.^{1, 2} Um diese Schwankungen auszugleichen, ist eine akkurate Normalisierung der mRNA-Expression nötig.

Es gibt verschiedene Normalisierungsmethoden, die ihre jeweiligen Vor- und Nachteile mit sich bringen.¹ Die gängigsten Methoden sollen hier in Kürze dargestellt werden. Das einfachste Verfahren ist der konsequente Einsatz des gleichen Probenvolumens, Probengewichts oder der gleichen Zellzahl. Jedoch ist es aufgrund zu hoher Unterschiede der mRNA-Menge pro ml oder mg Gewebe beziehungsweise pro Zellzahl zur exakten Normalisierung nicht ausreichend und sollte daher mit anderen Methoden kombiniert werden.¹ Ein zweites Verfahren zur Normalisierung ist das Beziehen der mRNA auf die totale RNA-Menge der Probe. Dies setzt voraus, dass das Verhältnis von mRNA und ribosomaler RNA (rRNA) immer konstant bleibt.¹ Es hat sich jedoch gezeigt, dass das Verhältnis von mRNA zu rRNA abhängig von den Versuchsbedingungen Schwankungen unterliegt.³ Ebenfalls kann eine Normalisierung mit genomischer DNA vorgenommen werden. Jedoch wird diese durch die Variabilität der DNA-Menge und durch die Schwierigkeit einer zeitgleichen Extraktion von mRNA und DNA limitiert.¹ Die Transfektion von künstlich synthetisierten RNA-Molekülen in die Zelle hat den Vorteil, dass pro Zelle exakt die gleiche Molekülmenge eingebaut werden kann. Nachteilig ist, dass diese Methode sehr aufwendig ist und sich nicht für den Vergleich verschiedener Zell- oder Gewebearten eignet.¹

Das derzeit am weitesten verbreitete Verfahren zur Normalisierung der Zielgenexpression ist die Verwendung von Referenzgenen beziehungsweise internen Kontrollgenen

(ICG).^{1, 4} Hierbei wird die Zielgenexpression in Verhältnis zur Expression konstant exprimierter ICG gesetzt, wodurch versuchsbedingte Schwankungen der mRNA-Menge ausgeglichen werden sollen. Dies funktioniert allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die mRNA der ICG stabil exprimiert wird und keinen Regulationen unterliegt.¹

1.1.2 Notwendigkeit interner Kontrollgene für Expressionsstudien

ICG sind Gene, deren Funktionen essentiell für das Überleben der Zelle sind und die in allen kernhaltigen Zellen vorkommen und synthetisiert werden.⁵ Im Gegensatz zu vielen anderen Genen, deren Expressionsmuster abhängig von der Zellart oder von den Umweltbedingungen innerhalb und außerhalb der Zelle sind, gilt die mRNA-Expression der ICG als weitgehend konstant. Das bedeutet, dass sie bestenfalls nicht beziehungsweise kaum von Einflussfaktoren reguliert werden und dass sie unabhängig von der Gewebeart gleichmäßig exprimiert werden.⁶ Es gibt zwei Arten von Einflussfaktoren: innere und äußere. Unter inneren Einflussfaktoren sollen hier Vorgänge verstanden werden, die sich innerhalb des untersuchten Organismus abspielen, wie beispielsweise die Stoffwechsellage oder hormonelle Schwankungen. Äußere Einflussfaktoren umfassen dagegen Manipulationen von außen, wie die Exposition mit Substanzen, die sich auf das Transkriptom auswirken, sowie mRNA-verändernde Prozesse bei der mRNA-Extraktion und -Bearbeitung.

Bekannte und häufig verwendete ICG sind beispielsweise Beta-Actin (ACTB), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder 18S ribosomale RNA (RNA18S). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Schwankungen in der Expression von ICG vernachlässigbar gering seien. In den letzten Jahren hat sich jedoch herausgestellt, dass die meisten der verwendeten ICG durch innere und äußere Einflussfaktoren doch maßgeblich reguliert werden können und dadurch die Quantifizierung eines Zielgens verfälscht werden kann. In einer Studie von Spanakis et al. konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionsprofile von ACTB, GAPDH und 28S ribosomale RNA (RNA28S) in verschiedenen Epithel- und Fibroblasten-Zelllinien voneinander unterscheiden und dass sie durch Inkubation mit den transkriptionsmodulierenden Substanzen Cholera toxin und 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat unabhängig voneinander reguliert werden.⁷ Tricarico et al. untersuchten elf ICG in Patientenbiopsien aus unterschiedlichem Gewebe und fanden heraus, dass sich die Genexpression sowohl zwischen den Individuen, als auch zwischen verschiedenen Gewebearten des gleichen Individuums unterscheidet.⁸

Für vergleichende Expressionsstudien an ruhenden und aktivierten humanen T-Lymphozyten hat sich RNA18S als verlässliches ICG erwiesen, wohingegen ACTB und GAPDH deutliche Unterschiede zwischen aktivierten und nicht-aktivierten T-Lymphozyten aufwiesen.⁹ Diese Studien zeigen, dass die Expressionsstabilität und damit das Potential eines Gens zur internen Kontrolle von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängen. Ein ICG, das sich in einem bestimmten Versuchsaufbau als stabil erwiesen hat, kann in einem anderen Rahmen Schwankungen unterliegen. So beobachteten Thellin et al. in kultivierten humanen mononuklearen Zellen Veränderungen in der Expression von GAPDH und dem ribosomalen Protein L32 durch eine Inkubation mit Mitogenen. Die gleichen Gene erwiesen sich jedoch als stabile ICG in Milzgewebe von Mäusen, die nach unterschiedlichen Immunisierungsprotokollen behandelt wurden.⁶ Einige Studien lassen vermuten, dass jedes ICG reguliert werden kann und somit kein ideales und universal einsetzbares ICG existiert.^{5, 10, 11}

Aufgrund der hohen Diversität in der Durchführung von RT-qPCR-Studien, sowie eines Mangels an Transparenz und Reliabilität vieler Publikationen entwickelten Bustin et al. die MIQE-Empfehlungen („Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“).⁴ Diese stellen Richtlinien über das Mindestmaß an Informationen dar, die Autoren von RT-qPCR-Studien veröffentlichen sollen, um deren Verlässlichkeit, korrekte Interpretation und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Des Weiteren gaben sie Empfehlungen zur praktischen Durchführung von RT-qPCR-Experimenten heraus. Bezüglich der Normalisierung von RT-qPCR-Daten legen sie Wissenschaftlern eine den eigentlichen Versuchen vorgeschaltete Validierung der ICG nahe, sowie den Gebrauch von mehreren ICG.^{4, 12}

Trotz der Studienlage und des Bekanntheitsgrades der MIQE-Empfehlungen werden ICG häufig ungeprüft aus der Literatur übernommen, ohne sie im Vorfeld auf einen Regulationseffekt durch die vorliegenden Versuchsbedingungen zu überprüfen. Eine Studie, die über 1700 Publikationen aus den Jahren 2009 bis 2013 auf ihre Qualität in der Durchführung und Transparenz von RT-qPCR-Studien untersuchte, zeigte, dass die meisten Autoren keine Validierung der ICG vornahmen. Gerade in den Zeitschriften mit einem hohen Impact-Faktor ließen sich kaum Studien mit zuvor getesteten ICG finden.¹³ Um eine möglichst exakte Normalisierung zu gewährleisten, ist es aber notwendig, valide ICG zu finden, deren Expressionen nicht durch den jeweiligen experimentellen Aufbau beeinflusst werden.

Bezüglich der Anzahl der zur Normalisierung einzusetzenden ICG herrscht Uneinigkeit. In den meisten Studien werden die Expressionen des Zielgens auf nur ein ICG bezogen.¹³ Vandesompele et al. konnten jedoch zeigen, dass die herkömmliche Normalisierung mit nur einem ICG in 30% der Fälle zu einer Verfälschung der Daten um das 3-fache und in 10% der Fälle sogar um das 6,4-fache führen kann.¹⁰ Daher raten einige Autoren von dem Gebrauch von nur einem ICG ab und empfehlen, mindestens zwei ICG zur Normalisierung zu verwenden.^{8, 10} In den MIQE-Empfehlungen werden sogar mindestens drei ICG empfohlen. Kommen weniger ICG zum Einsatz sollte der Autor explizit darauf hinweisen.¹² Andersen et al. relativieren diese Aussage jedoch, da auch der Gebrauch von mehreren ICG zu einer Verfälschung von Ergebnissen führen könne. So sei ein sehr stabiles ICG zur Normalisierung alleine besser geeignet, als die Kombination aus mehreren weniger stabilen ICG. Daher solle auch bei der Verwendung mehrerer ICG auf eine sorgfältige Auswahl geachtet werden.¹⁴

1.1.3 Verfahren zur Bestimmung von internen Kontrollgenen

Es existieren verschiedene Methoden zur Bestimmung von verlässlichen ICG. Neben der häufig angewendeten statistischen Analyse der einzelnen ICG auf signifikante Gruppenunterschiede („klassische“ Analyse), wurde eine Reihe von Software-basierten Applikationen entwickelt, die sich verschiedener Algorithmen bedienen.

1.1.3.1 „Klassische“ Analyse

Eine weit verbreitete Methode zur ICG-Evaluation ist die statistische Analyse der nicht-normalisierten Expressionswerte jedes einzelnen ICG auf signifikante Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Gruppen.^{15, 16} Diese hier als „klassische“ Analyse bezeichnete Methode deckt Regulationen der ICG durch die vorherrschenden Versuchsbedingungen auf und erlaubt eine Einschätzung darüber, ob das ICG für den jeweiligen Versuchsaufbau zur Normalisierung geeignet ist. Eine Schwäche dieses Verfahrens ist allerdings, dass lediglich die Gruppenmittelwerte miteinander verglichen werden, nicht jedoch die Schwankungen der Proben innerhalb der gleichen Gruppe. Zudem ist mit dieser Methode häufig die Verwendung von nur einem ICG verbunden, da keine Aussage getroffen werden kann, welche Kombination von ICG sich eignen würde.¹⁶

1.1.3.2 geNorm

Vandesomepele et al. entwickelten einen Algorithmus zur Evaluation der Expressionsstabilität von ICG, der nicht nur die Variation innerhalb eines ICG, sondern durch paarweise Vergleiche ebenso die Variation der ICG untereinander berücksichtigt. Dem liegt die Überlegung zugrunde, dass das Verhältnis der Expression von zwei idealen ICG in allen Proben konstant bleibt, unabhängig von der Zellart oder von Versuchsbedingungen. Das hat zum Vorteil, dass sowohl Schwankungen verschiedener ICG innerhalb der gleichen Probenart, als auch Schwankungen des gleichen ICG in verschiedenen Proben, beispielsweise in unterschiedlichen Gewebearten, miteinander verglichen werden.¹⁰ Zudem lässt sich mithilfe der geNorm-Software eine Aussage treffen, wie viele ICG zur Normalisierung eingesetzt werden sollten und ab welcher Anzahl der Einsatz eines weiteren ICG keinen zusätzlichen Nutzen mehr bringt.

Szabo et al. verglichen verschiedene statistische Modelle zur ICG-Bestimmung und beurteilten den von Vandesomepele et al. entwickelten Algorithmus als valide.¹⁷ Ein limitierender Faktor ist allerdings, dass die Berechnungen verfälscht werden können, wenn die eingesetzten ICG sich gegenseitig regulieren oder wenn sie durch ähnliche Faktoren reguliert werden. Um die Wahrscheinlichkeit solcher Ko-Regulationen möglichst gering zu halten, empfehlen Vandesomepele et al. ICG auszuwählen, die im Zellzyklus unterschiedliche Funktionen übernehmen.¹⁰ Des Weiteren können webbasierte Datenbanken wie die Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN) genutzt werden, um die ICG auf bekannte, in der Literatur beschriebene Ko-Regulationen zu überprüfen.¹⁶

1.1.3.3 NormFinder

Das von Andersen et al. entwickelte Microsoft Excel Add-In NormFinder berücksichtigt in seinem Algorithmus nicht nur Variationen der ICG-Expression über dem gesamten Probenkollektiv, sondern zusätzlich Variationen der ICG zwischen einzelnen Subgruppen. Aus der Intragruppen-Variation und der Intergruppen-Variation wird eine Stabilitätskonstante für jedes einzelne ICG berechnet. Nachteilig ist, dass dabei keine Vergleiche zwischen den verschiedenen ICG hergestellt werden, sondern jedes ICG für sich betrachtet wird.¹⁴ Andererseits werden die Ergebnisse auf diese Weise nicht durch Ko-Regulationen der ICG verfälscht, wie es bei Methoden mit paarweisen Vergleichen der Fall ist.¹⁰

¹⁴ Für die Verwendung von NormFinder wird eine Anzahl von mindestens acht Proben je

Subgruppe empfohlen, sodass bei einer geringen Probenanzahl geNorm verlässlicher erscheint.^{14, 18}

1.1.3.4 BestKeeper

Pfaffl et al. verbinden in ihrer Microsoft Excel-basierten Applikation BestKeeper die statistische Analyse jedes einzelnen ICG mit der Methode der paarweisen Vergleiche. In einer Voranalyse wird jedes ICG für sich evaluiert, was einen Ausschluss besonders instabiler ICG aus der Gesamtanalyse ermöglicht. Durch paarweise Vergleiche werden die Korrelationen aller möglichen ICG-Kombinationen berechnet und aus den höchst-korrelierten ICG ein BestKeeper-Index ermittelt. Es wird eine Rangordnung der ICG bezüglich ihrer Korrelationen mit dem BestKeeper-Index erstellt, wobei eine hohe Korrelation für eine hohe Expressionsstabilität spricht.¹⁹ Das Besondere an diesem mehrstufigen Vorgehen ist, dass eine Beurteilung der ICG auf mehreren Ebenen möglich ist und dass nach jedem Schritt instabile ICG aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen werden können. Allerdings birgt diese Methode auch die Gefahr einer Verfälschung durch potenzielle Ko-Regulationen der ICG.

1.1.3.5 Vergleich der Software-Applikationen

In einigen Studien wurden ICG mithilfe dieser drei Software-Applikationen ermittelt und die Ergebnisse miteinander verglichen. De Spiegelaere et al. untersuchten 14 ICG in verschiedenen testikulären Gewebearten und beobachteten, dass sich mit geNorm, BestKeeper und NormFinder trotz unterschiedlicher Berechnungen ähnliche Ergebnisse zeigten.¹⁸ Ebenfalls ähnliche Ergebnisse der drei Algorithmen fanden sich bei der Testung von sechs ICG in fetalen Schafsleberproben nach einer antenatalen Gabe von Glukokortikoiden (GC) verglichen mit einer nicht behandelten Kontrollgruppe.¹⁶ Bei der Evaluation von acht ICG in vier Gruppen von humanen mesenchymalen Stammzellen beobachteten Li et al. übereinstimmende Resultate in der geNorm- und NormFinder-Analyse, jedoch Abweichungen in der BestKeeper-Analyse, was sie auf die unterschiedlichen Algorithmen zur Berechnung zurückführten.²⁰ In den meisten Fällen scheinen also geNorm, BestKeeper und NormFinder trotz verschiedener Vorgehensweisen in der ICG-Analyse zwar keine identischen, aber doch weitgehend übereinstimmende Ergebnisse zu produzieren.^{16, 18, 21} Da jede der drei Software-Applikationen ihre eigenen Stärken und Schwächen hat, können manche Schwankungen eines ICG möglicherweise nur durch einen der drei

Algorithmen aufgedeckt werden.^{18, 20} Somit können sich die drei Algorithmen gegenseitig ergänzen.

In den Hinweisen zur praktischen Umsetzung der MIQE-Richtlinien empfehlen Bustin et al. die Nutzung von mindestens einem Algorithmus wie geNorm zur Validierung von ICG.¹² Aufgrund der unterschiedlichen Analyseverfahren mit ihren unterschiedlichen Vor- und Nachteilen, scheint es jedoch ratsam zu sein, eine Testung der ICG mit mehreren Algorithmen vorzunehmen und die Ergebnisse aller Algorithmen in der Auswahl zu berücksichtigen.

1.1.3.6 Probenumfang zur ICG-Bestimmung

In der Literatur finden sich kaum Aussagen darüber, wie viele Proben zur Bestimmung geeigneter ICG eingesetzt werden sollten. Für NormFinder wird die Anzahl von mindestens acht Proben je Gruppe empfohlen.¹⁴ Vandesompele et al. führten die Analysen mit Gruppengrößen zwischen neun und 34 Proben durch.¹⁰ In ICG-Studien in der humanen Plazenta bewegte sich die Gesamtprobenanzahl in einem Bereich von 16 bis 119 Proben.²²⁻³² In Anbetracht bereits durchgeführter Studien zur ICG-Validierung lässt sich festhalten, dass die zur Evaluation verwendeten Proben eine repräsentative Stichprobe des gesamten Probenkollektivs darstellen sollten.

1.1.4 Interne Kontrollgene in der humanen Plazenta

Auch für PCR-Studien der humanen Plazenta werden ICG häufig ohne Validierung aus der Literatur übernommen. Besonders weit verbreitet ist die Verwendung von GAPDH, RNA18S und ACTB. Nur wenige Autoren evaluierten bisher die ICG vor ihren Experimenten. Zu diesen wenigen gehören Drewlo et al., die die Expressionsstabilität von acht ICG in der humanen Plazenta hinsichtlich verschiedener klinischer Gruppen mittels geNorm verglichen. Dabei erwiesen sich 14-3-3 Protein Zeta/Delta (YWHAZ), Cytochrom C1 (CYC1) und DNA Topoisomerase Typ I (TOP1) als die stabilsten drei ICG.²³ Cleal et al. analysierten ICG in Plazenten aus normalen Schwangerschaften in Bezug auf die RNA-Extraktionsmethode und kamen auf ähnliche Ergebnisse.²² YWHAZ wurde in einigen geNorm-Studien hinsichtlich seiner Expressionsstabilität bei diversen Schwangerschaftskomplikationen wie der fetalen Wachstumsrestriktion, dem Gestationsdiabetes, der schwangerschaftsinduzierten Hypertonie und der Präeklampsie untersucht und als geeignetes ICG befunden.²⁶⁻²⁸ Bei einer NormFinder-Analyse von Lanoix et al. schnitt

YWHAZ jedoch als eines der instabilsten ICG schlecht ab.²⁶ In deren Studie wurden neun Gene hinsichtlich ihrer Eignung als ICG im Rahmen von Expressionsstudien zu Präeklampsie und Gestationsdiabetes mittels geNorm und NormFinder untersucht.²⁶ Beide Algorithmen stellten Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) und Cyclophilin A (PPIA) als die stabilsten Gene heraus und RNA18S als das Instabilste. Dahingegen erwies sich RNA18S zusammen mit GAPDH in einer geNorm-Studie zum Thema fetale Wachstumsrestriktion als geeignetes ICG.²⁸

Im Folgenden soll näher auf den Einfluss der plazentaren Lokalisation, des fetalen Geschlechts und des Schwangerschaftsalters auf die Expression von ICG in der humanen Plazenta eingegangen werden.

1.1.4.1 Einfluss der plazentaren Lokalisation auf interne Kontrollgene

Es ist schon lange bekannt, dass die humane Plazenta lokalisationsbezogene Unterschiede in ihrer Morphologie aufweist. Bereits in den 60er Jahren beschrieben Fox et al. eine stärkere Vaskularisation in zentralen Abschnitten der Plazenta, verglichen mit der Plazentaperipherie.³³ So überrascht es nicht, dass auch die Expression einiger Gene in verschiedenen Regionen der Plazenta variiert.³⁴⁻³⁷ Darunter befinden sich beispielsweise Hypoxie-regulierte Gene, wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF),³⁴ sowie Mediatoren der Angiogenese, wie Angiopoietin-1.³⁵ Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Expression von ICG von der plazentaren Lokalisation beeinflusst werden kann.^{36,37} So beobachteten Tzschoppe et al. in zentralen Plazentaprobe höherer Expressionswerte für die ICG Beta-2-Microglobulin (B2M) und HPRT1 als in peripheren Abschnitten.³⁶

1.1.4.2 Einfluss des fetalen Geschlechts auf interne Kontrollgene in der humanen Plazenta

Neben der plazentaren Lokalisation, kann die Expression von Genen in der humanen Plazenta in Abhängigkeit des fetalen Geschlechts variieren. In einer Studie von Sood et al. fand sich beispielsweise in den Plazenten weiblicher Feten eine höhere Expression von Genen, die an der Immunregulation beteiligt sind, wie Januskinase 1, Interleukin 2-Rezeptor (Subeinheit Beta) und Apolipoprotein J. Des Weiteren waren viele der geschlechtsregulierten Gene auf Geschlechtschromosomen lokalisiert.³⁸ Cleal et al. konnten in einer geNorm-Studie auch für einige ICG geschlechtsabhängige Effekte feststellen:

Von 17 untersuchten Genen wiesen die sieben stabilsten ICG eine höhere mRNA-Expression bei männlichen Feten auf. Dahingegen zeigten die Plazenten weiblicher Feten höhere Werte ribosomaler RNA 18S.³⁹

1.1.4.3 Einfluss des Schwangerschaftsalters auf interne Kontrollgene in der humanen Plazenta

Die Plazenta ist ein schnell wachsendes Gewebe, das sich im Laufe der Schwangerschaft differenziert und weiterentwickelt. Sie reagiert sowohl auf die sich verändernden Bedürfnisse des wachsenden Feten, als auch auf endokrine und metabolische Schwankungen im maternalen Organismus.^{40, 41} Die Veränderungen der Plazenta spiegeln sich auch in deren Genexpression wieder. Sitras et al. verglichen Plazenten des ersten Schwangerschaftstrimesters mit Plazenten des dritten Trimesters und beobachteten bei insgesamt 7519 Genen (entspricht 25% der untersuchten Gene) Unterschiede in der Genexpression.⁴² Unter diesen regulierten Genen fanden sich auch einige ICG, wie B2M, HMBS, PPIA, RPL19 und YWHAZ. Lacey et al. untersuchten den Einfluss des Schwangerschaftsalters auf die ICG-Expression und stellten ebenfalls eine Zunahme der Expression von GAPDH vom ersten zum dritten Trimenon fest. ACTB und der eukaryotische Translation-Initiationsfaktor 2, Subeinheit 2 (EIF2S2) blieben dagegen konstant.³² Statistische Analysen der Ct-Werte („cycle threshold“, entspricht der Zykluszahl in RT-qPCR-Versuchen, ab der die Fluoreszenz eines Gens sich eindeutig von der Hintergrundstrahlung abhebt) der ICG GAPDH und RNA18S zwischen dem ersten und dem dritten Schwangerschaftstrimenon ergaben für GAPDH einen signifikanten Anstieg des Expressionsniveaus über das Schwangerschaftsalter hinweg, jedoch nur geringe Schwankungen für RNA18S.³¹

Gerade am Beispiel von GAPDH und RNA18S wird deutlich, dass die Expression der ICG stark von der zugrundeliegenden Fragestellung und den Versuchsbedingungen abhängig ist. Dennoch werden diese beiden ICG häufig für Studien in der humanen Plazenta ohne eine vorherige Evaluation eingesetzt.⁴³⁻⁵² Da eine Normalisierung mit instabilen ICG Studienergebnisse maßgeblich verfälschen können,^{10, 16} ist eine Validierung der ICG auch für Genexpressionsstudien in der humanen Plazenta von höchster Relevanz.

1.1.5 Einfluss synthetischer Glukokortikoide auf interne Kontrollgene

In einer geNorm-Studie mit fetalen Schafsleberproben konnte gezeigt werden, dass einige ICG, unter anderem Beta-Tubulin (TUBB), nicht nur durch das Schwangerschaftsalter bei Geburt und das fetale Geschlecht reguliert werden, sondern auch durch eine antenatale Behandlung mit Dexamethason (DEX).¹⁶ Die synthetisch hergestellten Glukokortikoide (GC) DEX und Betamethason (BET) werden weltweit zur Beschleunigung der Lungenreife bei drohender Frühgeburt eingesetzt.^{53, 54} Im Gegensatz zu endogenen GC werden sie nicht von dem placentaren Enzym 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 β HSD2) abgebaut und gelangen nahezu vollständig in den fetalen Organismus.⁵⁵ Tierexperimentelle und Studien am Menschen deuten darauf hin, dass eine antenatale GC-Gabe das Expressionsprofil diverser Gene in der Plazenta regulieren kann (siehe 1.2.4).^{43, 56-64} Bisher gibt es allerdings noch keine Studie in der humanen Plazenta, die ICG hinsichtlich eines Regulationseffektes durch eine antenatale GC-Behandlung evaluiert.

1.2 Lungenreifeinduktion

1.2.1 Ein Blick in die Historie

Das neonatale Atemnotsyndrom tritt insbesondere bei Neugeborenen auf, die vor Vollendung der 34. Schwangerschaftswoche (SSW) geboren wurden, und ist Schätzungen zufolge für rund 60% der perinatalen Sterblichkeit verantwortlich.⁵⁴ Im Jahr 2010 stellten 9,2% aller Lebendgeburten in Deutschland Frühgeburten dar. Weltweit nimmt die Frühgeburtenrate in den letzten Jahrzehnten zu, wobei dank verbesserter Möglichkeiten in der Behandlung und Prävention die neonatale Mortalität und Morbidität gesunken sind.^{65, 66} Gerade die Lungenreifeinduktion stellt über eine Senkung der Inzidenz und Mortalität des Atemnotsyndroms einen großen Fortschritt in der Geburtsmedizin dar.^{53, 67}

1969 entdeckten Liggins et al. eine bessere Belüftung der Lungen frühgeborener Lämmer nach einer Behandlung der Mütter mit DEX und vermuteten als Ursache eine erhöhte Sufactant-Produktion durch DEX.⁶⁸ Auch wenn die genauen Mechanismen bisher noch nicht vollständig geklärt sind, konnte nachgewiesen werden, dass GC die Lungenreifung durch eine Stimulation der Typ-II-Pneumozyten und der Sufactant-Produktion beschleunigen.⁶⁹ In einer randomisierten, placebokontrollierten klinischen Studie am Menschen wiesen Liggins und Howie 1972 erstmals eine signifikante Reduktion der Inzidenz des Atemnotsyndroms nach antenataler BET-Gabe nach.⁷⁰ Crowley et al. schlussfolgerten

1990 in einem systematischen Review eine signifikante Senkung des Auftretens des Atemnotsyndroms durch pränatale GC-Gabe, sowie eine Reduktion der intraventrikulären Hämorrhagie, der nekrotisierenden Enterokolitis und der neonatalen Mortalität.⁶⁷ Diese Ergebnisse wurden 2006 in einer großen Cochrane-Meta-Analyse bestätigt. Außerdem konnte eine signifikante Reduktion der neonatalen Infektionsrate innerhalb der ersten 48 Stunden, sowie eine Reduktion der Notwendigkeit stationärer Behandlungen auf einer neonatologischen Intensivstation gezeigt werden.⁵⁴ In einem Konsensus des National Institute of Health (NIH) wurde 1994 eine Empfehlung für die maternale GC-Gabe bei drohender Frühgeburt ausgesprochen.⁵³ Derzeit wird in rund 10% aller Schwangerschaften eine Lungenreifeinduktion durchgeführt.⁷¹

1.2.2 Leitlinien zur Durchführung der Lungenreifeinduktion

Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) empfiehlt in ihren Leitlinien die einmalige Gabe von BET bei drohender oder medizinisch indizierter Frühgeburt zwischen 23+5 und 33+6 SSW. Zu ihrer Indikation führen eine vorzeitige Wehentätigkeit, eine Verkürzung der funktionellen Zervixlänge, eine vorzeitige Muttermunderweiterung, sowie ein vorzeitiger Blasensprung. Dabei sollen 12mg BET intramuskulär verabreicht und die Gabe nach 24h einmalig wiederholt werden. Nach 18h wird mit einem Wirkungseintritt gerechnet.^{72, 73}

1.2.3 Auswirkungen einer Glukokortikoidexposition auf das Neugeborene

Kurzfristige Folgen. Einige Studien konnten neben dem verbesserten klinischen Outcome auch negative Auswirkungen einer GC-Exposition auf den Feten beziehungsweise das Neugeborene zeigen. So können Nebenwirkungen, wie eine Abnahme der fetalen Herzfrequenzvariabilität, der fetalen Atemexkursionen oder der fetalen Bewegungen auftreten, die in der Regel allerdings nach vier bis sieben Tagen abklingen.^{74, 75} Außerdem kann eine antenatale GC-Behandlung zu einer Reduktion des Geburtsgewichts, der Körperlänge und des Kopfumfanges der Neugeborenen führen.⁷⁶⁻⁷⁹ Diese Veränderungen scheinen abhängig vom fetalen Geschlecht, der BET-Dosis und dem Schwangerschaftsalter bei Geburt zu sein.⁸⁰

Langfristige Folgen. Auch langfristige Folgen im Sinne einer perinatalen Programmierung sind für das Neugeborene möglich und können bis ins Erwachsenenalter bestehen.^{56, 81} In zahlreichen Tierstudien konnte gezeigt werden, dass eine antenatale GC-Exposition langfristige Auswirkungen auf die Gehirnentwicklung, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, das kardiovaskuläre und das metabolische System, sowie auf das Verhaltensmuster der Versuchstiere hat.⁸¹ Auch im Menschen gibt es Hinweise auf langfristige Veränderungen durch eine antenatale GC-Gabe. So wiesen exponierte Neugeborene eine verringerte Gehirnoberfläche und kortikale Faltung auf.⁸² Noch im Alter von drei und sechs Jahren präsentierten exponierte Kinder vermehrt aggressiv-destruktive, hyperkinetische Verhaltensmuster und eine reduzierte Aufmerksamkeit.⁸³ Neugeborene zeigen nach antenataler GC-Gabe eine verminderte Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse.⁸⁴ Bei exponierten Kindern im Alter von sechs bis elf Jahren wurde eine gesteigerte Stressreaktion nachgewiesen, gemessen an erhöhten Kortisolwerten im Vergleich zur Kontrollgruppe.⁸⁵ In einer Follow-up-Studie der Ligging-Kohorte wurden bei 30-Jährigen Hinweise auf eine erhöhte Insulinresistenz gefunden. Verglichen mit der Placebogruppe zeigten sich allerdings keine Unterschiede in der Prävalenz von Diabetes mellitus, von kardiovaskulären Krankheiten, sowie kardiovaskulären Risikofaktoren.⁸⁶ Kelly et al. beobachteten jedoch bei jungen Erwachsenen einen Zusammenhang zwischen antenataler GC-Exposition und einer verringerten Dehnbarkeit der Aorta ascendens.⁸⁷ Trotz möglicher negativer Auswirkungen konnte in der Cochrane-Meta-Analyse aus dem Jahr 2006 gezeigt werden, dass der Nutzen der Lungenreifeinduktion die möglichen Risiken eindeutig übersteigt.⁵⁴ Zudem existieren bisher keine Alternativen, die die Kosten-Nutzen-Bilanz der synthetischen GC übertreffen.⁸⁸

1.2.4 Rolle der Plazenta für die fetale Programmierung

Als Schnittstelle zwischen Mutter und Kind führt die Plazenta während der Schwangerschaft wichtige Aufgaben der fetalen Homöostase aus. Sie gewährleistet die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr und produziert als endokrines Organ Hormone und Enzyme für den fetalen Organismus. Die Plazenta reagiert auf Veränderungen im mütterlichen Organismus mit einer Adaption ihrer Versorgung des Fetus, beispielsweise über eine Anpassung ihrer endokrinen Leistung oder ihres Metabolismus. Somit kann sie im Sinne einer pränatalen Programmierung zu einer Änderung der Entwicklung fetaler Organsysteme an

die vorliegenden Umweltbedingungen beitragen und den Gesundheitszustand beziehungsweise das Auftreten von Krankheiten im späteren Leben beeinflussen.^{89, 90}

Viele tierexperimentelle Studien zeigten morphologische, strukturelle oder funktionelle Veränderungen der Plazenta durch antenatale GC-Exposition.^{56-58, 60, 61} Unter anderem konnten eine Beeinflussung der Expression der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II^{60, 61}, der Glukosetransporter GLUT1- und GLUT3⁵⁷, sowie eine Veränderung der Leptin-Synthese⁵⁸ in der Plazenta nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine Regulation der 11 β HSD2-Expression beobachtet, einem Enzym, das den Feten durch eine Umwandlung des aktiven maternalen Kortisols in das inaktive Kortison vor einem Kortisolüberschuss bewahrt.⁵⁶

Bisher liegen nur wenige Studien der humanen Plazenta zur Beeinflussung der Genexpression durch eine antenatale GC-Therapie vor. *In vitro* stimuliert eine DEX-Exposition die Aktivität des System-A, einem bedeutenden plazentaren Aminosäuretransport-Systems, sowie die Differenzierung des Synzytiotrophoblasten.⁶² In kultivierten Trophoblasten führte eine Behandlung mit Triamcinolon zu einer Herabregulation von GLUT1 und GLUT3.⁶³ Demendi et al. beschrieben eine verminderte plazentare 11 β HSD2-Expression in der Gruppe der Frühgeborenen, fanden jedoch keine Unterschiede zwischen mit GC behandelten und nicht behandelten Neugeborenen.⁴³ Stark et al. konnten jedoch geschlechtsabhängige Veränderungen der plazentaren 11 β HSD2-Aktivität durch eine antenatale GC-Gabe feststellen.⁶⁴ Des Weiteren wurden in fetalem Nabelschnurblut verminderte Plasmakonzentrationen für das Wachstumshormon (GH) und IGF-II festgestellt.⁵⁹ Jedoch ist unklar, welche Rolle die Plazenta dabei spielt.

Es wird angenommen, dass GC-Rezeptoren zentrale Akteure in der perinatalen Programmierung durch eine antenatale GC-Exposition sind.^{81, 84} Da synthetische GC wie BET und DEX Agonisten der GC-Rezeptoren darstellen und diese auch in der humanen Plazenta exprimiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass eine Regulation der Rezeptoren in der Plazenta durch eine GC-Behandlung der Mutter stattfinden kann.⁹¹ Eine solche Regulation könnte Veränderungen in dem GC-Haushalt des Feten bewirken. In einer Studie von Bromer et al. wird ein Einfluss von genetisch und epigenetisch bedingten Variationen des GC-Rezeptor-Gens in der humanen Plazenta auf die neurobiologische Entwicklung der Kinder beobachtet.⁹² Saif et al. wiesen mittels Western-Blot verschiedene Expressionsmuster der GC-Rezeptor-Isoformen bezüglich des Schwangerschaftsalters bei Geburt und des Geschlechts, nicht jedoch bezüglich einer BET-Behandlung nach.⁹¹

Um die Thematik eines möglichen Einflusses antenataler GC-Exposition auf die placentaren und den fetalen Organismus genauer zu ergründen, bedarf es weiterer Genexpressionsstudien an der humanen Plazenta. Für die Sicherstellung von validen Ergebnissen aus RT-qPCR-Experimenten sind stabile ICG nötig, deren Expression nicht von den Versuchsbedingungen reguliert wird.

1.3 Fragestellung, Arbeitshypothesen und Ziel

ICG werden häufig zur Normalisierung von RT-qPCR-Studien in der humanen Plazenta verwendet. Wie oben beschrieben kann die mRNA-Expression von Referenzgenen durch bestimmte Faktoren beeinflusst werden. Somit ist es nötig für jedes Setting stabile ICG zu etablieren. Es gibt bereits Hinweise darauf, dass sich die Expressionen einiger ICG in der humanen Plazenta bezüglich des Schwangerschaftsalters, des fetalen Geschlechts, sowie der placentaren Lokalisation der Proben unterscheiden.^{31, 32, 36, 39}

Es stellt sich daher die Frage, ob eine einmalige antenatale Behandlung mit 2x12mg BET zur Lungenreifeinduktion in der menschlichen Plazenta zu einer Beeinflussung der Genexpression führt und welche ICG hiervon unbeteiligt sind. Ferner soll untersucht werden, ob diese Regulation vom fetalen Geschlecht, dem Schwangerschaftsalter bei Geburt, sowie der Lokalisation der Plazentaprobe abhängt, und welche ICG für Genexpressionsstudien im Rahmen antenataler GC-Gaben in der humanen Plazenta geeignet sind.

Arbeitshypothesen. Entsprechend der Fragestellung wurden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

- Die Expression von einigen ICG in der humanen Plazenta wird von den Faktoren BET-Behandlung, Schwangerschaftsalter bei Geburt, fetales Geschlecht und Lokalisation der Plazentaprobe beeinflusst.
- Mithilfe der Software-Applikationen geNorm, BestKeeper und NormFinder lässt sich eine Kombination aus stabilen ICG finden.
- Durch die Normalisierung eines Zielgens mit verschiedenen ICG lassen sich unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Expression des Zielgens erzeugen.

Ziel. Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine Kombination aus geeigneten Referenzgenen für Expressionsstudien an der humanen Plazenta zu finden, deren mRNA-Expression nicht von einer einmaligen BET-Behandlung der Mutter zur Lungenreifeinduktion beeinflusst

wird. Des Weiteren soll die mRNA-Expression nicht durch die Faktoren Geschlecht, Schwangerschaftsalter bei Geburt und Lokalisation der Plazentaprobe reguliert werden. Am Beispiel des GC-Rezeptors α (NR3C1) als Zielgen soll demonstriert werden, dass die Ergebnisse alleine durch die Auswahl der ICG signifikant verändert werden können und dass somit die Verwendung geeigneter ICG für eine akkurate und valide Normalisierung notwendig ist.

2. Methodik

2.1 Studienkollektiv

Bei dem Studienkollektiv dieser Fall-Kontroll-Studie handelt es sich um eine ausgewählte Subpopulation der Kohorten-Studie „Auswirkungen maternaler Glukokortikoidgaben im Rahmen der Lungenreifeinduktion bei drohender Frühgeburt auf das maternale Plazentalaktogen“ der AG „Experimentelle Geburtsmedizin“ der Klinik für Geburtsmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Ethik-Antragsnummer: EA2/149/07). Alle Probandinnen waren schwangere Frauen, die in der Klinik für Geburtsmedizin der Charité Berlin am Campus Virchow Klinikum und am Campus Charité Mitte entbunden wurden.

In die Studie wurden gesunde Schwangere (n=86) eingeschlossen, die bei drohender Frühgeburt mit einer einmaligen intramuskulären Gabe von 2x12mg BET (Celestan®) im Abstand von 24h zwischen der 23+5 und der 34+0 SSW behandelt wurden. Zudem wurde leitliniengetreu eine Tokolyse mit Fenoterol oder Nifedipin durchgeführt.^{72, 73} Bei vorzeitigem Blasensprung oder bei Verdacht auf eine Infektion erhielten die Schwangeren eine antibiotische Therapie. Frauen, die wiederholt BET-Zyklen erhielten, sowie Frauen, die vor Abschluss eines vollständigen BET-Zyklus entbunden wurden, wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Ein- und Ausschlusskriterien sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien für Probandinnen

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Einlingsschwangerschaft Alter der Schwangeren: 18 bis 45 Jahre Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der BET-Gabe: 23+5 bis 34+0 SSW normosomer Fetus zum Zeitpunkt der BET-Gabe (Ultraschallschätzwert nach der Hadlock-Formel: ⁹³ 10. bis 95. Perzentile) einmaliger BET-Zyklus	Mehrlingsschwangerschaft, virale Infektionen (HIV, Hepatitis C) Schwangerschaftsgestosen (Gestationsdiabetes, Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie, Präeklampsie, Eklampsie, HELLP) metabolische Erkrankungen (Diabetes Mellitus, Cushing Syndrom, unzureichend behandelte Hypo- oder Hyperthyreose) Feten mit schweren Fehlbildungen, intrauteriner Wachstumsrestriktion, bereits vorbestehender Wachstumskurvenabflachung, pathologischem umbilikalem oder uterinem Doppler repetitive BET-Gaben, anderweitige GC-Behandlung Entbindung vor Abschluss eines vollständigen BET-Zyklus

Die Teilnehmerinnen wurden mit Kontrollprobandinnen (n=92) bezüglich des Schwangerschaftsalters zum Zeitpunkt der Geburt und des fetalen Geschlechts gepaart. Die Kontrollprobandinnen erhielten keine BET-Behandlung. Ansonsten galten dieselben Ein- und Ausschlusskriterien.

Für die im Folgenden beschriebene Fall-Kontroll-Studie wurde eine Subkohorte von Probandinnen ausgewählt, die ein möglichst breites Spektrum bezüglich des Gestationsalters und eine gleichmäßige Verteilung des fetalen Geschlechts abbildet. Die mit BET behandelten Probandinnen (n=24) wurden mit Kontrollprobandinnen nach Schwangerschaftsalter und fetalem Geschlecht gepaart, die keine BET-Gabe erhielten (n=24). Von jeder Probandin wurden zwei Plazentaprobe aus verschiedenen Lokalisationen entnommen, sodass bei 48 Probandinnen ein Umfang von insgesamt 96 Proben untersucht wurde.

2.2 Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte durch die AG „Perinatale Programmierung“, Abteilung „Experimentelle Geburtsmedizin“, Klinik für Geburtsmedizin der Charité Berlin. Die Plazentaprobe wurden direkt nach der Untersuchung durch die Hebamme gewonnen. Die Entnahme erfolgte nach standardisiertem Protokoll („systematic and uniform random sampling protocol“) ⁹⁴ mithilfe einer Kreisschablone, die aus 16 gleich großen Kreissektoren besteht. Nach Auflage der Schablone wurden aus einem Sektor pro Plazenta zwei 1cm² große Gewebestücke über die gesamte Tiefe der Plazenta entnommen. Eine Probe entstammt aus zentraler und eine Probe aus peripherer Lokalisation. Bei jeder neuen Plazenta wurde der im Uhrzeigersinn nächste Kreissektor gewählt. Die Proben wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwertung bei -80°C gelagert.

2.3 RNA-Isolation

2.3.1 Etablierung der RNA-Isolation

Optimierung der RNA-Isolation. Das Gewebe wurde zunächst im gefrorenen Zustand zerkleinert und in 600µl RLT-Lysepuffer gelöst, der mit 6µl β-Mercaptoethanol versetzt wurde. Die Proben wurden mit einem TissueLyser (Qiagen, Deutschland) homogenisiert

und die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die RNA-Qualität wurde durch Messung der OD 260/280 am FLUOStar Omega (BMG Labtech, Deutschland) und durch Ermittlung der RIN (RNA Integrity Number) am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Kalifornien, USA) überprüft (siehe unten). Da erste RNA-Isolationsversuche eine hohe Degradierung der RNA zeigten, wurden verschiedene Extraktionsverfahren und Versuchsparmeter getestet, um die RNA-Qualität nach Extraktion zu optimieren. Dabei wurden folgende Verfahren miteinander verglichen:

1. **Optimierung der Zerkleinerungsmethode des Gewebes.** Die gefrorene Plazenta wurde einerseits durch Schneiden mit dem Skalpell, andererseits durch Zerschlagen mit dem Hammer zerkleinert. Dabei wurde darauf geachtet, bei welcher dieser Methoden das Gewebe am stärksten gefroren bleibt und inwiefern sie sich auf die OD 260/280 und die RIN auswirkt.
2. **Optimierung der Gewebemenge.** Der Hersteller des RNeasy Mini Kits empfiehlt maximal 30mg Gewebe einzusetzen. Es wurde ermittelt, inwieweit sich die RNA-Ausbeute durch veränderte Mengen (20mg, 40mg, 80mg, 100mg, 160mg und 200mg) steigern lässt, ohne die RNA-Degradierung zu erhöhen.
3. **Optimierung der Homogenisierungsmethode.** Das Gewebe wurde durch Verwendung des TissueLyser homogenisiert. Dabei wurde der Einsatz von einer größeren Stahlkugel à 5mm Durchmesser (Stainless Steel Beads, Qiagen), sowie von mehreren kleineren Keramikugeln à 2mm Durchmesser (ZR BashingBead™ Lysis Tubes, Zymo Research) und von Keramikugeln à 2,8mm Durchmesser (Precellys Keramik-Kit, Peqlab) getestet.
4. **Optimierung der Einstellungen am TissueLyser.** Außerdem wurden am TissueLyser die Rüttelfrequenzen und die Dauer optimiert: 2x4min bei 25hz, 2x30sec bei 15hz und 4x20sec bei 10hz. Ziel war es herauszufinden, welches Homogenisierungsverfahren zu einer geringeren RNA-Degradierung führt.
5. **Vergleich von verschiedenen RNA-Extraktionsverfahren.** a) Lyse des Gewebes in RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol und anschließender RNA-Isolation auf Säulen mithilfe des RNeasy Mini Kit; b) Lyse des Gewebes in Trizol mit anschließender RNA-Isolation auf Säulen mithilfe des RNeasy Mini Kit; c) Lyse des Gewebes in Trizol mit nachfolgender RNA-Isolation ohne Säulen nach dem von Haimov-Kochmann modifiziertem TRIZOL Reagent Protokoll (Invitrogen).⁹⁵

6. **Beeinflussung der RNA-Qualität durch die Spezies.** Da die RNA-Isolation für Schafplazenten in vorherigen Studien bereits etabliert wurde und wesentlich bessere RIN-Werte lieferte, wurde das bis dato etablierte Extraktionsverfahren jeweils mit einer Schaf- und einer humanen Plazentaprobe durchgeführt und die RIN-Werte miteinander verglichen.
7. **Beeinflussung der RNA-Qualität durch den Geburtsmodus.** Des Weiteren wurde überprüft, ob der Geburtsmodus (Spontangeburt vs. Sectio) Auswirkungen auf die RNA-Qualität der humanen Plazenta hat.

Endgültiges Extraktions-Protokoll. Aufgrund der Ergebnisse aus den Etablierungsversuchen (siehe 3.2) wurde sich für das folgende Vorgehen zur RNA-Isolation entschieden: Die bei -80°C gelagerten Plazentaprobe wurden im gefrorenen Zustand durch Hämmern zerkleinert. Es wurden jeweils 30-45mg Gewebe abgewogen und in 2ml-Gefäße mit 600µl gekühlten RLT-Puffer, das mit 6µl β-Mercaptoethanol versetzt wurde, überführt. Jedem Gefäß wurde eine Stahlkugel mit 5mm Durchmesser zugeführt. Anschließend wurde die Gewebe-RLT-Lösung zwei bis fünf Mal im TissueLyser bei 15hz für jeweils 30sec geschüttelt, bis das Gewebe optisch vollständig homogenisiert war. Die Gewebe-RLT-Lösung wurde zur weiteren Zerkleinerung auf Shredder-Säulen gegeben und 2min bei höchster Umdrehungszahl (20.000xg) zentrifugiert (Eppendorf, Deutschland). Anschließend wurde das Eluat 3min bei 20.000xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand zur Fällung der RNA in ein neues Gefäß mit jeweils 600µl 70%iges Ethanol überführt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die weitere Extraktion wurde mit dem RNeasy Mini Kit entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Abbau von DNA-Teilen innerhalb der Proben erfolgte an der im Protokoll vorgesehene Stelle. Die Proben wurden auf der Säule für 15min bei 30°C mit jeweils 10µl DNase inkubiert, die in 70µl RDD-Puffer gelöst wurde. Zum Lösen der RNA wurden die Membranen mit jeweils 32µl Nuclease-freiem Wasser versetzt und 3min bei 30°C inkubiert, bevor sie 1min bei 8.000xg zentrifugiert wurden. Das RNA-haltige Eluat wurde bei -80°C gelagert.

Kontrolle der RNA-Integrität. Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde die RIN von jeder Probe durch Messung am Agilent 2100 Bioanalyser bestimmt. Die RIN dient der Klassifizierung von RNA hinsichtlich ihres Degradationsgrades, wobei 1 für die höchste und 10 für die geringste RNA-Degradation steht. Der Ermittlung der RIN durch den Agilent

2. Methodik

2100 Bioanalyzer liegt die Separierung der einzelnen RNA-Fragmente durch Elektrophorese zugrunde, der sich eine Laser-induzierte Fluoreszenzmessung und die automatische Berechnung der RIN anschließt.

Für die Messungen wurde das Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet. Die RNA 6000 Nano Chips wurden gemäß den Angaben des Herstellers mit Gel, Marker, Leiter und den Proben beladen. Die Messung erfolgte am Agilent 2100 Bioanalyzer durch die Agilent 2100 Expert software (Version B.02.08.SI648, Agilent Technologies, Kalifornien, USA) mit dem Protokoll „Eukaryote Total RNA Nano“.

In dem Elektropherogramm intakter RNA-Proben sind drei Peaks bei ansonsten flacher Kurve (Plateauphase) nahe der Basislinie sichtbar, einer für den Marker und zwei für die ribosomale RNA 18S und 28S. Je geringer die rRNA-Peaks ausfallen und je weiter sich die Plateauphase von der Basislinie entfernt, desto degradierter ist die RNA. In Abbildung 1 sind Beispiele für Elektropherogramme bei unterschiedlich ausgeprägten RNA-Degradationsgraden und RIN-Werten aufgeführt.

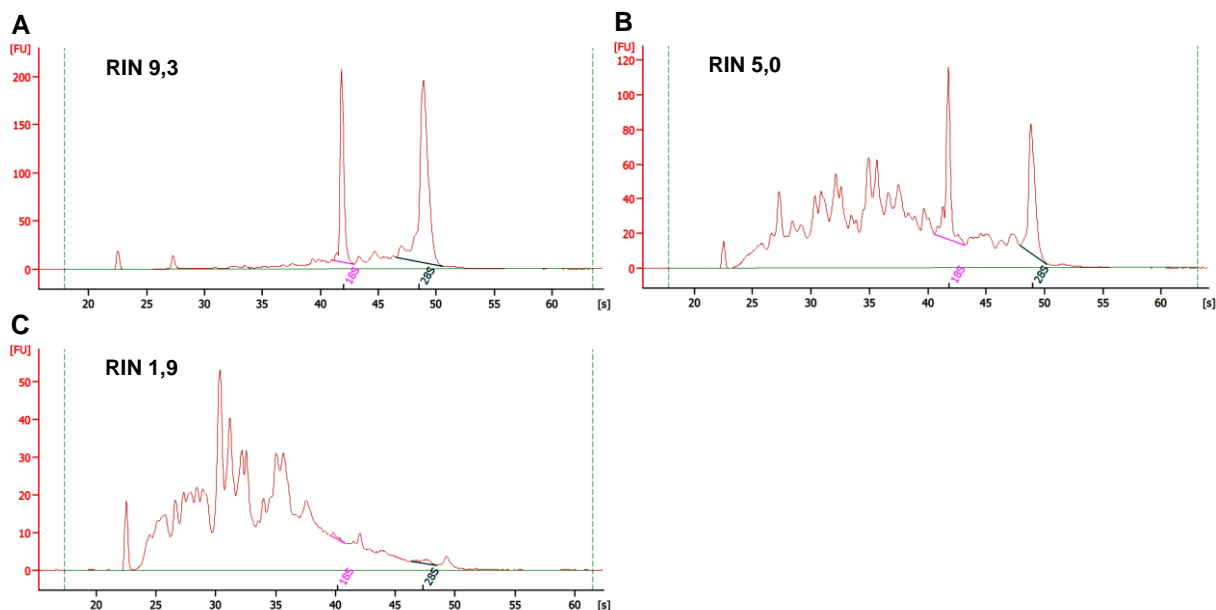


Abbildung 1: Exemplarische Elektropherogramme von RNA-Proben in Abhängigkeit von der RNA-Integrität (RIN)

Die Abbildungen wurden mit der Agilent 2100 Expert software (Version B.02.08.SI648, Agilent Technologies, Kalifornien, USA) erstellt.

Die RNA-Konzentration und die Reinheit der RNA-Proben wurden am FLUOStar Omega mit der Software Omega (Version 3.00, BMG Labtech, Deutschland) gemessen. Als Maß für die Reinheit der RNA-Proben diente das Verhältnis der Nukleinsäure-Absorption bei

260nm zu 280nm (OD 260/280). Eine OD 260/280 von ca. 2,0 spricht für eine große Reinheit der RNA.

2.3.2 Umschreiben der mRNA in cDNA

In Vorbereitung auf die PCR- und RT-qPCR-Versuche wurden alle RNA-Proben in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurde das iScript Select cDNA Synthesis Kit (BioRad) unter dem Einsatz des Random primer mix und von 1µg RNA je Probe verwendet. Bei jedem Durchlauf wurde eine Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase mitgeführt, um Verunreinigungen durch genomische DNA auszuschließen. Das Protokoll wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt und die cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

2.4 Literaturrecherche und Analyse interner Kontrollgene auf Ko-Regulation

2.4.1 Literaturrecherche

Die ICG wurden nach zwei Kriterien ausgewählt. Einerseits wurden nach denjenigen gesucht, deren Expressionsstabilität bereits in der humanen Plazenta mittels geNorm oder anderen Verfahren evaluiert und positiv bewertet wurde, andererseits wurden die ICG gewählt, die bereits in PCR-Experimenten in der humanen Plazenta im Zusammenhang mit dem GC-Modell verwendet wurden. Um die bereits in der Plazenta analysierten ICG zusammenzutragen wurde eine Literaturrecherche in PubMed (NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda MD, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) und im Web of Science (Thomson Reuters, New York, USA, <http://webofknowledge.com>) durchgeführt. Dabei wurden folgende Suchstrategien für PubMed verwendet: (1) „geNorm” AND „human placenta”; (2) („housekeeping gene” OR „control gene” OR „reference gene”) AND „human placenta” AND „PCR”. Als Filter wurde „human“ und „English“ eingestellt. (3) Die gefundenen Artikel wurden im Web of Science auf zitierte und zitierende Artikel untersucht.

Die darüber gefundenen ICG, wurden in absteigender Priorität nach zwei Kriterien sortiert: (1) Das ICG ist in mindestens einem Analyseverfahren unter den stabilsten drei ICG. Je häufiger es unter den stabilsten Genen ist, desto höher die Bewertung. (2) Das ICG wurde bereits im GC-Modell oder innerhalb fetaler Wachstumsstudien verwendet. Für

das zweite Kriterium wurde eine weitere Suchstrategie in PubMed durchgeführt: („cortison“ OR „cortisol“ OR „glucocorticoid“ OR „dexamethasone“ OR „betamethasone“) AND „human placenta“ AND „PCR“. Als Filter wurde „human“ und „English“ eingestellt.

2.4.2 IPA-Analyse

Da die Ergebnisse der geNorm-Analyse verfälscht werden können, wenn die untersuchten ICG ähnliche Expressionsprofile aufweisen,¹⁰ wurde überprüft, ob die potenziellen ICG untereinander ko-reguliert werden. Es wurde eine Analyse mittels QUIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, QUIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity, accessed 31.03.2015, Version 23814503, Build 338830M) durchgeführt. IPA ist eine webbasierte Software, die aus bereits publizierten Daten die Interaktionen zwischen humanen, Maus- und Rattengenomen sammelt und analysiert. Somit können gezielt Interaktionen und Ko-Regulationen zwischen verschiedenen Genen ausfindig gemacht werden. Die über die Literaturrecherche gefundenen ICG wurden hinsichtlich des Interaktions-Typs „Transkription“ und „Expression“ analysiert. Dabei wurden sowohl direkte, als auch indirekte Interaktionen erfasst. Nach der automatischen Erstellung eines Netzwerks, das die Interaktionen der ICG untereinander visualisiert, wurden alle Transkriptionsfaktoren und Moleküle, die nur zu einem ICG in Beziehung standen manuell gelöscht.

Für diese PCR-Studie wurden sieben ICG ausgewählt, die möglichst geringe Ko-Regulationen zu anderen ICG aufweisen. Dabei wurden die ICG bevorzugt, die bereits in GC-Studien verwendet wurden.

2.5 Etablierung der Primersequenzen

Für die Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR wurden Primer für die sieben ICG, für die ribosomale RNA 18S und 28S, sowie für das Zielgen NR3C1 etabliert.

2.5.1 Literaturrecherche nach Primersequenzen und Primerdesign

In Vorexperimenten wurden die Eigenschaften von jeweils zwei Primerpaaren pro Gen miteinander verglichen (siehe 2.5.2) und sich anschließend für das besser bewertete Paar entschieden. Dabei wurden je ein Primerpaar aus bereits publizierten Artikeln und ein selbst erstelltes Primerpaar verwendet. PubMed und Springerlink (per Volltextsuche)

wurden auf das jeweilige ICG in der humanen Plazenta hin durchsucht. Die Eigenschaften der gefundenen Primersequenzen wurden mit PrimerBLAST (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) und Oligo Analyser 3.1 (Integrated DNA Technologies, <http://eu.idtdna.com>) analysiert. Die optimalen Primereigenschaften sind in Tabelle 2 aufgeführt. Sofern keine Primer gefunden wurden, die den gewünschten Kriterien entsprachen, wurde die Suche auf andere humane Gewebe erweitert.

Parallel dazu wurden Primer mit den in Tabelle 2 aufgeführten Parametern mithilfe des Programms Primer Premier 6.11 (Premier Biosoft, Kalifornien, USA) erstellt. Die Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 2: Optimale Eigenschaften der Primersequenzen

PrimerBLAST	
Produktlänge	100-220 bp
Länge der Primer	18-25 bp
Schmelztemperatur T _m	60±3°C
GC-Gehalt	40-60%
GC-Klammer	1- bis 3-mal G oder C innerhalb der letzten 5 Basen (3'-Ende)
Basenwiederholungen	maximal 4-mal die gleiche Base hintereinander
Dinukleotidwiederholungen	maximal 4
Spezifität für Zielgen	mindestens 4 Mismatches mit Nebenprodukten
Exon-Überspannung	in mindestens einem Primer
Oligo Analyser 3.1	
Hairpins	$\Delta G < 3 \text{ -kcal/mol}$
3'-Hairpins	$\Delta G < 2 \text{ -kcal/mol}$
Selbstdimere	$\Delta G < 6 \text{ -kcal/mol}$
3'-Selbstdimere	$\Delta G < 5 \text{ -kcal/mol}$
Heterodimere	$\Delta G < 6 \text{ -kcal/mol}$
3'-Heterodimere	$\Delta G < 5 \text{ -kcal/mol}$

2.5.2 Etablierung der Primer

Test-PCR. Für jedes Primerpaar wurde eine Test-PCR mit zwei Proben, einer Negativkontrolle aus der Reverse-Transkriptase-Reaktion und einer Wasserkontrolle durchgeführt. Dazu wurden 10ng cDNA und je 10pmol des Forward- und Reverse-Primers in 12,5µl Nuklease-freiem Wasser gelöst, mit 12,5µl Amplitaq Gold 260 Master Mix (Applied biosystems) versetzt und nach dem folgenden PCR-Protokoll inkubiert: Ein Zyklus initialer Denaturierung für 10min bei 95°C; 40 Zyklen à 20sec Denaturierung bei 95°C, 32sec

Annealing bei der im Produktblatt der jeweiligen Primer angegebenen Schmelztemperatur, 1min Elongation bei 72°C; Kühlung bei 4°C bis das Programm beendet wurde. Die Proben wurden auf ein mit Ethidiumbromid versetztes 3%-iges Agarose-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese gemeinsam mit dem Marker 6x Loading Dye und der Leiter Gene Ruler Ultra Range DNA Ladder (Thermo Scientific) 60min bei 100V aufgetrennt. Es wurden Bilder am ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, Deutschland) mit der Image Lab™ Software (Version 5.0, Bio-Rad, Deutschland) erstellt. Die Primer wurden hinsichtlich ihrer Produktspezifität (nur ein Produkt, sowie Größe des Produkts) beurteilt. Zudem sollten die Kontrollen negativ sein, also keine Banden zeigen.

Gradienten-PCR. In einer Gradienten-PCR nach demselben Protokoll wurden für jeden Primer zehn verschiedene Annealing-Temperaturen getestet. Die beste Annealing-Temperatur zeigte nach der Gelelektrophorese auf dem Foto die stärkste Bande und wurde für die RT-qPCR-Versuche verwendet.

RT-qPCR-Test und Sequenzierung. In einem ersten RT-qPCR-Test wurden für jeden Primer 8ng cDNA und je 12pmol des Forward- und Reverse-Primers in 5µl Nuklease-freiem Wasser und 5µl Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) gelöst. Es wurden jeweils zwei Proben, eine Negativkontrolle aus der Reverse-Transkriptase-Reaktion und eine Wasserkontrolle in Dreifachbestimmung gemessen. Die Proben wurden auf eine MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) aufgetragen und an dem PCR-Gerät 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Kalifornien, USA) mit der 7500 System SDS Software (Version 1.4 und Version 2.3, Applied Biosystems, Kalifornien, USA) gemessen. Das Protokoll entsprach dem der Test-PCR, jedoch fand nach dem letzten Zyklus eine Schmelzkurvenbestimmung statt (15sec bei 95°C, 1min bei 60°C, 15sec bei 95°C, 15sec bei 60°C). Die Primer wurden anhand ihrer Ct-Werte (zwischen 12 und 30) und den Verläufen der Amplifikations- und Schmelzkurven beurteilt (nur ein Produkt, keine Detektion der Wasser- und Negativkontrollen). Die PCR-Produkte wurden mit dem GenUP™ PCR Cleanup Kit (biotechrabbit) aufbereitet und von der Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland) sequenziert. Anschließend wurden die Ergebnisse der Sequenzierung mit der FASTA-Sequenz des Gens (PubMed) abgeglichen.

2. Methodik

Effizienzmessung. Für jedes Primerpaar wurde die Effizienz über eine Standardreihe in einer RT-qPCR bestimmt. Dabei wurden je 32ng, 16ng, 8ng, 4ng, 2ng, 1ng und 0,5ng cDNA sowie eine Wasserkontrolle gemessen. Die Effizienz wurde mit der Formel $E = (10^{-1/\text{Steigung der Standardkurve}} - 1) \times 100\%$ berechnet und nur Werte zwischen 90% und 110% angenommen.

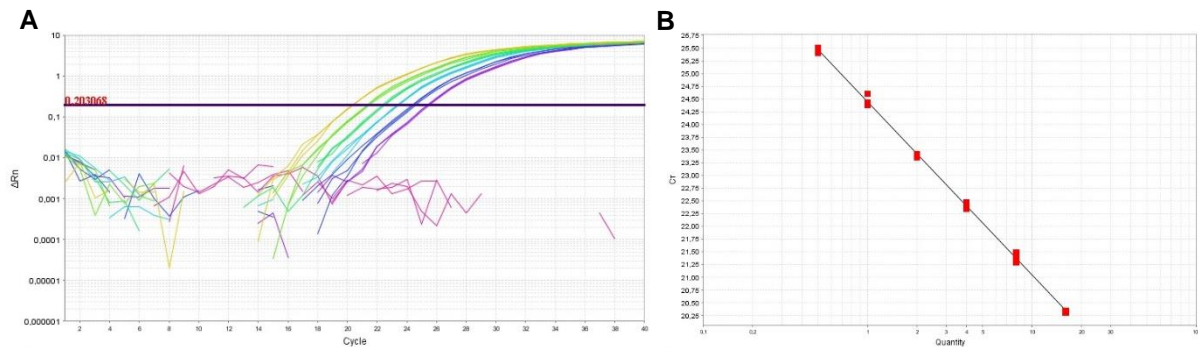


Abbildung 2: Exemplarische Amplifikationskurve (A) und Standardkurve (B) in der Real-time-PCR zur Effizienzmessung

Die Abbildungen wurden mit der 7500 System SDS Software (Version 2.3, Applied Biosystems, Kalifornien, USA) erstellt.

Auswahl des Primerpaares. Pro ICG wurde sich für das Primerpaar (bereits publiziert vs. selbst erstellt) mit der größten Produktspezifität, der geringsten Tendenz zur Dimerbildung, also einem eindeutigen Peak in der Schmelzkurve (Abb. 3), und der besten Effizienz entschieden. Die Primersequenzen sind in Tabelle 9 (siehe 3.3.3) aufgeführt.

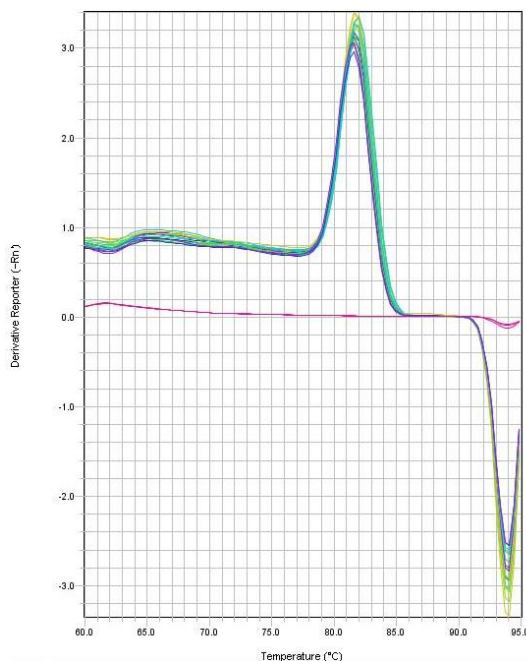


Abbildung 3: Exemplarische Schmelzkurve ohne Nebenprodukte und mit negativen Wasserkontrollen

Die Abbildung wurde mit der 7500 System SDS Software (Version 2.3, Applied Biosystems, Kalifornien, USA) erstellt.

2.6 Messung der Genexpression mittels RT-qPCR

Die 96 Plazentaprobe wurden hinsichtlich ihrer Expression der sieben ICG, der ribosomalen RNA 18S und 28S und des Zielgens NR3C1 mittels RT-qPCR untersucht. Dabei wurden für die ICG und das Zielgen je 10ng cDNA, für RNA18S und RNA28S je 2ng cDNA eingesetzt, mit je 1,2µM des Forward- und Reverse-Primers in 5µl nukleasefreiem Wasser gelöst und mit 5µl Power SYBR Green PCR Master Mix versetzt. Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei jedem PCR-Lauf wurden eine weitere Plazentaprobe als interne Kontrolle und eine reine Wasserkontrolle als Negativkontrolle mitgeführt. Für die Reaktionen wurde das 7500 Real Time PCR System mit der 7500 System SDS Software Version 1.4 und Version 2.3 verwendet. Dabei wurde das in Tabelle 3 aufgeführte Protokoll angewandt.

Tabelle 3: Protokoll für die quantitative Real-time-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10min	1
Denaturierung	95°C	20sec	40 (alle ICG und NR3C1)
Annealing	siehe Tab. 9	32sec	30 (RNA18S und RNA28S)
Elongation	72°C	60sec	
Schmelzkurve	95°C	15sec	1
	60°C	60sec	
	95°C	15sec	
	60°C	15sec	

2.7 Berechnungen und statistische Auswertung

2.7.1 Berechnungen zur Quantifizierung der Genexpression

Die Rohdaten wurden von der 7500 System SDS Software Version 1.4 und Version 2.3 in Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) exportiert. Es wurde das geometrische Mittel der Ct-Werte der Triplikate, sowie die Standardabweichung (SD) ermittelt. Ab einer $SD > 0,3$ oder einer Differenz von $> 0,3$ Ct-Werten zwischen den Triplikaten wurde die jeweilige Probe nochmals gemessen. Die Ct-Werte der Proben aus unterschiedlichen PCR-Läufen wurden durch Abzug der Ct-Werte einer internen Kontrolle korrigiert. Zur Berechnung der relativen Quantität (Q) wurde die Δ -Ct-Methode unter Berücksichtigung der gemessenen Effizienzen (E) je Gen angewandt. Ct_{min} stellt den niedrigsten Ct-Wert je Gen dar.

$$Ct_{\text{korr}} = Ct_{\text{Probe}} - Ct_{\text{(interne Kontrolle)}} \quad (1)$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{min}} - \Delta Ct_{\text{korr}} \quad (2)$$

$$Q = E^{\Delta Ct} \quad (3)^{96}$$

2.7.2 Software-Applikationen

Die sieben ICG wurden mithilfe der Microsoft Excel-basierten Programme geNorm, BestKeeper und NormFinder hinsichtlich ihrer Validität als Referenzgene untersucht. Für alle drei Programme wurden die relativen Expressionswerte ($E^{\Delta Ct}$) berechnet und die Mittelwerte aus den zentralen und peripheren Plazentaproben der jeweils gleichen Probandin eingesetzt.

geNorm. Die Analyse mit der geNorm Visual basic application (V 3.5, Biogazelle NV, Zwijnaarde, Belgium) wurde entsprechend der von Vandesompele et al. publizierten Methode¹⁰ und entsprechend den Anleitungen des Herstellers⁹⁶ durchgeführt, wobei die Faktoren BET-Behandlung, Geschlecht und Schwangerschaftsalter bei Geburt berücksichtigt wurden. Durch den Vergleich der Expression (logarithmierte Werte) von zwei ICG je Probe werden die paarweisen Variationen aller möglichen ICG-Kombinationen, sowie aller möglichen Proben-Kombinationen berechnet. Basierend auf der SD aller Kombinationen wird für jedes ICG eine Stabilitätskonstante M gebildet. Je niedriger der M-Wert ausfällt, desto stabiler ist die Expression des ICG. Schritt für Schritt wird das am wenigsten stabile ICG aus der Analyse ausgeschlossen, wobei die M-Werte jedes Mal neu berechnet werden. So wird eine Rangordnung der ICG hinsichtlich ihrer Expressionsstabilität erstellt, an deren Spitze die beiden stabilsten Gene stehen. Aus dem geometrischen Mittel der ICG wird der Normalisierungsfaktor (NF) bestimmt. Um zu ermitteln, wie viele ICG mindestens zur Normalisierung eingesetzt werden sollten, berechnet geNorm paarweise Vergleiche $V_{n/n+1}$ von NF_n und NF_{n+1} , beginnend mit dem NF der beiden stabilsten ICG und dem NF, der zusätzlich das nächst-stabile ICG beinhaltet. Die jeweils nächst-stabilen ICG werden solange schrittweise in die Berechnungen eingeschlossen, bis $V_{n/n+1} \leq 0,15$ eintritt. Diese stellt den nach Vandesompele et al. empfohlenen Grenzwert dar, der anzeigt, dass der Einschluss eines weiteren ICG keinen signifikanten Nutzen zur Normalisierung darstellt.¹⁰

NormFinder. Mithilfe des NormFinder Excel Add-In (v0.953, MDL – Molecular Diagnostic Laboratory, Aarhus University Hospital Skejby, Dänemark) wurde der von Andersen et al. publizierte Algorithmus zur Berechnung eines Stabilitätswertes für jedes ICG angewandt.¹⁴ NormFinder berechnet für jedes ICG die Variation innerhalb der eigenen Gruppe, sowie die die Variation der ICG untereinander und bildet daraus einen Stabilitätswert für jedes ICG. Je geringer dieser Wert ausfällt, desto höher ist die Expressionsstabilität des ICG.

BestKeeper. Die Software BestKeeper (Version 1, verfügbar unter <http://www.genequantification.de/bestkeeper.html>) wurde nach dem von Pfaffl et al. publizierten Vorgehen verwendet.¹⁹ BestKeeper ermittelt zunächst für jedes ICG den durchschnittlichen Expressionswert (geometrisches Mittel der eingesetzten RT-qPCR-Daten), sowie die SD der Expressionswerte. Je geringer die SD ausfällt, desto höher ist die Expressionsstabilität eines ICG. Ein ICG mit einer $SD > 1,0$ gilt als instabil. Aus den stabilen ICG wird der BestKeeper-Index berechnet, der das geometrische Mittel der durchschnittlichen Expressionswerte der ICG darstellt. Für jedes ICG werden paarweise Korrelationsanalysen mit jedem anderen ICG und mit dem BestKeeper-Index durchgeführt und der Pearson Korrelationskoeffizient (r) berechnet. Je höher der Korrelationseffizient zwischen den ICG und dem BestKeeper-Index ist, desto valider gelten die eingesetzten ICG und der BestKeeper-Index.

2.7.3 Normalisierung des Zielgens

Die relative Quantität (Q) des Zielgens NR3C1 wurde nach der Δ -Ct-Methode bestimmt. Zur Normalisierung wurde der NF aus dem geometrischen Mittel der verwendeten ICG gebildet. Es wurden neu-skalierte normalisierte Expressionslevel des Zielgens berechnet, indem der niedrigste Expressionswert $\text{Min}(Q_{\text{Probe}}/NF_{\text{Probe}})$ bei 1 festgelegt wurde (geNorm V 3.5 manual).⁹⁶

$$Q_{\text{normalisiert/neu-skaliert}} = (Q_{\text{Probe}}/NF_{\text{Probe}}) / \text{Min}(Q_{\text{Probe}}/NF_{\text{Probe}}) \quad (4)$$

Es wurden verschiedene Kombinationen aus ICG zur Normalisierung eingesetzt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

2.7.4 Statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen wurde das Programm SPSS 19 statistical software (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.) verwendet. Graphische Darstellungen erfolgten mithilfe des Programms SigmaPlot 12.5 (Systat Software, San José, Kalifornien, USA).

Zur Beschreibung der Gruppenmerkmale wurden absolute und relative Häufigkeiten verwendet. Metrisch skalierte Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Explorative Datenanalyse. In einer explorativen Datenanalyse der relativen Quantitäten jedes Gens wurden Lage und Verteilung der Daten in Boxplots visualisiert. Werte, die unter dem 3-fachen Wert der 25. Perzentile beziehungsweise über dem 3-fachen Wert der 75. Perzentile lagen, wurden als extreme Ausreißer definiert. Die entsprechenden Proben wurden nochmals in einer PCR gemessen. Bei erneutem Ausreißern wurden sie aus der Analyse des betreffenden Gens ausgeschlossen.

Die relativen Quantitäten jedes Gens wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung ($p > 0,05$) untersucht. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde versucht, durch logarithmische Transformierung eine Normalverteilung herzustellen.

„Klassische“ Analyse der ICG. Zunächst wurde jedes ICG einzeln analysiert. Dabei wurde mittels MANOVA (bei normalverteilten Daten) beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test (bei nicht-normalverteilten Daten) überprüft, ob die Probenentnahme aus zentraler oder peripherer Lokalisation der Plazenta einen Einfluss auf das Expressionsprofil der Referenzgene hat. Für alle weiteren Analysen wurden die zentralen und peripheren Proben getrennt voneinander beobachtet. Um die Expressionsstabilität der ICG zu analysieren, wurde für jedes normalverteilte ICG eine MANOVA (bei einem $p > 0,05$ im Levene-Test) mit den Faktoren BET-Behandlung, Geschlecht und Schwangerschaftsalter bei Geburt ($<37+0$ SSW vs. $\geq 37+0$ SSW) durchgeführt, gefolgt von einem Holm's-Sidak-Test für paarweise Vergleiche. Gegebenenfalls wurden logarithmisch transformierte Werte verwendet, um eine Normalverteilung zu erhalten. Nicht-normalverteilte Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen Behandlung, Geschlecht oder Schwangerschaftsalter untersucht. Das Signifikanzniveau für alle Tests wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

Statistische Auswertung der Software-Applikation. Für jede der Applikationen geNorm, BestKeeper und NormFinder wurde eine Rangliste erstellt, wobei jedem ICG eine Platzierung entsprechend seiner Expressionsstabilität zugewiesen wurde. Basierend auf dem Durchschnittswert aller Platzierungen eines ICG wurde eine neue Software-übergreifende Rangliste erstellt. Dabei stellte der geringste Durchschnittswert die höchste Expressionsstabilität dar.

Statistische Auswertung der Zielgen-Normalisierung. Nach abgeschlossener Analyse der ICG-Expressionen, wurde das Zielgen mit unterschiedlichen ICG beziehungsweise ICG-Kombinationen normalisiert. Die normalisierten Expressionslevel des Zielgens wurden auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen BET-Behandlung, Geschlecht und Schwangerschaftsalter bei Geburt getestet. Dafür wurde eine MANOVA (Levene-Test $p > 0,05$) mit einem Holm's-Sidak-Test für paarweise Vergleiche durchgeführt. Effekte zwischen den Subgruppen wurden mittels t-Test beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

Korrelationsanalyse. Mit der Pearson-Gleichung wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen der durchschnittlichen Expression der einzelnen Gene und der RNA-Konzentration (ng/ μ l pro mg Gewebe) besteht.

2.8 Reagenzien und Material

Tabelle 4: Reagenzien, Lösungsmittel und Material

Reagenzien und Lösungsmittel	Artikelnummer	Hersteller
2-Mercaptoethanol	8057400005	Merck, Deutschland
Agarose	A9539-500G	Sigma-Aldrich, USA
Amplitaq Gold 260 Master Mix	4398876	Applied Biosystems by life technologies, USA
Ethanol 70 Vol-% (MEK)		Herbeta Arzneimittel, Deutschland
Ethidiumbromid	1116150010	Merck, Deutschland
Gene Ruler Ultra Range DNA Ladder (inkl. 6x Loading Dye)	00141398	Thermo Scientific, USA
Power SYBR® Green PCR Master Mix	4367659	Applied Biosystems by life technologies, USA
TRIzol® Reagent	15596-018	Invitrogen, USA
Wasser (Nuclease-frei, DEPC-behandelt)	T143-4	Roth, Deutschland
Kits und Sets	Artikelnummer	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit (inkl. Chips)	5067-1511	Agilent Technologies, Deutschland
GenUP™ PCR Cleanup Kit	BR0700302	Biotechrabbit, Deutschland
iScript™ Select cDNA Synthesis Kit	170-8897	BioRad, Deutschland
RNase-Free DNase Set	79254	Qiagen, Deutschland
RNeasy Mini Kit (inkl. RLT- und RDD-Puffer)	74106	Qiagen, Deutschland
Material	Artikelnummer	Hersteller
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	N8010560	Applied Biosystems by life technologies, USA
Precellys Keramik-Kit 2.8 mm	91-PCS-CK28	Peqlab, Deutschland
QIAshredder™	79656	Qiagen, Deutschland
Stainless Steel Beads, 5 mm (200)	69989	Qiagen, Deutschland
ZR BashingBead™ Lysis Tubes (2.0 mm)	S6003-50	Zymo Research, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Studienkollektivs

Sowohl in der BET-Gruppe (n=24), als auch in der Kontrollgruppe (n=24) betrug der Anteil an weiblichen und männlichen Neugeborenen jeweils 50%. Tabelle 5 fasst die durchschnittliche Schwangerschaftsdauer der einzelnen Gruppen zusammen.

Tabelle 5: Durchschnitt und Verteilung der Schwangerschaftsdauer der einzelnen Gruppen

Geschlecht	Schwangerschaftsdauer in Tagen p.m.		p-Wert (t-Test)
	BET Mittelwert; min. – max. Dauer	Kontrolle Mittelwert; min. – max. Dauer	
Weiblich	<u>245</u> ; 177 – 290 (n=12)	<u>260</u> ; 236 – 290 (n=12)	0,058
Männlich	<u>245</u> ; 186 – 293 (n=12)	<u>254</u> ; 222 – 291 (n=12)	0,304

3.2 Einfluss der Extraktionsmethode auf die RNA-Qualität

Die Zerkleinerungsmethode mit dem Hammer oder dem Skalpell nahm kaum Einfluss auf die RNA-Qualität am Ende der Extraktion. Allerdings erwies sich das Zerhämmern als die praktikabelste Methode, da die Proben dabei vollständig gefroren blieben. Die höchste RNA-Ausbeute mit der besten RNA-Qualität ergab sich bei dem Einsatz von 40mg Gewebe. Bei der Homogenisierung mit dem TissueLyser lieferten zwei Zyklen für 30sec bei 15hz unter der Verwendung von Stahlkugeln die besten Ergebnisse. Die Lyse in RLT-Puffer und Extraktion mit dem RNeasy Mini Kit erwies sich gegenüber der Trizol-Methode als überlegen. Der Geburtsmodus nahm bei humanen Gewebeproben keinen wesentlichen Einfluss auf die RNA-Qualität. Die Güte des Extraktionsverfahrens wurde durch die gleichzeitige RNA-Isolation aus Schafsplazenten validiert. Hierbei lagen die RIN-Werte der Schafsplazenten deutlich über denen der humanen Plazentaprobe. Die Auswirkungen verschiedener Methoden der Gewebezerkleinerung und RNA-Extraktion auf die RNA-Qualität sind in Tabelle 6 dargestellt.

Die durchschnittliche RNA-Konzentration der 96 Plazentaprobe betrug 683,15ng/µl. Für zwei Proben betrug der RIN-Wert 3,0. Alle anderen Proben lagen in einem Bereich zwischen 4,0 und 7,4. Der mittlere RIN-Wert aller Proben lag bei 5,73 und die mittlere OD 260/280 bei 2,05. Bei der Aufteilung des Probenkollektivs in Gruppen entsprechend der placentaren Lokalisation, des Schwangerschaftsalters bei Geburt, des fetalen Geschlecht

3. Ergebnisse

und einer BET-Behandlung fanden sich keine signifikanten Unterschiede der RIN-Werte zwischen den Gruppen.

Tabelle 6: Modifizierungen der RNA-Isolation und deren Einfluss auf die RNA-Qualität

Test	Gruppen und Anzahl der Proben	RNA-Konzentration in ng/µl	Ratio 260/280	RIN
1. Zerkleinerungsmethode	Skalpell (n=4)	424,11	2,01	5,13
	Hammer (n=4)	886,53	2,07	5,70
2. Gewebemenge	20mg (n=1)	1530,00	2,13	4,40
	40mg (n=1)	1927,31	2,12	5,20
	80mg (n=1)	1798,43	2,11	4,20
	100mg (n=1)	1750,81	2,12	4,00
	160mg (n=1)	1110,64	2,09	4,30
	200mg (n=1)	603,84	2,05	4,40
3. Homogenisierung	Stahlkugeln 5,0mm (n=2)	689,45	2,05	5,35
	Keramikkugeln 2,8mm (n=2)	504,83	2,05	4,15
	Keramikkugeln 2,0mm (n=2)	278,42	2,03	3,95
4. Einstellungen am Tissue Lyser	2x 4min bei 25hz (n=6)	491,69	2,04	4,75
	2x30sec bei 15hz (n=6)	589,35	2,05	4,82
	4x20sec bei 10hz (n=6)	462,33	2,04	4,10
5. RNA-Extraktionsverfahren	RLT-Puffer + RNeasy Mini Kit (n=3)	427,67	2,04	4,67
	Trizol + RNeasy Mini Kit (n=3)	1419,68	2,11	4,63
	Trizol + TRIzol Reagent Protokoll (n=3)	61,62	1,91	3,23
6. Spezies	Schaf (n=1)	1281,04	2,10	8,40
	Mensch (n=1)	638,08	2,07	5,30
7. Geburtsmodus	Sectio (n=2)	1088,15	2,09	5,35
	Spontangeburt (n=2)	411,895	2,04	5,20

3.3 Beschreibung der internen Kontrollgene

3.3.1 Beurteilung von in der Literatur beschriebenen und in der humanen Plazenta verwendeten internen Kontrollgenen

Die Literaturrecherche lieferte elf Artikel, in denen 22 ICG in der humanen Plazenta evaluiert wurden (Abb. 4 und Tab. 7). Bei sieben Artikeln handelte es sich um geNorm-Studien. Vier Artikel beschrieben andere Verfahren zur ICG-Evaluierung.

3. Ergebnisse

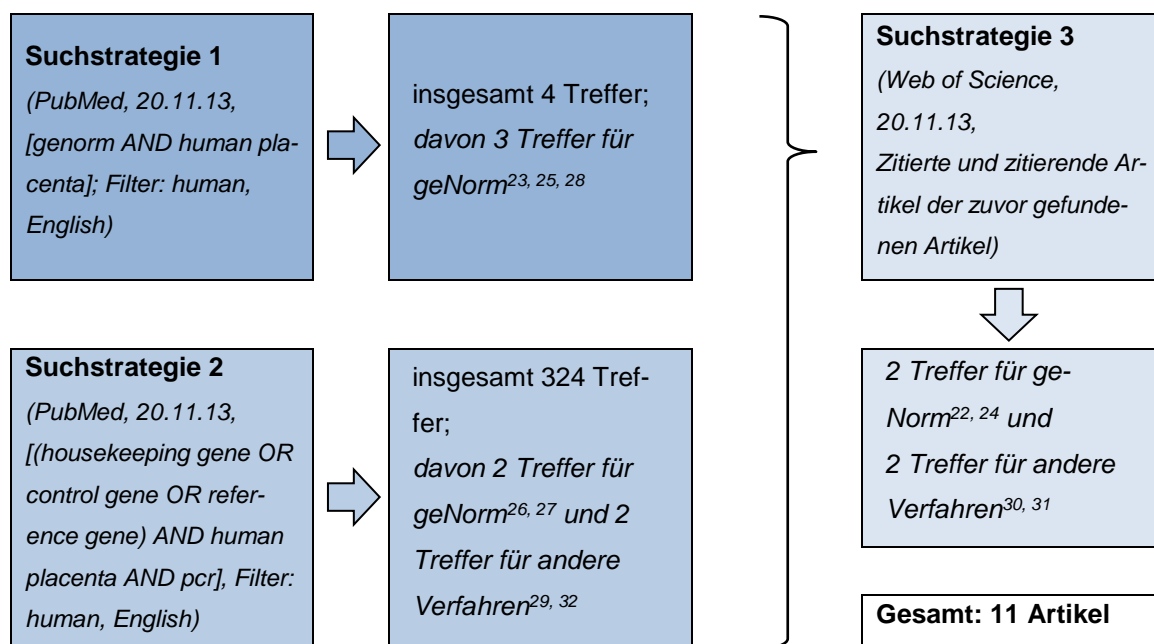


Abbildung 4: Ergebnisse der Literaturrecherche

Des Weiteren wurden 24 Artikel gefunden, in denen PCR-Studien in der humanen Plazenta im Rahmen des GC-Modells oder fetaler Wachstumsrestriktion beschrieben wurden. Die bereits evaluierten ICG und die entsprechenden Studien in der humanen Plazenta sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Liste der in der humanen Plazenta evaluierten ICG

Symbol	Gename	Studien zur ICG-Validierung	GC-/ fetale Wachstumsstudien
ACTB	Beta-Actin	Cleal, ²² Lanoix, ²⁶ Murthi, ²⁸ Huang, ³⁰ Lacey ³²	Demendi, ⁴³ Schoof, ⁴⁴ Schoof, ⁴⁵ Borzsonyi, ⁹⁷ Ma, ⁹⁸ Zhou, ⁹⁹ Chen, ¹⁰⁰ Akhter, ¹⁰¹ Sun, ¹⁰² Li ¹⁰³
ALAS1	5'-Aminolevulinat-Synthase 1	Fajardy ²⁹	-
ATP5O	ATP-Synthase, F1-Komplex, Subeinheit O	Hulkova ²⁵	-
ATP5B	ATP-Synthase, F1-Komplex, Beta-Polypeptid	Cleal ²²	-
ATP6	ATP-Synthase 6	Hulkova ²⁵	-
B2M	Beta-2-Microglobulin	Meller, ²⁷ Drewlo, ²³ Cleal, ²² Huang, ³⁰ Fa- jardy, ²⁹	Tzschoppe, ¹⁰⁴ Pavek ¹⁰⁵
CYC1	Cytochrom C1	Cleal, ²² Drewlo ²³	-
EIF2S2	Eukaryotischer Translation-Initiationsfaktor 2, Subeinheit 2	Lacey ³²	-
EIF4A2	Eukaryotischer Translation-Initiationsfaktor 4, Subeinheit 2	Cleal ²²	-

3. Ergebnisse

<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Cleal, ²² Drewlo, ²³ Drolet, ²⁴ Lanoix, ²⁶ Meller, ²⁷ Murthi, ²⁸ Huang, ³⁰ Lacey, ³² Patel ³¹	Demendi, ⁴³ Schoof, ⁴⁴ Schoof, ⁴⁵ Ma, ⁴⁶ Lee ⁴⁷
<i>HMBS</i>	Hydroxymethylbilan-Synthase	Meller ²⁷	Schoof ⁴⁴ , Schoof ⁴⁵
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1	Meller, ²⁷ Drewlo, ²³ Lanoix, ²⁶ Drolet, ²⁴ Hulkova ²⁵	Tzschoppe, ¹⁰⁴ Pavek ¹⁰⁵
<i>PPIA</i>	Cyclophilin A	Lanoix, ²⁶ Fajardy ²⁹	Sehringer ⁴⁸
PSMB6	Proteasom, Subeinheit Beta 6	Hulkova ²⁵	-
<i>RNA 18S5</i>	18S ribosomale RNA	Murthi, ²⁸ Lanoix, ²⁶ Cleal, ²² Patel ³¹	Sehringer, ⁴⁸ Torricelli, ⁴⁹ Johnson, ⁵⁰ Chan, ⁵¹ Driver ⁵²
<i>RPL19</i>	Ribosomales Protein L19	Huang ³⁰	Mark ¹⁰⁶
<i>SDHA</i>	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Flavoprotein, Subeinheit A	Meller, ²⁷ Murthi, ²⁸ Drewlo, ²³ Lanoix, ²⁶ Cleal, ²² Hulkova ²⁵	Bassols, ¹⁰⁷ Czikk ¹⁰⁸
SF3A1	Splicing-Faktor 3a, Subeinheit 1	Cleal ²²	-
<i>TBP</i>	Tata-Box-Bindeprotein	Drewlo, ²³ Drolet, ²⁴ Hulkova, ²⁵ Lanoix, ²⁶ Meller, ²⁷ Murthi, ²⁸ Huang ³⁰	Audette, ⁶² Czikk, ¹⁰⁸ Manceau ¹⁰⁹
TOP1	DNA Topoisomerase Typ I	Drewlo, ²³ Lanoix, ²⁶ Cleal ²²	-
UBC	Ubiquitin C	Cleal, ²² Huang ³⁰	-
<i>YWHAZ</i>	14-3-3 Protein Zeta/Delta	Meller, ²⁷ Murthi, ²⁸ Drewlo, ²³ Lanoix, ²⁶ Cleal, ²² Drolet, ²⁴ Huang ³⁰	Czikk ¹⁰⁸

Insgesamt fanden sich *YWHAZ*, *SDHA* und *HPRT1* unter den am häufigsten verwendeten und am stabilsten evaluierten Referenzgenen (Tab. 8). *ACTB*, *RNA18S* und *GAPDH* wurden zwar oft für RT-qPCR-Studien eingesetzt, jedoch wiesen sie in einigen Studien starke Schwankungen in ihrer Expression auf.^{22, 23, 26, 28, 31, 32} Die Analyse der gefundenen ICG nach ihren bisher beschriebenen Fähigkeiten zur Normalisierung und nach ihrem Einsatz in GC-Studien ergab die in Tabelle 8 aufgeführte Reihenfolge. Die im GC-Modell verwendeten ICG sind in den Tabellen 7 und 8 fett und kursiv markiert.

3. Ergebnisse

Tabelle 8: Bewertung der in der humanen Plazenta evaluierten ICG

Gen	Setting	Algorithmus	Probenanzahl	Anzahl der ICG	Ranking der Expressionsstabilität (1=stabilstes bis n=instabilstes ICG)	Autor
1. YWHAZ	Gestationsdiabetes, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie	geNorm	n=20	7 ICG	3	Meller ²⁷
	Fetale Wachstumsrestriktion	geNorm	n=50	6 ICG	3	Murthi ²⁸
	Vergleich klinischer Gruppen	geNorm	n=90	8 ICG	1-3	Drewlo ²³
	Präeklampsie	geNorm	n=22	9 ICG	4	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=22	9 ICG	7	
	Gestationsdiabetes	geNorm	n=16	9 ICG	1-2	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=16	9 ICG	2	
	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 3 Trizol: 4	Cleal ²²
	Schwangerschaftsalter	geNorm	n=35	4 ICG	1-3	Drolet ²⁴
RNA-Degradation und RIN		n=119	7 ICG	RNA-Integrität beeinflusst die Expression	Huang ³⁰	
2. TOP1	Vergleich klinischer Gruppen	geNorm	n=90	8 ICG	1-3	Drewlo ²³
	Präeklampsie	geNorm	n=22	9 ICG	3	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=22	9 ICG	4	
	Gestationsdiabetes	geNorm	n=16	9 ICG	4	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=16	9 ICG	3	
RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 3 Trizol: 1-2	Cleal ²²	
3. SDHA	Gestationsdiabetes, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie	geNorm	n=20	7 ICG	1-2	Meller ²⁷
	Fetale Wachstumsrestriktion	geNorm	n=50	6 ICG	5	Murthi ²⁸
	Vergleich klinischer Gruppen	geNorm	n=90	8 ICG	4-6	Drewlo ²³
	Präeklampsie	geNorm	n=22	9 ICG	6	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=22	9 ICG	5	
	Gestationsdiabetes	geNorm	n=16	9 ICG	7	Lanoix ²⁶
NormFinder		n=16	9 ICG	1		

3. Ergebnisse

	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 11 Trizol: 8	Cleal ²²
	Humane Plazentaprobe	geNorm	n=20	6 ICG	1-2	Hulkova ²⁵
4. HPRT1	Gestationsdiabetes, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie	geNorm	n=20	7 ICG	4	Meller ²⁷
	Vergleich klinischer Gruppen	geNorm	n=90	8 ICG	4-6	Drewlo ²³
	Präeklampsie	geNorm	n=22	9 ICG	1-2	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=22	9 ICG	2	
	Gestationsdiabetes	geNorm	n=16	9 ICG	5	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=16	9 ICG	8	
	Schwangerschaftsalter	geNorm	n=35	4 ICG	1-3	Drolet ²⁴
Humane Plazentaprobe	geNorm	n=20	6 ICG	6	Hulkova ²⁵	
5. CYC1	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 1-2 Trizol: 6	Cleal ²²
	Vergleich klinischer Gruppen	geNorm	n=90	8 ICG	1-3	Drewlo ²³
6. TBP	Vergleich klinischer Gruppen	geNorm	n=90	8 ICG	4-6	Drewlo ²³
	Schwangerschaftsalter	geNorm	n=35	4 ICG	4	Drolet ²⁴
	Humane Plazentaprobe	geNorm	n=20	6 ICG	4	Hulkova ²⁵
	Präeklampsie	geNorm	n=22	9 ICG	7	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=22	9 ICG	8	
	Gestationsdiabetes	geNorm	n=16	9 ICG	8	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=16	9 ICG	9	
	Gestationsdiabetes, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie	geNorm	n=20	7 ICG	1-2	Meller ²⁷
	Fetale Wachstumsrestriktion	geNorm	n=50	6 ICG	6	Murthi ²⁸
RNA-Degradation und RIN		n=119	7 ICG	RNA-Integrität beeinflusst die Expression	Huang ³⁰	
7. GAPDH	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 10 Trizol: 11	Cleal ²²
	Vergleich klinischer Gruppen	geNorm	n=90	8 ICG	7-8	Drewlo ²³
	Schwangerschaftsalter	geNorm	n=35	4 ICG	1-3	Drolet ²⁴

3. Ergebnisse

	Präeklampsie	geNorm	n=22	9 ICG	8	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=22	9 ICG	6	
	Gestationsdiabetes	geNorm	n=16	9 ICG	3	
		NormFinder	n=16	9 ICG	5	
	Gestationsdiabetes, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie	geNorm	n=20	7 ICG	6	Meller ²⁷
	Fetale Wachstumsrestriktion	geNorm	n=50	6 ICG	1-2	Murthi ²⁸
	RNA-Degradation und RIN		n=119	7 ICG	RNA-Integrität beeinflusst die Expression	Huang ³⁰
	Gestationsalter (1. vs. 3. Trimester)	Variation der Ct-Werte	n=64	3 ICG	Gestationsalter beeinflusst die Expression	Lacey ³²
Gestationsalter (1. vs. 3. Trimester)	Variation der Ct-Werte	n=16	2 ICG	Hohe Schwankungen der Ct-Werte über das Schwangerschaftsalter	Patel ³¹	
8. PPIA	Präeklampsie	geNorm	n=22	9 ICG	1-2	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=22	9 ICG	1	
	Gestationsdiabetes	geNorm	n=16	9 ICG	1-2	
		NormFinder	n=16	9 ICG	4	
	Behandlung des Gewebes, RNA-Degradation		n=k.A.	3 ICG	Gewebebehandlung beeinflusst Expression	Fajardy ²⁹
9. ATP50	Humane Plazentaprobe	geNorm	n=20	6 ICG	1-2	Hulkova ²⁵
10. ATP6	Humane Plazentaprobe	geNorm	n=20	6 ICG	3	Hulkova ²⁵
11. UBC	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 1-2 Trizol: 1-2	Cleal ²²
	RNA-Degradation und RIN		n=119	7 ICG	RNA-Integrität beeinflusst die Expression	Huang ³⁰
12. EIF4A2	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 7 Trizol: 3	Cleal ²²
13. RNA 18S5	Fetale Wachstumsrestriktion	geNorm	n=50	6 ICG	1-2	Murthi ²⁸
	Präeklampsie	geNorm	n=22	9 ICG	9	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=22	9 ICG	9	
	Gestationsdiabetes	geNorm	n=16	9 ICG	9	
		NormFinder	n=16	9 ICG	7	
	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Von der geNorm-Analyse ausgeschlossen	Cleal ²²

3. Ergebnisse

	Gestationsalter (1. vs. 3. Trimester)	Variation der Ct-Werte	n=16	2 ICG	Geringe Schwankungen der Ct-Werte über das Schwangerschaftsalter	Patel ³¹
14. B2M	Gestationsdiabetes, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie	geNorm	n=20	7 ICG	7	Meller ²⁷
	Vergleich klinischer Gruppen	geNorm	n=90	8 ICG	7-8	Drewlo ²³
	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 9 Trizol: 10	Cleal ²²
	RNA-Degradation und RIN		n=119	7 ICG	Stabilstes ICG bezüglich RNA-Degradation	Huang ³⁰
	Behandlung des Gewebes, RNA-Degradation		n=k.A.	3 ICG	Stabilstes ICG bezüglich RNA-Degradation	Fajardy ²⁹
15. ACTB	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 8 Trizol: 7	Cleal ²²
	Präeklampsie	geNorm	n=22	9 ICG	5	Lanoix ²⁶
		NormFinder	n=22	9 ICG	3	
	Gestationsdiabetes	geNorm	n=16	9 ICG	6	
		NormFinder	n=16	9 ICG	6	
	Fetale Wachstumsrestriktion	geNorm	n=50	6 ICG	4	Murthi ²⁸
	RNA-Degradation und RIN		n=119	7 ICG	RNA-Integrität beeinflusst die Expression	Huang ³⁰
Gestationsalter (1. vs. 3. Trimester)	Variation der Ct-Werte	n=64	3 ICG	Expression nicht von Schwangerschaftsalter beeinflusst	Lacey ³²	
16. EIF2S2	Gestationsalter (1. vs. 3. Trimester)	Variation der Ct-Werte	n=64	3 ICG	Expression nicht von Schwangerschaftsalter beeinflusst	Lacey ³²
17. HMBS	Gestationsdiabetes, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie	geNorm	n=20	7 ICG	5	Meller ²⁷
18. RPL19	RNA-Degradation und RIN		n=119	7 ICG	RNA-Integrität beeinflusst Expression moderat	Huang ³⁰
19. ATP5B	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 5 Trizol: 5	Cleal ²²
20. SF3A1	RNA-Extraktion (RNeasy Mini Kit vs. Trizol)	geNorm	n=20	11 ICG	Kit: 6 Trizol: 9	Cleal ²²
21. PSMB6	Humane Plazentaprobe	geNorm	n=20	6 ICG	5	Hulkova ²⁵
22. ALAS1	Behandlung des Gewebes, RNA-Degradation		n=k.A.	3 ICG	Gewebebehandlung beeinflusst Expression	Fajardy ²⁹

3.3.2 Ko-Regulationen der internen Kontrollgene untereinander

In einer ersten IPA-Analyse mittels QUIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis (durchgeführt am 09.12.2013) wurden die 15 am besten bewerteten ICG untersucht und auf potenzielle Ko-Regulationen auf Expressions- (E) und Transkriptionsebene (T), sowie auf Protein-Protein- (PP) und Protein-DNA-Interaktionen (PD) überprüft. Dabei ergab sich das in Abbildung 5 dargestellte Ergebnis. Des Weiteren wurde eine IPA-Analyse mit den ICG durchgeführt, die bereits in der humanen Plazenta evaluiert und zudem im GC-Modell oder innerhalb fetaler Wachstumsstudien eingesetzt wurden (durchgeführt am 09.12.2013). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

In Anbetracht beider Analysen wies SDHA die geringste Anzahl an Ko-Regulationen auf, gefolgt von PPIA, YWHAZ und RPL19. SDHA, PPIA und YWHAZ wurden zudem in mehreren Studien als Referenzgene in der humanen Plazenta getestet und als stabil bewertet (Tab. 8). HPRT1, HMBS und B2M zeigten nur geringfügige Ko-Regulationen mit anderen Genen. HPRT1 wurde in der humanen Plazenta ebenfalls als stabil eingestuft. HMBS und B2M erwiesen sich in bisherigen Studien als moderat stabil bis instabil, allerdings wurden sie bereits in GC- oder Wachstumsstudien in der humanen Plazenta verwendet. Ein hohes Ko-Regulationspotenzial wiesen GAPDH, ACTB, TBP, TOP1 und UBC auf. EIF4A2, EIF2S2, CYC1, M-ATP6 und ATP50 zeigten zwar nur geringfügige Ko-Regulationen, allerdings wurden sie bisher noch nicht im Rahmen fetaler Wachstums- oder GC-Studien in der humanen Plazenta verwendet.

Für die PCR-Studie wurden folgende sieben ICG ausgewählt: B2M, HMBS, HPRT1, PPIA, RPL19, SDHA, YWHAZ. Im Mai 2015 wurde eine erneute IPA-Analyse mit diesen sieben ICG durchgeführt (Abb. 7), um neue Effekte auf Expressions- und Transkriptionsebene in der Beurteilung der ICG zu berücksichtigen. Es zeigten sich inzwischen mehr direkte und indirekte Interaktionen der Gene untereinander im Vergleich zu der initialen Analyse vom Dezember 2013. RPL19 wies über MYCN eine direkte Regulation mit B2M auf,¹¹⁰ sowie eine direkte Regulation mit PPIA über MYC.¹¹¹ Des Weiteren wurden direkte Interaktionen zwischen B2M und SDHA über HTT,¹¹²⁻¹¹⁴ zwischen HMBS und HPRT1 über NFEL2,^{115, 116} zwischen YWHAZ und PPIA über TERT^{117, 118} und zwischen B2M und YWHAZ über NR3C1¹¹⁹ gefunden. Zudem wurde ein Einfluss durch das Glukokortikoid DEX auf B2M entdeckt.¹²⁰ Es fanden sich keine direkten Ko-Regulationen zwischen PPIA, HMBS und SDHA, sowie zwischen RPL19, HMBS und SDHA.

3. Ergebnisse

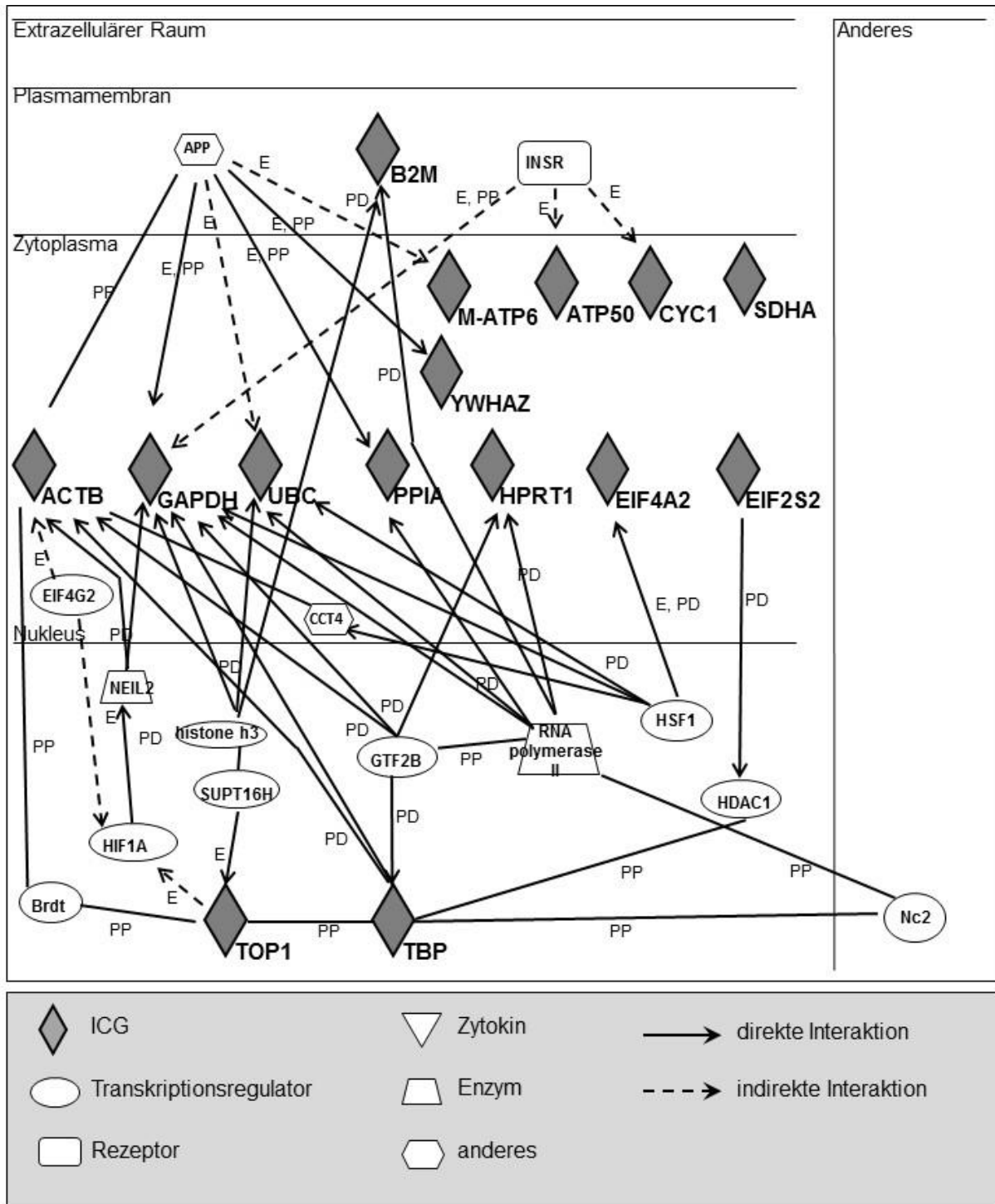


Abbildung 5: Ko-Regulationen der 15 am besten bewerteten ICG
(Dez. 2013)

3. Ergebnisse

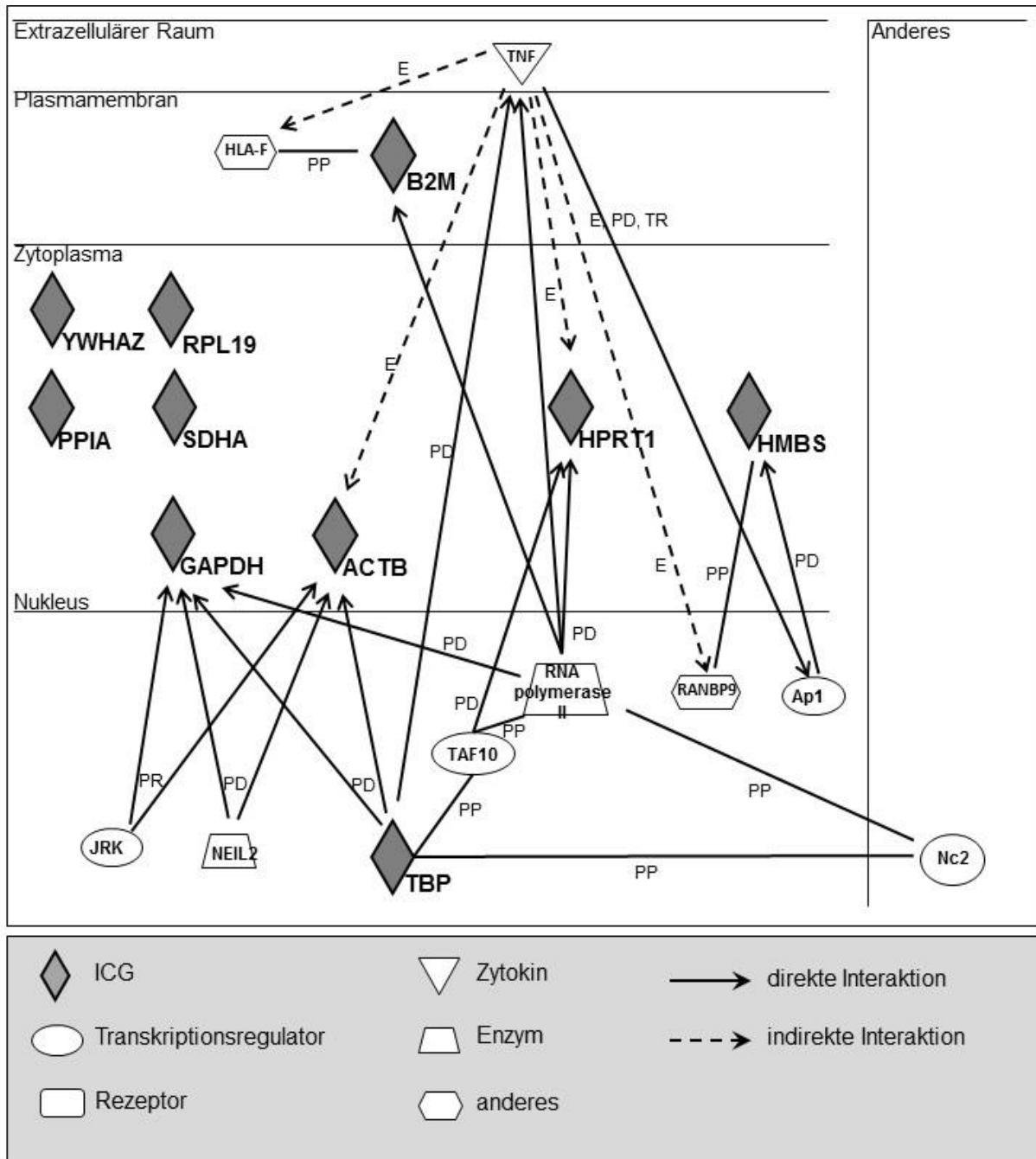


Abbildung 6: Ko-Regulationen der in GC-Studien in der humanen Plazenta verwendeten ICG (Dez. 2013)

3. Ergebnisse

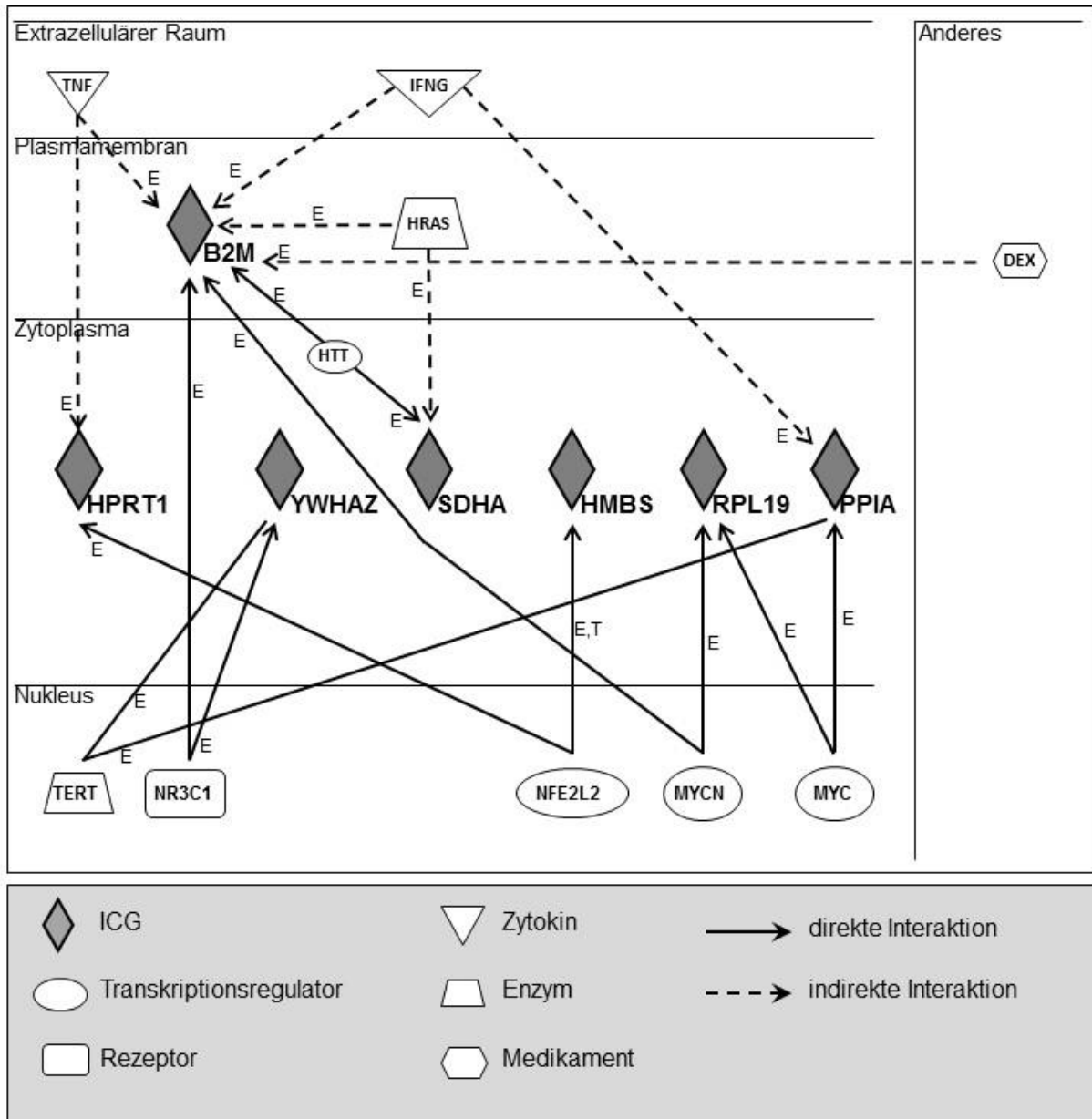


Abbildung 7: Ko-Regulationen der sieben getesteten ICG
(Mai 2015)

Zu den Abbildungen 5 bis 7: Die Analyse auf potenzielle Ko-Regulationen zwischen 15 ICG wurde mit der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) durchgeführt.

Interaktionstypen: E = Expression, PD = Protein-DNA-Interaktion, PP = Protein-Protein-Interaktion, TR = Transkription.

ICG: *ACTB* (Beta-Actin), *ATP5O* (ATP-Synthase, F1-Komplex, Subeinheit O), *B2M* (Beta-2-Microglobulin), *CYC1* (Cytochrom C1), *EIF2S2* (Eukaryotischer Translation-Initiationsfaktor 2, Subeinheit 2), *EIF4A2* (Eukaryotischer Translation-Initiationsfaktor 4, Subeinheit 2), *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), *HMBS* (Hydroxymethylbilan-Synthase), *HPRT1* (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1), *M-ATP6* (ATP-Synthase 6), *PPIA* (Cyclophilin A), *RPL19* (Ribosomales Protein L19), *SDHA* (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Flavoprotein, Subeinheit A), *TBP* (Tata-Box-Bindeprotein), *TOP1* (DNA Topoisomerase Typ I), *UBC* (Ubiquitin C), *YWHAZ* (14-3-3 Protein Zeta/Delta).

Potenzielle Ko-Regulatoren: *Ap1* (Aktivatorprotein 1), *APP* (Amyloid-Vorläufer-Protein), *Brd1* (Testespezifisches Protein der Bromodomäne), *CCT4* (Chaperonin-enthaltendes T-Komplex-Polypeptid-1, Delta-Untereinheit), *DEX* (Dexamethason), *EIF4G2* (Eukaryotischer Translation-Initiationsfaktor 4, Gamma 2), *GTF2B* (Transkriptionsfaktor IIB), *HDAC1* (Histon-Deacetylase 1), *HIF1A* (Hypoxie-induzierter Faktor 1, Alpha-Untereinheit), *histone h3* (Histon h3), *HLA-F* (Haupthistokompatibilitätskomplex, Klasse I, F), *HRAS* (Harvey-Ratten-Sarkom-Virusonkogen), *HSF1* (Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1), *HTT* (Huntingtin), *IFNG* (Interferon-gamma), *INSR* (Insulinrezeptor), *JRK* (Jrk helix-turn-helix Protein), *MYC* (virales Myelocytomatose-Onkogen), *MYCN* (virales Myelocytomatose-Onkogen, Neuroblastom-abgeleitetes Homolog), *Nc2* (Negativer Kofaktor 2), *NEIL2* (Nei-ähnliche DNA-Glycosylase 2), *NFE2L2* (NFE-ähnlicher Faktor 2), *NR3C1* (Glukokortikoidrezeptor alpha), *RANBP9* (RAN-bindendes Protein 9), *RNA polymerase II* (RNA-Polymerase II), *SUPT16H* (Chromatin-spezifischer Transkription-Elongationsfaktor, 140 kDa Untereinheit), *TAF10* (Tata-Box-Bindeprotein-assoziierter-Faktor 10), *TERT* (Telomerase-Reverse Transkriptase), *TNF* (Tumornekrosefaktor).

Abbildung 7 nach Gütling et al.¹²¹

3.3.3 Ergebnisse der Primeretablierung

Eine Übersicht der verwendeten Primerpaare ist in Tabelle 9 dargestellt. Die PCR-Produkte aller Primer zeigten in der Gelelektrophorese die erwartete Produktgröße des amplifizierten Genabschnitts und keine Banden in den Negativkontrollen. In der RT-qPCR zeigten die Schmelzkurven eindeutige „single“ Peaks für die jeweiligen Produkte, welche im Anschluss sequenziert wurden. Die Negativkontrollen waren nicht detektierbar. Die Effizienzen aller Primersequenzen lagen zwischen 92,1% und 102,5%. Die Sequenzen der PCR-Produkte entsprachen jeweils den amplifizierten Genabschnitten der FASTA-Sequenzen.

3. Ergebnisse

Tabelle 9: Primerübersicht für die potenziellen Referenzgene, das Zielgen und ribosomale RNA in der humanen Plazenta

Gen Abkürzung	Primersequenzen (5' → 3')	Produktgröße	Effizienz*	Annealing-Temperatur	Zugangsnummer	Funktion und Referenz
<i>B2M</i>	F: GGC TAT CCA GCG TAC TCC AAA R: CGG CAG GCA TAC TCA TCT TTT T	246 bp	97,2%	57,1°C	NM_004048.2	Beta-Kette von Klasse-I-Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), <i>Drewlo</i> ²³
<i>HMBS</i>	F: GCC AGC TTG CTC GCA TAC AGA R: CCA GGT CCA CTT CAT TCT TCT CCA G	195 bp	98,8%	61,8°C	NM_000190.3	Enzym der Häm-Biosynthese**
<i>HPRT1</i>	F: AGC CCT GGC GTC GTG ATT AGT R: ACA GGA CTG AAC GTC TTG CTC G	140 bp	95,2%	63,4°C	NM_000194.2	Nukleosid-, Nukleotid- und Nukleinsäuremetabolismus**
<i>PPIA</i>	F: GTC AAC CCC ACC GTG TTC TTC R: TTT CTG CTG TCT TTG GGA CCT TG	100 bp	94,7%	58,8°C	NM_021130.3	Proteinstoffwechsel und -modifizierung, <i>Piechota-Polanczyk</i> ¹²²
<i>RPL19</i>	F: GAG TAT GCT CAG GCT TCA GAA GAG G R: GGA ATG GAC CGT CAC AGG CTT G	175 bp	98,7 %	61,7°C	NM_000981.3	Proteinstoffwechsel und -modifizierung**
<i>SDHA</i>	F: TAC AAG GTG CGG ATT GAT G R: CGA TCA CGG GTC TAT ATT CAA	148 bp	102,5 %	52,0°C	NM_004168.2	Komplex der mitochondrialen Atmungskette, <i>Lanoix</i> ²⁶
<i>YWHAZ</i>	F: GCA ACC AAC ACA TCC TAT CAG ACT G R: GGT ATC CGA TGT CCA CAA TGT CAA G	217 bp	97,1%	60,1°C	NM_003406.3	Vermittlung der Signaltransduktion **
<i>NR3C1</i>	F: AAA CCT TAC TGC TTC TCT CTT CA R: GTT AAG GAG ATT TTC AAC CAC TTC	203 bp	98,2 %	53,4°C	NM_000176.2	Glukokortikoidrezeptor, <i>Pavek</i> ¹⁰⁵
<i>RNA28S</i>	F: GCA AAA GCT CGC TTG ATC TTG A R: CAC AAG CCA GTT ATC CCT GTG G	131 bp	92,1%	60,0°C	NR_003287.2	Ribosomale RNA, bildet den größten Anteil von eukaryotischen zytoplasmatischen Ribosomen und damit eine der Hauptkomponenten aller eukaryotischen Zellen, <i>Schmittgen</i> ¹⁵
<i>RNA18S</i>	F: GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT R: CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG	151 bp	100,2%	57,0°C	NR_003286.2	Ribosomale RNA, involviert in die korrekte Positionierung von mRNA und tRNA, <i>Vazquez-Blomquist</i> ¹²³

Bei allen Amplifikationen wurde das folgende PCR-Protokoll verwendet: initiale Denaturierung für 10min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen à 95°C für 20sec, entsprechend der Annealing-Temperatur des Primerpaares 53,4-63,4°C für 32sec, und 72°C für 60sec. Jeder PCR-Lauf wurde von einer Schmelzkurvenanalyse gefolgt (ein Zyklus bei 95°C für 15sec, 60°C für 60sec, 95°C für 15sec und 60°C für 15sec). *PCR-Effizienzen wurden mit der folgenden Formel berechnet: $(10^{-1/\text{Steigung}-1}) \times 100\%$; ** erstellt mit der Software Primer Premier 6

Tabelle nach Gütling et al.¹²¹

3.4 Expressionsanalysen der internen Kontrollgene

3.4.1 „Klassische“ Analyse

Normalverteilung. Die Analyse der Expressionswerte (relative Quantität) ergab lediglich für RPL19 ($p=0,056$) eine Normalverteilung mit $p>0,05$ im Kolmogorov-Smirnov-Test. Bei B2M ($p=0,002$, $p_{\log}>0,200$), HMBS ($p=0,039$, $p_{\log}=0,110$), SDHA ($p=0,001$, $p_{\log}>0,200$) und YWHAZ ($p=0,000$, $p_{\log}>0,200$) konnte durch Logarithmierung eine Normalverteilung erreicht werden. Die Daten von HPRT1 ($p=0,037$, $p_{\log}=0,017$) und PPIA ($p=0,000$, $p_{\log}=0,037$) blieben auch nach Logarithmierung nicht normalverteilt. Bei Trennung des Datensatzes bezüglich der Lokalisation der entnommenen Proben in zentral und peripher wiesen alle ICG eine Normalverteilung auf.

Lokalisationseffekt. Bei keinem ICG fanden sich signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den zentralen und den peripheren Plazentaprobe (Tab. 10). Da aus jeder Plazenta eine zentrale und eine periphere Probe stammt und angenommen werden kann, dass Proben der gleichen Plazenta einander mehr ähneln als Proben aus unterschiedlichen Plazenten, wurden für die weiteren Analysen die zentralen und peripheren Expressionswerte getrennt voneinander betrachtet. Somit wurden systematische Abhängigkeiten zwischen den Proben ausgeschlossen, welche die Standardfehler verzerrt hätten.

Tabelle 10: Unterschiede in der ICG-Expression nach plazentarer Lokalisation

ICG	Zentrale Proben		Periphere Proben		p-Wert (t-Test)
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD.	
B2M	0,238	0,127	0,261	0,160	0,444
HMBS	0,259	0,156	0,252	0,149	0,814
HPRT1	0,415	0,180	0,401	0,176	0,708
PPIA	0,335	0,169	0,355	0,169	0,559
RPL19	0,325	0,189	0,379	0,234	0,216
SDHA	0,323	0,180	0,351	0,215	0,496
YWHAZ	0,293	0,212	0,304	0,217	0,825

Effekte durch Gestationsalter, Geschlecht und BET-Behandlung. Hinsichtlich möglicher Effekte auf die ICG-Expression durch das Geschlecht, das Schwangerschaftsalter bei Geburt oder die BET-Behandlung ergaben sich lediglich für die zentralen Proben signifikante Unterschiede (Abb. 8). So zeigten HPRT1 und PPIA signifikant höhere Expressionswerte unter den Frühgeborenen (<37+0 SSW) verglichen mit den Reifgeborenen ($\geq 37+0$ SSW) (HPRT1: Relative Quantität $Q_{<37+0 \text{ SSW}} = 0,467 \pm 0,190$ vs. $Q_{\geq 37+0 \text{ SSW}} = 0,354 \pm 0,150$, $p=0,016$; PPIA: $Q_{<37+0 \text{ SSW}} = 0,386 \pm 0,172$ vs. $Q_{\geq 37+0 \text{ SSW}} = 0,275 \pm 0,145$, $p=0,033$). Zudem konnte für HPRT1 ein signifikanter geschlechtsabhängiger Effekt mit höheren Expressionswerten für die Plazenten weiblicher Neugeborener nachgewiesen werden ($Q_{\text{weiblich}} = 0,461 \pm 0,205$ vs. $Q_{\text{männlich}} = 0,369 \pm 0,140$, $p=0,024$).

Innerhalb der Plazenten weiblicher Reifgeborener zeigte sich durch die BET-Behandlung eine signifikante Hochregulation der Genexpression für B2M, HMBS, HPRT1 und PPIA (B2M: $Q_{\text{BET}} = 0,315 \pm 0,091$ vs. $Q_{\text{Kontrolle}} = 0,164 \pm 0,134$, $p=0,042$; HMBS: $Q_{\text{BET}} = 0,377 \pm 0,261$ vs. $Q_{\text{Kontrolle}} = 0,144 \pm 0,101$, $p=0,048$; HPRT1: $Q_{\text{BET}} = 0,468 \pm 0,087$ vs. $Q_{\text{Kontrolle}} = 0,292 \pm 0,165$, $p=0,039$; PPIA: $Q_{\text{BET}} = 0,390 \pm 0,156$ vs. $Q_{\text{Kontrolle}} = 0,204 \pm 0,125$, $p=0,044$). Außerdem fanden sich Behandlungseffekte für RPL19 innerhalb der weiblichen Frühgeborenen ($Q_{\text{BET}} = 0,440 \pm 0,111$ vs. $Q_{\text{Kontrolle}} = 0,300 \pm 0,711$, $p=0,024$) und für HPRT1 innerhalb der männlichen Frühgeborenen ($Q_{\text{BET}} = 0,302 \pm 0,101$ vs. $Q_{\text{Kontrolle}} = 0,475 \pm 0,119$, $p=0,044$), sowie ein geschlechtsabhängiger Effekt für RPL19 und HPRT1 innerhalb der behandelten Frühgeborenen (RPL19: $Q_{\text{weiblich}} = 0,440 \pm 0,111$ vs. $Q_{\text{männlich}} = 0,235 \pm 0,141$, $p=0,018$; HPRT1: $Q_{\text{weiblich}} = 0,534 \pm 0,231$ vs. $Q_{\text{männlich}} = 0,302 \pm 0,101$, $p=0,008$). Keine Regulationen fanden sich für SDHA und YWHAZ. HPRT1 erwies sich als das am stärksten regulierte ICG.

Innerhalb der peripheren Proben fand sich für kein Gen ein signifikanter Gruppeneffekt. Die Ergebnisse der Berechnungen sind den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

3. Ergebnisse

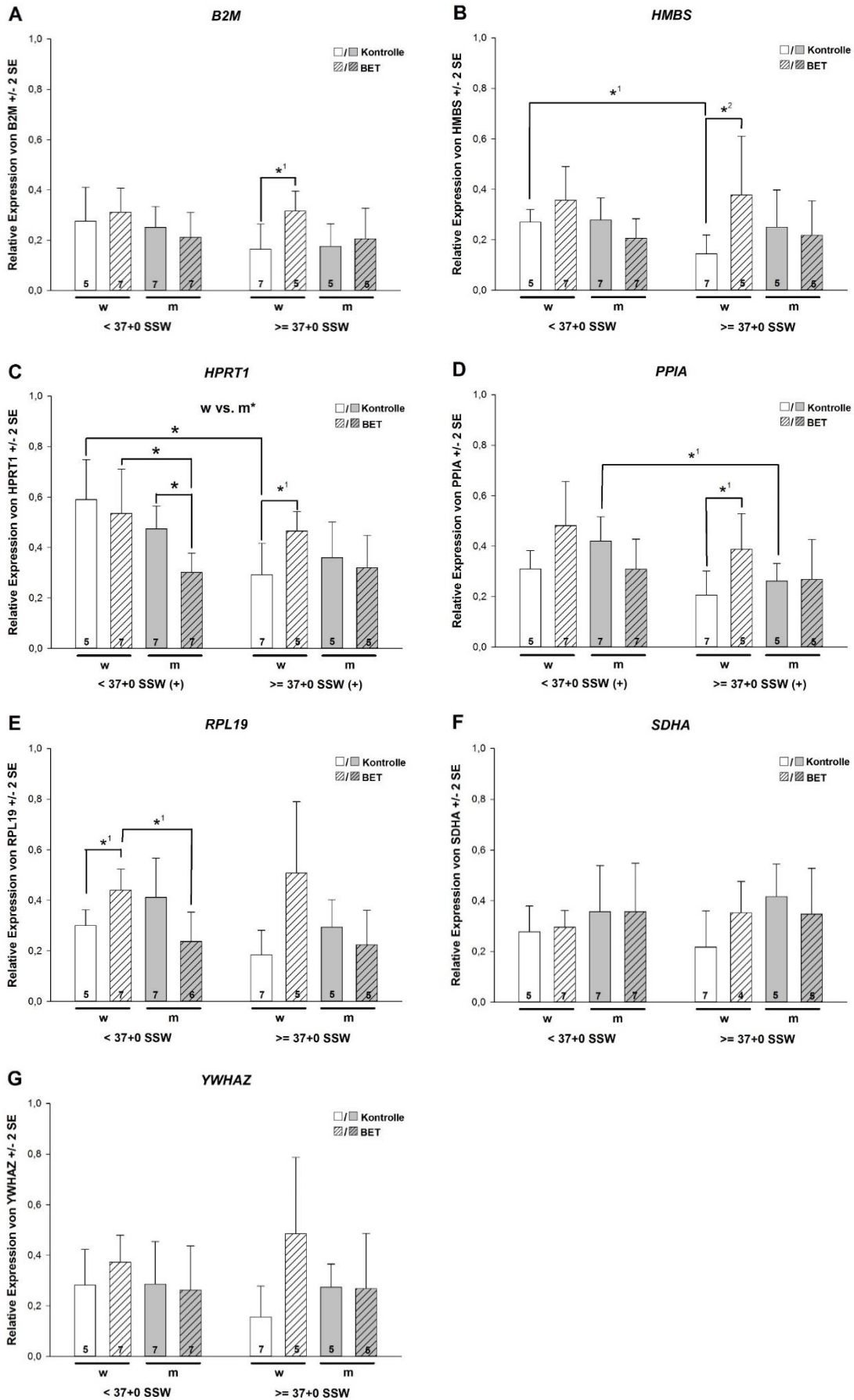


Abbildung 8: „Klassische“ Analyse der Expressionswerte der ICG in zentralen Proben

3. Ergebnisse

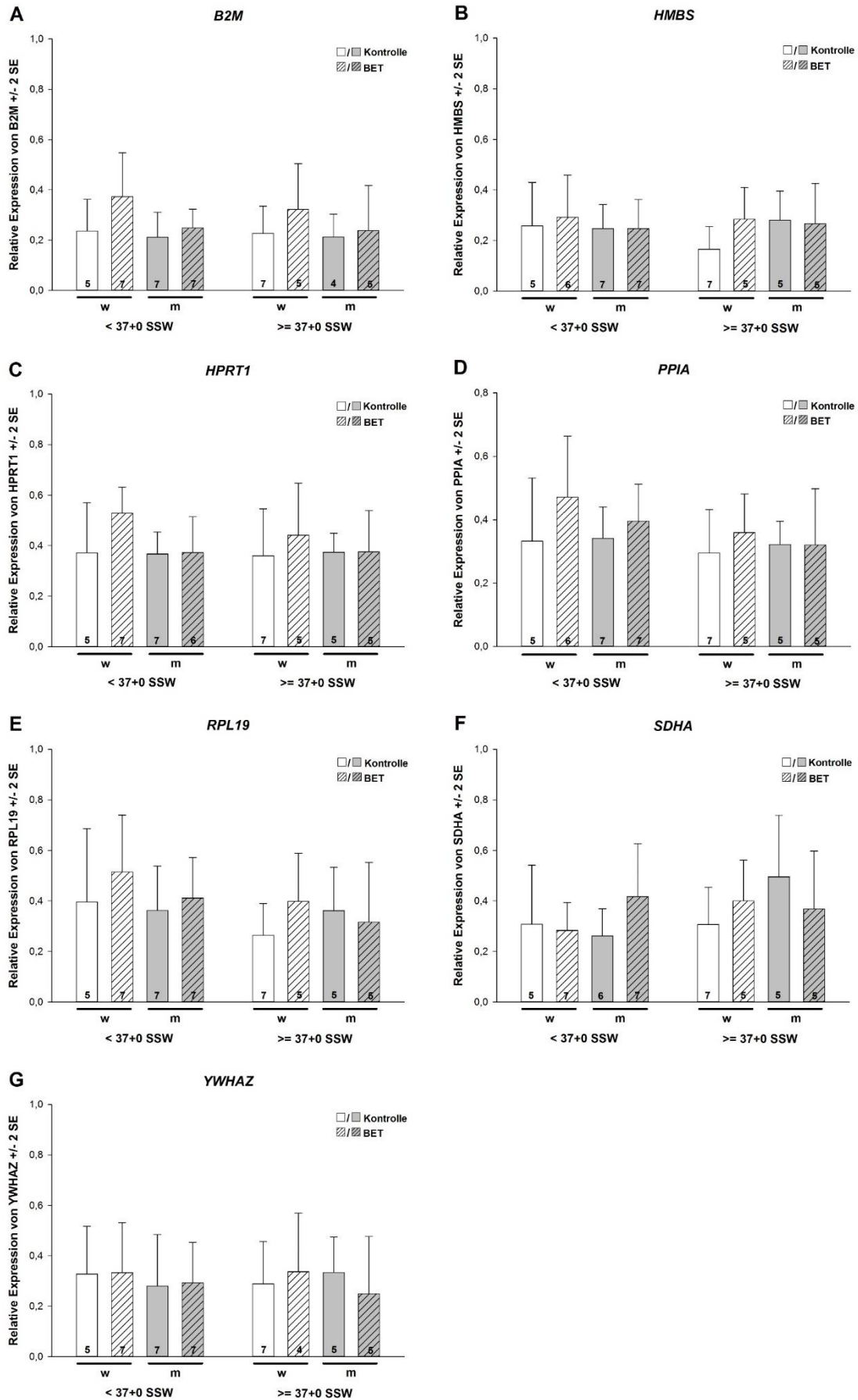


Abbildung 9: „Klassische“ Analyse der Expressionswerte der ICG in peripheren Proben

Zu den Abbildungen 8 und 9: Die RT-qPCR-Rohdaten der sieben getesteten ICG wurden entsprechend ihrer Lokalisation aufgeteilt und mittels MANOVA mit den Hauptfaktoren Schwangerschaftsalter bei Geburt, Geschlecht und BET-Behandlung analysiert. Bei signifikanten Effekten mit $p < 0,05$ wurde ein paarweiser Vergleich mittels Holm's-Sidak-Test angeschlossen. * = signifikante Effekte für die Faktoren Geschlecht und BET-Behandlung; (+) = signifikante Effekte für den Faktor Schwangerschaftsalter; ¹ = signifikante Effekte im t-Test; ² = signifikante Effekte im Mann-Whitney-U-Test. Relative Expression = Effizienz ^{Δ Ct} mit Δ Ct = Ct_{min} - Ct_{Probe}. Die Balken geben den Mittelwert \pm 2-fachen Standardfehler (SE) an. Die Probenanzahl n ist am Fuß der Balken angegeben.

Abbildung 8 nach Gütling et al.¹²¹

3.4.2 Analyse mit Algorithmen

geNorm. Die geNorm-Analyse der sieben ICG wurde zunächst mit allen Proben durchgeführt und anschließend mit dem nach plazentarer Lokalisation getrennten Datensatz wiederholt. Dabei lieferten die Analyse aller Proben (n=96) und die Analyse der peripheren Proben (n=48) die gleichen Ergebnisse bezüglich der Reihenfolge der ICG, sortiert nach deren Stabilitätswert M (Abb. 10, Tab. 12). Die stabilsten drei ICG waren PPIA und RPL19, gefolgt von HMBS. Verglichen mit den zentralen Proben (n=48) ergab sich lediglich eine Abweichung unter den ersten drei ICG. Hier stellten HMBS und RPL19 die beiden stabilsten ICG dar. PPIA präsentierte sich auf Rang drei. In allen drei Analysen zeigte sich HPRT1 als das instabilste ICG. Zur Ermittlung der optimalen Anzahl der ICG wurde die paarweise Variation $V_{n/n+1}$ berechnet und entsprechend den Empfehlungen von Vandesompele et al. $V \leq 0,15$ als Grenzwert festgelegt.¹⁰ Bei der Betrachtung aller Proben ($V_{3/4}=0,146$), sowie der zentralen Proben ($V_{3/4}=0,137$) stellte sich eine Normalisierung mit drei ICG als geeignet dar. Für die peripheren Proben ($V_{4/5}=0,123$) ergab sich eine Normalisierung mit vier ICG (Abb. 10).

Da die im Mai 2015 durchgeführte IPA-Analyse (Abb. 7) eine potenzielle Ko-Regulation zwischen PPIA und RPL19 aufzeigte, wurde die geNorm-Analyse einmal ohne PPIA und einmal ohne RPL19 wiederholt. Weder der Ausschluss von PPIA, noch der von RPL19 führte zu einer Veränderung der Reihenfolge der übrigen ICG (Tab. 11).

NormFinder. Größere Unterschiede bezüglich der Lokalisation ergaben sich beim Vergleich der NormFinder-Analyse zwischen den zentralen und peripheren Proben (Abb. 11, Tab. 12). Unter den zentralen Proben war RPL19 mit Abstand das instabilste Gen verglichen mit den übrigen ICG. Dahingegen stellte es sich innerhalb der peripheren Proben deutlich als das stabilste Gen heraus. Bei Betrachtung des gesamten Probenkollektivs

nahm es auf Platz drei eine mittlere Stellung ein. In allen drei Berechnungen rangierten HMBS und PPIA unter den stabilsten drei ICG. Unter den instabilsten drei ICG befanden sich HPRT1 und YWHAZ.

BestKeeper. Bezogen auf die SD der einzelnen ICG und der sich daraus ergebenden Sortierung der ICG lieferten die BestKeeper-Analysen mit dem gesamten Probenkollektiv, mit den zentralen Proben, sowie mit den peripheren Proben ähnliche Ergebnisse (Abb. 12 A-C, Tab.12). B2M und HMBS stellten sich hier als die stabilsten Gene mit den geringsten SD heraus. YWHAZ, RPL19 und SDHA wiesen dagegen die höchsten SD und damit die größten Schwankungen auf. Auch beim Vergleich der ICG-Reihenfolge, die sich aus der Korrelationsanalyse mit dem BestKeeper-Index ergab, zeigten sich ähnliche Ergebnisse für alle drei Analysen (Abb. 12 D-F, Tab. 12). Hier waren die stabilsten drei ICG für das gesamte Probenkollektiv und die peripheren Proben RPL19, HMBS und PPIA, und für die zentralen Proben RPL19, YWHAZ und HMBS. HPRT1, B2M und SDHA wurden in allen drei Analysen (gesamt, zentral und peripher) als instabil bewertet. Auffallend ist, dass B2M, bewertet durch den BestKeeper-Index unter den beiden instabilsten ICG zu finden war, wohingegen es bezogen auf die SD das stabilste ICG zu sein schien. Andersherum verhielt es sich mit RPL19, sowie allein für die zentralen Proben mit YWHAZ. Trotz hoher SD präsentierten sie sich in der Analyse des BestKeeper-Index als die stabilsten ICG.

3. Ergebnisse

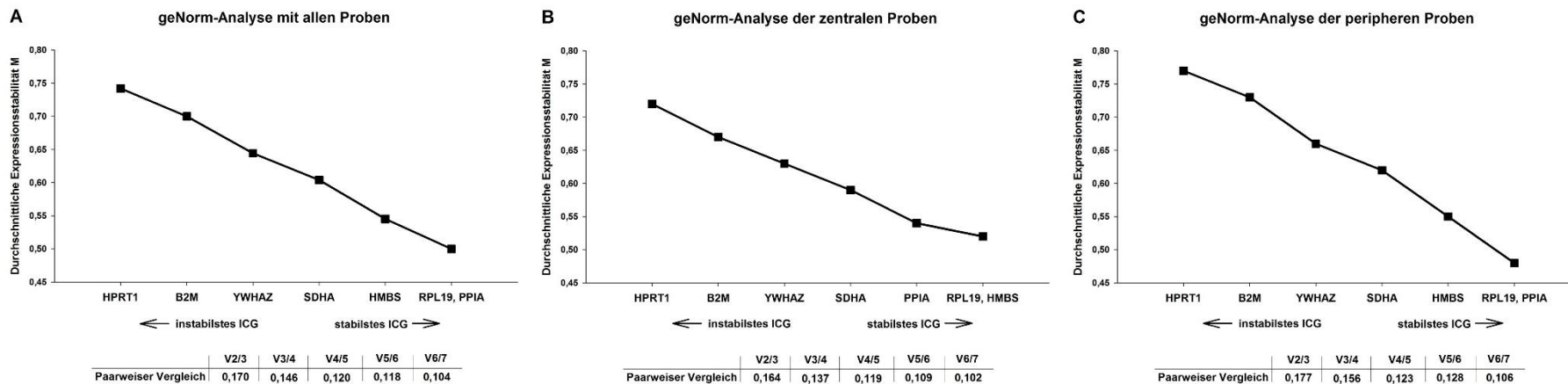


Abbildung 10: geNorm-Analyse der sieben ausgewählten ICG

Durchschnittliche Expressionsstabilität M der verbleibenden ICG nach schrittweisem Ausschluss des jeweils instabilsten ICG, berechnet mithilfe der geNorm-Software. Der paarweise Vergleich V zeigt die zusätzliche Reliabilität des Normalisierungsfaktors an, der durch das Hinzufügen eines weiteren ICG entsteht.

Abbildung 10A nach Gütling et al.¹²¹

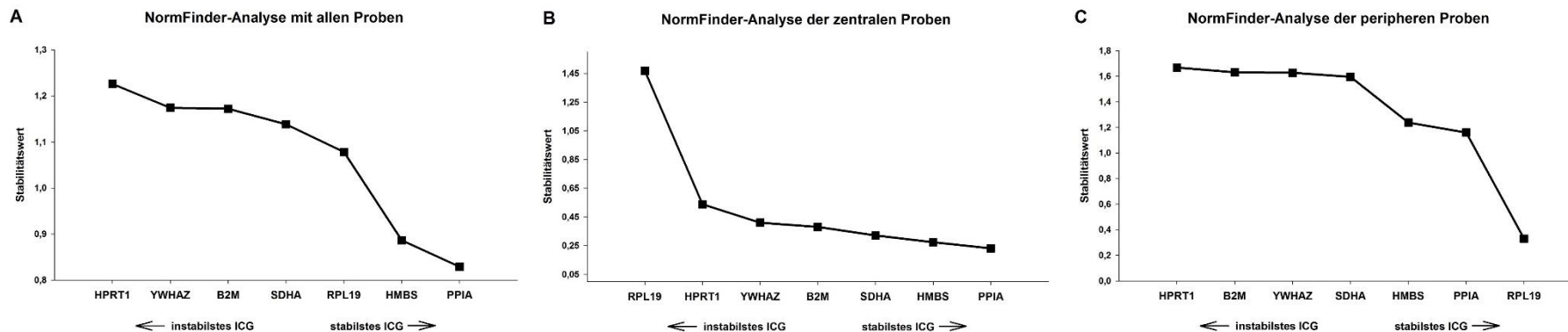


Abbildung 11: NormFinder-Analyse der sieben ICG

Stabilitätswert der ICG, berechnet mithilfe der NormFinder-Software.

3. Ergebnisse

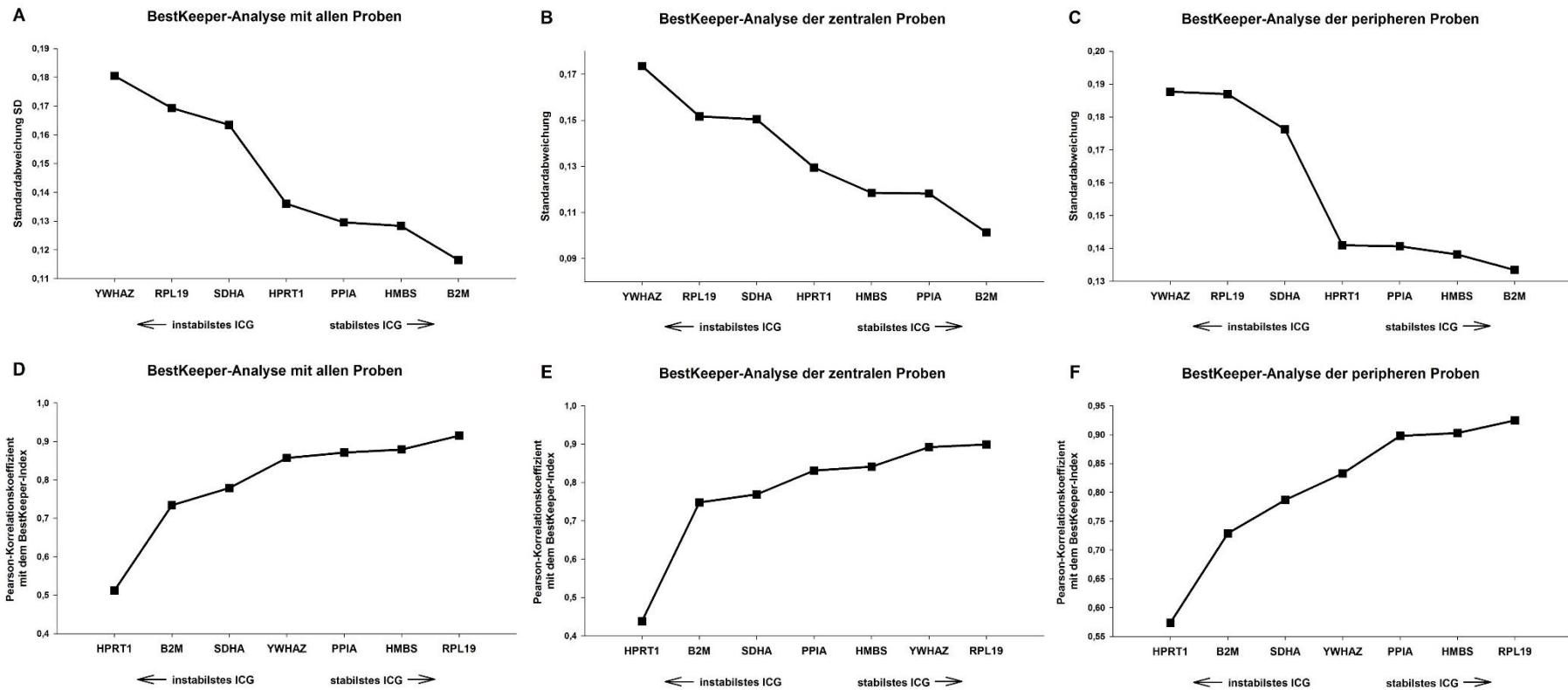


Abbildung 12: BestKeeper-Analyse der sieben ICG

A-C: Standardabweichungen der einzelnen ICG, berechnet mithilfe der BestKeeper-Software. Eine geringe SD spricht für eine hohe Expressionsstabilität des ICG. D-F: Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen jedem ICG und dem BestKeeper-Index. Eine hohe Korrelation zeigt eine hohe Expressionsstabilität des ICG an.

3. Ergebnisse

Tabelle 11: Vergleich des geNorm-Rankings mit sechs ICG nach Ausschluss von PPIA oder RPL19

A: geNorm-Analyse mit sechs ICG (ohne PPIA, alle Proben)						
Gen	<i>RPL19</i>	<i>HMBS</i>	<i>SDHA</i>	<i>YWHAZ</i>	<i>B2M</i>	<i>HPRT1</i>
M-Wert	0,57	0,57	0,63	0,65	0,73	0,78
Rang	1	2	3	4	5	6
B: geNorm-Analyse mit sechs ICG (ohne RPL19, alle Proben)						
Gen	<i>PPIA</i>	<i>HMBS</i>	<i>SDHA</i>	<i>YWHAZ</i>	<i>B2M</i>	<i>HPRT1</i>
M-Wert	0,57	0,57	0,63	0,68	0,73	0,77
Rang	1	2	3	4	5	6

Ranking von sechs ICG anhand der durchschnittlichen Expressionsstabilität M. Der M-Wert der verbleibenden ICG wurde nach schrittweisem Ausschluss des jeweils instabilsten ICG mithilfe der geNorm-Software berechnet.

Software-übergreifendes Ranking. Die ICG wurden entsprechend ihren Platzierungen aus geNorm, NormFinder und BestKeeper einander gegenübergestellt und aus den Mittelwerten ihrer Platzierungen ein Software-übergreifendes Ranking erstellt (Tab. 12). Das Ranking wurde einerseits mit dem gesamten Probenkollektiv (n=96), und andererseits mit den Proben durchgeführt, die entweder nur aus der zentralen (n=48) oder nur aus der peripheren (n=48) Plazentalokalisation entnommen wurden. In allen drei Analysen stellten HMBS, PPIA, RPL19 und SDHA die stabilsten ICG und B2M, YWHAZ und HPRT1 die instabilsten ICG dar. Das Ranking der gesamten Proben und das der zentralen Proben lieferten die gleichen Ergebnisse. Lediglich das Ranking der peripheren Proben ergab Abweichungen innerhalb der ersten vier Platzierungen.

Tabelle 12: Vergleich der Expressionsstabilität der sieben Referenzgene in der humanen Plazenta, berechnet mit geNorm, NormFinder und BestKeeper

A: Gesamtes Probenkollektiv								
Rang	geNorm		NormFinder		BestKeeper		BestKeeper	
	Gen	Stabilität	Gen	Stabilität	Gen	Stabilität ^a	Gen	Stabilität ^b
1	<i>PPIA</i>	0,50	<i>PPIA</i>	0,829	<i>B2M</i>	0,116	<i>RPL19</i>	0,915
2	<i>RPL19</i>	0,50	<i>HMBS</i>	0,886	<i>HMBS</i>	0,128	<i>HMBS</i>	0,879
3	<i>HMBS</i>	0,55	<i>rPL19</i>	1,078	<i>PPIA</i>	0,130	<i>PPIA</i>	0,871
4	<i>SDHA</i>	0,60	<i>SDHA</i>	1,138	<i>HPRT1</i>	0,136	<i>YWHAZ</i>	0,857
5	<i>YWHAZ</i>	0,64	<i>B2M</i>	1,172	<i>SDHA</i>	0,164	<i>SDHA</i>	0,779
6	<i>B2M</i>	0,70	<i>YWHAZ</i>	1,174	<i>RPL19</i>	0,169	<i>B2M</i>	0,734
7	<i>HPRT1</i>	0,74	<i>HPRT1</i>	1,226	<i>YWHAZ</i>	0,181	<i>HPRT1</i>	0,512
Software-übergreifendes Ranking^c: (1) HMBS – (2) PPIA – (3) RPL19 – (4) SDHA – (5) B2M – (6) YWHAZ – (7) HPRT1								

3. Ergebnisse

B: Zentrale Proben								
Rang	geNorm		NormFinder		BestKeeper		BestKeeper	
	Gen	Stabilität	Gen	Stabilität	Gen	Stabilität ^a	Gen	Stabilität ^b
1	<i>RPL19</i>	0,52	<i>PPIA</i>	0,231	<i>B2M</i>	0,101	<i>RPL19</i>	0,899
2	<i>HMBS</i>	0,52	<i>HMBS</i>	0,274	<i>PPIA</i>	0,118	<i>YWHAZ</i>	0,892
3	<i>PPIA</i>	0,54	<i>SDHA</i>	0,322	<i>HMBS</i>	0,119	<i>HMBS</i>	0,841
4	<i>SDHA</i>	0,59	<i>B2M</i>	0,380	<i>HPRT1</i>	0,129	<i>PPIA</i>	0,831
5	<i>YWHAZ</i>	0,63	<i>YWHAZ</i>	0,410	<i>SDHA</i>	0,150	<i>SDHA</i>	0,769
6	<i>B2M</i>	0,67	<i>HPRT1</i>	0,538	<i>RPL19</i>	0,152	<i>B2M</i>	0,748
7	<i>HPRT1</i>	0,72	<i>RPL19</i>	1,467	<i>YWHAZ</i>	0,174	<i>HPRT1</i>	0,438
Software-übergreifendes Ranking ^c : (1) <i>HMBS</i> – (2) <i>PPIA</i> – (3) <i>RPL19</i> – (4) <i>SDHA</i> – (5) <i>B2M</i> – (6) <i>YWHAZ</i> – (7) <i>HPRT1</i>								
C: Periphere Proben								
Rang	geNorm		NormFinder		BestKeeper		BestKeeper	
	Gen	Stabilität	Gen	Stabilität	Gen	Stabilität ^a	Gen	Stabilität ^b
1	<i>PPIA</i>	0,48	<i>RPL19</i>	0,330	<i>B2M</i>	0,133	<i>RPL19</i>	0,925
2	<i>RPL19</i>	0,48	<i>PPIA</i>	1,160	<i>HMBS</i>	0,138	<i>HMBS</i>	0,903
3	<i>HMBS</i>	0,55	<i>HMBS</i>	1,238	<i>PPIA</i>	0,141	<i>PPIA</i>	0,898
4	<i>SDHA</i>	0,62	<i>SDHA</i>	1,595	<i>HPRT1</i>	0,141	<i>YWHAZ</i>	0,833
5	<i>YWHAZ</i>	0,66	<i>YWHAZ</i>	1,627	<i>SDHA</i>	0,176	<i>SDHA</i>	0,787
6	<i>B2M</i>	0,73	<i>B2M</i>	1,631	<i>RPL19</i>	0,187	<i>B2M</i>	0,729
7	<i>HPRT1</i>	0,77	<i>HPRT1</i>	1,667	<i>YWHAZ</i>	0,188	<i>HPRT1</i>	0,574
Software-übergreifendes Ranking ^c : (1) <i>PPIA</i> – (2) <i>RPL19</i> – (3) <i>HMBS</i> – (4) <i>SDHA</i> – (5) <i>B2M</i> – (6) <i>YWHAZ</i> – (7) <i>HPRT1</i>								

^a Standardabweichung, bezogen auf die durchschnittliche relative Quantität ($Q = E^{C_{tmin} - C_{tProbe}}$)

^b Pearson-Korrelationskoeffizient (r) zwischen dem ICG und dem BestKeeper-Index (berechnet aus dem geometrischen Mittel aller ICG)

^c Berechnung basierend auf den durchschnittlichen Platzierungen der ICG in allen drei Software-Applikationen

Tabelle 10A nach Gütling et al.¹²¹

3.5 Einfluss des Normalisierungsverfahrens auf die Zielgenexpression

Normalisierung der Zielgenexpression. Die RT-qPCR Rohdaten des Zielgens NR3C1 wurden mit verschiedenen ICG, sowie verschiedenen Kombinationen von ICG normalisiert. Als NF wurden die relativen Quantitäten beziehungsweise das geometrische Mittel der relativen Quantitäten folgender ICG verwendet: (1) Die Kombination der besten vier ICG, bewertet durch das Software-übergreifende Ranking und geNorm (*PPIA*, *RPL19*, *HMBS*, *SDHA*); (2) *HPRT1* als das laut Ranking und „klassischer“ Analyse instabilste Gen; (3) *SDHA* als das gemäß der „klassischen“ Analyse am wenigsten regulierte Gen; (4) *RPL19*, das anhand der Software-Algorithmen stabil bewertet wurde, in der „klassischen“ Analyse jedoch Regulationen aufwies.

Normalverteilung. Die normalisierten und neu-skalierten Daten (geNorm V 3.5 manual⁹⁶) wurden entsprechend der Probenlokalisierung in einen zentralen und einen peripheren Datensatz aufgeteilt und auf Normalverteilung überprüft (Kolmogorov-Smirnov-Test $p > 0,05$). Innerhalb der zentralen Proben wiesen lediglich die mit RPL19 normalisierten Expressionswerte eine Normalverteilung ($p = 0,139$) auf. Die mit den vier stabilsten ICG ($p = 0,018$, $p_{\log} > 200$) und die mit HPRT1 ($p = 0,002$, $p_{\log} > 0,200$) normalisierten Daten erreichten durch Logarithmierung eine Normalverteilung. Die mit SDHA normalisierten Expressionen waren auch nach Logarithmierung nicht normalverteilt ($p = 0,006$, $p_{\log} = 0,031$). Die Analyse der peripheren Proben ergab eine Normalverteilung der mit HPRT1 ($p = 0,078$) und der mit RPL19 ($p > 0,200$) normalisierten Daten. Die mit den vier stabilsten ICG ($p = 0,021$, $p_{\log} > 0,200$) und die mit SDHA ($p = 0,000$, $p_{\log} > 0,200$) normalisierten Expressionswerte konnten durch Logarithmierung in eine Normalverteilung überführt werden.

Effekte durch Gestationsalter, Geschlecht und BET-Behandlung. Sowohl innerhalb der zentralen, als auch innerhalb der peripheren Proben ergaben sich durch die Verwendung verschiedener ICG zur Normalisierung unterschiedliche Ergebnisse in der Auswertung (Abb. 13 und 14).

Bei den zentralen Proben ließ sich kein signifikanter Einfluss durch das Gestationsalter bei Geburt, das Geschlecht oder durch eine Behandlung mit BET auf die Zielgenexpression nachweisen, wenn die RT-qPCR-Daten mit den besten vier ICG oder alleine mit HPRT1 normalisiert wurden (Abb. 13). Jedoch zeigte sich bei der Normalisierung mit HPRT1 für die $<37+0$ SSW Geborenen ein nicht-signifikanter Trend zu einer Hochregulation von NR3C1 durch die BET-Behandlung (normalisierte, neu-skalierte Zielgenexpression $nQ_{\text{BET}} = 15,90 \pm 11,33$ vs. $nQ_{\text{Kontrolle}} = 9,38 \pm 3,84$, $p = 0,149$). Nach der Normalisierung mit SDHA zeigte sich ein geschlechtsabhängiger Effekt mit signifikant höheren Zielgenexpressionen innerhalb der weiblichen Gruppe verglichen mit den männlichen Neugeborenen ($nQ_{\text{weiblich}} = 40,41 \pm 22,23$ vs. $nQ_{\text{männlich}} = 26,19 \pm 14,18$, $p = 0,018$). Die mit RPL19 normalisierten Daten wiesen dagegen einen durch das Schwangerschaftsalter bedingten Einfluss auf, insbesondere in der männlichen nicht-behandelten Kontrollgruppe (alle zentralen Proben: $nQ_{<37+0 \text{ SSW}} = 4,27 \pm 1,44$ vs. $nQ_{\geq 37+0 \text{ SSW}} = 5,64 \pm 2,39$, $p = 0,039$; männliche Kontrollgruppe: $nQ_{<37+0 \text{ SSW}} = 3,50 \pm 0,64$ vs. $nQ_{\geq 37+0 \text{ SSW}} = 5,93 \pm 1,71$, $p = 0,047$).

3. Ergebnisse

Für die peripheren Proben (Abb. 14) konnte sowohl für die mit den besten vier ICG, als auch für die mit SDHA normalisierten Expressionswerte ein signifikanter geschlechtsabhängiger Effekt nachgewiesen werden (HMBS+PPIA+RPL19+SDHA: $nQ_{\text{weiblich}} = 7,44 \pm 2,71$ vs. $nQ_{\text{männlich}} = 5,59 \pm 2,31$, $p=0,021$; SDHA: $nQ_{\text{weiblich}} = 36,40 \pm 16,44$ vs. $nQ_{\text{männlich}} = 23,73 \pm 13,91$, $p=0,002$). Dieser spiegelte sich für die mit SDHA normalisierten Werte vor allem in der vor 37+0 SSW geborenen BET-Gruppe wieder ($nQ_{\text{weiblich}} = 42,15 \pm 16,40$ vs. $nQ_{\text{männlich}} = 20,16 \pm 7,11$, $p=0,005$). Die mit HPRT1 und die mit RPL19 normalisierten Daten zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede bezogen auf das Gestationsalter, das Geschlecht oder eine BET-Behandlung.

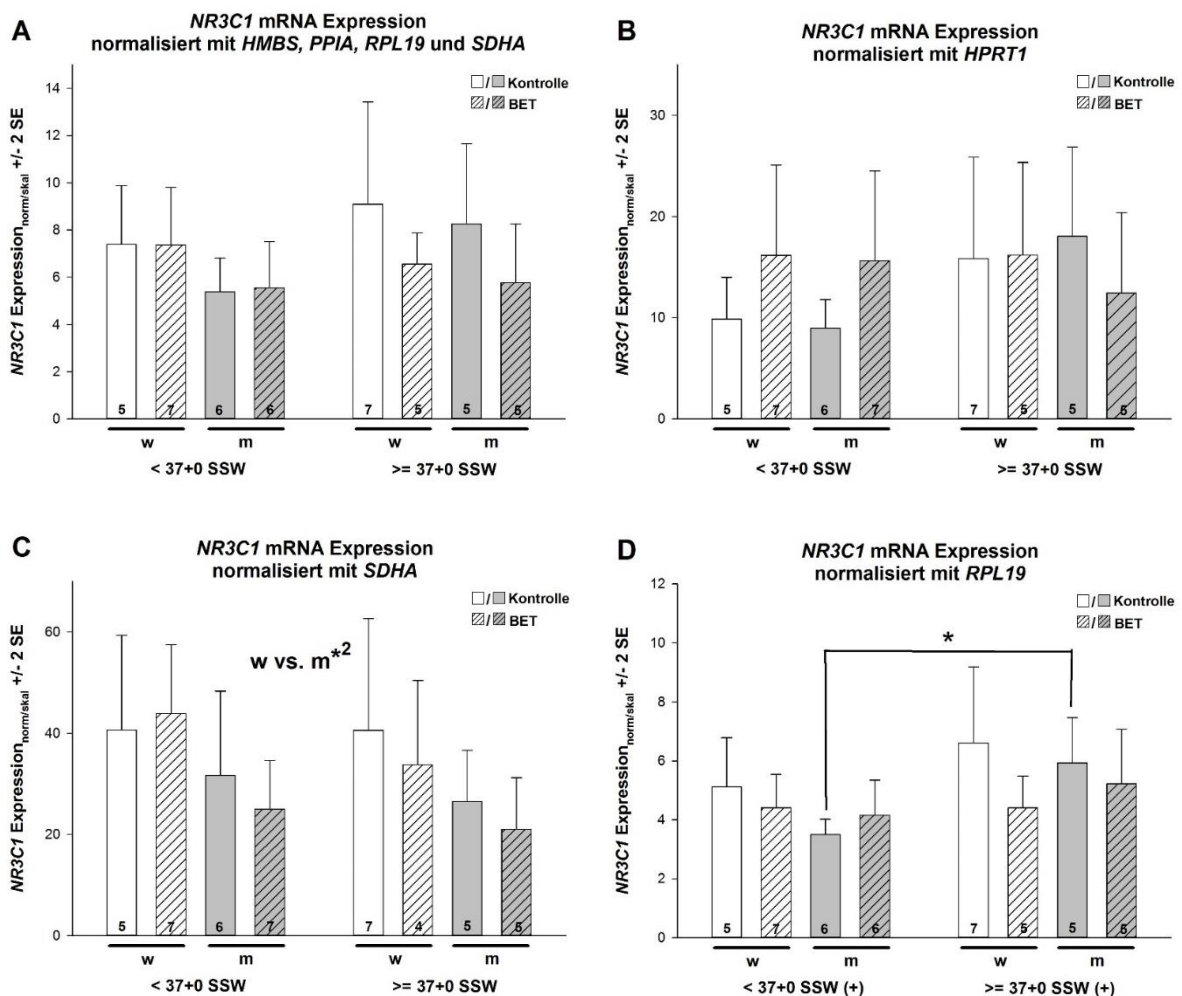


Abbildung 13: Vergleich der Zielgenexpression in zentralen Proben nach Normalisierung mit verschiedenen ICG

3. Ergebnisse

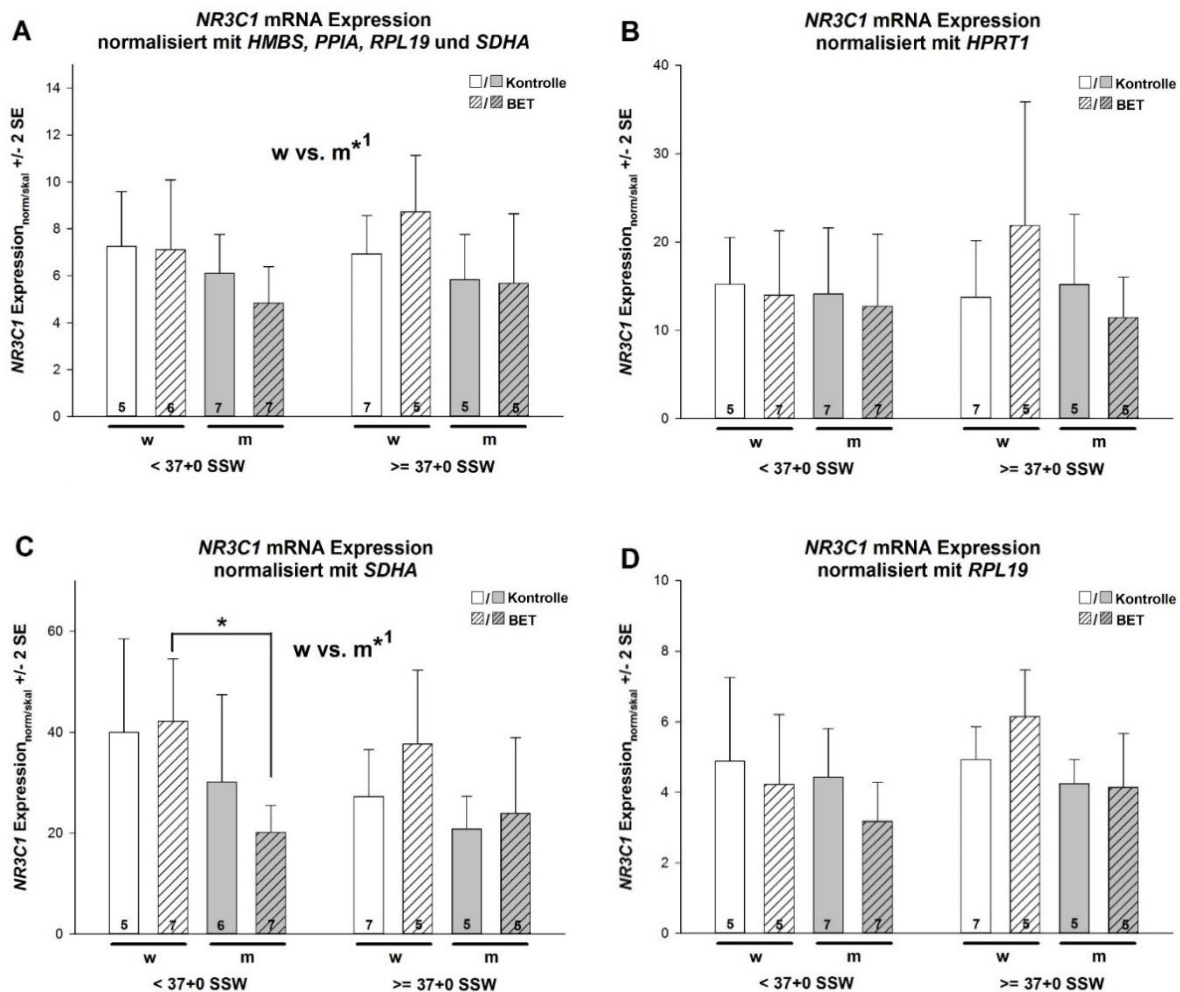


Abbildung 14: Vergleich der Zielgenexpression in peripheren Proben nach Normalisierung mit verschiedenen ICG

Zu den Abbildungen 13 und 14: Die normalisierten, neu-skalierten Zielgenexpressionen wurden entsprechend ihrer Lokalisation aufgeteilt und mittels MANOVA mit den Hauptfaktoren Schwangerschaftsalter bei Geburt, Geschlecht und BET-Behandlung analysiert. Bei signifikanten Effekten mit $p < 0,05$ wurde ein paarweiser Vergleich mittels Holm's-Sidak-Test angeschlossen. * = signifikante Effekte für die Faktoren Geschlecht und BET-Behandlung; (+) = signifikante Effekte für den Faktor Schwangerschaftsalter; ¹ = signifikante Unterschiede für Geschlecht im t-Test; ² = signifikante Unterschiede für Geschlecht im Mann-Whitney-U-Test. $NR3C1\ Expression_{norm/skal} = (Q_{Probe}/NF_{Probe}) / \text{Min}(Q_{Probe}/NF_{Probe})$ (geNorm V 3.5 manual⁹⁶). Die Balken geben den Mittelwert \pm 2-fachen Standardfehler (SE) an. Die Probenanzahl n ist am Fuß der Balken angegeben.

Abbildung 14 nach Gütling et al.¹²¹

3.6 Einfluss der Ontogenese auf die Genexpression

Über das Schwangerschaftsalter hinweg ließ sich in den Plazentaprobe eine signifikante Abnahme der totalen RNA-Konzentration pro mg Gewebe beobachten (RNA-Konzentration_{<37+0 SSW} = $21,68 \pm 8,59$ ng/ μ l vs. RNA-Konzentration _{$\geq 37+0$ SSW} = $17,05 \pm 7,84$, $p = 0,007$; Abb. 15). In einer nachfolgenden Untersuchung, ob sich dieser Effekt auch auf Expressi-

3. Ergebnisse

onsebene der mRNA widerspiegelt, wurde das geometrische Mittel aller ICG-Expressionen gebildet und auf signifikante Unterschiede bezogen auf des Schwangerschaftsalter bei Geburt analysiert. Hier zeigte sich lediglich ein Trend zu einer geringeren mRNA-Expression unter den Reifgeborenen verglichen mit den Frühgeborenen ($Q_{<37+0} \text{ SSW} = 0,33 \pm 0,15$ vs. $Q_{\geq 37+0} \text{ SSW} = 0,29 \pm 0,15$, $p=0,283$). Ein signifikanter Effekt ließ sich nicht nachweisen. Ebenfalls ein nicht-signifikanter Trend zur Abnahme der RNA-Expression im Schwangerschaftsverlauf konnte für die ribosomale RNA18S und RNA 28S beobachtet werden (RNA18S: $Q_{<37+0} \text{ SSW} = 0,44 \pm 0,16$ vs. $Q_{\geq 37+0} \text{ SSW} = 0,40 \pm 0,19$, $p=0,205$; RNA28S: $Q_{<37+0} \text{ SSW} = 0,48 \pm 0,18$ vs. $Q_{\geq 37+0} \text{ SSW} = 0,42 \pm 0,22$, $p=0,123$).

Vergleich der totalen RNA-Menge und der Rohdaten der qRT-PCR

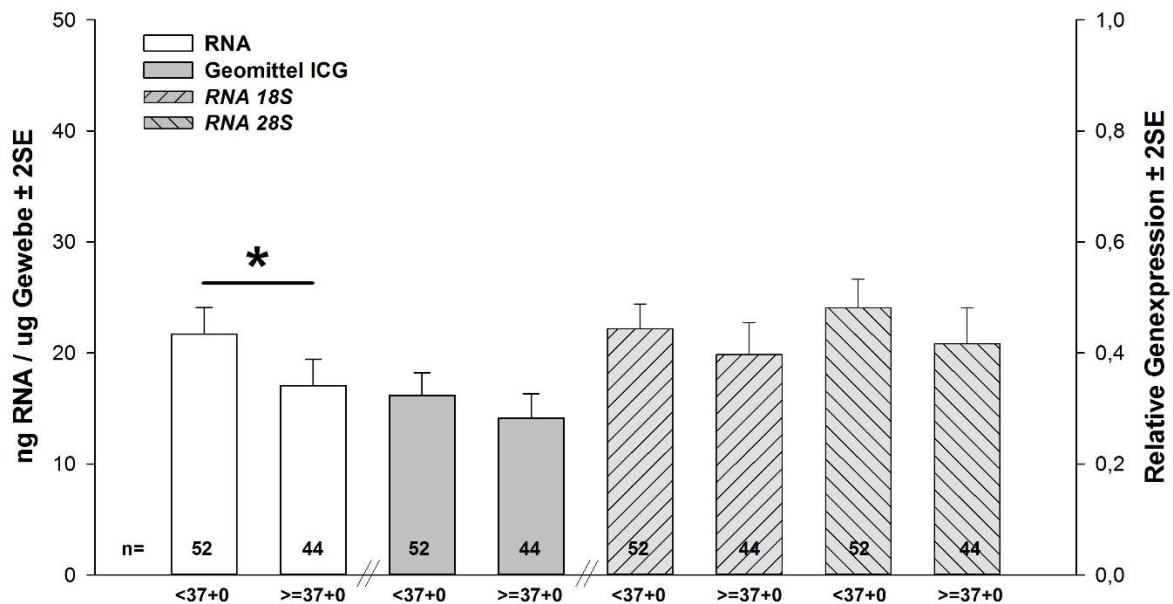


Abbildung 15: Vergleich der totalen RNA-Konzentration, der mRNA- und rRNA-Expression zwischen früh- und reifgeborenen Plazenten

Schwangerschaftsalter bei Geburt <37+0 SSW vs. ≥37+0 SSW; * = t-Test mit $p < 0,05$.

Abbildung nach Gütling et al.¹²¹

Anschließend wurde die Expression der sieben ICG, des Zielgens, sowie von RNA18S und RNA28S auf eine Korrelation mit der totalen RNA-Konzentration getestet (Tab. 13). Bis auf RNA18S ließ sich für alle Gene eine signifikante positive Korrelation nachweisen, wenn auch nur schwach bis moderat (Bereich des Korrelationskoeffizienten $r: 0,203 \leq r \leq 0,520$). B2M ($r=0,203$) und HPRT1 ($r=0,204$) waren mit einem Korrelationskoeffizient $r < 0,3$ nur schwach zur RNA-Konzentration korreliert. Die stärkste Korrelation wiesen RNA28S ($r=0,520$) und YWHAZ ($r=0,489$) auf. Außerdem waren die Expressionswerte

3. Ergebnisse

aller ICG positiv mit der Expression von NR3C1 korreliert. Hier zeigten sich die stärksten Korrelationen für SDHA ($r=0,775$) und YWHAZ ($r=0,740$). Die schwächste Korrelation wies HPRT1 ($r=0,329$) auf. RNA18S ($r=0,308$) und RNA28S ($r=0,605$) waren ebenfalls signifikant positiv mit der NR3C1-Expression korreliert (Tab. 13).

Tabelle 13: Pearson-Korrelationen zwischen der RNA-Konzentration und den RT-qPCR-Rohdaten aller ICG und des Zielgens.

Gen	RNA (ng/ μ g Gewebe)	NR3C1
HMBS	0,401**	0,626**
PPIA	0,384**	0,633**
RPL19	0,370**	0,631**
SDHA	0,435**	0,775**
B2M	0,203*	0,577**
YWHAZ	0,489*	0,740**
HPRT1	0,204*	0,329**
NR3C1	0,315*	-
RNA18S	0,140	0,308**
RNA28S	0,520**	0,605**

Die stabilsten ICG sind fett markiert. Angegeben ist der Pearson-Korrelationskoeffizient r . ** = Korrelation mit $p<0,01$; * = Korrelation mit $p<0,05$.

Tabelle nach Gütling et al.¹²¹

4. Diskussion

Die Verlässlichkeit von Messungen in Genexpressionsstudien ist abhängig von der Auswahl der richtigen ICG für die Normalisierung der Zielgenexpression. Einige Studien zur ICG-Validierung in der humanen Plazenta konnten zeigen, dass sich in Abhängigkeit von der Fragestellung und den Versuchsbedingungen unterschiedliche ICG beziehungsweise Kombinationen von ICG zur Normalisierung eignen.²²⁻²⁸ So scheinen SDHA, TBP und YWHAZ valide ICG für Genexpressionsstudien unter Berücksichtigung der Schwangerschaftskomplikationen Gestationsdiabetes und schwangerschaftsinduzierte Hypertonie zu sein.²⁷ Unter dem Aspekt der fetalen Wachstumsrestriktion erwiesen sich dagegen GAPDH, RNA18S und YWHAZ als geeignete ICG.²⁸

Die einmalige BET-Gabe bei drohender Frühgeburt konnte nachweislich die neonatale Mortalität und Morbidität senken und wird in Deutschland als Standardtherapie zur Lungenreifeinduktion eingesetzt.^{54, 72, 73} Dennoch weisen Studien darauf hin, dass eine hohe antenatale GC-Exposition im Sinne einer perinatalen Programmierung sowohl kurzfristige, als auch langfristige Folgen für das Neugeborene haben kann, die dessen Gesundheit bis ins Erwachsenenalter beeinflussen können.^{75, 80, 85, 86} Als Schnittstelle zwischen Mutter und Kind scheint die Plazenta dabei eine zentrale Rolle zu spielen.⁹⁰ So konnten bereits einige Auswirkungen einer antenatalen GC-Exposition auf das Genexpressionsprofil der humanen Plazenta nachgewiesen werden.^{43, 62-64}

Derzeit liegen keine Untersuchungen vor, die den Einfluss einer einmaligen antenatalen BET-Gabe zur Lungenreifeinduktion auf die Expression von ICG in der humanen Plazenta analysieren. In der vorliegenden Studie wurden daher sieben ICG auf ihre Eignung zur Normalisierung von Zielgenen in der humanen Plazenta getestet und dabei die Faktoren BET-Behandlung, Schwangerschaftsalter bei Geburt, fetales Geschlecht und placentare Lokalisation der entnommenen Proben berücksichtigt.

4.1 Literaturrecherche und IPA-Analyse der Referenzgene

Die in dieser Studie überprüften ICG wurden anhand der folgenden drei Kriterien ausgewählt: 1) Das ICG wurde bereits in der humanen Plazenta evaluiert und wies dabei ein hohes Maß an Expressionsstabilität auf. 2) Das ICG wurde im Rahmen von GC- oder fetalen Wachstumsstudien verwendet. 3) Das ICG zeigte in der IPA-Analyse keine oder wenige Ko-Regulationen zu anderen ICG.

Über die erste Literaturrecherche wurden elf Studien gefunden, in denen ICG in der humanen Plazenta evaluiert wurden (Abb. 4).²²⁻³² Darunter befanden sich sieben geNorm-Studien.²²⁻²⁸ Das Ranking der insgesamt 22 identifizierten ICG entsprechend ihrer Stabilität erwies sich jedoch aufgrund der unterschiedlichen Studiendesigns und der stark divergierenden Ergebnisse zwischen den Studien als schwierig. Beispielsweise wurde in zwei Studien wegen einer Zunahme der Expression von GAPDH im Verlauf der Schwangerschaft von dessen Verwendung abgeraten.^{31, 32} In einer geNorm-Analyse von Drolet et al. ergab sich dagegen, dass GAPDH in Kombination mit YWHAZ und HPRT zur Normalisierung von Plazenten unterschiedlichen Schwangerschaftsalters geeignet sei.²⁴ Des Weiteren erwies sich ein Vergleich der Studien schwierig, da jeweils eine unterschiedliche Anzahl, sowie eine unterschiedliche Kombination von ICG getestet wurde. So wurden zehn der 22 ICG bisher nur in einer einzigen Studie evaluiert, wohingegen das häufig verwendete GAPDH in neun Studien zur ICG-Validierung untersucht wurde (Tab. 7).

Das Hinzuziehen des zweiten Kriteriums, die Verwendung des ICG im Rahmen der antenatalen GC-Exposition, stellte einen weiteren Problempunkt in dem Ranking dar. Hier ergaben sich große Abweichungen zwischen den bisher als stabil bewerteten ICG und den im Rahmen von GC-Studien häufig eingesetzten ICG. Diese Diskrepanzen zeigten sich vor allem für ACTB, GAPDH und RNA18S, die regelmäßig als Referenzgene in GC-Studien verwendet wurden, sich jedoch in einigen Studien zur ICG-Stabilität als ungeeignet erwiesen (Tab. 8).^{22, 23, 26, 28, 31, 32}

In der vorliegenden Studie wurde folgendes Stratifizierungsverfahren angewandt: Je häufiger ein ICG in geNorm-Studien unter den ersten drei ICG befand beziehungsweise je häufiger es in anderen Studien als stabil bewertet wurde, desto höher wurde es gelistet. Schlechte Bewertungen in einer Studie führten zu einer geringeren Platzierung. ICG, die sich auf einer gleichen Platzierung befanden wurden entsprechend ihrer Häufigkeit in der Verwendung in GC-Studien sortiert (Tab. 8).

Anschließend wurden zwei IPA-Analysen durchgeführt, um potenzielle Ko-Regulationen der ICG zu untersuchen. Die erste Analyse umfasste die ICG, die sich auf den ersten 15 Plätzen des Rankings befanden. Die zweite Analyse umfasste nur diejenigen ICG, die in GC-Studien in der humanen Plazenta verwendet wurden. Da Interaktionen der ICG untereinander potenziell zu einer Verfälschung der geNorm-Analyse führen können, wurden ko-regulierte ICG, wie TOP1 oder TBP ausgeschlossen, auch wenn sie in früheren Studien als stabil bewertet wurden.^{22, 23, 27} Somit erfolgte die endgültige Auswahl der ICG dieser Studie anhand der IPA-Analyse unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der

Literaturrecherche. Daraus ergaben sich folgende für die Testung geeignete sieben ICG: B2M, HMBS, HPRT1, PPIA, RPL19, SDHA und YWHAZ.

Durch dieses Vorgehen konnten bereits im Vorfeld die jeweiligen ICG ausgewählt werden, die unter den gegebenen Studienbedingungen ein möglichst hohes Potenzial zur validen Normalisierung von Zielgenen haben. Dies hatte allerdings zur Folge, dass einige bekannte und häufig verwendete ICG von vorneherein ausgeschlossen wurden, da sie entweder in bisherigen Studien als instabil bewertet wurden, zum Beispiel RNA18S^{22, 26} und GAPDH,^{22, 31, 32} oder in der IPA Analyse Ko-Regulationen mit anderen ICG aufwiesen, zum Beispiel ACTB und GAPDH (Abb. 5 und 6).

Zusammenfassend: Durch die Literaturrecherche wurde eine Vorauswahl an ICG getroffen, die bereits in früheren Studien als stabil bewertet oder häufig in GC-Studien verwendet wurden. Diese wurden in einer IPA-Analyse auf Ko-Regulationen überprüft. Es wurden die sieben ICG ausgewählt, die die wenigsten Ko-Regulationen aufwiesen (B2M, HMBS, HPRT1, PPIA, RPL19, SDHA und YWHAZ).

4.2 „Klassische“ Analyse der RT-qPCR-Ergebnisse

Der Einfluss der Faktoren BET-Behandlung, fetales Geschlecht, Schwangerschaftsalter bei Geburt und placentare Lokalisation der entnommenen Proben wurde in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht. In der „klassischen“ Analyse wurden für jedes einzelne ICG die Rohdaten der RT-qPCR-Versuche auf signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Untergruppen getestet. Die zweite Analyse wurde mithilfe der Software-basierten Algorithmen geNorm, NormFinder und BestKeeper durchgeführt, in denen nicht nur jedes ICG für sich analysiert, sondern auch die Genexpressionen der ICG untereinander verglichen werden.

4.2.1 Einfluss der placentaren Lokalisation auf die ICG-Expression

Da einige Studien Hinweise darauf geben, dass sich zentrale und periphere Anteile der Plazenta hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils unterscheiden,³⁴⁻³⁷ wurde getestet, ob die placentare Lokalisation der Probenentnahme ebenso einen Einfluss auf die ICG-Expression haben kann.

In der „klassischen“ Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den zentral und peripher entnommenen Proben festgestellt werden (Tab. 10). Wurden die zentralen und peripheren Proben jedoch getrennt voneinander untersucht, zeigten sich

innerhalb der zentralen Proben deutlich mehr regulierende Effekte, als in den peripheren Proben. So wurden für die zentralen Proben bei fünf der sieben getesteten ICG signifikante Unterschiede bezüglich des Schwangerschaftsalters, des fetalen Geschlechts und/oder einer BET-Behandlung festgestellt (Abb. 8). Die Expressionswerte der peripheren Proben blieben dagegen von diesen Faktoren unbeeinflusst (Abb. 9).

Warum nur innerhalb der zentralen Proben signifikante Regulationen beobachtet wurden, ist unklar. Auch innerhalb der peripheren Proben zeichnet sich der Trend ab, dass die Expression von B2M und RPL19 für weibliche Neugeborene durch eine BET-Gabe induziert werden könnte. Dies kann sowohl für die Neugeborenen <37+0 SSW und ≥37+0 SSW beobachtet werden. Möglicherweise sind Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen, sichtbar an den hohen SD, oder zu kleine Fallzahlen dafür verantwortlich, dass diese Unterschiede nicht signifikant wurden. Um dies näher zu untersuchen sind weitere Studien mit höheren Fallzahlen nötig.

Eine andere mögliche Erklärung könnten lokalisationsbedingte Unterschiede in der Plazentamorphologie sein, wie die von Fox et al. beschriebenen Differenzen in der Vaskularisation zwischen zentralen und peripheren Abschnitten.³³ Diese könnten einen Einfluss auf das Expressionsprofil bestimmter Gene nehmen. So beobachteten Wyatt et al. eine stärkere Expression von Hypoxie-regulierten Genen wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) in peripher entnommenen Proben und vermuteten, dass dies auf eine geringere Blutversorgung in der Peripherie zurückzuführen sei.³⁴ Tzschoppe et al. beschrieben lokalisationsbedingte Expressionsunterschiede der Referenzgene B2M und HPRT1 mit signifikant höheren Werten in zentralen, verglichen mit peripheren Abschnitten.³⁶ Die vorliegende Studie ergab für HPRT1 und HMBS ebenfalls tendenziell höhere ICG-Expressionen in den zentralen Plazentaprobe. Für alle anderen ICG, inklusive B2M, zeigte sich dagegen ein Trend zu höheren Werten in den peripheren Proben. Die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen ICG in dieser Studie und in bereits vorhandenen Studien deuten darauf hin, dass neben der plazentaren Lokalisation noch andere Faktoren bei der Regulation von ICG eine Rolle spielen.

Zusammenfassend: Auch wenn in dieser Studie insgesamt kein statistisch signifikanter Lokalisationseffekt nachgewiesen werden konnte, lassen auch unsere Ergebnisse vermuten, dass der Ort der Probenentnahme die Ergebnisse von RT-qPCR-Studien beeinflussen kann. Diese Beobachtung passt zu bereits publizierten Studien, die lokalisationsbedingte Unterschiede der Genexpression in der humanen Plazenta aufzeigen. Daher ist

es ratsam, die Lokalisation der Probenentnahme generell bei RT-qPCR-Studien, sowie bei Studien zur ICG-Validierung zu berücksichtigen.

4.2.2 Einfluss des fetalen Geschlechts auf die ICG-Expression

Ein weiterer Faktor, der bekanntermaßen einen Einfluss auf die Genexpression in der humanen Plazenta hat, ist das fetale Geschlecht. Zwischen den Plazenten männlicher und weiblicher Feten existieren genetische Unterschiede,^{38, 91} die einer Untersuchung von Cleal et al. zufolge auch einige ICG betrifft.³⁹ In Cleals Studie wurde das Expressionsniveau von 17 ICG in den Plazenten männlicher Neugeborener mit denen weiblicher Neugeborener verglichen und dabei unter anderem für YWHAZ, UBC und TOP1 signifikant höhere Expressionswerte innerhalb der männlichen Gruppe beobachtet. In der vorliegenden Studie konnte lediglich für HPRT1 ein geschlechtsabhängiger Effekt für die zentral entnommenen Proben nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Cleals Feststellungen zeigten sich hier signifikant höhere Werte in der Gruppe der weiblichen Neugeborenen. Für alle anderen ICG ließ sich kein genereller geschlechtsabhängiger Effekt beobachten. Sood et al. untersuchten die humane Plazenta auf Variationen im Genexpressionsprofil und fanden einige Gene, deren Expression sich in Abhängigkeit vom fetalen Geschlecht unterscheidet.³⁸ Viele dieser geschlechtsregulierten Gene waren auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert. Das HPRT1-Gen ist als einziges von den hier getesteten sieben ICG auf dem X-Chromosom lokalisiert. Dies könnte eine mögliche Erklärung für eine höhere HPRT1-Expression in der weiblichen Gruppe sein.

Des Weiteren waren geschlechtsspezifische Unterschiede der Expressionswerte für HPRT1 und RPL19 in zentral entnommenen Proben in der Gruppe der mit BET behandelten Frühgeborenen zu finden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass neben dem Geschlecht noch andere Faktoren, wie das Schwangerschaftsalter oder pränatale Therapien die ICG-Expression in der humanen Plazenta beeinflussen.

Zusammenfassend: Von den sieben getesteten ICG zeigte nur HPRT1 generelle geschlechtsabhängige Expressionsunterschiede in den zentralen Plazentaprobe. Zudem fanden sich für HPRT1 und RPL19 geschlechtsabhängige Subgruppeneffekte unter den mit BET behandelten Frühgeborenen.

4.2.3 Einfluss des Schwangerschaftsalters bei Geburt auf die ICG-Expression

Die Plazenta unterliegt mit fortschreitender Schwangerschaft sowohl morphologischen, als auch genetischen Veränderungen.⁴⁰⁻⁴² So konnten in der humanen Plazenta bei einer großen Anzahl von Genen signifikante Expressionsunterschiede zwischen dem ersten und dem dritten Schwangerschaftstrimester festgestellt werden.⁴² Darunter befanden sich auch einige ICG, wie B2M, HMBS, PPIA, RPL19 und YWHAZ,⁴² sowie GAPDH.^{31, 32} In Anbetracht dessen wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob sich die Expressionen der ICG auch in den letzten Schwangerschaftswochen noch verändern. Es wurden Plazenten von Schwangeren mit einer Geburt <37+0 SSW mit denen ≥37+0 SSW verglichen. Dabei konnte in den zentral entnommenen Proben ein vom Schwangerschaftsalter abhängiger Effekt für die Referenzgene HPRT1 und PPIA beobachtet werden (Abb. 8). Beide ICG zeigten signifikant niedrigere Expressionswerte bei Reifgeborenen verglichen mit Frühgeborenen. Somit lässt sich eine Abnahme der Expression über den Schwangerschaftsverlauf annehmen. Bei PPIA war dieser Effekt in der männlichen Kontrollgruppe besonders ausgeprägt. Für HMBS zeigte sich lediglich in der weiblichen Kontrollgruppe eine vom Schwangerschaftsalter abhängige Reduktion der Expression (Abb.8).

Verdünnungseffekt. HPRT1 und PPIA zeigten bereits in der fetalen Schafsleber in der „klassischen“ Analyse eine Abnahme der mRNA-Expression über das Schwangerschaftsalter.¹⁶ Da in dieser Studie eine solche Abnahme für alle ICG verzeichnet wurde, führten Xu et al. diese Beobachtung auf einen generellen Verdünnungseffekt der mRNA zurück. So zeigte sich vom 50. bis zum 140. Schwangerschaftstag eine Reduktion der gesamten RNA-Menge. Dabei nahm der Anteil der ribosomalen RNA18S und RNA28S in einem geringeren Ausmaß ab, als der Anteil der mRNA der ICG. Somit verschob sich das Verhältnis von rRNA zu mRNA am Ende der Schwangerschaft zugunsten der rRNA. Da für RT-qPCR-Versuche für jede Probe die gleiche Menge an totaler RNA eingesetzt wird, bleibt ein solcher Verdünnungseffekt in der „klassischen“ Analyse unberücksichtigt. Dadurch kann es zu Fehlinterpretationen kommen. Ein ähnlicher Verdünnungseffekt der mRNA stabiler exprimierter ICG wurde auch in bovinem Brustdrüsengewebe im Verlauf des Laktationszyklus beobachtet.¹²⁴ Zudem stellten Parent et al. eine Verdünnung von mRNA in kultivierten humanen Hepatozyten während der Zelldifferenzierung fest.¹²⁵ Auch in der vorliegenden Studie wurde eine Abnahme der gesamten RNA-Menge zum Ende der Schwangerschaft nachgewiesen (Abb. 15). Zudem waren die Expressionen aller ICG signifikant mit der gesamten RNA-Menge korreliert, wenn auch teilweise nur

schwach (Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen $r=0,203$ und $r=0,520$, Tab. 13). Die stärkste Korrelation wies RNA28S auf ($r=0,520$), die den größten Anteil der gesamten RNA bildet. Somit nahm nicht nur die gesamte RNA-Synthese zum Ende der Schwangerschaft hin ab, sondern auch der prozentuale Anteil der mRNA der ICG, sowie der prozentuale Anteil der rRNA. Dies deutet darauf hin, dass andere Gene am Ende der Schwangerschaft stärker hochreguliert werden und die mRNA der ICG dadurch verdünnt wird. Unterschiede der mRNA-Expression eines bestimmten Gens können somit nicht nur durch eine veränderte Transkription des jeweiligen Gens, sondern auch durch ein verändertes Verhältnis seiner mRNA zur gesamten RNA verursacht werden.^{16, 124, 125}

Zusammenfassend: In der „klassischen“ Analyse zeigten HPRT1 und PPIA, sowie HMBS für die weiblichen Neugeborenen, eine Abnahme der mRNA-Expression über das Schwangerschaftsalter. Gleichzeitig weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass die mRNA aller hier getesteten ICG mit fortschreitender Schwangerschaft verdünnt wird. Ein solcher Verdünnungseffekt wird in der „klassischen“ Analyse nicht berücksichtigt. Somit kann in der „klassischen“ Analyse nicht eindeutig geklärt werden, ob die beobachteten signifikanten Unterschiede auf eine Herabregulation oder eine Verdünnung der ICG-mRNA zurückzuführen sind.

4.2.4 Einfluss der einmaligen Lungenreifeinduktion mit BET auf die ICG-Expression

Es ist bekannt, dass eine antenatale GC-Behandlung die Expression einiger Gene beeinflussen kann.^{43, 56-58, 60-64} Gerade in tierexperimentellen Studien konnte in der Plazenta durch eine GC-Gabe eine veränderte Regulation von Hormonen, Rezeptoren und Proteinen, die für fetales Wachstum und den Stoffwechsel verantwortlich sind, gezeigt werden.^{56-58, 60, 61} In Studien an der humanen Plazenta wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet.^{43, 62-64} Bisher wurde noch kein möglicher Einfluss einer antenatalen GC-Behandlung auf Referenzgene in der humanen Plazenta getestet. Xu et al. wiesen jedoch eine signifikante Regulation des ICG TUBB durch eine antenatale Behandlung mit DEX in der fetalen Schafsleber nach.¹⁶

In der vorliegenden Studie konnten innerhalb der zentral entnommenen Plazentaprobe behandlungsabhängige Effekte für die Referenzgene B2M, HMBS, HPRT1, PPIA und RPL19 festgestellt werden (Abb. 8). So führte eine einmalige antenatale BET-Gabe in der Gruppe der weiblichen Reifgeborenen zu einer signifikanten Hochregulation von B2M, HMBS, HPRT1 und PPIA. Für RPL19 ließen sich in dieser Gruppe ebenfalls tendenziell

ein Anstieg der Expression beobachten, sowie ein signifikanter BET-bedingter Anstieg innerhalb der weiblichen Frühgeborenen. Lediglich SDHA und YWHAZ wiesen keine signifikanten Regulationen auf, wobei sich bei beiden ICG in der Gruppe der weiblichen Reifgeborenen der Trend zu einer Hochregulation der Genexpression durch die BET-Gabe zeigte.

Insgesamt scheinen weibliche Feten stärker auf eine antenatale GC-Exposition zu reagieren, wobei die Effekte erst einige Wochen nach der BET-Behandlung sichtbar werden. Da es sich um eine Studie am Menschen handelt, konnte der zeitliche Abstand zwischen Durchführung der Lungenreifeinduktion und Geburt nicht standardisiert werden. Zudem war der Probenumfang zu gering, um die Probandinnen nach diesem Kriterium auszuwählen. Daher können hier keine Aussagen getroffen werden, in welchem Schwangerschaftsalter die Plazenten besonders vulnerabel auf eine GC-Gabe reagieren, nach welcher Dauer Expressionsveränderungen auftreten und wie lange sie anhalten. Jedoch wurde in einer humanen Studie zur Nachweisbarkeit von BET im maternalen Plasma ein Peak innerhalb von 1h nach intramuskulärer Injektion von 12mg BET und eine Halbierung der Plasmakonzentration nach 6h festgestellt.¹²⁶ Im fetalen Plasma war BET bereits 1h nach maternaler Applikation nachweisbar. Die Höchstwerte wurden 2h nach BET-Gabe gemessen. In einer vergleichbaren tierexperimentellen Studie sanken die BET-Konzentrationen im maternalen Plasma innerhalb von 12h und im fetalen Plasma innerhalb von 8h unter die Nachweisgrenze.¹²⁷

Trotz der offenbar zügigen Elimination von BET aus dem maternalen und fetalen Organismus, waren in der vorliegenden Studie die deutlichsten behandlungsabhängigen Effekte nach 37+0 SSW sichtbar, also erst mehrere Wochen nach der BET-Gabe. In der Gruppe der Frühgeborenen zeigten sich dagegen kaum signifikante Effekte.

Einige Studien geben bereits Hinweise darauf, dass der Zeitpunkt der GC-Behandlung, sowie der Zeitpunkt der Geburt eine Rolle bei der Regulation von Genen spielen. Die in der Schafsleber beobachtete behandlungsbedingte Abnahme der TUBB-Expression betraf nur weibliche Feten mit einer Schwangerschaftsdauer von 125-127 Tagen, wobei die Gesamtschwangerschaftsdauer von Schafen 150 Tage beträgt. Die DEX-Gabe wurde aber bereits an Tag 40-41 durchgeführt. So zeigen sich auch hier erst mehrere Wochen nach der GC-Exposition Auswirkungen auf die Genexpression.¹⁶ Stark et al. untersuchten den zeitlichen Zusammenhang zwischen der Durchführung der Lungenreifeinduktion und der Geburt auf die 11 β HSD2-Aktivität in der humanen Plazenta bei Frühgeborenen.⁶⁴ Es ergaben sich nur für Plazenten weiblicher Frühgeborener signifikante Unterschiede. Hier

wurden höhere Aktivitätswerte gemessen, wenn die Geburt weniger als 72h nach der BET-Gabe stattfand, verglichen mit der Gruppe, die nach mehr als 72h nach BET-Gabe geboren wurden. Auch in der vorliegenden Studie reagierten die weiblichen Feten stärker auf eine antenatale Exposition synthetischer GC, als die männlichen Feten. Dabei scheinen der Zeitpunkt der GC-Gabe, sowie der Zeitpunkt der Geburt relevant für das Ausmaß der Regulation zu sein. Insgesamt zeigen sich jedoch je nach Gen starke individuelle Unterschiede.

Eine Erklärung für die Hochregulation der hier beschriebenen ICG nach Lungenreifinduktion in Plazenten weiblicher Feten ist bisher nicht bekannt. Allerdings berichteten einige Autoren von unterschiedlichen geschlechtsspezifischen Reaktionen der Plazenta auf Umwelteinflüsse wie Unterernährung oder Stress während der Schwangerschaft, und folgerten daraus, dass männliche und weibliche Feten verschiedene Adaptionsmechanismen besitzen.^{128, 129} So äußerten Clifton et al. die These, dass weibliche Feten mit einer höheren GC-Sensibilität auf maternalen Stress reagierten, indem sie weniger in Wachstum und dafür mehr in Überleben investierten. Dies diene möglicherweise der Sicherung der Reproduktionsfähigkeit mit Spezieserhalt. Männliche Feten würden dagegen mit einer partiellen Resistenz gegenüber GC reagieren und mehr in fetales Wachstum investieren, was ihnen evolutionär betrachtet nach der Geburt größere Überlebensvorteile biete.¹²⁸ Tatsächlich wiesen Braun et al. nicht nur eine generelle Reduktion des Geburtsgewicht durch eine antenatale BET-Gabe nach, sondern auch, dass dieser Effekt bei weiblichen Neugeborenen stärker ausgeprägt war.⁸⁰ Murphy et al. stellten fest, dass nicht-behandeltes maternales Asthma zu leicht erhöhten Kortisolwerten im Nabelschnurblut führte. Diese wiederum bewirkten nur bei weiblichen Feten eine Abnahme des Geburtsgewichts um 12%.¹³⁰ Folgt man nun der Annahme, dass maternaler Stress, auch in Form von synthetischen GC, bei weiblichen Feten zu einer Reduktion des Wachstums und zu einer Verstärkung der für das Überleben notwendigen Prozesse führt, müsste man eine Herunterregulation von wachstumssteuernden Genen und eine Hochregulation von Genen, die für das zelluläre Überleben essenziell sind, erwarten. Die meisten der bekannten (und alle der hier untersuchten) ICG haben für das Überleben der Zelle absolut notwendige Funktionen.⁵ Dieser Zusammenhang könnte erklären, warum eine BET-bedingte Regulation von ICG nur in Plazenten weiblicher Feten stattfindet.

Zusammenfassend: Bei vier der sieben getesteten ICG fand sich eine signifikante behandlungsabhängige Hochregulation der mRNA-Expression in der Gruppe der weibli-

chen Reifgeborenen. Bei den anderen drei ICG ließ sich ebenfalls ein Trend dazu beobachten. Somit scheinen die Plazenten weiblicher Feten sensibler auf eine antenatale GC-Gabe zu reagieren.

Insgesamt zeigte sich in der „klassischen“ Analyse nur für SDHA und YWHAZ eine von der placentaren Lokalisation, dem Schwangerschaftsalter bei Geburt, dem fetalen Geschlecht und der BET-Behandlung unabhängige Expression. Alle anderen hier getesteten ICG wären entsprechend dieser Auswertung nicht zur Normalisierung von Zielgenen geeignet.

4.3 Vergleich der Software-basierten Algorithmen zur ICG-Validierung

Es gilt hierbei aber zu beachten, dass die „klassische“ Methode nur die Gruppenmittelwerte vergleicht, jedoch nicht die Variationen der Proben innerhalb der gleichen Gruppe berücksichtigt. Einige Autoren postulierten bereits, dass die „klassische“ Analyse zur Evaluation von ICG unzulänglich sei.^{16, 124} Hohe Schwankungen in der Expression führen zu einer hohen SD und diese wiederum zu weniger verlässlichen Aussagen über Unterschiede zwischen den Gruppen. So werden ICG möglicherweise fälschlich als stabil eingestuft, da sich aufgrund der hohen SD weniger signifikante Unterschiede offenbaren. Des Weiteren wird für die RT-qPCR stets eine einheitliche Menge von totaler RNA eingesetzt, wodurch nur die relative Expression eines Gens gemessen wird. Verändert sich jedoch die totale RNA-Menge, beispielsweise durch eine stark gesteigerte mRNA-Expression anderer Gene, kann sich das Verhältnis der ICG-mRNA zur totalen mRNA verschieben, ohne dass sich die eigentliche ICG-Expression verändert. Dieser Verdünnungseffekt wird in der „klassischen“ Analyse nicht berücksichtigt, kann aber gerade in der Wachstums- und Differenzierungsphase von Gewebe ins Gewicht fallen.^{16, 124, 125}

Um diese Nachteile auszugleichen wurden Algorithmen zur ICG-Validierung entwickelt.^{10, 12, 16} Da jeder bisher entwickelte Algorithmus seine eigenen Stärken und Schwächen mit sich bringt, schlagen De Spiegelaere et al. vor, mehrere Algorithmen in die Evaluation von ICG miteinzubeziehen.¹⁸ In der vorliegenden Studie wurden die Software-basierten Algorithmen geNorm, NormFinder und BestKeeper verwendet. geNorm berechnet über paarweise Vergleiche sowohl das Verhältnis der ICG-Expressionen zwischen den Proben, als auch das Verhältnis der ICG untereinander.¹⁰ NormFinder ermittelt die Expressionsstabilität jedes einzelnen ICG durch Schwankungen innerhalb und zwischen den zu

untersuchenden Gruppen.¹⁴ BestKeeper analysiert zunächst die Expressionsstabilität jedes ICG für sich und vergleicht im nächsten Schritt über Korrelationsanalysen die Expression eines ICG mit dem BestKeeper-Index, gebildet durch das geometrische Mittel der höchstkorrelierten ICG.¹⁹

Im Folgenden werden die Ergebnisse der geNorm-Analyse mit denen der NormFinder- und BestKeeper-Analysen verglichen.

4.3.1 Vergleich von geNorm mit BestKeeper und NormFinder

In bisherigen geNorm-Studien in der humanen Plazenta stellten sich besonders YWHAZ, TOP1, SDHA und HPRT1 als valide ICG heraus.²²⁻²⁸ Je nach Studie wurden unterschiedliche Aspekte, wie Geburtsmodus, fetale Wachstumsrestriktion, Präeklampsie oder Gestationsdiabetes analysiert. Da TOP1 in der IPA-Analyse mehrere direkte Ko-Regulationen zu anderen ICG aufzeigte (Abb. 5 und 6) und da Ko-Regulationen die geNorm-Analyse verfälschen können, wurde dieses ICG vorneherein aus der vorliegenden Studie ausgeschlossen.

Erstaunlicherweise befanden sich die sonst als sehr stabil bewerteten ICG YWHAZ und HPRT1 in dieser Studie unter den drei am wenigsten geeigneten ICG, und zwar unabhängig davon, ob die Analyse mit dem gesamten Probenkollektiv durchgeführt wurde oder die zentralen und peripheren Proben jeweils getrennt analysiert wurden (Abb. 10). Dagegen wurden PPIA, RPL19 und HMBS als sehr stabil eingestuft. Möglicherweise sind Unterschiede im Studiendesign für diese abweichenden Ergebnisse verantwortlich. So ist die hier vorgestellte Studie die erste, die einen regulierenden Einfluss einer GC-Gabe auf ICG-Expressionen untersucht.

Die Ergebnisse der geNorm-Analyse wurden unter Anwendung der BestKeeper- und NormFinder-Software bestätigt (Abb. 11 und 12). Nach der BestKeeper-Analyse ist YWHAZ das ICG mit der höchsten SD. Es weist also innerhalb des Probenkollektivs hohe Schwankungen in der Expression auf. Unterliegen die anderen ICG nicht denselben Schwankungen, ergeben sich daraus hohe SD der paarweisen Vergleiche von YWHAZ mit allen anderen ICG und damit ein hoher M-Wert in der geNorm-Analyse. Die SD von HPRT1 liegt in der BestKeeper-Analyse im Mittelfeld. Allerdings ist es das ICG mit dem niedrigsten Pearson-Korrelationskoeffizient verglichen zum BestKeeper-Index, der sich aus dem geometrischen Mittel aller ICG berechnet. Somit weicht das Expressionsprofil von HPRT1 am stärksten von dem aller anderen ICG ab. Diese Abweichung kann in der

geNorm-Analyse zu einer hohen SD in den paarweisen Vergleichen aller ICG-Kombinationen mit HPRT1 und zu einem hohen M-Wert führen.

Mit B2M verhält es sich ähnlich. In der BestKeeper-Analyse weist es von allen ICG die niedrigste SD auf, was auf geringe Expressionsschwankungen innerhalb des Probenkollektivs hinweist. Allerdings ist auch hier der Korrelationskoeffizient zum BestKeeper-Index relativ gering.

Die beiden von geNorm als sehr stabil bewerteten ICG PPIA und HMBS liegen auch in der BestKeeper-, sowie in der NormFinder-Analyse auf den besten drei (beziehungsweise vier) Plätzen. Sie zeigen einerseits eine gleichmäßige Expression über das Probenkollektiv auf (geringe SD und NormFinder-Stabilitätskonstante) und haben andererseits die größte Übereinstimmung mit dem Expressionsprofil der anderen ICG (hoher Korrelationskoeffizient mit BestKeeper-Index). Damit erfüllen sie die beiden Eigenschaften, die Vandesompele et al. für geeignete ICG voraussetzen.¹⁰

SDHA platziert sich in allen Algorithmen im Mittelfeld. Für RPL19 lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse nur schwer zusammenfügen. In der geNorm-Analyse gehört es unabhängig von der Lokalisation der Proben zu den beiden stabilsten ICG. Außerdem korreliert es am stärksten mit dem BestKeeper-Index. Da diese Algorithmen die Expressionen der verschiedenen ICG untereinander vergleichen, zeigt dieses Ergebnis an, dass sich das Expressionsprofil von RPL19 sehr ähnlich zu dem der anderen ICG verhält. Allerdings scheint RPL19 stärkeren Schwankungen zu unterliegen, als die meisten anderen ICG, sichtbar an der hohen SD in der BestKeeper-Analyse. Besonders auffallend sind jedoch die unterschiedlichen Ergebnisse für RPL19 der NormFinder-Berechnungen beim Vergleich der zentralen mit den peripheren Proben. Innerhalb der zentralen Proben weist RPL19 den höchsten Stabilitätswert auf und gilt damit als das Gen mit den größten Expressionsschwankungen. Dieses Ergebnis stimmt mit der hohen SD der BestKeeper-Analyse der zentralen Proben überein. Bei alleiniger NormFinder-Analyse der peripheren Proben ist RPL19 allerdings mit Abstand das stabilste ICG, obwohl es laut BestKeeper-Analyse eine hohe SD besitzt.

Zusammenfassend: In der geNorm-Analyse waren PPIA, RPL19 und HMBS unter den stabilsten drei ICG, wohingegen B2M, HPRT1 und YWHAZ für eine Normalisierung weniger geeignet erschienen. Dieses Ergebnis konnte bis auf wenige Ausnahmen durch die NormFinder- und BestKeeper-Analysen reproduziert werden.

4.3.2 Software-übergreifendes Ranking

Da jeder der Algorithmen seine eigenen Stärken und Schwächen mit sich bringt (siehe auch 1.1.3), können sie nur in der Gesamtschau betrachtet zu einer umfangreicheren Einschätzung der getesteten ICG beitragen. Insgesamt führt die Anwendung aller drei Programme zu ähnlichen Ergebnissen (Tab. 12). Gerade geNorm und die Korrelationsanalyse des jeweiligen ICG mit dem BestKeeper-Index zeigen große Übereinstimmungen. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass beide Analysen das Expressionsprofil mehrerer ICG miteinander vergleichen. Für beide Algorithmen gilt: Je mehr die Expression eines ICG der Expression der anderen gleicht, desto höher wird die Stabilität des ICG eingestuft. Aber auch die NormFinder-Analyse, die nur die Expressionsstabilität jedes ICG für sich analysiert, erzielt (mit Ausnahme von RPL19 in den zentralen Proben) ähnliche Ergebnisse. Lediglich die Bewertung über die SD in der BestKeeper-Analyse zeigt ein anderes Bild. Laut De Spiegelaere et al. ist sie zwar ein schwächeres Maß für die Bewertung der Expressionsstabilität als der Pearson-Korrelationskoeffizient der BestKeeper-Analyse.¹⁸ Dennoch liefert sie zusätzliche Informationen zur ICG-Evaluation und sollte daher in die Interpretation miteinbezogen werden.

In der vorliegenden Studie wurde aus den Ergebnissen der geNorm-, NormFinder- und BestKeeper-Analysen ein Software-übergreifendes Ranking erstellt (Tab. 12). Auch wenn aufgrund der Unterschiede der drei hier verwendeten Algorithmen ein direkter Vergleich unmöglich ist, erschien es am plausibelsten, für jedes ICG die Mittelwerte der Platzierungen zu ermitteln und die ICG aufsteigend zu sortieren. Der Vorteil daran ist, dass alle drei Algorithmen in einem Ranking zusammengefasst werden konnten. Trotzdem sollte auch jede Software entsprechend ihrer Stärken und Schwächen für sich betrachtet werden. Die Reihenfolge der ICG, die sich aus dem Software-übergreifenden Ranking ergibt entspricht bis auf kleinere Abweichungen den Ergebnissen der geNorm-Analyse. Daher gehen wir davon aus, dass die geNorm-Analyse ein geeignetes Verfahren zur ICG-Validierung ist.

Zusammenfassend: Um die Ergebnisse aller Software-basierten Analysen zu berücksichtigen wurde ein übergreifendes Ranking erstellt, dessen Ergebnisse weitestgehend mit denen der geNorm-Analyse übereinstimmen.

4.3.3 Vergleich zentraler und peripherer Proben.

In der NormFinder-Analyse finden sich innerhalb der zentralen Proben deutlich geringere und damit bessere Stabilitätswerte als innerhalb der peripheren Proben. Da sich die Stabilitätswerte sowohl aus den Variationen innerhalb der Gruppen, als auch aus den Variationen zwischen den Gruppen berechnen, spricht dies für insgesamt stabilere Expressionswerte der ICG in der Gruppe der zentralen Proben. Dies spiegelt sich auch in der geringeren SD der BestKeeper-Analyse der zentralen Proben wieder, verglichen mit den SD der peripheren Proben. Möglicherweise sind solche regionalen Unterschiede in der Expressionsstabilität auf morphologische Ursachen, wie eine schwächere Vaskularisierung der Plazentaperipherie (siehe 1.1.4.1 und 4.2.1), zurückzuführen.³³ Höhere Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen könnten auch erklären, warum nach der „klassischen“ Analyse der peripher entnommenen Proben weniger signifikante Gruppeneffekte sichtbar werden.

Mit der bereits erwähnten Ausnahme von RPL19 in der NormFinder-Analyse nimmt die placentare Lokalisation der Proben keinen wesentlichen Einfluss auf das Ranking der ICG in allen drei Algorithmen.

Zusammenfassend: Auch wenn die Expressionswerte in den peripheren Proben insgesamt höheren Schwankungen unterliegen, unterscheiden sich die Ergebnisse der Software-basierten Analysen nicht wesentlich in Abhängigkeit von der placentaren Lokalisation.

4.3.4 Anzahl der ICG zur Normalisierung

Als einziger der drei Algorithmen erlaubt geNorm eine Aussage darüber, wie viele ICG zur Normalisierung notwendig sind. Vandesompele et al. schlagen vor, dass ab einer paarweisen Variation von $V \leq 0,15$ kein weiteres ICG zur Normalisierung hinzugefügt werden müsse.¹⁰ Allerdings sollte bedacht werden, dass dieser Grenzwert willkürlich gewählt wurde. Nach dieser Regel erschien in der vorliegenden Studie die Verwendung von drei oder vier ICG sinnvoll, je nachdem ob nur die zentralen, nur die peripheren oder alle Plazentaprobe in die geNorm-Analyse eingeschlossen wurden. Insgesamt lag jedoch die paarweise Variation $V_{3/4}$, die über das Hinzufügen eines vierten ICG entscheidet in allen drei Analysen nahe an der Grenze von 0,15 (gesamt: $V_{3/4}=0,146$, zentral: $V_{3/4}=0,137$, peripher: $V_{3/4}=0,156$).

Entsprechend der Ergebnisse der geNorm-Analyse und des Software-übergreifenden Rankings sind die drei stabilsten ICG PPIA, RPL19 und HMBS (in variierender Reihenfolge). SDHA befindet sich jeweils auf dem vierten Platz. Werden die Ergebnisse der „klassischen“ Analyse in die Überlegungen einbezogen, wird sichtbar, dass die Expressionen von PPIA, RPL19 und HMBS innerhalb der zentralen Proben signifikante Gruppenunterschiede aufweisen. Für SDHA wurden dagegen keine signifikanten Effekte durch das fetale Geschlecht, das Gestationsalter oder die BET-Behandlung gefunden. Daher erscheint es durchaus gerechtfertigt, SDHA als viertes ICG in die Normalisierung mit aufzunehmen.

Zusammenfassend: Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen ist die Kombination aus vier ICG (HMBS, PPIA, RPL19, SDHA) für die Normalisierung von RT-qPCR-Daten geeignet.

4.3.5 Vergleich der geNorm-Ergebnisse mit der IPA-Analyse

Da die geNorm-Analyse verfälscht werden kann, wenn die getesteten ICG untereinander ko-reguliert werden, wurde vor Beginn der Studie (Dezember 2013) eine IPA-Analyse durchgeführt und nur die ICG eingeschlossen, die keine oder nur sehr wenige Interaktionen aufwiesen (siehe 3.3.2, Abb. 5 und 6). Um die geNorm-Ergebnisse auch im Nachhinein zu validieren wurde die IPA-Analyse nach Abschluss der geNorm-Analyse mit den sieben getesteten ICG wiederholt (Mai 2015, Abb. 7). Inzwischen zeigten sich deutlich mehr direkte Ko-Regulationen, darunter auch zwischen RPL19 und PPIA, welche von geNorm am besten bewertet wurden. Zwischen PPIA, HMBS und SDHA, sowie zwischen RPL19, HMBS und SDHA zeigten sich keine Ko-Regulationen. HMBS und SDHA gehörten laut geNorm ebenfalls zu den stabilsten vier ICG (Abb. 10).

Die Studie, die eine Ko-Regulation zwischen RPL19 und PPIA aufzeigte, wurde von Guo et al. durchgeführt und untersuchte den Einfluss des Proto-Onkogens MYC auf die Genexpression in kultivierten Rattenfibroblasten.¹¹¹ Dazu wurden vergleichende cDNA-Microarrays mit Zellen mit normaler MYC-Expression, mit Zellen ohne MYC-Expression und mit Zellen, in denen künstlich eine MYC-Überexpression erzeugt wurde, durchgeführt. Es fanden sich insgesamt 198 Gene, darunter auch RPL19 und PPIA, deren Expression von MYC reguliert wurde. Inwiefern diese Ergebnisse auf die humane Plazenta übertragen werden können, ist unklar. Bisher ist noch kein Einfluss der MYC-Expression auf RPL19 und PPIA in der humanen Plazenta bekannt. Um dennoch eine Verfälschung

des geNorm-Ergebnisses durch eine potenzielle Ko-Regulation dieser beiden Gene auszuschließen, wurde die geNorm-Analyse zweimal wiederholt und dabei RPL19 oder PPIA nacheinander ausgeschlossen (Tab. 11). In keinem Fall führte das Weglassen eines der beiden ICG zu einer Veränderung im Ranking der übrigen ICG. Somit wurden die ausgewählten ICG belassen und die geNorm-Analyse mit allen sieben ICG durchgeführt.

Dieses Beispiel zeigt allerdings, wie wichtig es ist, frühere Ergebnisse immer wieder neu zu hinterfragen und in den Kontext aktueller Forschungen einzuordnen.

Zusammenfassend: In der Wiederholung der IPA-Analyse zeigte sich eine Ko-Regulation zwischen RPL19 und PPIA. Diese nahm jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse der geNorm-Analyse.

4.3.6 Empfehlung für die Normalisierung von Zielgenen

Die vorliegende Studie kommt zu dem Ergebnis, dass für die Untersuchung des Einflusses einer antenatalen GC-Exposition im Rahmen einer Lungenreifeinduktion auf die Zielgenexpression in der humanen Plazenta eine Normalisierung von RT-qPCR-Daten mit der Kombination aus den ICG PPIA, RPL19, HMBS und SDHA vorgenommen werden sollte. Diese Empfehlung gilt unabhängig von der Lokalisation der Proben, dem Schwangerschaftsalter bei Geburt und dem fetalen Geschlecht.

4.4 Auswirkungen verschiedener Normalisierungsverfahren auf die Zielgenexpression

In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass die Expression der früher als stabil angenommenen ICG, in Abhängigkeit von dem jeweiligen Studiendesign, Schwankungen unterliegen kann.^{7, 8, 10, 16} So ist es naheliegend, dass instabil exprimierte ICG die Ergebnisse von RT-qPCR-Studien verfälschen können, wenn sie zur Normalisierung von Zielgenen eingesetzt werden.^{4, 10} Xu et al. normalisierten die RT-qPCR-Rohdaten des GC-Rezeptors α (NR3C1) in der fetalen Schafsleber mit verschiedenen ICG beziehungsweise ICG-Kombinationen und verglichen die normalisierten Expressionswerte miteinander.¹⁶ Je nach Normalisierungsverfahren zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Daher ist es unbedingt notwendig, im Vorfeld die Stabilität der ICG unter den vorliegenden Versuchsbedingungen zu evaluieren.

Auch in der hier vorliegenden Studie konnte anhand des Zielgens NR3C1 bestätigt werden, dass der Einsatz verschiedener ICG zur Normalisierung von Zielgenen in RT-qPCR-

Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Auswertung führt (Abb. 13 und 14). Sowohl in den zentralen, als auch in den peripheren Plazentaprobe ergaben sich je nach verwendeten ICG unterschiedliche Expressionsmuster des NR3C1-Gens. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Gebrauch ungeeigneter ICG RT-qPCR-Ergebnisse verfälschen kann.

Die Analyse der Algorithmen ergab, dass eine Kombination der vier stabilsten ICG aus der geNorm-Analyse (HMBS, PPIA, RPL19 und SDHA) am besten für die Normalisierung geeignet sei. Innerhalb der peripheren Proben führte eine Normalisierung mit dieser Kombination zu signifikanten geschlechtsabhängigen Unterschieden mit einer höheren NR3C1-Expression für die weiblichen Neugeborenen (Abb. 14). Laut „klassischer“ Analyse wären für die peripheren Proben alle getesteten ICG zur Normalisierung geeignet, da sie durch die untersuchten Faktoren nicht signifikant reguliert wurden. Eine Normalisierung mit SDHA alleine zeigte zwar auch signifikante geschlechtsabhängige Unterschiede auf, allerdings führte eine Normalisierung mit HPRT1 oder RPL19 zu keinen signifikanten Effekten auf die NR3C1-Expression. Obwohl also SDHA, HPRT1 und RPL19 nach der „klassischen“ Analyse gleichermaßen zur Normalisierung geeignet wären, ergaben sich durch ihre Verwendung unterschiedliche Ergebnisse. Dies unterstreicht die Unzulänglichkeit der „klassischen“ Analyse bei der Auswahl von ICG.

Innerhalb der zentralen Proben offenbarten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede, wenn NR3C1 mit den stabilsten vier ICG aus der geNorm-Analyse normalisiert wurde (Abb. 13). Eine Normalisierung allein mit SDHA, das laut „klassischer“ Analyse für zentrale Plazentaprobe am geeignetsten erschien, führte dagegen zu einem signifikanten geschlechtsabhängigen Effekt. Auch hier widersprechen die Ergebnisse der geNorm-Analyse also denen der „klassischen“ Analyse. Nach dieser wären lediglich SDHA oder YWHAZ als ICG geeignet, da sich für die anderen ICG signifikante Gruppenunterschiede in der Expression zeigten.

Es stellt sich nun die Frage, wie es möglich ist, dass ICG, die sich in der „klassischen“ Analyse als reguliert erweisen, sich trotzdem für die Normalisierung von Zielgenen eignen. Wie bereits unter 4.2.3 und 4.3 als „Verdünnungseffekt“ beschrieben, kann die „klassische“ Analyse zu Fehlinterpretationen führen, da sie nicht das Verhältnis von mRNA zur gesamten RNA-Menge berücksichtigt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass es Verschiebungen im Verhältnis der einzelnen RNA-Anteile geben kann.^{16, 124, 125} Auch in der vorliegenden Studie hat sich das Verhältnis der ICG-mRNA zur gesamten RNA in den

letzten Schwangerschaftswochen verschoben. Die paarweisen Vergleiche der ICG-Expression in der geNorm-Methode ermöglichen eine Berücksichtigung der Verhältnisse der ICG-Expressionen zueinander. Bleibt das Verhältnis der ICG zueinander konstant, sind signifikante Unterschiede in der „klassischen“ Analyse eher auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen. Tatsächlich regulierte ICG fallen dagegen in der geNorm-Analyse durch hohe M-Werte auf, da ihr Verhältnis zu den anderen ICG Schwankungen unterliegt.¹⁰ Somit ist geNorm als verlässlichere Methode zu bewerten. Die Ergebnisse der geNorm-Analyse wurden in der vorliegenden Arbeit unter Hinzuziehen der beiden Algorithmen NormFinder und BestKeeper verifiziert.

Zusammenfassend: Anhand von unterschiedlichen Ergebnisse der Zielgenexpression nach Normalisierung mit verschiedenen ICG konnte gezeigt werden, dass die „klassische“ Analyse alleine zur Auswahl stabiler ICG ungeeignet ist. Mithilfe der Software-basierten Algorithmen geNorm, NormFinder und BestKeeper ließ sich eine valide ICG-Kombination zur Normalisierung von RT-qPCR-Daten finden.

Da die vorliegende Studie zum Ziel hatte, geeignete ICG für weitere Genexpressionsstudien zu finden, wurde für deren Durchführung nur eine ausgewählte Subpopulation einer Kohorten-Studie mit geringem Probandinnenumfang (n=48) verwendet. Somit ist das Studiendesign unzureichend, um verlässliche Aussagen über Zielgenexpressionen zu treffen. Die Zielgen-Analyse wurde lediglich zu Demonstrationszwecken für die ICG-Bewertung durchgeführt.

4.5 Limitationen der Studie

Selektionsbias. Bei dem Studiendesign der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Studie. Dafür wurde eine repräsentative Subpopulation einer Kohorten-Studie der AG „Experimentelle Geburtsmedizin“ der Klinik für Geburtsmedizin der Charité (Arbeitstitel: „Auswirkungen maternaler Glukokortikoidgaben im Rahmen der Lungenreifeinduktion bei drohender Frühgeburt auf das maternale Plazentalaktogen“, Ethik-Antragsnummer: EA2/149/07) ausgewählt, die die Auswirkungen einer antenatalen GC-Gabe im Rahmen der Lungenreifeinduktion auf die Plazenta analysiert. Alle Teilnehmerinnen an der Studie waren schwangere Frauen, die in der Klinik für Geburtsmedizin der Charité entbunden wurden. Das Perinatalzentrum der Charité erhielt vom Gemeinsamen

Bundesausschuss eine Level-I-Zertifizierung, welche die hohen medizinischen Standards für die Betreuung von Risikoschwangerschaften und -geburten attestiert. Dies bedingt eine Verschiebung des Patientenlientels zugunsten eines höheren Anteils an Frauen mit Risikoschwangerschaften. Zudem wurde innerhalb des Studienkollektivs entsprechend der Ein- und Ausschlusskriterien der vorliegenden Studie eine weitere Selektion vorgenommen (siehe 2.1). Demnach ist eine Übertragbarkeit des Probandenkollektivs auf die Allgemeinbevölkerung nur bedingt möglich.

Informationsbias. Sämtliche personenbezogene Daten, sowie die Informationen über den Schwangerschaftsverlauf entstammen den stationären Patientenakten. Vor Einschluss in die Studie wurden die Akten auf die festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien überprüft (siehe 2.1). Die Angaben zu den in der Studie untersuchten Faktoren BET-Behandlung, fetales Geschlecht und Schwangerschaftsalter bei Geburt sind ebenfalls auf die Patientenakten zurückzuführen. Eine unvollständige oder fehlerhafte Dokumentation während des stationären Aufenthalts könnte demnach zu einer Verzerrung der Ergebnisse geführt haben.

Systematische Fehler. Generell können systematische Fehler durch falsch geeichte Geräte sowie Ungenauigkeiten in der Versuchsdurchführung entstehen. Gerade die RT-qPCR ist eine sensible Methode, die hohe Sorgfalt bei der Gewebe- und Probenaufbereitung, bei der Durchführung der Messungen und bei der Auswertung voraussetzt. Um dies zu gewährleisten wurde sich in der vorliegenden Arbeit an den MIQE-Empfehlungen zur standardisierten Durchführung von RT-qPCR-Studien orientiert.⁴ Zur Minimierung von Pipettierfehlern oder Messfehlern durch Verunreinigung wurden alle Versuche in Dreifachbestimmung durchgeführt. Jede RT-qPCR-Messung erfolgte in Anwesenheit einer internen Kontrolle und einer Negativkontrolle. Die Amplifikation des richtigen PCR-Produkts wurde mit einer Schmelzkurvenanalyse am Ende jeder Messung verifiziert und das Produkt sequenziert.

Um Fehler in der Datenerfassung und -übertragung möglichst gering zu halten, wurden die Daten sowohl in Papierform, als auch elektronisch dokumentiert und miteinander abgeglichen.

RNA-Degradation. Eine Schwäche dieser Studie liegt in den hohen Schwankungen der Expressionswerte, die sich in einer hohen SD widerspiegelt. Dies scheint jedoch ein bekanntes Problem bei Studien an humanen Plazentaprobe zu sein. So berichten auch Pidoux et al. hohe inter- und intraplazentare Schwankungen in der Expression von placentaren Hormonen.³⁷ Eine mögliche Ursache für Schwankungen in den Expressionsmesswerten kann eine hohe RNA-Degradation der Proben sein, die zur Verfälschung von RT-qPCR-Ergebnissen führen kann.¹³¹ Auch wenn nur wenige Autoren die RNA-Integrität vor Expressionsstudien überprüfen und veröffentlichen, ist die RNA-Degradation ein bekanntes Problem in placentarem Gewebe.^{23, 29, 30, 95} Dies ist womöglich auf eine hohe RNase-Aktivität zurückzuführen.⁹⁵ Fajardy et al. führten eine Studie in der humanen Plazenta mit RIN-Werten zwischen 4,50 und 7,22 durch.²⁹ Huang et al. testeten die ICG-Expression in der humanen Plazenta in Abhängigkeit von RIN-Werten zwischen 2 und 8 und beobachteten ab einem RIN-Wert von 5 weitgehend stabile ICG-Expressionen.³⁰ In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Verfahren zur Gewebezerkleinerung, Homogenisierung und RNA-Extraktion im Hinblick auf die RNA-Qualität evaluiert und optimiert (Tab. 6). Es wurde sich für das Verfahren entschieden, das die höchsten RIN-Werte lieferte. Diese lagen zwischen 3,0 und 7,4, wobei nur zwei Proben RIN-Werte von 3,0 zeigten. Alle anderen Werte waren $\geq 4,0$. Der durchschnittliche RIN-Wert betrug 5,7. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der RIN-Werte zwischen den Gruppen, die in dieser Studie miteinander verglichen wurden. Somit ist es unwahrscheinlich, dass Gruppenunterschiede in der Genexpression auf Unterschiede der RIN-Werte zurückzuführen sind. Insgesamt befanden sich die RIN-Werte der vorliegenden Studie in einem akzeptablen Bereich, in dem keine wesentlichen Auswirkungen auf die Genexpression zu erwarten sind.

Fallzahl. Sicherlich würde eine höhere Fallzahl die SD in dieser Studie senken, sodass eine verlässlichere Beurteilung der Regulation der ICG-Expression durch die beschriebenen Faktoren möglich wäre. Die primären Ziele dieser Studie waren jedoch zu zeigen, (1) dass eine Regulation von ICG stattfindet, (2) dass die Auswahl der ICG die Ergebnisse der Zielgenexpression beeinflusst, sowie (3) ein Set aus ICG zu finden, das unter den gegebenen Studienbedingungen eine valide Normalisierung von Zielgenen erlaubt. Da sich signifikante Unterschiede in den statistischen Auswertungen fanden, war die Fallzahl ausreichend, um die Ziele (1) und (2) zu erreichen. Schwankungen in der Expression

spiegeln sich auch in der von geNorm ermittelten paarweisen Variation V wieder.¹⁰ Dennoch war es mit der vorliegenden Fallzahl möglich, bei einer Kombination aus vier ICG einen Wert von $V \leq 0,15$ zu erreichen. Die geNorm-Ergebnisse wurden durch die Algorithmen BestKeeper und NormFinder verifiziert. Da eine Fallzahlerhöhung lediglich die Reliabilität der „klassischen“ Analyse verbessern würde, jedoch nicht die der Software-basierten Algorithmen, war die Fallzahl dieser Studie ausreichend.

5. Schlussfolgerung

Um verlässliche Ergebnisse in RT-qPCR-Studien zu erzielen, bedarf es stabiler ICG zur Normalisierung von Zielgenen, deren Expression nicht durch die zugrundeliegenden Versuchsbedingungen beeinflusst wird. Diese Studie ist die erste, die den Einfluss einer einmaligen antenatalen GC-Therapie mit 2x12mg BET zur Lungenreifeinduktion auf das Expressionsverhalten von ICG in der humanen Plazenta untersucht. Zudem wurden möglichen Regulationen durch das Schwangerschaftsalter bei Geburt, das fetale Geschlecht, sowie die Lokalisation der Plazentaprobe analysiert. Die Besonderheit dieser Studie liegt darin, dass mehrere Analyseverfahren angewandt und miteinander verglichen wurden.

In der „klassischen“ Analyse wurde jedes ICG auf signifikante Gruppenunterschiede getestet. Dabei zeigten sich in den zentral entnommenen Proben bei fünf von sieben ICG signifikante Effekte durch die getesteten Faktoren, besonders innerhalb der Gruppe der weiblichen Neugeborenen. Demzufolge wären lediglich SDHA und YWHAZ für die Normalisierung von Zielgenen geeignet. In den peripher entnommenen Proben wurden dagegen keine signifikanten Genregulationen beobachtet. Zudem wurde unabhängig von der Lokalisation eine Abnahme der totalen RNA-Menge über das Schwangerschaftsalter hinweg beobachtet, die sowohl die mRNA der ICG, als auch – in größerem Ausmaß – die ribosomale RNA 18S und 28S betraf. Dieser Verdünnungseffekt der mRNA wird in der „klassischen“ Analyse nicht berücksichtigt und kann zu einer fehlerhaften Auswertung führen. Da dieses Verfahren noch weitere Schwächen aufweist, wurden zur ICG-Validierung die drei Software-basierten Algorithmen geNorm, NormFinder und BestKeeper hinzugezogen, die nicht nur jedes ICG für sich analysieren, sondern auch Vergleiche der ICG-Expressionen untereinander durchführen. Um eine Verfälschung der Berechnungen durch potenzielle Ko-Regulationen der ICG untereinander auszuschließen, wurden die sieben ICG in einer webbasierten IPA-Analyse auf Interaktionen überprüft. Mithilfe der Algorithmen konnte eine valide Kombination aus vier ICG (HMBS, PPIA, RPL19, SDHA) gefunden werden, welche sich für die Normalisierung innerhalb von RT-qPCR-Studien eignet.

Um die Notwendigkeit der Verwendung valider ICG zu untermauern, wurden die RT-qPCR-Rohdaten des exemplarischen Zielgens NR3C1 mit verschiedenen ICG bezie-

hungsweise ICG-Kombinationen normalisiert. Hierbei ergaben sich je nach Normalisierungsverfahren signifikante Unterschiede in der Auswertung. Der Einsatz ungeeigneter ICG würde also zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen.

Nach Normalisierung von NR3C1 mit der am besten geeigneten ICG-Kombination zeigten sich für die peripheren Plazentaprobe geschlechtsabhängige Expressionsunterschiede für NR3C1. Weder in den zentralen, noch in den peripheren Proben ließ sich ein Effekt durch eine antenatale BET-Behandlung oder das Schwangerschaftsalter bei Geburt nachweisen. Da die Zielgen-Analyse lediglich zu Demonstrationszwecken durchgeführt wurde, bedarf es einer größeren Studie mit einer höheren Fallzahl, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

Zusammenfassend betrachtet konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Expression von ICG in der humanen Plazenta in Abhängigkeit einer BET-Behandlung, des Schwangerschaftsalters bei Geburt, des fetalen Geschlechts und/ oder der Lokalisation der Plazentaprobe reguliert werden kann. Dennoch gelang es mithilfe der Algorithmen geNorm, NormFinder und BestKeeper, eine valide Kombination aus stabilen ICG zu finden, die sich für das hier vorliegende Studiendesign zur Normalisierung von Zielgenen eignet. Anhand des Zielgens NR3C1 wurde demonstriert, dass der Einsatz ungeeigneter ICG zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann.

Diese Studie versteht sich als Vorarbeit für sich anschließende Genexpressionsstudien an der humanen Plazenta, die den Einfluss einer antenatalen BET-Behandlung zur Lungenreifeinduktion untersuchen. Zudem hebt sie allgemein die Wichtigkeit von ICG-Validierungen hervor, die den eigentlichen Versuchen vorangehen und an die jeweiligen Versuchsbedingungen angepasst werden sollten. Als methodische Arbeit diskutiert sie verschiedene Verfahren der ICG-Evaluation und zeigt ein mögliches Vorgehen zur Findung geeigneter ICG auf.

Literaturverzeichnis

- 1 Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005; 6: 279-84
- 2 Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15: 155-66
- 3 Hansen MC, Nielsen AK, Molin S, Hammer K, Kilstруп M. Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. *J Bacteriol* 2001; 183: 4747-51
- 4 Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611-22
- 5 Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2000; 2: 143-7
- 6 Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; 75: 291-5
- 7 Spanakis E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3809-19
- 8 Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 2002; 309: 293-300
- 9 Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004; 59: 566-73
- 10 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0034
- 11 Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000; 24: 227-35
- 12 Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* 2010; 11: 74
- 13 Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley G, Wittwer CT, Schjerling P, Day PJ, Abreu M, Aguado B, Beaulieu JF, Beckers A, Bogaert S, Browne JA, Carrasco-Ramiro F, Ceelen L, Ciborowski K, Cornillie P, Coulon S, Cuypers A, De Brouwer S, De Ceuninck L, De Craene J, De Naeyer H, De Spiegelaere W, Deckers K,

- Dheedene A, Durinck K, Ferreira-Teixeira M, Fieuw A, Gallup JM, Gonzalo-Flores S, Goossens K, Heindryckx F, Herring E, Hoenicka H, Icardi L, Jaggi R, Javad F, Karampelias M, Kibenge F, Kibenge M, Kumps C, Lambertz I, Lammens T, Markey A, Messiaen P, Mets E, Morais S, Mudarra-Rubio A, Nakiwala J, Nelis H, Olsvik PA, Perez-Novo C, Plusquin M, Remans T, Rihani A, Rodrigues-Santos P, Rondou P, Sanders R, Schmidt-Bleek K, Skovgaard K, Smeets K, Tabera L, Toegel S, Van Acker T, Van den Broeck W, Van der Meulen J, Van Gele M, Van Peer G, Van Poucke M, Van Roy N, Vergult S, Wauman J, Tshuikina-Wiklander M, Willems E, Zaccara S, Zeka F, Vandesompele J. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods* 2013; 10: 1063-7
- 14 Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64: 5245-50
- 15 Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000; 46: 69-81
- 16 Xu H, Bionaz M, Sloboda DM, Ehrlich L, Li S, Newnham JP, Dudenhausen JW, Henrich W, Plagemann A, Challis JR, Braun T. The dilution effect and the importance of selecting the right internal control genes for RT-qPCR: a paradigmatic approach in fetal sheep. *BMC Res Notes* 2015; 8: 58
- 17 Szabo A, Perou CM, Karaca M, Perreard L, Palais R, Quackenbush JF, Bernard PS. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biol* 2004; 5: R59
- 18 De Spiegelaere W, Dern-Wieloch J, Weigel R, Schumacher V, Schorle H, Nettersheim D, Bergmann M, Brehm R, Kliesch S, Vandekerckhove L, Fink C. Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PLoS One* 2015; 10: e0122515
- 19 Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004; 26: 509-15
- 20 Li X, Yang Q, Bai J, Xuan Y, Wang Y. Identification of appropriate reference genes for human mesenchymal stem cell analysis by quantitative real-time PCR. *Biotechnol Lett* 2015; 37: 67-73
- 21 Spalenza V, Girolami F, Bevilacqua C, Riondato F, Rasero R, Nebbia C, Sacchi P, Martin P. Identification of internal control genes for quantitative expression analysis by real-time PCR in bovine peripheral lymphocytes. *Vet J* 2011; 189: 278-83
- 22 Cleal JK, Day P, Hanson MA, Lewis RM. Measurement of housekeeping genes in human placenta. *Placenta* 2009; 30: 1002-3
- 23 Drewlo S, Levytska K, Kingdom J. Revisiting the housekeeping genes of human placental development and insufficiency syndromes. *Placenta* 2012; 33: 952-4
- 24 Drolet R, Simard M, Plante J, Laberge P, Tremblay Y. Human type 2 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA and protein distribution in placental villi at mid and term pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5: 30
- 25 Hulkova M, Zeman J. Placental tissue as model for pilot study focused on RNA analysis from human foetal tissue. *Prague Med Rep* 2011; 112: 93-101

- 26 Lanoix D, Lacasse AA, St-Pierre J, Taylor SC, Ethier-Chiasson M, Lafond J, Vaillancourt C. Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta. *Mol Biotechnol* 2012; 52: 234-43
- 27 Meller M, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA. Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta* 2005; 26: 601-7
- 28 Murthi P, Fitzpatrick E, Borg AJ, Donath S, Brennecke SP, Kalionis B. GAPDH, 18S rRNA and YWHAZ are suitable endogenous reference genes for relative gene expression studies in placental tissues from human idiopathic fetal growth restriction. *Placenta* 2008; 29: 798-801
- 29 Fajardy I, Moitrot E, Vambergue A, Vandersippe-Millot M, Deruelle P, Rousseaux J. Time course analysis of RNA stability in human placenta. *BMC Mol Biol* 2009; 10: 21
- 30 Huang X, Baumann M, Nikitina L, Wenger F, Surbek D, Korner M, Albrecht C. RNA degradation differentially affects quantitative mRNA measurements of endogenous reference genes in human placenta. *Placenta* 2013; 34: 544-547
- 31 Patel P, Boyd CA, Johnston DG, Williamson C. Analysis of GAPDH as a standard for gene expression quantification in human placenta. *Placenta* 2002; 23: 697-8
- 32 Lacey HA, Nolan T, Greenwood SL, Glazier JD, Sibley CP. Gestational profile of Na⁺/H⁺ exchanger and Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger mRNA expression in placenta using real-time QPCR. *Placenta* 2005; 26: 93-8
- 33 Fox H. The Pattern of Villous Variability in the Normal Placenta. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1964; 71: 749-58
- 34 Wyatt SM, Kraus FT, Roh CR, Elchalal U, Nelson DM, Sadovsky Y. The correlation between sampling site and gene expression in the term human placenta. *Placenta* 2005; 26: 372-9
- 35 De A, Maulik D, Lankachandra K, Mundy DC, Ye SQ, Gerkovich MM. Fetoplacental regional variations in the expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie2 in normal-term and near-term pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016: 1-8
- 36 Tzschoppe AA, Struwe E, Dorr HG, Goecke TW, Beckmann MW, Schild RL, Dotsch J. Differences in gene expression dependent on sampling site in placental tissue of fetuses with intrauterine growth restriction. *Placenta* 2010; 31: 178-85
- 37 Pidoux G, Gerbaud P, Laurendeau I, Guibourdenche J, Bertin G, Vidaud M, Evain-Brion D, Frenco JL. Large variability of trophoblast gene expression within and between human normal term placentae. *Placenta* 2004; 25: 469-73
- 38 Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, Brown PO. Gene expression patterns in human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5478-83
- 39 Cleal JK, Day PL, Hanson MA, Lewis RM. Sex differences in the mRNA levels of housekeeping genes in human placenta. *Placenta* 2010; 31: 556-7
- 40 Morrish DW, Dakour J, Li H. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol* 1998; 39: 179-95
- 41 Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol* 2010; 54: 303-12
- 42 Sitras V, Fenton C, Paulssen R, Vartun A, Acharya G. Differences in gene expression between first and third trimester human placenta: a microarray study. *PLoS One* 2012; 7: e33294
- 43 Demendi C, Borzsonyi B, Pajor A, Rigo J, Jr., Nagy ZB, Szentpeteri I, Joo JG. Abnormal fetomaternal glucocorticoid metabolism in the background of

- premature delivery: placental expression patterns of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 165: 210-4
- 44 Schoof E, Girstl M, Frobenius W, Kirschbaum M, Dorr HG, Rascher W, Dotsch J. Decreased gene expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in human placenta of patients with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1313-7
- 45 Schoof E, Girstl M, Frobenius W, Kirschbaum M, Repp R, Knerr I, Rascher W, Dotsch J. Course of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase mRNA expression during human gestation. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 187-92
- 46 Ma Y, Kadner SS, Guller S. Differential effects of lipopolysaccharide and thrombin on interleukin-8 expression in syncytiotrophoblasts and endothelial cells: implications for fetal survival. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034: 236-44
- 47 Lee MJ, Ma Y, LaChapelle L, Kadner SS, Guller S. Glucocorticoid enhances transforming growth factor-beta effects on extracellular matrix protein expression in human placental mesenchymal cells. *Biol Reprod* 2004; 70: 1246-52
- 48 Sehringer B, Zahradnik HP, Deppert WR, Simon M, Noethling C, Schaefer WR. Evaluation of different strategies for real-time RT-PCR expression analysis of corticotropin-releasing hormone and related proteins in human gestational tissues. *Anal Bioanal Chem* 2005; 383: 768-75
- 49 Torricelli M, Novembri R, Bloise E, De Bonis M, Challis JR, Petraglia F. Changes in placental CRH, urocortins, and CRH-receptor mRNA expression associated with preterm delivery and chorioamnionitis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 534-40
- 50 Johnson RF, Rennie N, Murphy V, Zakar T, Clifton V, Smith R. Expression of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid transcripts in the human placenta at term. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4887-93
- 51 Chan J, Rabbitt EH, Innes BA, Bulmer JN, Stewart PM, Kilby MD, Hewison M. Glucocorticoid-induced apoptosis in human decidua: a novel role for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in late gestation. *J Endocrinol* 2007; 195: 7-15
- 52 Driver PM, Rauz S, Walker EA, Hewison M, Kilby MD, Stewart PM. Characterization of human trophoblast as a mineralocorticoid target tissue. *Molecular Human Reproduction* 2003; 9: 793-798
- 53 Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. *NIH Consens Statement* 1994; 12: 1-24
- 54 Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2006: CD004454
- 55 Blanford AT, Murphy BE. In vitro metabolism of prednisolone, dexamethasone, betamethasone, and cortisol by the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 127: 264-7
- 56 Braun T, Challis JR, Newnham JP, Sloboda DM. Early-life glucocorticoid exposure: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and long-term disease risk. *Endocr Rev* 2013; 34: 885-916
- 57 Langdown ML, Sugden MC. Enhanced placental GLUT1 and GLUT3 expression in dexamethasone-induced fetal growth retardation. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185: 109-17
- 58 Sugden MC, Langdown ML, Munns MJ, Holness MJ. Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated

- with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 529-39
- 59 Ahmad I, Beharry KD, Valencia AM, Cho S, Guajardo L, Nageotte MP, Modanlou HD. Influence of a single course of antenatal betamethasone on the maternal-fetal insulin-IGF-GH axis in singleton pregnancies. *Growth Horm IGF Res* 2006; 16: 267-75
- 60 Ain R, Canham LN, Soares MJ. Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction impacts the placental prolactin family, insulin-like growth factor-II and the Akt signaling pathway. *J Endocrinol* 2005; 185: 253-63
- 61 Gatford KL, Owens JA, Li S, Moss TJ, Newnham JP, Challis JR, Sloboda DM. Repeated betamethasone treatment of pregnant sheep programs persistent reductions in circulating IGF-I and IGF-binding proteins in progeny. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E170-8
- 62 Audette MC, Greenwood SL, Sibley CP, Jones CJ, Challis JR, Matthews SG, Jones RL. Dexamethasone stimulates placental system A transport and trophoblast differentiation in term villous explants. *Placenta* 2010; 31: 97-105
- 63 Hahn T, Barth S, Graf R, Engelmann M, Beslagic D, Reul JM, Holsboer F, Dohr G, Desoye G. Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1445-52
- 64 Stark MJ, Wright IM, Clifton VL. Sex-specific alterations in placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 activity and early postnatal clinical course following antenatal betamethasone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R510-4
- 65 Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 2012; 379: 2162-72
- 66 Oestergaard MZ, Inoue M, Yoshida S, Mahanani WR, Gore FM, Cousens S, Lawn JE, Mathers CD, United Nations Inter-Agency Group for Child Mortality E, the Child Health Epidemiology Reference G. Neonatal mortality levels for 193 countries in 2009 with trends since 1990: a systematic analysis of progress, projections, and priorities. *PLoS Med* 2011; 8: e1001080
- 67 Crowley P, Chalmers I, Keirse MJ. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97: 11-25
- 68 Liggins GC. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol* 1969; 45: 515-23
- 69 Mendelson CR, Boggaram V. Hormonal control of the surfactant system in fetal lung. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 415-40
- 70 Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 1972; 50: 515-25
- 71 Crudo A, Petropoulos S, Moisiadis VG, Iqbal M, Kostaki A, Machnes Z, Szyf M, Matthews SG. Prenatal synthetic glucocorticoid treatment changes DNA methylation states in male organ systems: multigenerational effects. *Endocrinology* 2012; 153: 3269-83
- 72 Empfehlungen zum Vorgehen beim vorzeitigen Blasensprung: AWMF, Register-Nr. 015/029 2006
- 73 Antenatale Kortikosteroide zur Lungenreifung (ACS): DGGG, Nr. 015069, 2008

- 74 Verdurmen KM, Renckens J, van Laar JO, Oei SG. The influence of corticosteroids on fetal heart rate variability: a systematic review of the literature. *Obstet Gynecol Surv* 2013; 68: 811-24
- 75 Deren O, Karaer C, Onderoglu L, Yigit N, Durukan T, Bahado-Singh RO. The effect of steroids on the biophysical profile and Doppler indices of umbilical and middle cerebral arteries in healthy preterm fetuses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 99: 72-6
- 76 Thorp JA, Jones PG, Knox E, Clark RH. Does antenatal corticosteroid therapy affect birth weight and head circumference? *Obstet Gynecol* 2002; 99: 101-8
- 77 French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. Repeated antenatal corticosteroids: Size at birth and subsequent development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999; 180: 114-121
- 78 Murphy KE, Willan AR, Hannah ME, Ohlsson A, Kelly EN, Matthews SG, Saigal S, Asztalos E, Ross S, Delisle MF, Amankwah K, Guselle P, Gafni A, Lee SK, Armson BA, Multiple Courses of Antenatal Corticosteroids for Preterm Birth Study Collaborative G. Effect of antenatal corticosteroids on fetal growth and gestational age at birth. *Obstet Gynecol* 2012; 119: 917-23
- 79 Bloom SL, Sheffield JS, McIntire DD, Leveno KJ. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 485-90
- 80 Braun T, Sloboda DM, Tutschek B, Harder T, Challis JR, Dudenhausen JW, Plagemann A, Henrich W. Fetal and neonatal outcomes after term and preterm delivery following betamethasone administration. *Int J Gynaecol Obstet* 2015; 130: 64-9
- 81 Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 2004; 151 Suppl 3: U49-62
- 82 Modi N, Lewis H, Al-Naqeeb N, Ajayi-Obe M, Dore CJ, Rutherford M. The effects of repeated antenatal glucocorticoid therapy on the developing brain. *Pediatr Res* 2001; 50: 581-5
- 83 French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP. Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 588-95
- 84 Tegethoff M, Pryce C, Meinlschmidt G. Effects of intrauterine exposure to synthetic glucocorticoids on fetal, newborn, and infant hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in humans: a systematic review. *Endocr Rev* 2009; 30: 753-89
- 85 Alexander N, Rosenlocher F, Stalder T, Linke J, Distler W, Morgner J, Kirschbaum C. Impact of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on endocrine stress reactivity in term-born children. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 3538-44
- 86 Dalziel SR, Walker NK, Parag V, Mantell C, Rea HH, Rodgers A, Harding JE. Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 365: 1856-62
- 87 Kelly BA, Lewandowski AJ, Worton SA, Davis EF, Lazdam M, Francis J, Neubauer S, Lucas A, Singhal A, Leeson P. Antenatal glucocorticoid exposure and long-term alterations in aortic function and glucose metabolism. *Pediatrics* 2012; 129: e1282-90
- 88 Justus G, Sloboda DM, Henrich W, Plagemann A, Dudenhausen JW, Braun T. Avoiding the prenatal programming effects of glucocorticoids: are there alternative treatments for the induction of antenatal lung maturation? *J Perinat Med* 2015; 43: 503-23

- 89 Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. The placenta and intrauterine programming. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 439-50
- 90 Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)* 2007; 113: 1-13
- 91 Saif Z, Hodyl NA, Stark MJ, Fuller PJ, Cole T, Lu N, Clifton VL. Expression of eight glucocorticoid receptor isoforms in the human preterm placenta vary with fetal sex and birthweight. *Placenta* 2015; 36: 723-30
- 92 Bromer C, Marsit CJ, Armstrong DA, Padbury JF, Lester B. Genetic and epigenetic variation of the glucocorticoid receptor (NR3C1) in placenta and infant neurobehavior. *Dev Psychobiol* 2013; 55: 673-83
- 93 Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements--a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151: 333-7
- 94 Mayhew TM. Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta* 2008; 29: 1-14
- 95 Haimov-Kochman R, Fisher SJ, Winn VD. Modification of the standard trizol-based technique improves the integrity of RNA isolated from RNase-rich placental tissue. *Clinical Chemistry* 2006; 52: 159-160
- 96 geNorm manual.
http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf
- 97 Borzsonyi B, Demendi C, Pajor A, Rigo J, Jr., Marosi K, Agota A, Nagy ZB, Joo JG. Gene expression patterns of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 enzyme in human placenta from intrauterine growth restriction: the role of impaired feto-maternal glucocorticoid metabolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 161: 12-7
- 98 Ma R, Liu J, Wu L, Sun J, Yang Z, Yu C, Yuan P, Xiao X. Differential expression of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in pregnant women with diet-treated gestational diabetes mellitus. *Steroids* 2012; 77: 798-805
- 99 Zhou F, He MM, Liu ZF, Zhang L, Gao BX, Wang XD. Expression of corticotrophin-releasing hormone and its receptor in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Placenta* 2013; 34: 401-6
- 100 Chen Y, Allars M, Pan X, Maiti K, Angeli G, Smith R, Nicholson RC. Effects of corticotrophin releasing hormone (CRH) on cell viability and differentiation in the human BeWo choriocarcinoma cell line: a potential syncytialisation inducer distinct from cyclic adenosine monophosphate (cAMP). *Reprod Biol Endocrinol* 2013; 11: 30
- 101 Akhter A, Das V, Naik S, Faridi RM, Pandey A, Agrawal S. Upregulation of HLA-G in JEG-3 cells by dexamethasone and hydrocortisone. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 285: 7-14
- 102 Sun K, Brockman D, Campos B, Pitzer B, Myatt L. Induction of surfactant protein A expression by cortisol facilitates prostaglandin synthesis in human chorionic trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4988-94
- 103 Li W, Gao L, Wang Y, Duan T, Myatt L, Sun K. Enhancement of cortisol-induced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by interleukin 1beta in cultured human chorionic trophoblast cells. *Endocrinology* 2006; 147: 2490-5
- 104 Tzschoppe A, Fahlbusch F, Seidel J, Dorr HG, Rascher W, Goecke TW, Beckmann MW, Schild RL, Struwe E, Dotsch J. Dexamethasone stimulates the expression of leptin and 11beta-HSD2 in primary human placental trophoblastic cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 156: 50-5

- 105 Pavek P, Cerveny L, Svecova L, Brysch M, Libra A, Vrzal R, Nachtigal P, Staud F, Ulrichova J, Fendrich Z, Dvorak Z. Examination of Glucocorticoid receptor alpha-mediated transcriptional regulation of P-glycoprotein, CYP3A4, and CYP2C9 genes in placental trophoblast cell lines. *Placenta* 2007; 28: 1004-11
- 106 Mark PJ, Waddell BJ. P-glycoprotein restricts access of cortisol and dexamethasone to the glucocorticoid receptor in placental BeWo cells. *Endocrinology* 2006; 147: 5147-52
- 107 Bassols J, Prats-Puig A, Vazquez-Ruiz M, Garcia-Gonzalez MM, Martinez-Pascual M, Avelli P, Martinez-Martinez R, Fabrega R, Colomer-Virosta C, Soriano-Rodriguez P, Diaz M, de Zegher F, Ibanez L, Lopez-Bermejo A. Placental FTO expression relates to fetal growth. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 1365-70
- 108 Czikk MJ, Drewlo S, Baczyk D, Adamson SL, Kingdom J. Dual specificity phosphatase 9 (DUSP9) expression is down-regulated in the severe pre-eclamptic placenta. *Placenta* 2013; 34: 174-81
- 109 Manceau S, Giraud C, Decleves X, Scherrmann JM, Artiguebille F, Goffinet F, Chappuy H, Vinot C, Treluyer JM. ABC drug transporter and nuclear receptor expression in human cytotrophoblasts: influence of spontaneous syncytialization and induction by glucocorticoids. *Placenta* 2012; 33: 927-32
- 110 Boon K, Caron HN, van Asperen R, Valentijn L, Hermus MC, van Sluis P, Roobeek I, Weis I, Voute PA, Schwab M, Versteeg R. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Embo Journal* 2001; 20: 1383-1393
- 111 Guo QM, Malek RL, Kim S, Chiao C, He M, Ruffly M, Sanka K, Lee NH, Dang CV, Liu ET. Identification of c-Myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Research* 2000; 60: 5922-5928
- 112 Benchoua A, Trioulier Y, Zala D, Gaillard MC, Lefort N, Dufour N, Saudou F, Elalouf JM, Hirsch E, Hantraye P, Deglon N, Brouillet E. Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 1652-63
- 113 Chaturvedi RK, Adihetty P, Shukla S, Hennessy T, Calingasan N, Yang L, Starkov A, Kiaei M, Cannella M, Sassone J, Ciammola A, Squitieri F, Beal MF. Impaired PGC-1alpha function in muscle in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 3048-65
- 114 Chan EY, Luthi-Carter R, Strand A, Solano SM, Hanson SA, DeJohn MM, Kooperberg C, Chase KO, DiFiglia M, Young AB, Leavitt BR, Cha JH, Aronin N, Hayden MR, Olson JM. Increased huntingtin protein length reduces the number of polyglutamine-induced gene expression changes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1939-51
- 115 Carter CJ. EIF2B and oligodendrocyte survival: Where nature and nurture meet in bipolar disorder and schizophrenia? *Schizophrenia Bulletin* 2007; 33: 1343-1353
- 116 Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway - Identification of novel gene clusters for cell survival. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 8135-8145
- 117 Wang WB, Yang L, Hu L, Li F, Ren L, Yu HJ, Liu Y, Xia L, Lei H, Liao ZK, Zhou FX, Xie CH, Zhou YF. Inhibition of UBE2D3 Expression Attenuates Radiosensitivity of MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Increasing hTERT Expression and Activity. *Plos One* 2013; 8

- 118 Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M, Ohko K, Yamane K, Tsuruo T. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *Embo Journal* 2000; 19: 2652-2661
- 119 Phuc Le P, Friedman JR, Schug J, Brestelli JE, Parker JB, Bochkis IM, Kaestner KH. Glucocorticoid receptor-dependent gene regulatory networks. *PLoS Genet* 2005; 1: e16
- 120 Kolbus A, Blazquez-Domingo M, Carotta S, Bakker W, Luedemann S, von Lindern M, Steinlein P, Beug H. Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* 2003; 102: 3136-3146
- 121 Gutling H, Bionaz M, Sloboda DM, Ehrlich L, Braun F, Gramzow AK, Henrich W, Plagemann A, Braun T. The importance of selecting the right internal control gene to study the effects of antenatal glucocorticoid administration in human placenta. *Placenta* 2016; 44: 19-22
- 122 Piechota-Polanczyk A, Demyanets S, Nykonenko O, Huk I, Mittlboeck M, Domenig CM, Neumayer C, Wojta J, Nanobachvili J, Klinger M. Decreased tissue levels of cyclophilin A, a cyclosporine a target and phospho-ERK1/2 in simvastatin patients with abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2013; 45: 682-8
- 123 Vazquez-Blomquist D, Fernandez JR, Miranda J, Bello C, Silva JA, Estrada RC, Novoa LI, Palenzuela D, Bello I. Selection of reference genes for use in quantitative reverse transcription PCR assays when using interferons in U87MG. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 11167-75
- 124 Bionaz M, Loor JJ. Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiol Genomics* 2007; 29: 312-9
- 125 Parent R, Beretta L. Translational control plays a prominent role in the hepatocytic differentiation of HepaRG liver progenitor cells. *Genome Biol* 2008; 9: R19
- 126 Ballard PL, Granberg P, Ballard RA. Glucocorticoid levels in maternal and cord serum after prenatal betamethasone therapy to prevent respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1975; 56: 1548-54
- 127 Schwab M, Coksaygan T, Samtani MN, Jusko WJ, Nathanielsz PW. Kinetics of betamethasone and fetal cardiovascular adverse effects in pregnant sheep after different doses. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 617-25
- 128 Clifton VL. Sexually dimorphic effects of maternal asthma during pregnancy on placental glucocorticoid metabolism and fetal growth. *Cell and Tissue Research* 2005; 322: 63-71
- 129 Challis J, Newnham J, Petraglia F, Yeganegi M, Bocking A. Fetal sex and preterm birth. *Placenta* 2013; 34: 95-99
- 130 Murphy VE, Gibson PG, Giles WB, Zakar T, Smith R, Bisits AM, Kessell CG, Clifton VL. Maternal asthma is associated with reduced female fetal growth. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003; 168: 1317-1323
- 131 Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters* 2006; 28: 1601-1613

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hanna Gütling, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Antenatale Glukokortikoidexposition – Etablierung von Referenzgenen in der humanen Plazenta“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Hanna Gütling hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Gütling H, Bionaz M, Sloboda DM, Ehrlich L, Braun F, Gramzow AK, Henrich W, Plagemann A, Braun T. The importance of selecting the right internal control gene to study the effects of antenatal glucocorticoid administration in human placenta. Placenta 2016; 44:19-22.

Beitrag von H. Gütling im Einzelnen:

- Literaturrecherche zu bereits verwendeten ICG in der humanen Plazenta und deren Evaluation
- Durchführung der IPA-Analyse mit Unterstützung von Dr. Hans-Joachim Mollenkopf
- Auswahl der in dieser Studie untersuchten ICG unter Berücksichtigung der IPA-Analyse und der Ergebnisse der Literaturrecherche
- Recherche beziehungsweise Erstellen der Primerpaare inkl. deren Testung
- Aufbereitung der Plazentaprobe ab dem Zeitpunkt der RNA-Isolation, inkl. Vorversuche
- Durchführung sämtlicher RT-qPCR-Experimente, inkl. deren Vorversuche
- Durchführung der statistischen Auswertung, sowie der Analysen mittels Software-basierten Algorithmen
- Interpretation der Ergebnisse und Einordnung in den aktuellen wissenschaftlichen Stand
- Erstellen der Graphiken und Tabellen
- Mitschrift an der Publikation

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Danksagung

Vielen Dank an die gesamte AG Perinatale Programmierung für die wunderbare Zusammenarbeit, den regen Austausch und die schöne Atmosphäre im Labor. Dabei gilt mein besonderer Dank Dr. Thorsten Braun und Prof. Dr. Wolfgang Henrich für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit, sowie für alle Hilfestellungen und Korrekturen. Loreen Ehrlich danke ich ganz herzlich für die beispielsweise Einarbeitung, die vielen Ratschläge und alle aufbauenden Worte. Ein großer Dank geht auch an Franziska Braun und Anne-Katrin Gramzow für die zeitaufwändige Probengewinnung im Rahmen der HPL-Studie.

Ich danke Dr. Hans-Joachim Mollenkopf für die Unterstützung bei der IPA-Analyse, sowie Massimo Bionaz für die Beratung bei der Datenauswertung und deren Interpretation. Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern der Klinik für Geburtsmedizin, insbesondere der AG „Experimentelle Geburtsmedizin“, der Charité (Berlin), den „Animal and Rangeland Sciences“ der Oregon State University (Corvallis, USA) und den Abteilungen „Biochemistry and Biomedical Sciences“, „Obstetrics and Gynecology“ und „Pediatrics“ der McMaster University (Canada), die an der Publikation meiner Arbeit mitgewirkt haben.

Außerdem danke ich meinen Eltern, die mir immer den Rücken frei gehalten und mir Mut zugesprochen haben. Meinen Freunden danke ich für den emotionalen Rückhalt und die Teilhabe an meinen Sorgen und Erfolgen. Ein besonderer Dank geht dabei an Wu, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte und die all meine Höhen und Tiefen (zumindest meist) geduldig ertragen hat, und an Martin, der immer für mich da war und mich stets liebevoll unterstützt hat. Ohne diesen Rückhalt wäre das Durchführen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. DANKE.