

Aus dem Center for Cardiovascular Research (CCR)  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Zusammenhänge zwischen der endothelialen  
Stickstoffmonoxid Synthase in der humanen  
Plazenta und fetalen sowie maternalen Parametern**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tim Andermann

aus Hannover

Datum der Promotion: 25. Oktober 2013



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Fetale Programmierung.....	2
1.1.1 Ursachen gestörter fetaler Entwicklung.....	4
1.1.2 Mechanismen gestörter fetaler Entwicklung.....	7
1.2 Stickstoffmonoxid (NO).....	10
1.2.1 Synthese und Wirkung von Stickstoffmonoxid.....	10
1.2.2 Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS).....	12
1.2.3 endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS).....	15
1.2.4 Genetische Regulation der Stickstoffmonoxid-Synthase.....	17
1.3 Proteine des Plazentagewebes und Gefäßregulation.....	19
2 Fragestellung.....	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Studiendesign.....	23
3.2 Material.....	26
3.2.1 Instrumente.....	26
3.2.2 Verbrauchsmaterial.....	26
3.2.3 Chemikalien.....	27
3.2.4 Lösungen und Puffer.....	28
3.2.5 Antikörper.....	30
3.2.6 Software.....	30
3.3 Methoden.....	31
3.3.1 Proteinisolation.....	31
3.3.2 Gesamtproteinbestimmung.....	32

---

3.3.3	Herstellung des Standard-Plazentagemisches.....	33
3.3.4	Western Blot.....	33
3.3.5	Proteindetektion.....	35
3.3.6	Auswertung der Daten.....	36
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Merkmale der Studienpopulation und Messwerte.....	40
4.2	Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und fetalen Parametern.....	42
4.2.1	eNOS und Geburtsgewicht.....	42
4.2.2	eNOS und Schwangerschaftsdauer.....	45
4.2.3	eNOS und APGAR-Score.....	46
4.2.4	eNOS und Aufenthalt auf der Neonatologie.....	48
4.3	Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und maternalen Parametern.....	49
4.3.1	eNOS und Rauchen.....	49
4.3.2	eNOS und Hypertonus.....	50
4.3.3	eNOS und Diabetes mellitus.....	50
4.4	Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und eNOS-Polymorphismus.....	51
4.5	Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und anderen Proteinen der Gefäßregulation.....	52
4.5.1	eNOS und das Renin-Angiotensin-System.....	53
4.5.2	eNOS und Klotho.....	55
4.5.3	eNOS und PPAR $\gamma$ .....	56
5	Diskussion.....	57
5.1	Methodische Betrachtung.....	57
5.2	Bewertung der Proteinkonzentrationen im Plazentagewebe.....	59
5.3	eNOS-Proteinkonzentration und Parameter der fetalen Programmierung.....	61
5.3.1	eNOS-Proteinkonzentration und Geburtsgewicht.....	61
5.3.2	Zusammenhang zwischen plazentarer eNOS-Proteinkonzentration und eNOS-Polymorphismus.....	64

---

5.4	Zusammenhang zwischen plazerarer eNOS-Proteinkonzentration und fetalen Parametern.....	67
5.4.1	eNOS und Schwangerschaftsdauer .....	67
5.4.2	eNOS-Proteinkonzentration und Aufenthalt auf der Neonatologie.....	70
5.5	Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und maternalen Parametern ..	72
5.6	Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und anderen Proteinen der Gefäßregulation.....	74
5.7	Ausblick.....	78
6	Zusammenfassung.....	79
7	Abstract.....	81
8	Abbildungsverzeichnis.....	82
9	Tabellenverzeichnis.....	83
10	Literaturverzeichnis.....	84
A	Lebenslauf .....	93
B	Danksagung .....	94
C	Erklärung.....	95

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APGAR	<i>Punkteschema zur Beurteilung Neugeborener</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AT-1	Angiotensin II-Rezeptor, Subtyp 1
BMI	Body Mass Index
CMV	Cytomegalievirus
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mononucleotid
11 $\beta$ -HSD	11- $\beta$ - Hydroxysteroiddehydrogenase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells (humanes Nabelvenenendothel)
IFN	Interferon
IUGR	intrauterine growth restriction (intrauterine Wachstumsretardierung)
kDa	Kilodalton
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin-Methylester
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
ONOO $\cdot$	Peroxynitrit
p-Akt	phosphoryliertes Akt (Serin/Threonin-Proteinkinase)
p-Erk	phosphoryliertes Erk (extracellular-signal-regulated kinase)
PE	Präeklampsie
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
QTL	quantitative trait locus (Region eines quantitativen Merkmals)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
SGA	small for gestational age (für das Gestationsalter untergewichtig)
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF	Tumornekrosefaktor
VNTR	variable number of tandem repeats (Minisatelliten-DNA)
VZV	Varizella Zoster Virus

## 1 Einleitung

Besonders in Wachstumsphasen passen sich Lebewesen Umwelteinflüssen an. So ist das menschliche Wachstum von Körper und Organen ein Prozess, der bis ins hohe Lebensalter anhält und von verschiedensten Einflüssen abhängig ist. Viele Gene sind an der Steuerung dieser Entwicklung beteiligt. Darüber hinaus bestimmt das Ausmaß der Genaktivität und dessen Steuerung in verschiedenen Lebensabschnitten maßgeblich den Phänotyp.

In verschiedensten Studien konnte mittlerweile gezeigt werden, dass temporäre Umwelteinflüsse, die während der Schwangerschaft und in der unmittelbar postpartalen Phase auf den sich entwickelnden Organismus einwirken, große Bedeutung für die spätere Gestalt eines Menschen haben.

Das intrauterine Wachstumspotential ist genetisch determiniert, die Ausschöpfung dieses Potentials hängt jedoch von einer Vielzahl von Faktoren, unter anderem der placentaren Funktion, ab. Die Prozesse, die eine optimale fetale Entwicklung steuern und den Menschen so bestmöglich auf das Leben außerhalb des Mutterleibs vorbereiten, sind nur in Ansätzen verstanden und bedürfen genauerer Betrachtung.

Der Einfluss dieser fetalen und maternalen Steuerungsprozesse auf die spätere Entwicklung des Menschen wird in den letzten Jahren immer deutlicher. Es stellt sich heraus, dass die phänotypische Plastizität beim Menschen höher als bislang vermutet anzusiedeln ist. Neben dem Genotyp scheinen die erworbenen Eigenschaften (Umwelteinflüsse) die phänotypische Ausprägung, insbesondere in kritischen Zeitfenstern, in größerem Maße zu beeinflussen.

Die Existenz kritischer Zeitfenster in der fetalen Entwicklung, etwa für die Organogenese, für Fehlbildungen aber auch das fetale Wachstum ist evident und wird seit mehr als 50 Jahren erforscht (1). Die intrauterine Entwicklung ist ein Zusammenspiel unterschiedlichster maternaler, fetaler und plazentarer Systeme, deren exakte Mechanismen zum heutigen Zeitpunkt noch unvollständig verstanden werden.

Besonders die negativen Einwirkungen durch Mangelversorgung oder Toxine (Nikotin, Alkohol), die eine Störung des intrauterinen Milieus bewirken, stehen bei der Erforschung dieser Systeme seit Jahrzehnten unter Beobachtung.

Das Wachstum in der Embryonalperiode (bis zur 8. Woche post conceptionem) geschieht hauptsächlich durch Zellproliferation und Hyperplasie, in der sowohl die Organogenese stattfindet als auch das Längenwachstum maximal ist. Ab der 32. Schwangerschaftswoche ist die Zellhypertrophie vorherrschend und die Vermehrung der Zellen durch Proliferation nimmt ab.

Aus der Beobachtung des engen Zusammenhangs zwischen temporären, während kritischer Zeitfenster in frühen Entwicklungsstufen einwirkenden Umwelteinflüssen und epidemiologischen Daten wurde die Hypothese der fetalen Programmierung abgeleitet. Es wird eine Fixierung pathogenetischer Mechanismen angenommen, die zeitlebens bestehen bleibt und neben dem Genotyp existiert. Diese Fixierung findet vermutlich besonders in den Phasen höchster Zellproliferation statt und zeigt die Plastizität der embryonalen und fetalen Entwicklung (2).

### **1.1 Fetale Programmierung**

Aus epidemiologischen Studien in Großbritannien, welche die geographische Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen der Jahre 1968 - 1978 betrachteten und eine überraschende Gleichverteilung mit der Säuglingssterblichkeit in den Jahren 1921 - 1925 zeig-



ten, ging die Idee der fetalen Programmierung hervor. Diese Studie kann als retrospektive Analyse einer sehr großen Kohorte chronisch kranker Patienten verstanden werden. Aufgrund der geographischen Übereinstimmung der Säuglingssterblichkeit und 50-60 Jahre später auftretender Kreislauferkrankungen, vermutete Barker, dass diese Patienten schon zum Zeitpunkt ihrer Geburt ein erhöhtes Risiko für diese Erkrankung trugen (3).

Maßgeblich verantwortlich für eine hohe Säuglingssterblichkeit war und ist ein geringes Geburtsgewicht, welches in einer Folgestudie als Risikofaktor für spätere ischämische Herzerkrankungen identifiziert wurde. In dieser konnten durch Aufzeichnungen von Hebammen einige Geburtsparameter der um 1920 geborenen Patienten zurückverfolgt werden, wobei Barker et al. eine Verdoppelung der Mortalität kardiovaskulärer Genese bei ehemals untergewichtigen Neugeborenen feststellten (4).

1993 zeigten Barker und Osmond zudem, dass der Risikofaktor „geringes Geburtsgewicht“ auch persistierte, wenn die Betrachtung um die Schwangerschaftsdauer korrigierter wurde. Das Geburtsgewicht gilt somit als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen (5). Im Jahr 1995 fasste das British Medical Journal diese Beobachtungen unter dem Namen „Barker Hypothese“ zusammen (6). Der Zusammenhang zwischen geringem Geburtsgewicht und dem Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen ist seitdem umfassend untersucht und in vielen Übersichtsarbeiten diskutiert worden (7).

Daraufhin begann man zu erforschen, ob sich dieser Zusammenhang auch für andere chronische Erkrankungen, insbesondere des Stoffwechsels, bei Patienten mit ursprünglich geringem Geburtsgewicht finden lässt. So waren mehrere Parameter, die dem metabolischen Syndrom zuzurechnen sind, ebenfalls mit einem geringen Geburtsgewicht assoziiert. Für arterielle Hypertonie, gestörte Glukosetoleranz und Diabetes Typ II ließen sich in verschiedenen Untersuchungen Korrelationen zum Geburtsgewicht finden

(8, 9). Auch in einer Studie zur Verteilung des Körperfettgewebes konnte eine Tendenz zu abdomineller Umverteilung und somit einem höheren Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen und Diabetes bei Erwachsenen mit ehemals niedrigem Geburtsgewicht ausgemacht werden (10).

All diese Beobachtungen führten zu der Theorie, dass Veränderungen des fetalen Milieus während der Schwangerschaft einen beachtlichen und frühzeitigen Einfluss auf den Phänotyp und insbesondere die Entwicklung chronischer Erkrankungen im Erwachsenenalter haben können.

### 1.1.1 Ursachen gestörter fetaler Entwicklung

Die frühzeitige Fixierung von Krankheitsdispositionen wird auf eine mangelnde Ernährung des Feten durch die Mutter zurückgeführt (11). Eine unzureichende Zufuhr von Nährstoffen führt zu einer fetalen Wachstumsretardierung (intrauterine growth restriction = IUGR) im Mutterleib, welche bei dem Feten zu einer Veränderung der Stoffwechsellage führt. Man nimmt an, dass sich der Stoffwechsel des Feten auf diese Weise an die Not- und Mangelsituation im Mutterleib anpasst. Was für den Feten zunächst einen Überlebensvorteil darstellt, könnte durch eine Fixierung und Programmierung dieser Mechanismen im späteren Leben unter anderem Ursache chronischer Stoffwechselerkrankungen (Adipositas) sowie einen haushälterischen Umgang mit Energiereserven bedeuten. Diese Vorprogrammierung eines sparsamen Stoffwechsels wird als „*Thrifty Phenotype*“ bezeichnet und von *Hales & Barker* in ihrer Hypothese diskutiert (9). Die intrauterine Mangelversorgung wird als vorübergehender Umwelteinfluss gesehen, der die Programmierung endokriner Systeme des Feten bewirkt.

Tritt nach dem intrauterinen Nährstoffmangel eine normale oder übermäßige Versorgung mit Nährstoffen innerhalb der ersten zwei Lebensjahre ein, so zeigt sich ein rasches extrauterines Wachstum, welches besonders mit einer Zunahme des abdominalen

Fettgewebes verbunden ist. Zudem zeigen diese Kinder eine gestörte Glukosetoleranz (12). Aus dieser Beobachtung folgte die Formulierung der „*Mismatch-Theorie*“, wonach drastische Unterschiede zwischen intra- und extrauterinem Milieu als Anpassungsstörung verantwortlich gemacht werden. Diese besagt, dass eine starke Abweichung der tatsächlich eingetroffenen von der „erwarteten“ Nährstofflage zu einem gleichermaßen erhöhten Risiko metabolischer Erkrankungen führt (13). Dieses Aufholwachstum wird auch „*catch-up fat*“ genannt und stellt sich im Rahmen der *Mismatch-Theorie* als Risikofaktor für spätere metabolische Störungen dar.

Eng verbunden mit der Hypothese der Fehlernährung im Mutterleib ist die „*Overnutrition-Hypothese*“, die etwa bei adipösen oder diabetischen Müttern für Veränderungen des intrauterinen Milieus verantwortlich gemacht wird. Es zeigt sich, dass sowohl Mangelernährung im Mutterleib als auch ein übermäßiges Nährstoffangebot für spätere chronische Erkrankungen des metabolischen Syndroms verantwortlich gemacht werden können (14).

Um diese pathologischen Zustände nach der Geburt zu quantifizieren wurden Termini eingeführt, die diese relativen Gewichts- und Längenparameter in Gruppen einteilen (Tab. 1). So wird bei hypotrophen, untergewichtigen oder kleinen Neugeborenen bezogen auf ihr Gestationsalter von *small for gestational age* (SGA)-Geborenen gesprochen, wenn diese unterhalb der zehnten Perzentile für die bevölkerungsgemittelte Gewichts- und Längenwachstumskurve liegen. Obwohl der Begriff häufig mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) gleichgesetzt wird, darf eine solche erst diagnostiziert werden, wenn das Neugeborene aufgrund einer Fehlernährung durch pathologische Prozesse in Wachstum und Entwicklung zurückbleibt. Da eine Retardierung meist asymmetrisch, das heißt in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft auftritt, bleiben Länge und Kopfumfang häufig im Normbereich, wohingegen das Gewicht zurückbleibt. Dies ist am häufigsten Folge einer fetoplazentaren Dysfunktion (siehe Tabelle).

Tabelle 1:

Abkürzungen und Definitionen	
SGA	small for gestational age = hypotroph, <10. Perzentile (Größe und Gewicht)
AGA	adequate for gestational age (eutroph)
LGA	large for gestational age = hypertroph, >90. Perzentile (Größe und Gewicht)
IUGR	intrauterine growth restriction (SGA mit pathologischer Ursache)
- primär	Beginn der Retardierung vor der 16. Schwangerschaftswoche (10-20% der Fälle) normaler Kopf/Bauchumfang-Index (symmetrisch) Ursachen: Chromosomenaberration, exogene Noxen (z.B. Alkohol, Medikamente)
- sekundär	Beginn der Retardierung im zweiten oder dritten Trimenon (30-35% der Fälle) Kopfumfang > Bauchumfang (asymmetrisch großer Kopf) Ursachen: uteroplazentare Dysfunktion, endokrin, metabolisch, infektiös
- intermediär	Beginn der Retardierung zwischen 16. und 24. SSW (45-55% der Fälle) Kombination prim. und sek. Faktoren: z.B. Fehlernährung, Nikotin
LBW	low birth weight (<2.250g)
VLBW	very low birth weight (<1.500g)
Frühgeburt	Geburten vor der 37. Schwangerschaftswoche (post menstruationem)
Gestationsalter	1. Tag der letzten Regelblutung bis zur Geburt (norm. 280d, 40w)

Tab. 1: Begriffsdefinitionen zu Schwangerschaftsparametern

Das abnorm verminderte Wachstum im Mutterleib wird zudem in eine primäre und sekundäre Form eingeteilt, die eine symmetrische von einer asymmetrischen Retardierung unterscheidet. Während bei der primären Form in der Embryonalperiode die Zellproliferation gestört wird und die symmetrische Retardierung auf einer Verminderung der Zellzahl beruht, ist der Fetus bei der sekundären Form durch ausreichende Zellzahl in der Lage diese sog. asymmetrische Retardierung durch „*catch-up growth (fat)*“ postpartal schnell aufzuholen (15).

Neben nutritiven Faktoren sind auch andere biometrische Parameter an der Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung beteiligt und in Tabelle 2 aufgezählt. In über 40% der Fälle, die nicht mit Dysmorphien, Chromosomenaberrationen oder Infektionen erklärt werden können, bleibt die Ursache einer IUGR sowie der Frühgeburtlich-

keit ungeklärt (16). Jedoch lässt sich häufig eine vaskuläre Genese durch die Erhöhung des Widerstandes plazentarer Gefäße und konsekutiver fetoplazentarer Dysfunktion vermuten. Hier spielen sowohl Noxen wie Nikotin aber auch hypertensive Entgleisungen, wie etwa bei der Präeklampsie, eine Rolle (17).

Tabelle 2:

Ursachen intrauteriner Wachstumsretardierung	
Biometrische Daten	Alter und Statur der Mutter
	Erstgebärende, Mehrlingsschwangerschaften
	mangelnde Schwangerschaftsvorsorge, niedriger soz.-ökon. Status
Krankheiten	
- maternal	Präeklampsie, chronische Erkrankung (Herz, Niere)
- genetisch/chromosomal	Trisomien, Achondroplasie, Osteogenesis imperfecta, Dismorphien
- Stoffwechsel	Polyhydramnion, transienter neonataler DM, Pankreasagenesie
- Infektionen	Röteln, CMV, Toxoplasmose, VZV
-Anomalien	Uterus- oder Plazentaanomalien
Noxen	Alkohol, Nikotin, Kokain, andere Drogen
ungeklärt	häufigste Ursache

Tab. 2: Risikofaktoren intrauteriner Wachstumsretardierung

### 1.1.2 Mechanismen gestörter fetaler Entwicklung

Neben der Mangelernährung werden weitere Mechanismen, die zu einer gestörten fetalen Entwicklung beitragen diskutiert.

#### Die 11- $\beta$ -HSD2-Hypothese

Diese Hypothese sieht in der Exposition des Fetus mit erhöhten Cortisolspiegeln die Hauptursache für die Störung des intrauterinen Milieus und somit den Einfluss auf Wachstum und Entwicklung. Um den Fetus vor dem Stresshormon zu schützen, wird

dieses in physiologischen Schwangerschaften durch die 11- $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase Typ 2 (11- $\beta$ -HSD2) abgepuffert. Ein Mangel an diesem Enzym wurde mit geringem Geburtsgewicht und der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen in Verbindung gebracht (18). Neueste Studien zeigen zudem ein erhöhtes Plazentagewicht bei Müttern, die in der Schwangerschaft starkem Stress ausgesetzt waren (19). Die Ursachen für diese Anpassung, welche als protektiver Faktor für den Fetus gesehen werden kann, werden derzeit diskutiert.

### **Die fetale Insulin Hypothese**

1999 wurde die Theorie der fetalen Programmierung um eine Hypothese der fetalen Insulinresistenz erweitert. Als Ursache für eine programmierte diabetogene Stoffwechsellage im späteren Leben und folglich gestörter Glukosetoleranz (Diabetes) vermuteten *Hattersley et al.* einen in der Fetalperiode fixierten Insulin-resistenten Genotyp. Neben dem direkten Nährstoffmangel als Ursache des geringen Geburtsgewichts machten sie einen gestörten Insulin-vermittelten Wachstumsreiz mitverantwortlich. Zudem postulieren sie einen direkten genetisch determinierten Effekt einer fetalen Resistenz gegenüber Insulin als Folge eines gestörten Glukosestoffwechsels der Mutter (20).

### **Epigenetische Veränderungen**

In einer holländischen Studie wurden Individuen untersucht, die intrauterin einer Hungerperiode (1944/45 aufgrund eines Embargos) ausgesetzt waren und damit in einer kritischen Entwicklungsphase einen Nährstoffmangel erfuhren. Bei diesen Individuen wurde, im Vergleich zu Geschwistern gleichen Geschlechts welche nicht in dieser Zeit geboren wurden, eine geringere Methylierung des Insulin-like Growth-Factor (IGF-2)-Gens gefunden; einem der bedeutenden Wachstumsfaktoren (21).

Dies führte zu der Überlegung, welche die fetale Programmierung und epigenetische Prägung über DNA-Methylierungen und Chromatinveränderungen, also ein unterschiedlich programmiertes Ableseverfahren verschiedener Genabschnitte, zu erklären

versucht. Die Steuerung geschieht dabei abseits der kodierenden DNA-Abschnitte (epigenetisch) und ist durch Interaktion mit Umweltfaktoren beeinflusst (21).

Am besten untersucht ist die Methylierung von Cytosinen, welche die Ablesewahrscheinlichkeit von Genabschnitten reguliert. Neben dieser epigenetischen Veränderung, wie sie in der holländischen Studie untersucht wurde, sind auch Acetylierungen und Phosphorylierung an posttranslationalen Prozessen beteiligt.

Auch in Zwillingsstudien konnten neue Beweise für die Barker-Hypothese und eine epigenetische Beteiligung an diesem Phänomen gesammelt werden. Hier zeigten diejenigen Zwillinge mit geringerem Geburtsgewicht im Erwachsenenalter, trotz identischem Genotyp und Gestationsalter, häufiger diabetogene Stoffwechsellagen und Übergewicht (22). Diese phänotypische Diskordanz monozygoter Zwillinge wurde bisher aufgrund des identischen Genotyps bei monozygoten Zwillingen auf spätere Umwelteinflüsse und minimale DNA-Veränderungen zurückgeführt.

In einer weiteren Studie konnten jedoch signifikante Unterschiede in der DNA-Methylierung von Leukozyten und Schleimhautzellen bei dizygoten Zwillingen gefunden werden (23). Die Forscher kommen zu dem Schluss, dass epigenetische Diskordanz bei dizygoten Zwillingen aufgrund unterschiedlicher DNA-Sequenzen vorkommen kann, favorisieren aber aufgrund einer Mikroarray-Analyse mittels Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) die Hypothese einer epigenetischen Veränderung der Zygoten. Diese Techniken, bei denen unterschiedliche Regionen durch einzelne Basentausche (SNP) oder repetitive Basenfolgen (VNTR) untersucht werden, sind zunehmend für die Entschlüsselung epigenetischer Merkmale und Mechanismen verfügbar.

## 1.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO, hier und im Folgenden wird auf die Kennzeichnung des freien Elektrons von NO<sup>•</sup> verzichtet) ist ein mittlerweile sehr detailliert untersuchtes Signalmolekül. Zunächst war jedoch das Wissen über den Ursprung und die molekulare Zusammensetzung dieses, unter anderem für die Funktion des Endothels überaus wichtigen Stoffes, unzureichend.

Die Erforschung dieses Systems hat auch den Wirkmechanismus der seit langem zur Behandlung arterieller Hypertonie klinisch eingesetzten NO-Donatoren offengelegt. So wurde schon 1924 die erste Nitrolingual<sup>®</sup> Zerbeißkapsel in Deutschland von der Firma G. POHL-BOSKAMP mit verdünntem Nitroglycerin hergestellt, ohne dass der Wirkmechanismus vollständig verstanden war.

Anfang der 1980er Jahre wurde bekannt, dass unterschiedliche physiologische Reize über einen vom Endothel gebildeten, flüchtigen Mediator zu Vasodilatation führen und eine entscheidende Rolle in dessen Funktion sowie der Blutdruckregulation einnehmen. Dieses Phänomen konnte nur bei intaktem Endothel nachgewiesen werden (24). Für diese Erkenntnis und die Identifizierung des Stoffes als NO erhielten Robert F. Furchgott, Ferid Murad und Louis J. Ignarro 1998 den Nobelpreis.

### 1.2.1 Synthese und Wirkung von Stickstoffmonoxid

#### **Synthese von Stickstoffmonoxid**

Initiiert durch die Anheftung von Acetylcholin, Bradykinin, Histamin, Serotonin, ATP, ADP, Thrombin und durch physikalische Reize wie Scherkräfte oder intravasale Hypoxie wurde dieser Mediator zunächst entsprechend seines Ursprungs und der Funktion als EDRF (endothelium-derived relaxing factor) bezeichnet und 1987 chemisch als Stickstoffmonoxid identifiziert (25, 26).



Bemerkenswert ist die Entdeckung, dass ein anorganisches, gasförmiges Radikal, welches das geringste Molekulargewicht aller bisher bekannten aktiv durch Säugetierzellen sezernierten Stoffe besitzt und bis dato als Schadstoff galt, als physiologischer Botenstoff in die Regulierung der Endothelfunktion eingreift (27).

Zeitgleich suchten andere Forschergruppen nach Prozessen endogener Stickstoffsynthese, da bekannt wurde, dass Menschen mehr Nitrat und Nitrit ausscheiden, als sie durch Nahrung aufnehmen. So wurde von unterschiedlichen Gruppen zunächst L-Arginin als Substrat für cGMP und NO in Nervenzellen beschrieben und wenig später in Makrophagen eine körpereigene Nitratbildung, ebenfalls aus L-Arginin identifiziert (28). Es war somit klar, dass NO durch enzymatische Prozesse in verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers gebildet wird. Die dazu befähigten Enzyme wurden Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) genannt und bisher unter anderem im Cerebellum, in Hepatozyten, Makrophagen, Thrombozyten und eben in Endothelzellen gefunden (29).

### **Wirkung von Stickstoffmonoxid**

NO als sehr kleines, gasförmiges, ungeladenes Molekül diffundiert leicht durch biologische Membranen. Das diffundierte NO hat im Gewebe eine für ein Radikal relativ lange Halbwertszeit von 2-3 Sekunden. Die direkte Detektion gestaltet sich in ex-vivo Plazentagewebe trotzdem sehr schwierig (30). Die Eigenschaften von NO werden als „autacoid“ bezeichnet, die jenen lokaler Hormone mit kurzer und synthesesnaher Wirkung entsprechen (31). Die Wirkungen von NO auf physiologischer sowie pathophysiologischer Ebene sind vielzählig und beeinflussen nicht nur das kardiovaskuläre und neuronale, sondern ebenfalls das reproduktive System (z.B. Plazenta) sowie das Immunsystem (32).

### Relaxation:

Im Gefäßsystem entfaltet es über eine parakrine Wirkung trotz kurzer Wirkungsdauer eine hohe biologische Aktivität und führt zu einer Vasodilatation besonders der Kapazi-

tätsgefäße und Arteriolen. Es reguliert dabei den systemischen Blutdruck und die lokale Mikrozirkulation in gut durchbluteten Organen wie z.B. der Lunge, dem Gehirn und der Plazenta (33).

#### Adhäsions- und Proliferationshemmung:

An der Oberfläche von Endothelzellen verhindert NO die Anheftung von Leukozyten und somit einen der ersten Schritte der Arteriosklerose (34). Auch in Thrombozyten vermindert es deren Aggregation und Adhäsion an der Gefäßwand. Zudem wirkt es antiproliferativ auf glatte Muskelzellen in der Gefäßwand und Makrophagen (Schaumzellen), was ebenfalls im Rahmen der Arteriosklerose-Entstehung von Bedeutung ist (35). Die antiproliferative Wirkung auf Myozyten spielt auch bei der Senkung des Gefäßwiderstandes in der Plazenta eine Rolle (36).

#### Immunmodulation und Infektabwehr:

In Immunzellen, besonders in Makrophagen, wird NO in hoher Konzentration gebildet. Es wird angenommen, dass so in erster Linie die Abwehr von Erregern durch einen zytotoxischen Effekt bewirkt werden soll. Zusätzlich wird der drastische systemische Blutdruckabfall beim septischen Schock mit einer hohen Dosis von NO in Verbindung gebracht (37).

### 1.2.2 Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)

Für die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) wurden bisher vier Isoformen beschrieben, die als Homodimere vorkommenden und jeweils aus 1.200 – 1.400 Aminosäuren bestehen. Es wurden drei konstitutive Formen (cNOS) und eine induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS, NOS2) identifiziert, welche sich von den anderen Formen wesentlich in der Wirkungsdauer und Synthesemenge unterscheidet (38).

Die folgende Abbildung zeigt schematisch die Isoformen, in der jeweils eine Oxygenase- und eine Reduktasedomäne, eine Bindungsstelle für den Kalzium-Calmodulin-Komplex sowie die aufgeführten Coenzyme und prosthetischen Gruppen gekennzeichnet sind. Die Splicingvariante (mtNOS) ist nicht abgebildet.

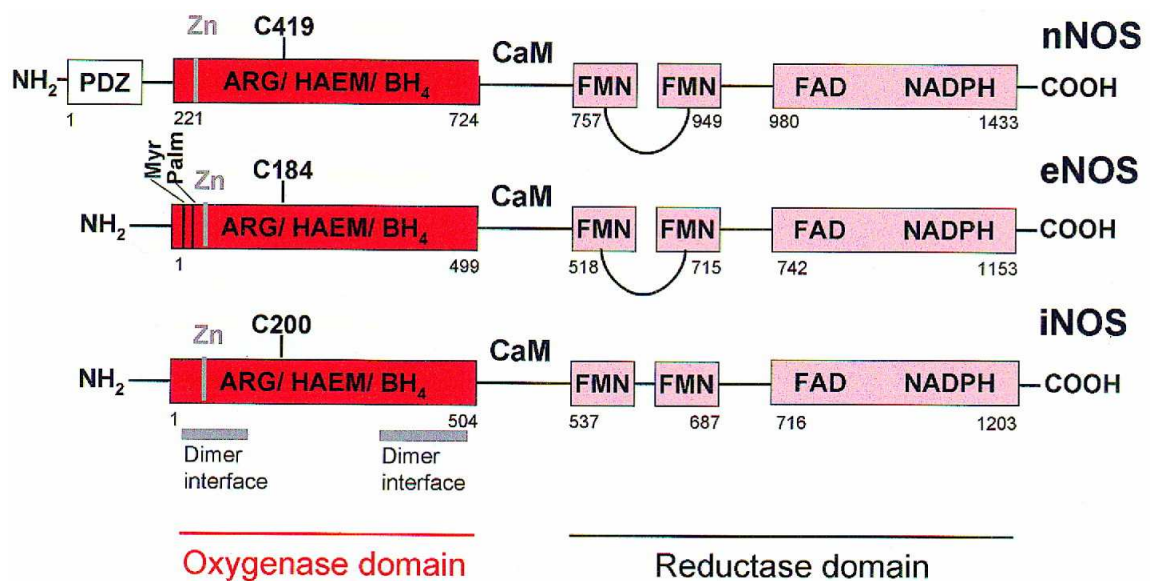


Abb. 1: Schematische Darstellung der humanen nNOS, eNOS und iNOS Oxygenase- und Reduktasedomänen mit Anzahl der Aminosäuren. C419, C184, C200: Cystein-Reste, CaM: Kalzium-Calmodulin, Myr: Myristoyl, Palm: Palmitoyl, Zn: Zink-Liganden. Darstellung nach Alderton 2001 (39).

Die NOS als Dioxygenase oxidiert die Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Da für die NO-Bildung sieben Einzelelektronen sowie beide Atome des Sauerstoffmoleküls (O<sub>2</sub>) übertragen werden müssen, besitzt die NOS ein starkes Redox-System mit FAD und FMN als prosthetische Gruppen am C-terminalen Ende. Am N-terminalen Ende befindet sich die Bindungsstelle für L-Arginin und die Kofaktoren Häm und 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>). Als Substrate dienen NADPH, Sauerstoff und L-Arginin (27).

In der folgenden Tabelle sind die Unterschiede der NOS-Isoformen hinsichtlich Lokalisation, Wirkungsdauer und Synthesemenge zusammengefasst. Auffällig ist die im Vergleich zu allen anderen Isoformen sehr lang andauernde Wirkung und drastisch erhöhte Syntheseleistung der induzierbaren NOS.

Tabelle 3:

<b>Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase</b>				
	eNOS	nNOS	iNOS	mtNOS (nNOS-Splicing)
Typ	konstitutiv	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
Vorwiegende Lokalisation	Endothel	Neuronen	Immunzellen	Mitochondrien
Dauer der Aktivität	Sekunden	Sekunden	Stunden bis Tage	Sekunden
Synthesemenge	Picomol	Picomol	Nanomol	Picomol
Subzelluläre Verteilung	95 % membranständig	>90 % im Cytosol	80–90 % im Cytosol	mitochondriale Membranen
Regulierung	Ca-Calmodulin	Ca-Calmodulin	unabhängig von Ca-Calmodulin	Ca <sup>2+</sup> - und spannungsabhängig

Tab. 3: Übersicht der NOS-Isoformen

### **Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS, NOS1):**

In nitrergen Neuronen wird NO durch die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS, NOS1) als Neurotransmitter für die NO/cGMP-Signaltransduktion und als Neuromodulator gebildet. Diese finden sich unter anderem in sympathischen Neuronen und in myenterischen Ganglienzellen.

### **Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS, NOS2):**

Die iNOS wurde 1991 als letzte der bisher identifizierten Isoformen in Makrophagen nach Stimulation mit Lipopolysacchariden beschrieben (40). Nach Induktion durch proinflammatorische Mediatoren (Zytokine, pathogene Viren, Hitzeschockproteine,

Hypoxie) findet sich die iNOS vorwiegend in Zelltypen des Immunsystems, wie Makrophagen, Mesangiumzellen, Mikrogliazellen und Kupferzellen. Später wurde auch in Zellen außerhalb des Immunsystems die Expression von iNOS nach adäquatem Reiz nachgewiesen, so in Endothelzellen, Astrozyten, Hepatozyten, Fibroblasten, beta-Zellen des Pankreas sowie Tumorzellen (41). Die iNOS wird höchstwahrscheinlich sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* ausschließlich nach Stimulation exprimiert (42).

#### **Mitochondriale Stickstoffmonoxid-Synthase (mtNOS):**

Kürzlich wurde eine mitochondriale Unterform beschrieben, für die bisher kein eigenes Gen gefunden wurde und welche als Splicingvariante der nNOS diskutiert wird. Diese ist in den Mitochondrien an der Modulation des Zellumsatzes beteiligt (43).

#### 1.2.3 endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS)

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS, NOS3) ist, auch aufgrund des unmittelbaren Einflusses auf die Gefäßregulation, die bisher am besten erforschte Isoform (32, 44). Die pathophysiologische Bedeutung von eNOS wurde unter anderem in homozygot eNOS-defizienten Mäusen gezeigt, welche Hypertonie und ischämische Gewebeschäden entwickelten (45).

Am Endothel bewirken physikalische Scherkräfte an sackförmigen Membranstrukturen (Caveolae) über Caveolin, welches im Ruhezustand eNOS inaktiviert, einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über membranständige Kanäle. Dieses bindet an den  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex, welcher an eNOS bindet und die Inaktivierung aufhebt. Das nun freigesetzte NO wirkt durch eine Vasodilatation den Scherkräften entgegen (46). Einer ständigen Irritation des Endothels, etwa im Rahmen einer Hypertonie, folgt eine Induktion der eNOS.

Ein anderer, über Mediatoren regulierter Mechanismus, entleert über membranständige und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher. Danach erfolgt ebenfalls die Bindung von Kalzium an den  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex und die eNOS-Aktivierung (25). Die folgende Abbildung zeigt diesen ersten Schritt sowie die weitere Kaskade.

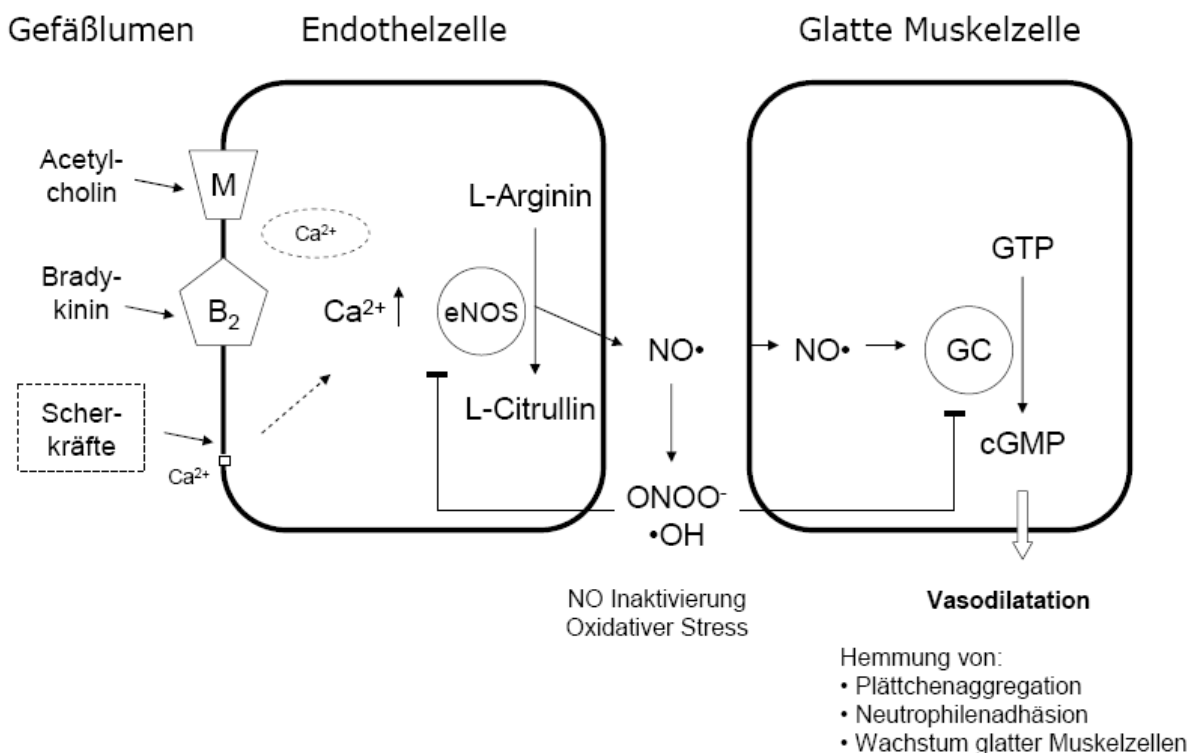


Abb. 2: Rolle von Stickstoffmonoxid in Endothel- und glatten Muskelzellen

Mediatoren aus dem Gefäßlumen oder Scherkräfte bewirken in der Endothelzelle einen Kalziumanstieg, entweder durch Kalzium-Einstrom oder durch intrazelluläre Kalziumspeicher. Dies führt über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex zu einer Aktivierung der eNOS, welche durch Aminosäurespaltung NO in das umliegende Gewebe freisetzt. In der glatten Muskelzelle aktiviert NO eine Guanylatzyklase. Das gebildete cGMP führt zu einer Senkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels der Muskelzelle und dadurch zu Vasodilatation. B<sub>2</sub>: Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor; M: muskarinerges ACh-Rezeptor; cGMP: zyklisches Guanosin 3',5'-Monophosphat; GC: Guanylatzyklase; GTP: Guanosin-5'-Triphosphat;  $\cdot\text{OH}$ : Hydroxyl Radikal; ONOO<sup>-</sup>: Peroxynitrit. Eigene Darstellung

Kurzfristig führen also physikalischer Stress und die in der Abbildung gezeigten Mediatoren zu einer NO-Freisetzung über die eNOS am Endothel durch Ablösung des Caveolins (Proteininteraktion). Langfristig reguliert und somit auch einer quantitativen Bestimmung zugänglich wird eNOS durch andauernde Scherkräfte (Hypertonie) mit folgender Transkriptionsfaktor-vermittelter gesteigerter Proteinsynthese. Die Substratverfügbarkeit (L-Arginin) scheint bei der physiologischen Reaktion kein limitierender Faktor zu sein, allerdings wurde im Tierversuch mittels L-NAME (Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester) durch Substratverknappung eine Endotheldysfunktion gezeigt (47, 48).

### **Nitrosativer Stress**

Entstehen im Organismus hohe Mengen von NO (z.B. bei der Infektabwehr), versagt die NO-Inaktivierung, welche sonst überwiegend durch Bindung an Häm im Blut stattfindet und es kommt zu einer Kumulation. Das unzureichend abgebaute NO reagiert mit radikalen Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) zu dem starken Oxidans Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ). Diese Verbindung führt durch Interaktion mit Proteinen und DNA zu Gewebeschäden, was als nitrosativer Stress bezeichnet wird. Zudem wirkt  $ONOO^-$  hemmend auf die eNOS und die lösliche Guanylatzyklase, welche in der glatten Muskelzelle die NO-Wirkung (Vasodilatation) katalysiert (49).

Zu der zytotoxischen Wirkung kommt somit auch eine abgeschwächte physiologische NO-Wirkung und relative Bioverfügbarkeit hinzu. In diesem Zusammenhang wird auch von einer janusköpfigen Funktion der eNOS gesprochen, die durch eine eNOS-Entkopplung statt ihrer protektiven eine zytotoxische Funktion einnimmt. Zu hohe Mengen an eNOS bzw. NO weisen damit auf einen pathologischen Prozess hin (50).

#### **1.2.4 Genetische Regulation der Stickstoffmonoxid-Synthase**

Neben der Regulation auf Proteinebene gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte Genvarianten Einfluss auf die Konzentration der eNOS in bestimmten Geweben haben. Der

Genlocus für die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthese liegt auf Chromosom 7q35-36. Das Gen besteht aus 25 Introns und 26 Exons, umfasst insgesamt 21 Kilobasen kodiert für eine mRNA von 4052 Nukleotiden (51).

Spezifische Marker mit einem hohen Polymorphismusgrad sind für eine so genannte QTL-Analyse geeignet („*quantitative trait locus*“, Region eines quantitativen Merkmals). So werden Abschnitte eines Chromosoms genannt, für die klinische Studiendaten über deren Einfluss auf die Ausprägung eines quantitativen phänotypischen Merkmals (zum Beispiel Körpergewicht und -länge oder Entwicklung von hypertensiven Erkrankungen) vorliegen.

In einem Vorversuch am selben Studienmaterial wurde eine Analyse des eNOS-Polymorphismus aus Leukozyten des Mutterblutes durch *Hocher et al.* unternommen (52). Der Intron 4a/b Polymorphismus stellt eine variable Menge von *tandem repeats* (VNTR) dar und wurde in der gesamten Studienpopulation von 2186 Mutter/Kind-Paaren analysiert. Bereits während der Erforschung des eNOS-Gens fand man Polymorphismen und mutmaßte eine daraus resultierende Krankheitsdisposition bezüglich kardiovaskulärer Ereignisse (53). Folglich wurden acht Polymorphismen gefunden, sechs einzelne Basentausche und zwei repetitive Sequenzen von denen der Intron 4a/b bislang am häufigsten untersucht wurde.

Eine Abhängigkeit der plazentaren eNOS von diesem Polymorphismus könnte auf dessen genetische Regulierung deuten. Es werden jedoch auch epigenetische Vorgänge vermutet, die unabhängig vom Polymorphismus für eine veränderte Proteinexpression verantwortlich sind.



### 1.3 Proteine des Plazentagewebes und Gefäßregulation

Die eNOS wurde als führende Isoform der NOS in der Plazenta, potentielle Regelstelle des Perfusionsdruckes und der fetalen Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff identifiziert (54, 55). Es wurde gezeigt, dass NO eine wesentliche Rolle bei der Regulation des fetoplazentaren Blutflusses und Gefäßwiderstandes einnimmt, da die Plazenta kein autonomes Nervensystem besitzt, welches eine zusätzliche Gefäßregulation ermöglichen würde (56).

Lokalisiert ist die eNOS insbesondere in den villösen Zotten der Kotyledonen und auf zytologischer Ebene in den Synzytiotrophoblasten, welche die Barriere zwischen Fetus und Mutter in diesen Zotten bilden (54, 57). Schon bei der Implantation der Blastozyste in das Endometrium wird eine wesentliche Rolle von NO vermutet, welches an den einsprossenden Gefäßen für die Senkung des Widerstandes sorgt. Es wurde gezeigt, dass eine Inhibierung der NOS durch die Blockierung des Substrats L-Arginin zu einer Erhöhung des Widerstands im fetoplazentaren Blutfluss führt (58-60).

Aufgrund der geringen Halbwertszeit von wenigen Sekunden von NO und der damit verbundenen eingeschränkten Möglichkeit der direkten Bestimmung wird der quantitative Nachweis von NO über die Expression des Enzyms eNOS geführt (61).

Zheng et al. zeigten mittels Chemilumineszens bzw. Western Blot parallel verlaufende Konzentrationen von NO und eNOS-Proteinexpression in Kotyledonengewebe zu unterschiedlichen Trächtigkeitzeitpunkten beim Schaf. So steigt die eNOS- und NO-Konzentration von Trächtigkeitstag 110 (entspricht beim Menschen ca. der 32. Schwangerschaftswoche) bis zu Tag 130 (entspricht beim Menschen ca. der 37. Schwangerschaftswoche) kontinuierlich bis auf das 2,5fache an, um dann kurz vor der Geburt (gemessen an Tag 142, entsprechend ca. der 39.-40. Schwangerschaftswoche) wieder auf das Ausgangsniveau abzusinken (61). Zusätzlich wurde die iNOS bestimmt, welche je-

doch über alle Messpunkte auf einem basalen Niveau ohne Korrelation zur NO-Konzentration gemessen wurde.

Um einen Verlauf beim Menschen abzubilden untersuchten Schiessl et al. 2003 die Konzentrationen von Nitrit/Nitrat und cGMP als Metabolite von NO im mütterlichen Blut und Urin. Diese verhielten sich hingegen konstant im Verlauf der Schwangerschaft und zeigten keine Korrelation mit dem Pulsatilitätsindex der uterinen Gefäße, also einem Parameter der fetalen Versorgung (62). Die Bestimmung von NO-Metaboliten ermöglicht zwar eine Verlaufsbetrachtung, scheint aber die vaskuläre Situation und somit die fetoplazentare Versorgung nicht abzubilden.

Das NO-System wurde auch im humanen Uterus gefunden und scheint eine bedeutende Rolle in der Geburtseinleitungsphase zu spielen. In dieser nimmt die Reaktion der Gefäße auf relaxierende Faktoren deutlich ab. Die parakrine Wirkung von NO steuert so den Uterustonius, die Blutgerinnung und die Immunsuppression; alles Faktoren, die einen zu erwartenden Blutverlust der Mutter und die immunologischen Abwehrreaktionen begrenzen (63, 64).

Myatt et al. untersuchten die eNOS-Proteinkonzentration in der Plazenta von präeklampsischen Müttern und Neugeborenen mit IUGR. In beiden Gruppen wurde eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration gefunden. Eine mögliche Erklärung sehen die Autoren in einer adaptiven Regulation des Endothels aufgrund der hohen hypertensiven Scherkräfte bei Präeklampsie und der mangelnden intrauterinen Versorgung mit Nährstoffen und Hypoxie bei IUGR (65). Auch Nasiel et al. fanden erhöhte eNOS mRNA bei IUGR und PE im Vergleich zu Plazenten normaler Schwangerschaften (56). In peripheren Thrombozyten von Müttern im dritten Trimenon bei einer IUGR-Schwangerschaft wurden ebenfalls erhöhte Werte von NO und Peroxynitrit gefunden (66).

Gegenteilige Ergebnisse wurden von Beinder et al. veröffentlicht, die eine verminderte NOS-Aktivität im uteroplazentaren Übergang fanden und diese als mögliche Ursache für schlechte Perfusion, Thrombosen der intervillösen Zotten und damit IUGR vermuten (67). Auch Schiessl et al. wiesen eine verminderte Expression von eNOS in Synzytiotrophoblasten von Neugeborenen mit IUGR, allerdings nicht in denen mit PE, nach (55).

Die Gefäßregulation der Plazenta ist aufgrund der fehlenden Innervation maßgeblich von lokalen und systemischen vasoaktiven Substanzen abhängig. Neben der eNOS als lokalem endothelständigem System reguliert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) durch humorale Steuerung die Durchblutung der Plazenta (33, 68).

Zusammenhänge zwischen eNOS und Klotho, einem Protein welches mit Alterungsprozessen in Verbindung steht, zeigen, dass Klotho modulierenden Einfluss auf eNOS und somit die NO-Freisetzung am Endothel hat. Zudem konnte gezeigt werden, dass die TNF-alpha vermittelte Inhibierung von eNOS durch Klotho aufgehoben wird (69).

PPAR $\gamma$  ist ein intrazellulärer nukleärer Rezeptor, der den Fettsäure- und Glukosestoffwechsel reguliert. Er wird pharmakologisch als Bindungsstelle für die agonistischen Thiazolidindione benutzt und wirkt antidiabetogen. In Endothelzellen wurde eine antiarteriosklerotische Wirkung nachgewiesen, indem eine Aktivierung des PPAR $\gamma$  die inflammatorische Antwort geschädigter Endothelzellen abschwächt. In humanen Plazenten zum Geburtszeitpunkt wurde bei diabetischen Müttern eine erniedrigte NO Freisetzung durch PPAR $\gamma$  Regulierung gefunden (70).

Um diese Interaktionen zu überprüfen, wurden die Betrachtung des RAAS-Systems, von Klotho und von PPAR $\gamma$  in die Betrachtung im Hinblick auf die Gefäßregulation der humanen Plazenta aufgenommen.

## 2 Fragestellung

Die bisherigen Arbeiten zu Auswirkungen der vaskulären Regulation über eNOS in der Plazenta wurden mit niedrigeren Fallzahlen ( $n < 20$ ) oder im Tierversuch durchgeführt (55, 61, 65). Zudem waren die Ergebnisse in der Vergangenheit widersprüchlich. Das janusköpfige Signalmolekül NO wurde in verschiedenen Studien für protektive wie auch für toxische oder adaptive Einflüsse verantwortlich gemacht (71).

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase spielt eine entscheidende Rolle in der vaskulären Regulation der Plazenta, deren Mechanismen aber immer noch unzureichend verstanden werden. In dieser Arbeit soll an dem bisher größten Patientenkollektiv ( $n=299$ ) der Zusammenhang von eNOS und Parametern der Schwangerschaft, der fetalen Programmierung und Interaktionen mit anderen Proteinen untersucht werden.

Dazu wurden mehrere Fragestellungen erarbeitet:

- 1.) Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und fetalen Parametern.
- 2.) Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und maternalen Parametern.
- 3.) Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und eNOS-Polymorphismus.
- 4.) Zusammenhang zwischen eNOS und anderen Proteinen der Gefäßregulation:  
Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), Angiotensin-II-Rezeptor Typ1, Klotho, Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR $\gamma$ ).

Die Absicht dieser klinisch epidemiologischen Assoziationsstudie ist es, Hypothesen zu testen und neue zu generieren. Die Betrachtung der placentaren Regelsysteme auf zellulärer und subzellulärer Ebene erfolgte hier nicht, sodass keine kausalen Ableitungen getroffen werden können.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Studiendesign**

In der Klinik für Geburtsmedizin, Campus Mitte der Charité - Universitätsmedizin Berlin wurde eine prospektive Kohortenstudie im Zeitraum von November 2002 bis Januar 2004 durchgeführt. Alle Frauen, die in dieser Klinik entbunden haben, wurden gebeten an der Studie teilzunehmen und Informationen über den Verlauf der Schwangerschaft zu geben und die Erlaubnis zu erteilen, Blut und das Plazentagewebe im Labor untersuchen zu lassen. Die Teilnehmerquote lag bei 93,7%.

#### **Ein- und Ausschlusskriterien**

Um eine verlässliche Erhebung der Sozialdaten zu gewähren, bestand als Einschlusskriterium eine ausreichende Kenntnis der deutschen oder englischen Sprache der Mutter. Zudem wurden nur Teilnehmer eingeschlossen, deren Mutterpass vollständig geführt und deren Probe korrekt beschriftet wurde. Um etwaige Unterschiede ethnischer Herkunft zu eliminieren, wurden retrospektiv nur alle kaukasischen Mütter ausgewählt. Insgesamt konnten 299 Teilnehmer in die Studie aufgenommen werden.

Genetische bzw. chromosomale Defekte, Uterus- oder Plazentaanomalien sowie Röteln-, CMV-, Toxoplasmose- und VZV-Infektionen sowie Mehrlingsschwangerschaften wurden post-hoc aus der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studienpopulation ausgeschlossen.

Da diese Studie am selben Material und über Jahre von mehreren Doktoranden durchgeführt wurde, ergibt sich in der Anzahl der Proben eine gewisse Variabilität, je nach untersuchtem Protein. Auch nach mehrmaligen Versuchen war es bei einigen Proben von Plazentagewebe nicht möglich eine korrekte Proteinanalyse durchzuführen. Diese Proben wurden ebenfalls retrospektiv ausgeschlossen.

## Datenerhebung

Anhand eines strukturierten persönlichen Interviews wurden empirisch Sozialdaten und Risikofaktoren für die Schwangerschaft erfragt, welche in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 4:

Daten aus dem systematischen Interview	
Biometrische Daten	Geburtsdatum, Größe, Gewicht (vor der Schwangerschaft)
Risikofaktoren	Rauchverhalten
	Diabetes (vor/während der Schwangerschaft, in der Familie)
	Bluthochdruck (vor/während der Schwangerschaft, in der Familie)
Angaben Kindsvater	Alter, Größe, Gewicht, Rauchverhalten, Alkoholkonsum

Tab. 4: Datenerhebung der Studienteilnehmer, systematisches Interview

Zusätzlich wurden Daten zum Schwangerschafts- und Geburtsverlauf, welche in der untenstehenden Tabelle aufgeführt sind, aus dem Mutterpass entnommen und in eine Datenbank übertragen. Die Daten des Mutterpasses wurden von dem behandelnden Facharzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe erhoben.

Tabelle 5:

Daten aus dem Mutterpass	
Biometrische Daten der Mutter	Geburtsdatum, Größe, Gewicht (vor der Schwangerschaft und im Verlauf)
Biometrische Daten des Kindes	Geburtsgewicht, Geschlecht, Länge, Kopfumfang, berechneter und korrigierter Geburtstermin
Geburtsspezifische Daten	Anzahl der Schwangerschaften, Anzahl der Geburten, Gestationsalter, APGAR-Score, Geburtsmodus, Lage
Risikofaktoren der Schwangerschaft	Ödeme
	Blutdruckwerte (während der Schwangerschaft bei Vorsorgeuntersuchungen)
	Infektionen, Impfungen
	sonstige Schwangerschaftskomplikationen

Tab. 5: Datenerhebung aus dem Mutterpass

**Gewinnung des Untersuchungsmaterials**

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Geburtsmedizin, Campus Mitte der Charité - Universitätsmedizin Berlin wurden die Hebammen der Geburtsstation angewiesen, nach der Beurteilung der Plazenta durch den verantwortlichen Arzt, bei jeder Geburt eine Kotyledone aus der Mitte der Plazenta zu entnehmen, in ein bereitgestelltes Gefäß zu geben und an das Labor zu übergeben. Die Aufarbeitung des Plazentagewebes erfolgte im Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

**Ethikantrag**

Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Charité Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Alle Teilnehmer wurden über das Forschungsvorhaben aufgeklärt, haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben und eine Datenschutzerklärung unterzeichnet.

## 3.2 Material

### 3.2.1 Instrumente

<b>Instrument</b>	<b>Hersteller</b>
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa AG, Mortsel, Belgien
Feinwaage	Sartorius BL600, Sartorius AG, Göttingen
Gel-Elektrophorese-Kammer	HU10W Wide Format Mini-Plus, Scie Plas Ltd., Cambridge, UK
Netzgerät	Biometra standard P25, Whatman Biometra GmbH, Tübingen
pH-Meter	WTW pH537, Wiss.-Techn. Werstätten GmbH, Weilheim
Photometer	Spectrophotometer Du530 UV/Vis, Beckmann Coulter, Krefeld
Pipetten	Eppendorf Reference® variabel, Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage	Scaltec SBC22, Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Scanner	Canon CanoScan 4400F, Canon Inc., Tokyo, Japan
Schüttler	Schüttler WT-17, Biometra, Göttingen
Semi Dry Blotter	Transblot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Biorad Laboratories Inc., Hercules, USA
Tischerhitzer	Test Tube Thermostat TCR 100, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ultraschall-Gerät	Sonoplus, Bandelin, Berlin
Vortex	Vortex Genie 2-Mixer, Bender & Holbein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 13, Heraeus Sepatech GmbH, Hanau

### 3.2.2 Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Eppendorfgefäße	1,5ml Reaktionsgefäß 3810, Eppendorf AG, Hamburg
Nitrocellulosemembran, Filterpapier	0,45µm Porengröße, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Film	Amersham Hyperfilm, GE Healthcare Inc., Fairfield, USA



Einmal-Skalpell, Aesculap	B. Braun Melsungen AG, Tuttlingen, Deutschland
Pipetten, 5/10/25ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Petrischalen, 35x10/100x20 mm	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Falcon® Röhrchen, 5-20ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

### 3.2.3 Chemikalien

Stoff	Hersteller
Ammoniumpersulfat	Fluka, Hamburg, Deutschland
BSA bovine serum albumin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Complete protease inhibitor	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
p-Comarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PAA Polyacryl Säure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ponceau-S	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Rotiload 1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDA (Natriumdiacetat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumaurylsulfat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Bio Rad, München, Deutschland
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

---

Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

---

### 3.2.4 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden im Labor selbst hergestellt.

---

#### Zusammensetzung des Lysepuffers

RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay)

---

0,5% (w/v) SDA

50 mM Tris pH 8,5

150 mM NaCl

0,1 % (v/v) SDS

1% (v/v) Triton X-100

2x Roche complete protease inhibitor

NaN<sub>3</sub> 0,2%

---

---

#### Zusammensetzung des TBS-T Puffers

---

20 mM Tris

140 mM NaCl

0,1% (v/v) Tween-20

pH 7,6 (HCl, KOH)

---

---

**Zusammensetzung des Transferpuffers**

---

184 mM Glycin  
24 mM Tris  
20% (v/v) Methanol

---

---

**Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers**

---

25 mM Tris  
250 mM Glycin  
0,1 % (w/v) SDS  
pH 8,3 (HCl, KOH)  
H<sub>2</sub>O bidest.

---

---

**Zusammensetzung des Strippingpuffers**

---

25 mM Glycin  
1% (w/v) SDS  
pH 2,0 (HCl, KOH)

---

---

**ECL-Mix (Enhanced chemiluminescence)**

---

**Lösung 1**

Luminol (0,8858g in 20 ml DMSO)  
p-Conmarinsäure (0,2956 g in 20 ml DMSO)  
1M Tris-HCl pH 8,5  
H<sub>2</sub>O

**Lösung 2**

H<sub>2</sub>O 30%  
1M Tris-HCl pH 8,5  
H<sub>2</sub>O

---

### Zusammensetzung der Western Blot Gele

<b>Trenngel 10%</b> v/v, Acrylamid, Rotiphorese Gel 30	<b>Sammelgel 5%</b> v/v, Acrylamid, Rotiphorese Gel 30
9,9ml H <sub>2</sub> O (deionisiertes Aqua bidest.)	10,2ml H <sub>2</sub> O (deionisiertes Aqua bidest.)
8,3ml 30% w/v Polyacryl Säure	2,53ml 30% w/v Polyacrylsäure
6,3ml 1,5 M Tris, pH 8,8 eingestellt und autoklaviert	1,88 M Tris, pH 6,8 eingestellt und autoklaviert
0,25ml 10% w/v SDS	0,15ml 10% w/v SDS
Polymerisationsstarter:	
0,25ml 10 % w/v APS	0,25ml 10 % w/v APS
0,01ml TEMED (Tetramethylethyldiamin)	0,015ml TEMED (Tetramethylethyldiamin)
= 25ml	= 15ml

### 3.2.5 Antikörper

<b>Verwendete Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Purified Mouse Anti-eNOS/NOS Type III Mab, clone3, Material Nr. 610297	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Anti-Aktin (20-33) antibody produced in rabbit, A5060	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA
goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

### 3.2.6 Software

<b>Verwendete Software</b>	<b>Hersteller</b>
AlphaEase FC Software Version 3.1.2	Alpha Innotech Company, San Leandro, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Microsoft Excel, Version XP	Microsoft Corp., Redmond, USA
SPSS Statistical Package for the Social Sciences, Version 17.0	SPSS Inc., Chicago, USA

### 3.3 Methoden

Das labortechnische Prozedere dient der Quantifizierung der Expression endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase im Plazentagewebe der Studienteilnehmer. Dazu wurde nach der Proteinisolation eine Western Blot-Analyse jeder doppelt aufgetragenen Probe mindestens zweimalig durchgeführt. Densitometrisch ausgewertet erlaubt diese Methode eine Quantifizierung des Proteins unabhängig von dessen momentaner Aktivierung oder Hemmung durch Membranproteine (z.B. Caveolin-1) und wurde deshalb anderen Methoden vorgezogen. Zudem wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der eNOS-Proteinexpression mittels Western Blot und NO-Menge im Plazentagewebe im Tierexperiment beschrieben (61).

#### 3.3.1 Proteinisolation

Die Gewebeproben der humanen Plazenta in Form einer Kotyledone wurden im Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité – Universitätsmedizin Berlin entnommen und kryokonserviert. Für die Proteinisolation wurde jeder Kotyledone im gefrorenen Zustand ein circa ein Gramm schweres, homogenes Stück aus dem mittleren Querschnitt mit einem sterilen Skalpell entnommen und in einem 1,5ml Standard Reaktionsgefäß 3810 (Eppendorf AG) in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) auf -196°C gekühlt.

Die gefrorenen Gewebeproben wurden in einem durch Stickstoff gekühlten Metallmörser zerkleinert und gewogen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter ständiger Kühlung auf Eis durchgeführt. Zur Proteinextraktion wurde RIPA-Lysepuffer im Verhältnis 1ml/100mg dem gemörserten Gewebe zugegeben.

Nach dem Schütteln mit dem Vortexer wurden die Zellmembranen mittels Beschallung mit Ultraschall aufgebrochen und somit die intrazellulären Proteine in das Trägermedium überführt. Dazu wurden Ultraschallwellen zweimalig für 15 Sekunden mit 7/10 Be-

schallungsintervallen und 80% Intensität appliziert. Anschließend wurde das Lysat bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Um Zelltrümmer, nicht aufgeschlossene Zellen und größere Zellorganellen aus der Probe zu entfernen, wurde der Aufschluss für 12 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert und das Pelett (Zelldebris) im Gefäß belassen. Der Überstand wurde zur Proteinmengenbestimmung abpipettiert.

### 3.3.2 Gesamtproteinbestimmung

Um gleiche Mengen des isolierten Proteins in die Gelelektrophorese übertragen zu können, wurde der Gesamtproteingehalt mittels Bicinchoninsäure Protein Assay Kit (BCA Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) ermittelt (72).

Die Methode nutzt die ablaufende Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Proteine im alkalischen Milieu. Detektierbar wird die Reaktion durch die Komplexbildung zweier Peptidgruppen der Bicinchoninsäure um das zentrale  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion, was eine Violettfärbung verursacht. Über dessen Intensität wird der Gesamtproteingehalt der Probe kolorimetrisch bestimmt. Das Farbsignal des wasserlöslichen Komplexes kann bei einem Absorptionsmaximum um 562nm als linear verlaufend betrachtet werden (73).

Als Standardprotein wurde bovines Serumalbumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen für eine Eichgerade verwendet. Die BSA-Proben wurden neben den Proteinlysaten aus dem Plazentagewebe auf eine sterile 96-Well-Platte jeweils dreifach aufgetragen, abgedeckt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Platte auf Eis bis Raumtemperatur gekühlt und dessen Farbintensität gemessen. Die Endkonzentrationen ergaben sich aus der Eichgeraden des BSA.

Anhand der Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurden die Proben mit Aqua bidest. auf 5µg/ml Gesamtproteinkonzentrationen verdünnt.

### 3.3.3 Herstellung des Standard-Plazentagemisches

Aus allen gewonnenen Proteinlysaten wurde ein Standardgemisch hergestellt, welches als Referenz für die einzelnen Proben diente.

Dazu wurde jeder Probe nach gründlichem Schütteln mit dem Vortexer eine Menge von 100µl entnommen, in einem 20ml-Falcon Röhrchen gesammelt und gemischt. Zur Vermeidung von zu häufigem Auftauen wurde von diesem Standardgemisch Aliquots von jeweils 1ml angefertigt und bei -20°C gelagert.

### 3.3.4 Western Blot

Die Proteinlysate wurden mit Hilfe der Westernblot Methode nach Laemmli hinsichtlich ihres Molekulargewichtes aufgetrennt (74). Dabei werden die Polypeptide zuvor durch Erhitzen auf 95°C denaturiert um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen und die Laufeigenschaften der Proteine zu vereinheitlichen. Weiterhin wurde die Probe durch Thiole reduziert um Disulfidbrücken aufzubrechen. Mit der Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) wird die Eigenladung der Proteine überlagert, sodass ausschließlich nach dem Molekulargewicht getrennt wird. Das Molekulargewicht von eNOS liegt bei 133 kDa, jenes von Aktin bei 42 kDa.

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE wurden 10%ige SDS-Gele als Trenngel und 5%ige SDS-Gele als Sammelgel verwendet. Der Zusatz „diskontinuierlich“ beschreibt diese Aufteilung in Sammel- und Trenngel. Die Gele wurden in 10%iger bzw. 5%iger SDS-Konzentration nach oben genannter Zusammensetzung hergestellt und aktiviert.

#### **Vorbereitung:**

Die Glasplatten, Kämme und Spacer der Gel-Elektrophorese-Kammer wurden mit Ethanol desinfiziert und nach dem Trocknen zusammengesetzt. Anschließend wurden

25ml des 10%igen Trenngels für die 60-minütige Polymerisation eingegossen und mit Isopropanol zur Nivellierung und Vermeidung von Kontakt mit Sauerstoff, welcher die zur Polymerisation benötigten Radikale binden könnte, überschichtet und später abgegossen. Das Sammelgel wurde danach aufgetragen, die Kämme für die Taschen eingeschoben und für weitere 30 Minuten polymerisiert.

### Elektrophorese:

Alle Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit reduzierendem Ladepuffer (Rotiload 1, Roth) versetzt, geschüttelt und 5 min. bei 90°C inkubiert, auf Eis zu Raumtemperatur gekühlt und der Verdunstungsrest herunter zentrifugiert.

Die Gele wurden wie folgt beladen:

WB Tag 1 Datum:		Gel-Nr. 1/2											Proben-Nr.(fortlaufend)			
Gel Tasche Nr.	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Eichgeradenkonz. / Proben Nr.	20		25		30		35		40		<b>Marker</b>	2346		2347	...	
Probe ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )	20		25		30		35		40		PAGE RULER	15		15		
H <sub>2</sub> O bidest. ( $\mu\text{l}$ )	25		20		15		10		5			7,5		7,5		
Ladepuffer ( $\mu\text{l}$ )	15		15		15		15		15			7,5		7,5		
Gesamtladung ( $\mu\text{l}$ )	60		60		60		60		60			30		30		
	Aufsteigende Probenreihe aus Standardmix											Proben				

Abb. 3: Beladungsplan der Gele in der SDS-PAGE

Jede Probe wurde stets doppelt aufgetragen. Hinter der Probenreihe des Standard-Plazentagemisches in aufsteigender Konzentration wurde ein Proteinmarker aufgetragen. Danach folgen die einzelnen Proben in doppelter Auftragung. Je Gel konnten so ca. 15 Proben ausgewertet werden. Anschließend wurden die Gelplatten in die Elektrophoresekammer überführt, diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt und etwaige Luftblasen mit einer Kanüle beseitigt.



Die Elektrophorese wurde bei 80V für 30 Minuten gestartet, um den Übergang der Proteine vom Sammelgel in das Trenngel zu gewährleisten und danach bei 110V für weitere 2,5 Stunden im Kühlraum (4°C) durchgeführt.

### **Blotting:**

Anschließend wurden die Proteine im Semi-Dry Blot Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran von 5,5cm Breite und 17cm Länge übertragen. Die Nitrocellulose wurde in H<sub>2</sub>O bidest. für zwei Minuten aktiviert und zusammen mit dem SDS-PAGE-Gel und je drei Filterpapiere (Whatman-Papier) in getrennten Gefäßen mit dem Transferpuffer befeuchtet. Anschließend wurden die Membranen luftblasenfrei in den Semi-Dry-Blotter überführt, wobei je drei Lagen Filterpapier die Nitrocellulose und das Gel bedeckten. Es wurde bei 25 V / 500mA für eine Stunde geblottet.

### 3.3.5 Proteindetektion

Nach erfolgtem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mittels Ponceau-red (0,1 % [w/v] in 5 % Essigsäure [v/v]) angefärbt und optisch auf Fehler untersucht. Nach vollständigem Entfernen der Farbrückstände auf der Membran durch dreimaliges Waschen über 5 Minuten mit TBS-T wurden die Membranen mit 5% Milchpulver in Aqua dest. geblockt.

Anschließend folgte die Behandlung der Membranen mittels Primärantikörper (1:1000-1:2000 verdünnt in 5% Milchpulver in TBS-T) Purified Mouse Anti-eNOS/NOS Type III Mab, clone3, Material Nr. 610297 über Nacht bei 4° C auf einem Schüttler.

Nach dem Waschen mit TBS-T über dreimalig 10 Minuten erfolgte die Behandlung mit dem Sekundärantikörper (1:2000 in 4% bovinem Serumalbumin in TBS-T) goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005 für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. An-

schließlich wurden die Membranen letztmalig für dreimal 10 Minuten in TBS-T gewaschen.

Zur Detektion wurden je 5ml der Lösungen 1 und 2 des selbst hergestellten ECL-Mixes unmittelbar vorher im Verhältnis 1:1 gemischt. Davon wurden ca. 3 bis 3,5 ml des Substrates für 5 min auf die Membranen gegeben, diese in eine Filmkassette überführt und je nach Lumineszenzstärke zwischen 30 Sekunden und 10 Minuten belichtet. Für die Entwicklung der Filme wurden Entwickler und Fixierer von Kodak nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.3.6 Auswertung der Daten

Die angefertigten Filme wurden in einem Scanner (Canon CanoScan 4400F) mit 600dpi digitalisiert. Abbildung 4 zeigt exemplarisch einen entwickelten und digitalisierten Fotofilm, der im Anschluss densitometrisch ausgewertet wurde.

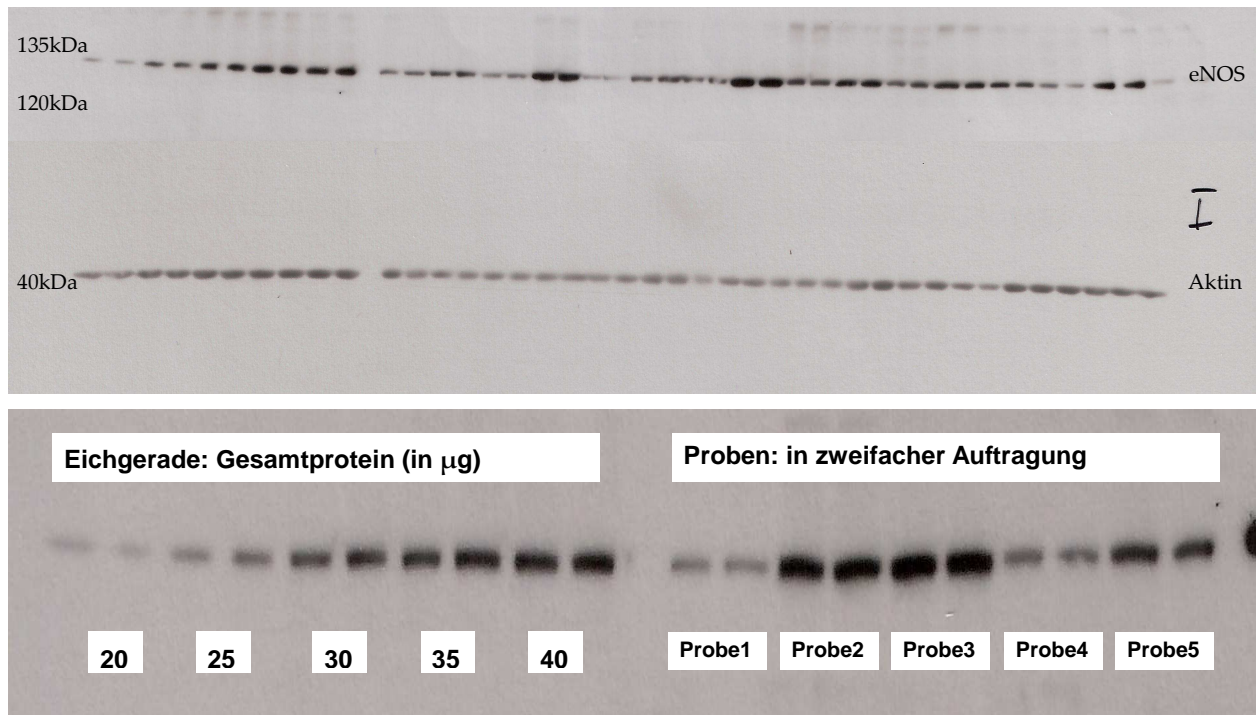


Abb. 4: Fotofilm der Western Blots aus Plazentalysaten, eNOS und Aktin doppelt aufgetragene Eichgeradengemische von 20, 25, 30, 35, 40 µg Gesamtprotein-Konzentration, Proteinmarker (Lücke), fortlaufend doppelt aufgetragene Proben. Eigene Darstellung.

Anschließend erfolgte die quantitative Auswertung der Filme densitometrisch mittels AlphaEase FC Software (Version 3.1.2, Alpha Innotech Company, San Leandro, USA). Hierbei wurden die Banden der eNOS bei 133 kDa auf dem digitalisierten Film umfahren und der von der Software ermittelte Schwarzwert (IDV, integrated density value) gegen den Hintergrund abgeglichen. Für die Aktin-Banden bei 42 kDa wurde ebenso verfahren.

Die so erhobenen Daten wurden in einer Microsoft Excel (Version XP, Microsoft Corp., Redmond, USA) Datenbank gespeichert und ausgewertet. Dabei wurden die Werte der Plazentagemisch-Reihe zu der Erstellung einer Referenzgeraden genutzt. Hierzu wurde der IDV der 20, 25, 30, 35, 40 µg / µl Gemischreihe, wie in Abbildung 5 gezeigt, in ein Koordinatenkreuz übertragen und eine Gerade ( $y=ax + b$ ) durch alle fünf Punkte gelegt.

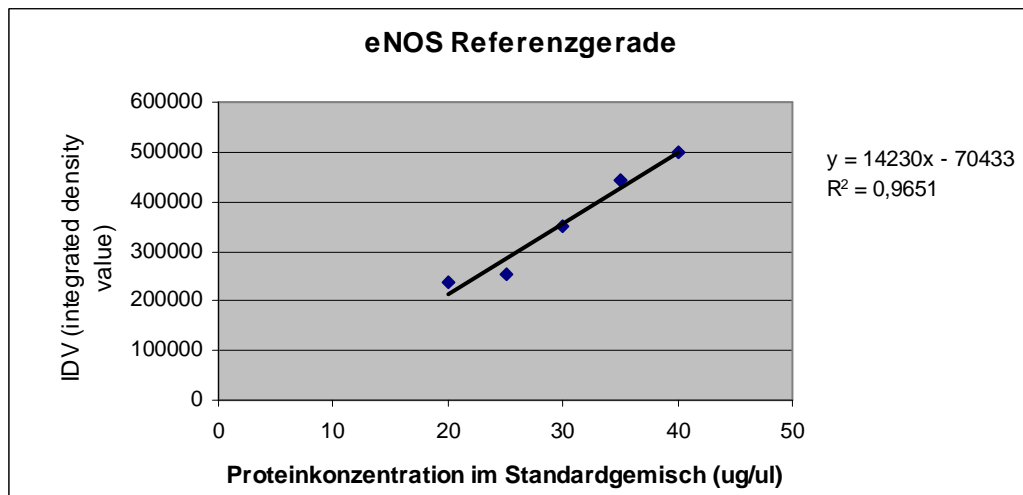


Abb. 5: Referenzgerade zur Berechnung der eNOS-Konzentration

Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  erklärt dabei den Anteil der Variabilität der abhängigen Variabel (Y), in diesem Fall des IDV, wobei 1,0 einen perfekt linearen Zusammenhang anzeigt. Für diesen Versuch wurden  $R^2$ -Werte von  $>0,9$  als suffizient angenommen, andernfalls der Versuch wiederholt. Für Aktin wurden nach gleicher Methode ebenfalls Referenzgeraden aus den Gemischen ermittelt und die Konzentrationen der einzelnen Proben daraus gefolgert. Da Aktin ein Housekeeping-Gen ist wird eine konstante Konzentration der Aktinwerte erwartet. Der Abgleich erfolgt zur weiteren Präzisierung der ermittelten eNOS-Werte. Die endgültigen Werte der einzelnen Proben ergeben sich aus den über die Referenzgerade errechneten eNOS-Konzentrationen, die schlussendlich noch mittels Aktinkonzentration relativiert wurden.

#### Statistische Auswertung:

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden das Software Package for the Social Studies, SPSS (Version 17.0, SPSS Inc. Chicago, USA) sowie GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Inc., La Jolla, USA) verwendet. In die Datenbank wurden die Ergebnisse weiterer Proteinuntersuchungen anderer Doktoranden der Arbeitsgruppe am selben Mate-

rial aufgenommen. Die Versuche wurden von Ludwig Schlemm (ACE), Marcel Schwietzer (AT-1), Ewelina Sceplik (PPAR $\gamma$ ) und Dr. Christoph Reichetzeder (Klotho) durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstest und dem Shapiro-Wilk-Test. Keinem der relevanten Parameter liegt eine Normalverteilung zugrunde. Lediglich für das Alter der Mutter konnte dies im Shapiro-Wilks-Test gezeigt werden.

Die Normverteilung der Grundgesamtheit ist eine Voraussetzung für die Korrelationsanalyse mittels Pearson-Test, welche bei intervallskalierten oder dichotomen Merkmalen lineare Zusammenhänge aufzeigt. Dieser kann hier nicht angewendet werden, da bei nicht-normalverteilter Grundlage nur die nicht-parametrischen Tests gültig sind. Dazu zählt der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, welcher bei ordinalskalierten oder nicht-normalverteilten Variablen, wie in diesem Fall, angewendet werden kann. Für den Vergleich zweier Gruppen wird der auf Rangplatzsummen basierende Mann-Whitney-U-Test, bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die dargestellten Boxplot-Diagramme sind Whiskers-Kastendiagramme mit 5-95% Interpercentilenabstand mit der Darstellung von Extremwerten.

Für alle Analysen werden Signifikanzwerte von  $p < 0,05$  als signifikant(\*),  $< 0,01$  als hochsignifikant(\*\*) und  $< 0,001$  als höchstsignifikant(\*\*\*) angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Merkmale der Studienpopulation und Messwerte

**Tabelle 6:**

<b>Mutter</b>	
- Alter (Jahre)	30,7 +/- 5,6
- Körperlänge (cm)	167,7 +/- 6,7
- BMI vor der Schwangerschaft (kg m <sup>-2</sup> )	23,6 +/- 4,3
- Primipara (%)	61,2
- Primigravida (%)	46,2
- Geburtsmodus (Sectio / vag. OP / spontan, %)	30,1 / 9,0 / 60,9
- Plazentengewicht (g)	595,9 +/- 140,6
- eNOS Intron 4a/b (AA / AB / BB, %)	3,8 / 28,9 / 67,3
<i>Bluthochdruck</i>	
- Hypertonus vor/während Schwangerschaft (%)	3,3 / 4,0
- Antihypertens. Therapie vor/während Schwangerschaft (%)	2,6 / 1,0
- positive Familienanamnese für Bluthochdruck (%)	38,6
<i>Diabetes mellitus</i>	
- vor/während Schwangerschaft (%)	0,7 / 5,0
- positive Familienanamnese für Diabetes mellitus (%)	36,5
<i>Rauchen</i>	
- nie geraucht (%)	72,3
- vor/während Schwangerschaft (%)	27,7 / 13,4
- Anzahl Packyears vor der Schwangerschaft, wenn Raucher (PY)	8,9 +/- 7,5
<b>Kind</b>	
- Geschlecht (w / m, %)	47,2 / 52,8
- Gestationsalter bei Geburt (Wochen)	38,8 +/- 2,0
- Geburtsgewicht des Kindes (g)	3440,6 +/- 595,7
- Geburtslänge (cm)	51,0 +/- 2,7
- Anzahl der Frühgeborenen < 37. SSW (%)	9,7
- Anzahl der SGA-Neugeborenen <10. Perzentile (%)	6,4
- Anzahl der Neugeborenen mit LBW <2.250g (%)	4,0
- Anzahl der LGA-Neugeborenen >90. Perzentile (%)	2,7
- Anzahl der Neugeborenen mit Aufenthalt auf der Neonatologie (%)	42,1
- APGAR 5min	9,38 +/- 0,8
- eNOS Intron 4a/b (AA / AB / BB,%)	5,4 / 28,8 / 65,9

Tab. 6: Deskriptive Merkmale der Studienpopulation

Arithmetisches Mittel und 2 $\sigma$  - Standardabweichung oder %, n=299

In der ersten Tabelle finden sich die deskriptiven Merkmale der untersuchten Studienkohorte. Es handelt sich um eine in Bezug auf Alter, BMI und weitere Parameter durchschnittliche, repräsentative Population.

Das durchschnittliche Geburtsgewicht der Studienpopulation liegt bei 3440 Gramm und damit im bundesdeutschen Durchschnitt von 3400 Gramm bei 682.500 Geburten. Weibliche Neugeborene sind mit 3390 Gramm (51 cm Körperlänge) etwas leichter als männliche mit 3510 (52 cm). Zweitgeborene wiegen im Schnitt 100 Gramm mehr. Auch die maternalen Parameter entsprechen den im Mikrozensus 2009 erhobenen Normwerten 25-30jähriger Frauen; Körpergröße: 168cm, BMI: 23,0 kg/m<sup>2</sup> (Statistisches Bundesamt, 2010).

### Proteingehalt des untersuchten Materials

**Tabelle 7:**

	$\bar{x}$	$2\sigma$	n
eNOS	1,345	+/- 0,616	299
ACE	1,340	+/- 0,780	255
AT-1	1,037	+/- 0,278	253
Klotho	1,034	+/- 0,218	299
PPAR $\gamma$	1,057	+/- 0,287	286

Tab. 7: Mittelwerte und zweifache Standardabweichungen der Konzentration der untersuchten Proteine im Plazentagewebe

*Konzentrationen sind relative Werte zum Aktingehalt der jeweiligen Probe. ACE = Angiotensin-converting-Enzyme, AT-1 = Angiotensinrezeptor Typ1, PPAR $\gamma$  = Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor  $\gamma$ .*

Die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase weist im Vergleich zu den anderen bestimmten Proteinen aus demselben Material mit einem Mittelwert von  $\bar{x}=1,345$  die höchste relative Konzentration auf. Auch die Standardabweichung von  $2\sigma=0,616$  ist unter den bestimmten Proteinen bei eNOS relativ hoch.

Die Daten der Proteine ACE, AT-1, PPAR $\gamma$ , Klotho und VDR wurden von weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe erhoben. Fehlende Fallzahlen sind auf Unterschiede in der Funktion der verwendeten Antikörper und den Gesamtproteingehalt der Proben zurückzuführen.

## **4.2 Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und fetalen Parametern**

### **4.2.1 eNOS und Geburtsgewicht**

In Bezug auf den ersten Teil der Fragestellung wurde die Korrelation fetaler Parameter, welche zur Erklärung der These einer fetalen Programmierung herangezogen werden, allen voran des Geburtsgewichts, mit der plazentaren eNOS-Konzentration untersucht.

Das in der Abbildung 6 dargestellte Streudiagramm zeigt eine Punktwolke, deren Zentrum sich im Bereich der einfachen eNOS-Konzentration und um das durchschnittliche Geburtsgewicht von 3440 Gramm befindet.

Die nicht-parametrische Rangkorrelationsanalyse nach Spearman-Rho zeigt mit einem  $p=0,062$  und  $r^2= -0,108$  einen nicht signifikanten Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und der eNOS-Konzentration, lässt jedoch einen schwachen negativen linearen Trend erkennen.

Korrigiert man das Geburtsgewicht um die Schwangerschaftsdauer (Regressionsanalyse), so zeigt sich, dass der Einfluss des Geburtsgewichts nicht mehr signifikant ist ( $p=0,876$ ). Die Aussage einer Abhängigkeit des Geburtsgewichts von der eNOS-Konzentration kann somit nicht getroffen werden.



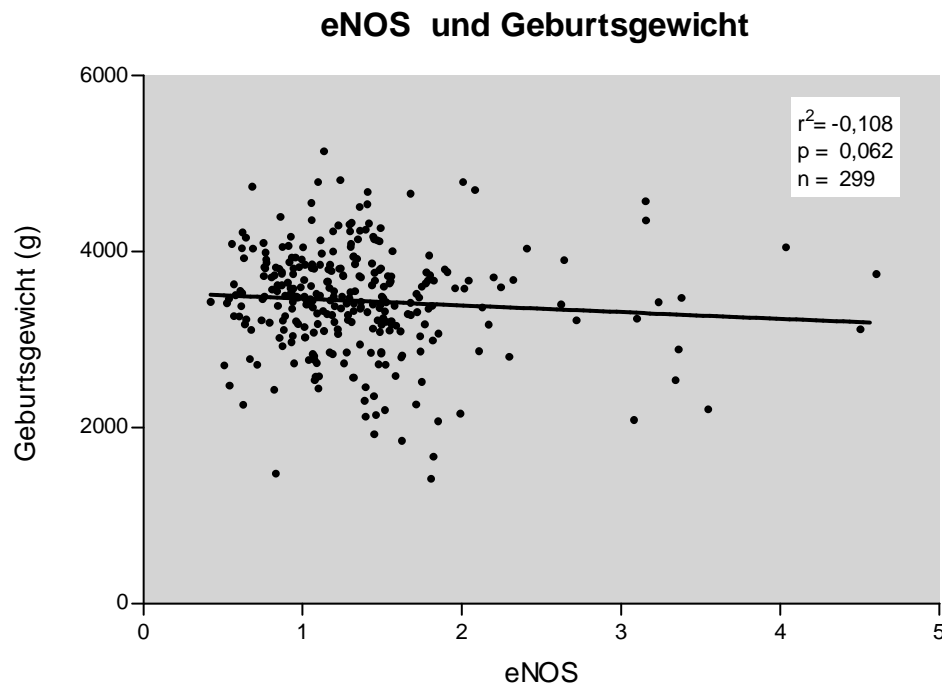


Abb. 6: Abhängigkeit des Geburtsgewichts von der eNOS-Konzentration (nicht signifikant)

*Konzentrationen sind relative Werte zum Aktingehalt der jeweiligen Probe.*

Anschließend wurde ein Gruppenvergleich zwischen LBW-Neugeborenen (<2.250g, n=12) und normgewichtig (AGA, >2.250g und <4.630g, nicht eingeschlossen wurden 8 Neugeborene mit einem Geburtsgewicht >4.630g) geborenen unternommen (Abb. 7). Mittels Mann-Whitney-U-Test konnte ein hoch signifikanter ( $p=0,001$ ) Unterschied der eNOS-Konzentration gezeigt werden. In der LBW-Gruppe wurde im Mittel eine 1,86-fache eNOS-Proteinkonzentration im Vergleich zum Aktingehalt gefunden. Die der normgewichtigen Kinder lag im Schnitt 1,32-fach höher. Es liegt eine durchschnittlich 41% höhere eNOS-Konzentration in der LBW-Gruppe vor.

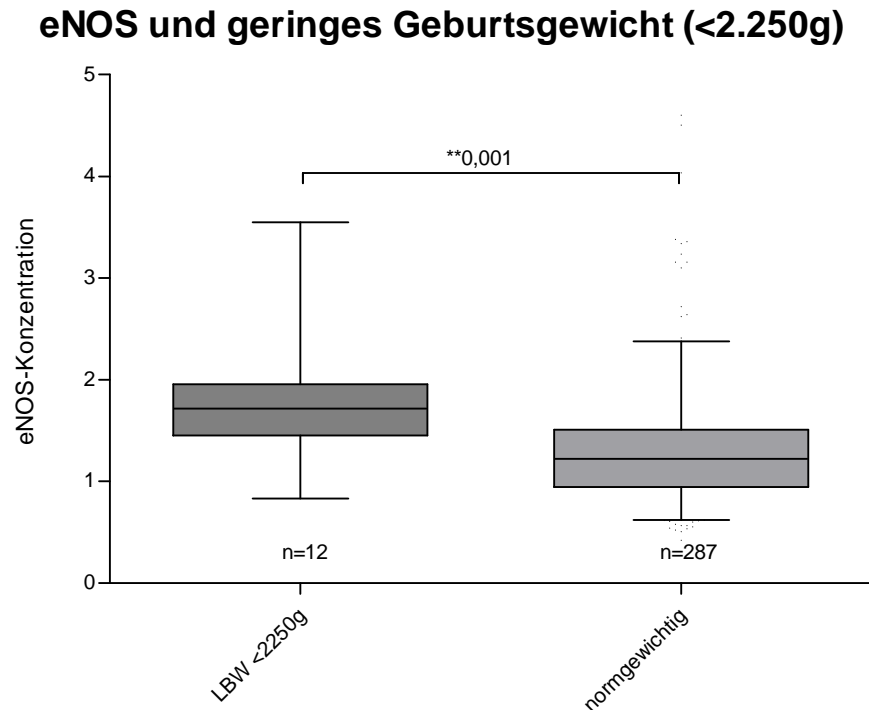


Abb. 7: eNOS und geringes Geburtsgewicht  
eNOS im Gruppenvergleich von Neugeborenen mit geringem Geburtsgewicht (LBW <2.250g) und Normgewichtigen (AGA). LBW wurde definiert als Gewicht unterhalb der zweifachen Standardabweichung. Konzentrationen sind relative Werte zum Aktinhalt der jeweiligen Probe.

Der Zusammenhang ließ sich auch noch nach der Korrektur für die Schwangerschaftsdauer mittels Regressionsanalyse zeigen ( $p=0,003$ ). Zweifelsohne wirkt sich eine kurze Schwangerschaftsdauer negativ auf das Geburtsgewicht aus, weshalb näherungsweise durch eine ANOVA korrigiert wurde.

### Plazentagewicht

Neben dem Geburtsgewicht wird das Plazentagewicht in neusten Studien für Effekte der fetalen Programmierung verantwortlich gemacht (19). Bei 267 Geburten dieser Studienpopulation wurde das Plazentagewicht bestimmt. Aus den Daten dieser Arbeit

konnte kein signifikanter Zusammenhang der eNOS-Proteinkonzentration im Plazentagewebe zum Geburtszeitpunkt mit dem Plazentagewicht hergestellt werden ( $p=0,224$ ).

#### 4.2.2 eNOS und Schwangerschaftsdauer

Ein negativ linearer Zusammenhang ( $p=0,006$ ,  $r^2= -0,158$ ) in der Spearman-Rho-Korrelation zeigte sich bei der Betrachtung der Schwangerschaftsdauer und der eNOS-Konzentration.

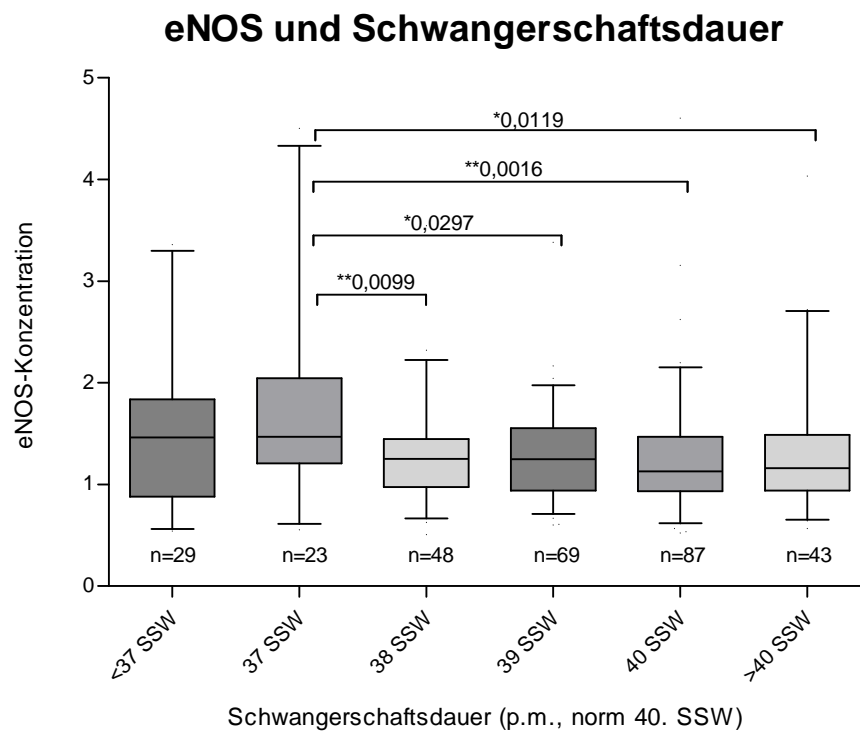


Abb. 8: eNOS-Proteinkonzentration bei unterschiedlicher Schwangerschaftsdauer

Die mittlere eNOS-Konzentration beträgt 1,62 bis zur 37. SSW und sinkt dann auf 1,28 in und nach der 38. SSW. Konzentrationen sind relative Werte zum Akt Gehalt der jeweiligen Probe

Um zu überprüfen, ob dieser negative lineare Zusammenhang präziser beschrieben werden kann, wurde die Studienpopulation in sechs näherungsweise gleichgroße Gruppen bezüglich der Schwangerschaftsdauer aufgeteilt.

Der Kruskal-Wallis-Test konnte signifikante Unterschiede der arithmetischen Mittelwerte zwischen den sechs Gruppen aufzeigen ( $p=0,0198$ ). Im Vergleich von jeweils zwei Gruppen durch den Mann-Whitney-U-Test ergaben sich die in Abbildung 8 im Boxplot dargestellten Zusammenhänge.

Die höchste Konzentration wurde bei einer Schwangerschaftsdauer von 37 Wochen gemessen und lag bei dem 1,67-fachen der Aktinkonzentration. Sie liegt signifikant höher als die Konzentrationen späterer Zeitpunkte, die im Schnitt bei 1,28 liegen. Es zeigt sich somit eine Abnahme der eNOS-Konzentration nach der 37. SSW um durchschnittlich 21%. Allerdings ist aufgrund der etwas geringeren Gruppengröße die Standardabweichung der Gruppen  $\leq 37$ . SSW höher als in den Vergleichsgruppen späterer Schwangerschaftswochen.

### **Geburtsmodus**

Kein signifikanter Unterschied konnte hingegen bei der Betrachtung des Geburtsmodus ermittelt werden. Die drei Gruppen (Spontanpartus, vaginal operative Entbindung und Sectio) wurden mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen ( $p=0,436$ ).

#### **4.2.3 eNOS und APGAR-Score**

Ein anerkannter Parameter zur Beurteilung des klinischen Zustandes Neugeborener ist der APGAR-Score. Ein kritischer Allgemeinzustand ist bei Werten unter 8 Punkten anzunehmen. In der Studienpopulation wiesen nur 10 Neugeborene einen APGAR-Score unter 8 auf. Ein mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführter Gruppenvergleich ermittelte keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte.

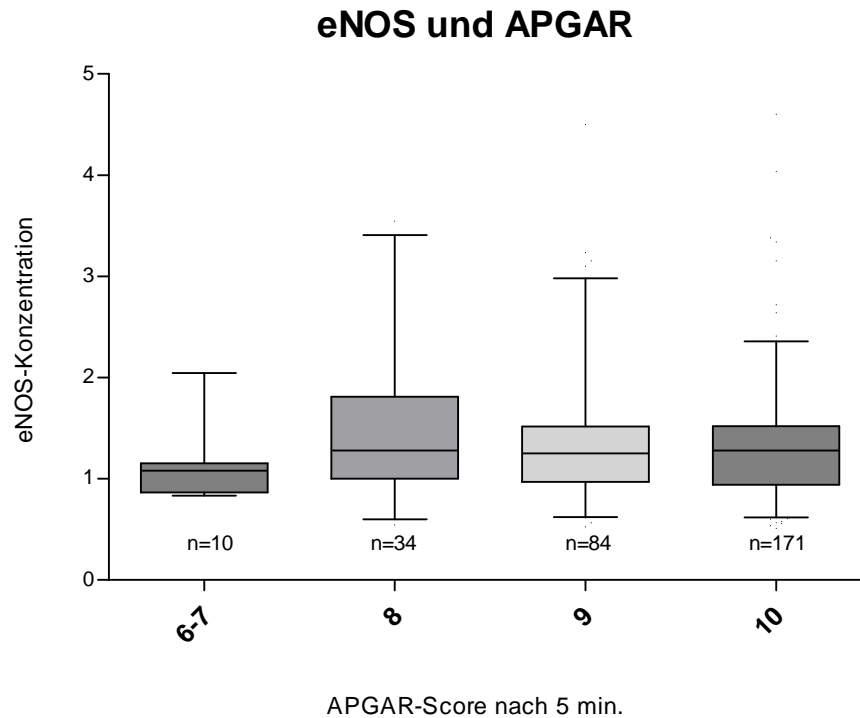


Abb. 9: eNOS-Proteinkonzentration in Abhängigkeit vom APGAR-Score  
(nicht signifikant)

*Konzentrationen sind relative Werte zum Aktidgehalt der jeweiligen Probe*

Um dennoch Aussagen über den Allgemeinzustand der Neugeborenen zu treffen, wurde die unmittelbar postpartale Aufnahme der Neugeborenen auf die Neonatologie, sowie deren Aufenthaltsdauer betrachtet. Auffällig ist, dass nur zehn Neugeborene einen APGAR-Wert unter 8 aufwiesen, aber 126 auf die Neonatologie aufgenommen wurden und somit trotz initial adäquatem APGAR-Wert ein reduzierter Allgemeinzustand der Neugeborenen anzunehmen ist.

#### 4.2.4 eNOS und Aufenthalt auf der Neonatologie

Von den 299 Neugeborenen wurden 126 auf der Neonatologie der Charité Campus Mitte behandelt, 19 davon länger als zehn Tage. Die Studienpopulation wurde dementsprechend in drei Gruppen aufgeteilt und verglichen.

Durch den Kruskal-Wallis-H-Test konnte ein hochsignifikanter Unterschied der Mittelwerte der plazentaren eNOS-Proteinkonzentration zwischen den drei Gruppen gezeigt werden ( $p=0,0041$ ). Dabei zeigte sich eine erhöhte eNOS-Konzentration in der Gruppe der länger als 10 Tage intensivmedizinisch behandelten Neugeborenen.

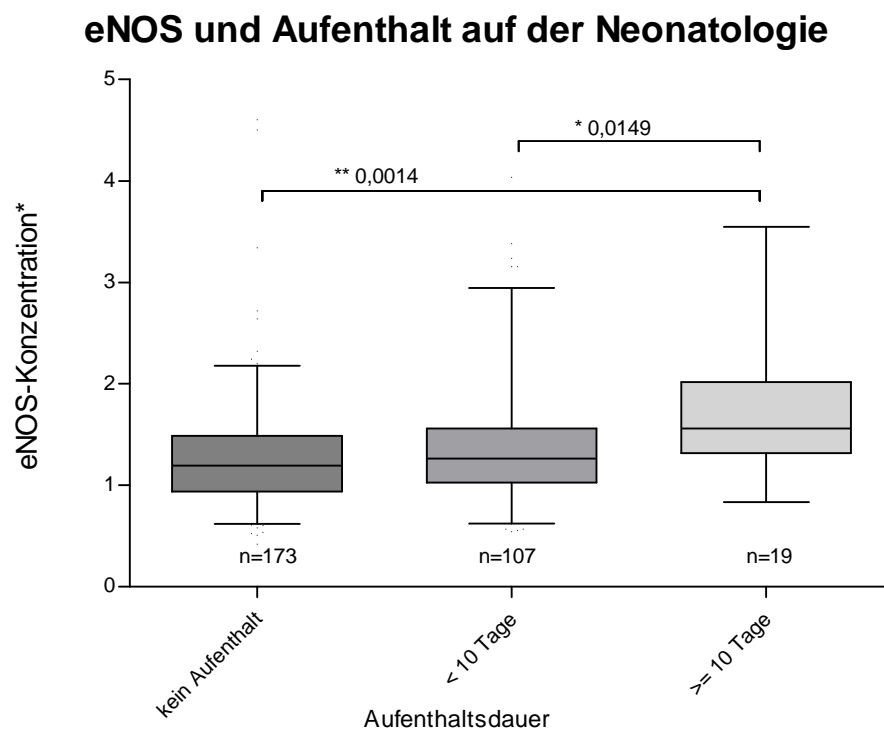


Abb. 10: eNOS-Konzentration und Aufenthaltsdauer auf der Neonatologie  
Konzentrationen sind relative Werte zum Aktinhalt der jeweiligen Plazentaprobe

Zwischen der Gruppe der nicht auf der Neonatologie behandelten und den Neugeborenen, die weniger als 10 Tage dort intensivmedizinisch versorgt wurden, konnte mittels Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied in der plazentaren eNOS-Konzentration ermittelt werden ( $p=0,1547$ ). Signifikant bzw. hochsignifikant waren hingegen die Unterschiede der länger als 10 Tage behandelten Neugeborenen gegenüber beiden anderen Gruppen ( $p=0,0149$ ,  $p=0,0014$ ).

### **4.3 Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und maternalen Parametern**

Verschiedene maternale Parameter stehen mit einer Einschränkung der fetalen Versorgung in Verbindung. So wurden die Daten aus dem systematischen Interview ausgewertet und die Auswirkungen des Rauchverhaltens und maternaler Erkrankungen (Hypertonus, Diabetes mellitus) auf die eNOS-Proteinkonzentration in der Plazenta untersucht. Betrachtet werden soll, ob diese Risikofaktoren zu signifikante Änderungen der eNOS-Proteinkonzentration führen.

#### **4.3.1 eNOS und Rauchen**

Zu den Parametern, welche die intrauterine Entwicklung stark beeinflussen gehört auch das maternale Rauchverhalten. 72,3% der in dieser Studie befragten Mütter haben nie geraucht. Vor der Schwangerschaft rauchten 27,7% und während der Schwangerschaft noch 13,4%. Unter den Rauchern wurde ein durchschnittlicher Konsum von 8,9 Packyears bis zur Schwangerschaft angegeben.

Die eNOS-Proteinkonzentration im plazentaren Gewebe konnte nicht mit dem Rauchverhalten vor der Schwangerschaft oder dem Gesamtkonsum (in Packyears) signifikant

korreliert werden ( $p=0,493$ ,  $p=0,806$ ). Auch der Vergleich von Gruppen ließ hier keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte erkennen. Das Rauchen während der Schwangerschaft zeigte einen sehr schwachen Trend für erhöhte Werte an ( $p=0,092$ ,  $r^2=0,098$ ).

#### 4.3.2 eNOS und Hypertonus

Ein mütterlicher Hypertonus gilt als Risikofaktor für uteroplazentare Dysfunktion, fetale Unreife und geringes Geburtsgewicht (56). Angaben aus dem systematischen Interview und dem Mutterpass wurden mit der plazentaren eNOS-Konzentration korreliert, um diesen Zusammenhang zu untersuchen. Zehn der befragten Mütter (3,3%) berichteten über einen arteriellen Hypertonus schon vor Schwangerschaftsbeginn, zwei weitere (0,7%) entwickelten diesen während der Schwangerschaft. Eine antihypertensive Therapie wurde vor der Schwangerschaft von 2,6% der Frauen eingenommen, nur drei Frauen setzten diese während der Schwangerschaft fort.

Die eNOS-Konzentration konnte mit keinem der erhobenen Parameter zum arteriellen Hypertonus signifikant ( $p=0,502$ ,  $r^2=0,039$ ) korreliert werden.

#### 4.3.3 eNOS und Diabetes mellitus

Neugeborene, deren Mütter an Diabetes mellitus (oder Gestationsdiabetes) leiden, sind in der Regel makrosom aber anfälliger für Reifungsstörungen, insbesondere der Lunge, und durch die Hypertrophie des Pankreas nach der Geburt häufig hypoglykäm. Die Daten des systematischen Interviews wurden ausgewertet und wenn nötig durch die Daten aus dem Mutterpass ergänzt.



Von den 299 untersuchten Müttern berichteten zwei Mütter schon vor der Schwangerschaft an Diabetes mellitus zu leiden. Fünfzehn der Mütter entwickelten einen Gestationsdiabetes.

Die eNOS-Proteinkonzentration konnte in keiner der beiden Gruppen signifikant mit Diabetes mellitus korreliert werden.

Insgesamt konnte kein Einfluss der maternalen Parameter auf die eNOS-Konzentration in der Plazenta nachgewiesen werden.

#### **4.4 Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und eNOS-Polymorphismus**

Bei fehlendem Einfluss maternaler biologischer Parameter (Rauchen, Hypertonus, Diabetes) auf die plazentare eNOS-Konzentration wurde weiter geprüft, ob maternale oder fetale genetische Varianten in Form des eNOS-Polymorphismus Einfluss auf die Proteinkonzentration in der Plazenta haben.

In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde mittels VNTR-Analyse aus Leukozyten der Mütter zum Geburtszeitpunkt sowie bei den Neugeborenen der Intron 4 a/b Polymorphismus bestimmt (52). Für die Mütter zeigte sich eine Verteilung der Genotypen (AA / AB / BB in %) von 3,8 / 28,9 / 67,3. Auch bei den Neugeborenen war der BB-Genotyp mit 65,9% am häufigsten vertreten. In der ersten Analyse dieser Daten 2008 konnte kein Einfluss auf maternale Parameter der Präeklampsie (Blutdruck, Proteinexkretion, Ödeme) gezeigt werden. Maternale Polymorphismen hatten ebenfalls keinen Einfluss auf fetales Wachstum und Geburtsgewicht (52).

Für 287 der in dieser Arbeit untersuchten Plazentaprobe n liegen Daten zum Polymorphismus von Mutter und Kind aus der 2008 durchgeführten VNTR-Analyse vor.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,464$ ,  $r^2=-0,043$ ) zwischen dem Intron 4 a/b Polymorphismus und der eNOS-Proteinkonzentration in der Plazenta festgestellt werden.

#### **4.5 Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und anderen Proteinen der Gefäßregulation**

Im letzten Teil der Fragestellung werden Zusammenhänge zwischen eNOS und weiteren im Plazentagewebe bestimmten Proteinen analysiert. Dabei ist das Renin-Angiotensin-System von Interesse, welches über einen anderen Mechanismus in die Gefäßregulation eingreift.

#### 4.5.1 eNOS und das Renin-Angiotensin-System

##### Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)

Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) findet sich wie die eNOS an den Endothelzellen der villösen Zotten der Plazenta, hier besonders im venösen Schenkel und in den Spiralarterien.

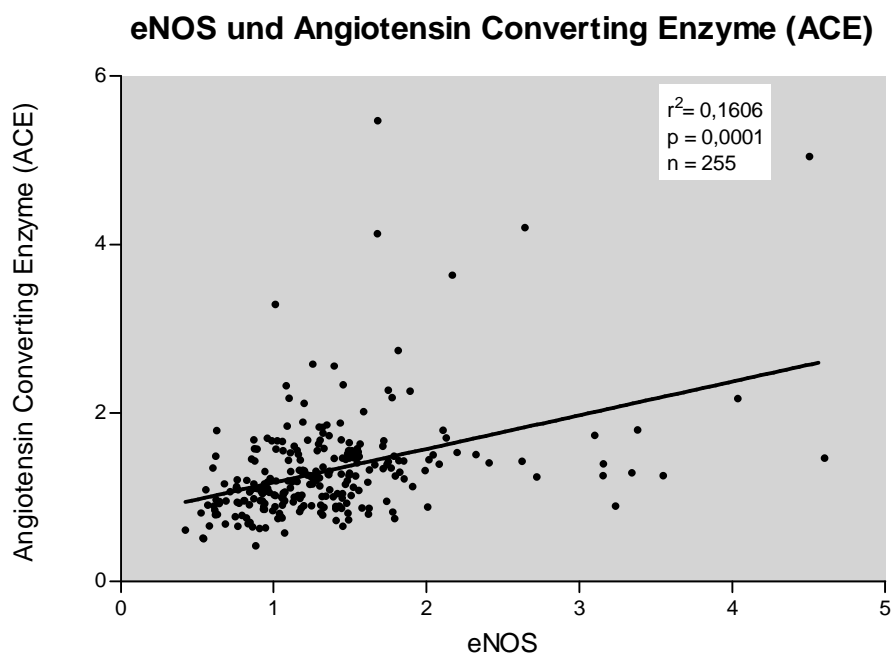


Abb. 11: Abhängigkeit der ACE-Konzentration von placentarem eNOS  
*Konzentrationen sind relative Werte zum Akt Gehalt der jeweiligen Probe*

Die Messung des ACE ergab einen hoch signifikanten positiven linearen Zusammenhang ( $p=0,0001$ ,  $r^2=0,1606$ ,  $n=255$ ).

### Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1 (AT-1)

Neben dem Angiotensin-konvertierenden Enzym wurden auch die Rezeptoren des RAAS-Systems im Plazentalysat mit derselben Methode bestimmt.

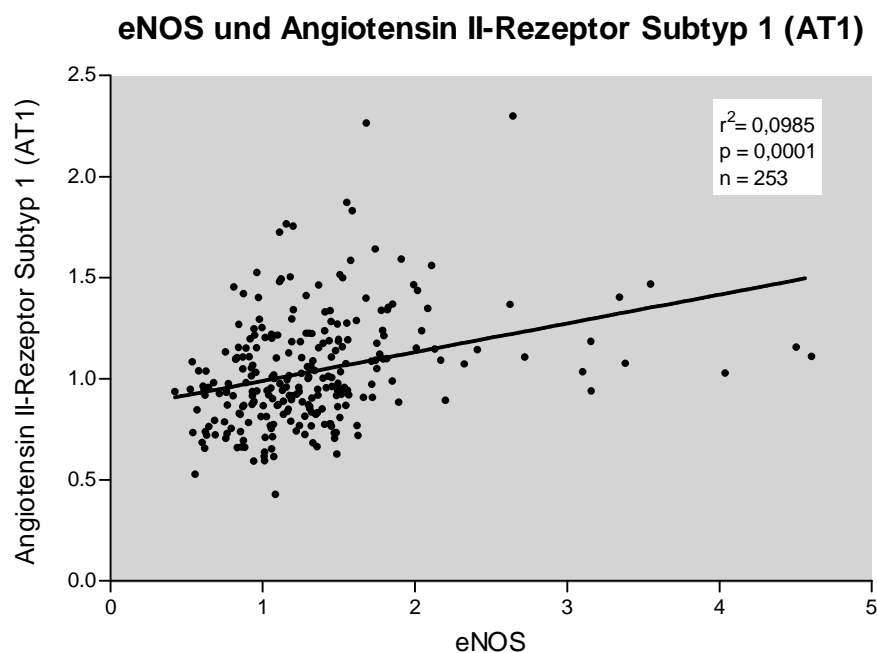


Abb. 12: Abhängigkeit der AT1-Konzentration von placentarem eNOS  
Konzentrationen sind relative Werte zum Aktinhalt der jeweiligen Probe

Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 zeigte eine deutlich signifikante Korrelation ( $p=0,0001$ ,  $r^2=0,0985$ ,  $n=253$ ) mit der gemessenen eNOS-Proteinkonzentration in der Plazenta. Allerdings zeigt der Korrelationskoeffizient nur eine schwach positive Stärke an.

Über die Funktion des Angiotensin-II-Rezeptors Typ 2 in der humanen Plazenta ist bisher noch wenig bekannt. Ein Nachweis des Rezeptors in placentarem Gewebe verschiedener Spezies konnte erbracht werden, nicht jedoch in humanem Plazentagewebe, so dass dessen Analyse hier nicht durchgeführt wurde (68).

#### 4.5.2 eNOS und Klotho

Klotho ist ein Protein, dessen Abwesenheit mit Arteriosklerose in Verbindung gebracht wird und dem eine protektive Wirkung in Bezug auf Alterungsprozesse zugeschrieben wird. Die Untersuchung des Zusammenhangs ergibt sich, da ein Mangel an Klotho im Tierversuch zu massiver Arteriosklerose führte und Einflüsse von Klotho auf die Gefäßdilatation und damit auf das NO-System gezeigt wurden.

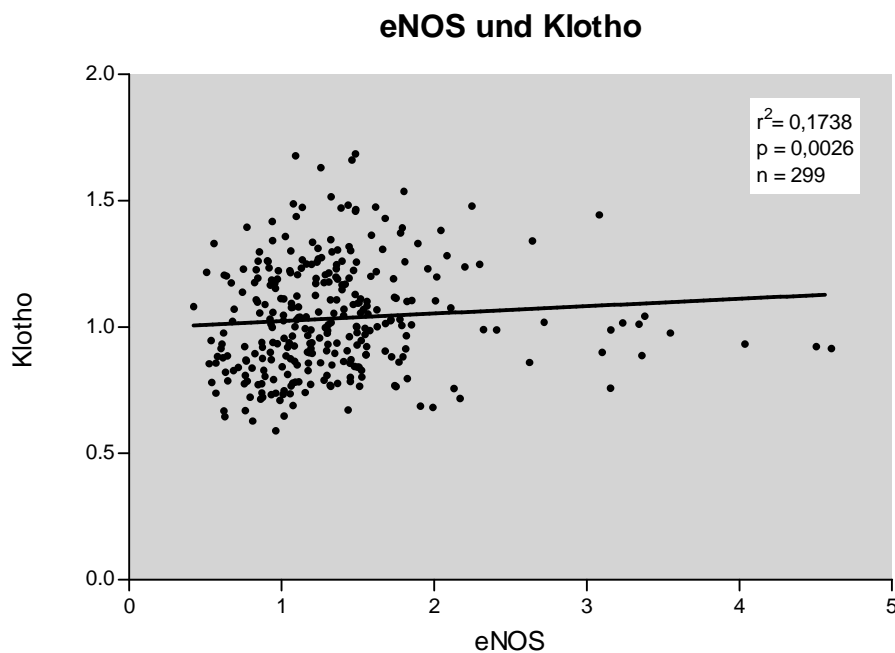


Abb. 13: Abhängigkeit der Klotho-Konzentration von placentarem eNOS  
*Konzentrationen sind relative Werte zum Aktinhalt der jeweiligen Probe*

Es zeigt sich ein hochsignifikanter ( $p=0,0026$ ) positiv korrelierter Zusammenhang zwischen eNOS und Klotho im placentaren Gewebe, der jedoch mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r^2=0,1738$  gering ist.

### 4.5.3 eNOS und PPAR $\gamma$

In Zellkulturen humaner Nabelschnurvenen (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) konnte eine Aktivierung des NO-Systems durch Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptor (PPAR $\gamma$ ) Liganden gezeigt werden (75). Es wurde daher der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von PPAR $\gamma$  und eNOS untersucht.

Hier konnte keine signifikante Korrelation der PPAR $\gamma$ -Proteinkonzentration und der eNOS-Konzentration im Plazentagewebe gezeigt werden ( $p=0,749$ ,  $r^2=0,019$ ,  $n=286$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl mit den Proteinen des RAAS-Systems (ACE, AT-1) als auch Klotho eine signifikante positive Korrelation vorliegt. Für PPAR $\gamma$  konnte dies nicht gezeigt werden.

## **5 Diskussion**

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase spielt in humanem Plazentagewebe die entscheidende Rolle bei der Freisetzung des vasoaktiven Moleküls NO und beeinflusst damit die Gefäßregulation dieses stark durchbluteten Organs (76-78).

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der plazentaren eNOS-Konzentration und verschiedenen fetalen und maternalen Parametern sowie plazentaren Proteine analysiert. Die Proteinkonzentration der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase zeigte einen Zusammenhang mit der Schwangerschaftsdauer und einer späteren Behandlung auf der Klinik für Neonatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

### **5.1 Methodische Betrachtung**

Ziel der verwendeten Methode war die Quantifizierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase in Plazentagewebe. Diese erlaubt Rückschlüsse auf die NO-Konzentration und damit auf die lokale Gefäßregulation. Zudem wurde für diese Arbeit ein systematisches Interview mit den an der Studie teilnehmenden Müttern durchgeführt. Durch die Verwendung humanen Materials sowie durch die Methode der Erhebung eines systematischen Interviews ergeben sich folgende Limitationen:

#### **Systematisches Interview**

Die Befragung der an dieser Studie teilnehmenden Mütter erfolgte am ersten oder zweiten Tag nach der Entbindung persönlich durch geschulte Doktoranden auf der Station für Geburtsmedizin oder der Klinik für Neonatologie. Angaben zum Gesundheitsverhalten (insbesondere dem Rauchverhalten) könnten gerade direkt nach der Entbindung eine Fehlerrate aufweisen, da eine Tendenz zu sozial erwünschten Antworten besteht.

Subjektiv bestand daneben der Eindruck, dass Mütter mit hohem Bildungsniveau eher einen Zigarettenkonsum in der Schwangerschaft „zugaben“ als Mütter mit niedrigerem sozialem Status, die sich häufig „ertappt“ gefühlt haben.

### **Geburtszeitpunkt**

Die intrauterine Entwicklung und fetales Wachstum sind dynamische und über Monate andauernde Prozesse. Das NO-System ist in relativ kurzer Zeit modulierbar. Für einige Transkriptionsfaktoren (z.B. NF-kappaB, KLF-2) wurden maximale Konzentrationen innerhalb von 30 min. bis zu 6h nach Stimulation gemessen (79). Die Messung des Proteins kann aus methodischen und ethischen Gründen nur am Ende der Schwangerschaft erfolgen und stellt eine Momentaufnahme dar. Es ist wahrscheinlich, dass im Verlauf der Schwangerschaft andere Konzentrationen der eNOS nachzuweisen wären. Verlaufsstudien werden bei Abruption durchgeführt, sind aber mit dem hier angewendeten Studiendesign nicht darzustellen. Eine Möglichkeit, diese Limitierung zu relativieren ist der Vergleich unterschiedlicher Gestationsalter, was hier im zweiten Ergebnisteil berücksichtigt wurde.

Durch die starke Abhängigkeit der eNOS-Expression von Scherkräften besteht die Möglichkeit einer Fehlerquelle in dem individuellen Geburtsverlauf und unterschiedlich starker Krafteinwirkung auf die Plazenta. Durch die unmittelbare postpartale Entnahme des Materials und die sofortige Kühlung auf  $-20^{\circ}\text{C}$ , sowie die taggleiche Überlieferung in das Labor sollte diese Fehlerquelle nur minimalen Einfluss haben. Zudem zeigte sich kein Zusammenhang der eNOS-Proteinkonzentration mit dem Geburtsmodus (spontan, vaginal operativ oder Sectio), was für eine untergeordnete Rolle dieser Fehlerquelle spricht.

### **Probenmenge**

Durch die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben ( $n=299$ ) lassen sich vergleichende Aussagen treffen. Dabei können durch die relativ hohe Stichprobengröße auch



geringe Unterschiede in den Messwerten zu signifikanten Ergebnissen führen. Dies ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu berücksichtigen, die durch Ausreißerwerte teils hohe Standardabweichungen zeigen.

### **Materialgewinnung**

Zur Proteinquantifizierung wurden Proteinlysate aus einer Kotyledone des Plazentagewebes gewonnen, isoliert und mittels Western-Blot aufgetrennt. Da aus jeder Kotyledone genau ein Gramm geschnitten wurde, ist trotz konstanter Versuchsdurchführung eine Variabilität in der Gewebestruktur der Kotyledone gegeben. Bindegewebige Plazentasepten enthalten weniger Endothel und somit auch weniger eNOS, welches sich hauptsächlich an den Synzytiotrophoblasten der villösen Zotten befindet. Durch die Mörserung und Homogenisierung des Gewebes wurde diese Fehlerquelle minimiert.

### **Limitationen des Studiendesigns**

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Assoziationsstudie, welche aus einem klinischen und einem experimentellen Teil besteht. Es wurden Zusammenhänge zwischen klinischen Daten und humanem Plazentagewebe untersucht. Eine Kausalität kann mit den generierten Daten nicht aufgezeigt werden, da hierzu weitergehende Untersuchungen des pathophysiologischen Mechanismus notwendig wären.

## **5.2 Bewertung der Proteinkonzentrationen im Plazentagewebe**

Im Vergleich zu den weiteren im selben Material untersuchten Proteinen weist eNOS die höchste Konzentration (relativ zur Aktinkonzentration gemessen) auf. Dies ist am ehesten auf die starke Vaskularisierung des Plazentagewebes, insbesondere der villösen Zotten und somit einer entsprechenden Endotheldichte im untersuchten Material zurückzuführen. Die relativ hohe Standardabweichung spricht für ein System, welches

sehr variabel und innerhalb kurzer Zeit modulierbar ist. Zudem wurde gezeigt, dass eine Vervielfachung der eNOS-Konzentration im Plazentagewebe innerhalb von 2-5 Tagen physiologisch vorkommt (61).

Neben eNOS weist auch ACE eine relativ hohe Konzentration und Standardabweichung gegenüber den anderen Proteinen auf. ACE als einer der Schlüsselfaktoren des RAAS-Systems wurde für physiologische Umbauvorgänge, besonders der Vaskularisierung durch Spiralarterien in der Uteruswand, über den gesamten Verlauf der Schwangerschaft identifiziert (80). Eine abnorme Vaskularisierung und erhöhte Proteinkonzentrationen von ACE im Plazentagewebe wurden mit pathologischen Schwangerschaftsverläufen wie Präeklampsie und Frühgeburtlichkeit in Verbindung gebracht (81). Zudem ist das Enzym ebenso hauptsächlich in Endothelzellen lokalisiert (82). Dies liefert eine mögliche Erklärung der zu eNOS ähnlich hohen Konzentration und Standardabweichung.

Eine detaillierte Betrachtung des RAAS-Systems in der humanen Plazenta lieferten Cooper et al. und verglichen es mit anderen Spezies (68). Der AT-1 Rezeptor, der beim Menschen keine Isoformen hat, zeigt sich für die vasokonstriktive und proliferative Wirkung von Angiotensin II verantwortlich, während der AT-2 Rezeptor eher antiproliferative und apoptotische Mechanismen steuert (83). In der humanen Plazenta konnte der AT-2 Rezeptor bislang nicht zuverlässig lokalisiert werden und wurde daher in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. Einzig Li et al. konnten sehr basale Konzentrationen mittels Autoradiographie ermitteln (84).

### **5.3 eNOS-Proteinkonzentration und Parameter der fetalen Programmierung**

Die Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der Parameter fetaler Programmierung ist durchaus kritisch zu vollziehen. Zwar zeigt die Hypothese der fetalen Programmierung eindeutig die Zusammenhänge des geringen Geburtsgewichts mit späteren Entwicklungen, jedoch ist die Ursache einer intrauterinen Mangelversorgung multifaktoriell. Um signifikanten Einfluss auf das Geburtsgewicht zu nehmen, muss die vaskuläre Komponente einen sehr starken Effekt haben. Zusätzlich ist es nötig für Parameter wie Schwangerschaftsdauer, Statur von Mutter (und Vater), Diabetes und Rauchen zu korrigieren, um den Effekt eindeutig zuordnen zu können.

Um Aussagen über den Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht und der eNOS-Konzentration zu treffen, muss zudem angenommen werden, dass die eNOS-Konzentration in der Plazenta am Geburtszeitpunkt einen Rückschluss auf die Versorgungssituation während der gesamten Schwangerschaft erlaubt.

#### **5.3.1 eNOS-Proteinkonzentration und Geburtsgewicht**

Im ersten Teil der Fragestellung wurde der Zusammenhang der eNOS-Konzentration mit fetalen Parametern betrachtet. Insbesondere für das Geburtsgewicht als wichtigstem Surrogatparameter in der Hypothese der fetalen Programmierung sollte hier ein möglicher Zusammenhang untersucht werden.

Die Abhängigkeit des Geburtsgewichts von der eNOS-Konzentration konnte nicht gezeigt werden. Der Einfluss der eNOS-Menge zum Geburtszeitpunkt auf das Geburtsgewicht muss somit als limitiert eingestuft werden, obwohl ein Trend zu gesteigerter eNOS-Expression bei leichteren Kindern erkennbar ist.

In der hier untersuchten Studienpopulation finden sich 12 Neugeborene mit einem Geburtsgewicht von weniger als 2250 Gramm, die per definitionem der zweifachen Standardabweichung vom Mittelwert zu den LBW-Geborenen gezählt werden.

### **LBW-Subgruppe**

Die Betrachtung der LBW-Gruppe erfolgt unter der Annahme, dass die Korrektur für die Schwangerschaftsdauer durch die Varianzanalyse auch bei dieser nicht-normalverteilten Grundgesamtheit Gültigkeit besitzt.

Der Vergleich von LBW-Geborenen mit normgewichtigen Neugeborenen (ausgenommen der acht LGA-Geborenen) zeigte eine signifikant höhere eNOS-Proteinkonzentration der LBW-Geborenen und dies auch, wenn das Gestationsalter als weitere abhängige Variable in der ANCOVA berechnet wurde. Es scheint also neben oder aufgrund der Frühgeburtlichkeit einen vaskulären Effekt zu geben, der in der relativ kleinen Gruppe der LBW-Geborenen über die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthese zu einer Beeinträchtigung von Wachstum und Entwicklung führt.

Ob es sich bei der eNOS-Erhöhung um einen reaktiven Mechanismus bei fetalem Nährstoff- und Sauerstoffmangel handelt, oder um nitrosativen Stress, konnte bislang nicht beantwortet werden. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf auf zellulärer und subzellulärer Ebene.

Die Therapie LBW-Geborener stellt in der Neonatologie eine der größten Herausforderungen dar. Aus diesem Grund wurden Tiermodelle entwickelt, um den Pathomechanismus aufzudecken. IUGR liegt immer dann vor, wenn einem LBW-Geborenen ein solcher Mechanismus zugrunde liegt.

In einem IUGR-Modell des Schweins konnte zudem von Blomberg et al. eine gesteigerte eNOS-Konzentrationen gezeigt werden (85). Am 50. Gestationstag wurde mRNA im Plazentagewebe von 14 putativen Entwicklungsgenen bestimmt und einzig für eNOS

eine unterschiedliche Regulation gefunden. Dabei fielen die IUGR-Plazenten durch eine um 68% gesteigerte eNOS-Transkription im Vergleich zu nicht wachstumsgestörten Plazenten auf. Aus den Daten dieser Arbeit ließ sich eine 41% gesteigerte eNOS-Menge in der humanen Plazenta bei LBW-Geborenen ermitteln. Diese Ergebnisse gehen mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen einher, in denen erhöhte eNOS-Proteinmengen in IUGR-Plazenten des Schweins in Trophoblasten und Endothelzellen gemessen wurden (86). Auch im IUGR-Modell des Schafes wurde eine Hochregulation der eNOS bei mittlerem Gestationsalter und in der Spätschwangerschaft gesehen (87).

Diese Beobachtungen aus dem Tiermodell konnten auch schon in humanem Gewebe gezeigt werden. Myatt et al. stellten ebenfalls eine erhöhte eNOS-Proteinkonzentration von menschlichen IUGR-Plazenten im dritten Trimenon fest (65). Trotz einer relativ geringen Anzahl untersuchter Plazenten (n=5) konnte eine signifikante Aussage getroffen werden. Die hohe Konzentration von eNOS wird von den Autoren als Kompensationsversuch der Plazenta bewertet, die bei IUGR herrschende Mangelversorgung und Hypoxie auszugleichen. Auch bei Präeklampsie wurde eine erhöhte eNOS gemessen und als adaptiver Prozess zur Senkung des plazentaren Gefäßwiderstandes gesehen (56). Auch Norris et al. fanden signifikant erhöhte Werte von NO-Metaboliten im fetoplazentaren Kreislauf (Nabelschnurblut) bei kompliziertem Schwangerschaftsverlauf durch PE oder IUGR (77).

Gegensätzlich dazu stehen die Ergebnisse von Schiessl et al., die eine abgeschwächte eNOS-Expression in IUGR-Plazenten fanden (55). Von den 22 untersuchten Plazenten fanden sich sechs von Feten mit IUGR und jeweils acht mit Präeklampsie sowie normalem Schwangerschaftsverlauf. In Plazenten von Präeklampsie-Patienten wurde keine signifikante Veränderung der eNOS-Konzentration, aber ein Trend zu einer vermehrten eNOS-Bildung beobachtet. Jedoch fanden Kim et al. in 126 präeklampischen Plazenten eine niedrigere eNOS-Expression und erklären das Krankheitsbild mit einem Versagen

der NO-gesteuerten Vasodilatation und folglich Hypertonus und eingeschränkter Versorgung des Fetus (88). In dieser Arbeit konnte keine Aussage zu Präeklampsie getroffen werden, da diese Patienten in der Studienpopulation nicht in ausreichender Anzahl vertreten waren.

Zusammenfassend konnten Übereinstimmungen der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Beobachtungen von Myatt et al. (65) ausgemacht und diese mit einer höheren Fallzahl (n=12) verifiziert werden. Bei LBW-Geborenen scheint eNOS an der Gefäßregulation und somit an einer Veränderung des intrauterinen Milieus beteiligt zu sein.

### 5.3.2 Zusammenhang zwischen plazentarer eNOS-Proteinkonzentration und eNOS-Polymorphismus

Bislang wurden die eNOS-Polymorphismen im Hinblick auf Präeklampsie untersucht, da eine Aktivierung des NO-Systems, die in der Schwangerschaft für gesteigerte Zirkulation ohne systemischen Blutdruckanstieg, in diesem Krankheitsbild ausbleibt (89).

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, diese Erkenntnisse der Regulation systemischer Effekte auf die Plazenta anzuwenden und eine mögliche Verbindung der eNOS-Aktivität mit den bisher für Präeklampsie untersuchten Polymorphismen aufzudecken.

Zu den Erkenntnissen von 2008 durch Hochar et al. (52), in denen der eNOS-Polymorphismus hinsichtlich klinischer Parameter der Präeklampsie sowie Parameter der fetalen Programmierung untersucht wurde, konnte die Bestimmung der plazentaren eNOS-Proteinkonzentration aus dieser Arbeit beitragen.

Es stellte sich keine Abhängigkeit der plazentaren eNOS-Konzentration vom Intron 4 a/b Polymorphismus dar. Somit konnte nicht nachgewiesen werden, dass ein direkter Einfluss dieser Genvariante auf klinische, wie nun auch auf plazentare Parameter vor-

liegt. Zwar ist die Vermutung zulässig, diesen nicht nachgewiesenen Einfluss mit epigenetischen Mechanismen zu erklären, allerdings müssten dazu weitere Untersuchungen der molekularen Mechanismen als Ursache einer gesteigerten oder reduzierten eNOS-Expression im Plazentagewebe folgen. Zudem konnten in dieser Arbeit keine Vergleiche mit den als ebenfalls auf die NOS-Aktivität einflussreich beschriebenen Polymorphismen Glu298Asp und -786T angestellt werden (90).

Von Serrano et al. wurde in den USA eine multizentrische Fall-Kontrollstudie zu dem Einfluss der eNOS-Polymorphismen auf Parameter der Präeklampsie unternommen (91). In dieser Studie konnte bei Müttern, die homozygot für das Asp298-Allel waren, eine über vierfach höhere Präeklampsiewahrscheinlichkeit gegenüber dem Glu298-Allel gefunden werden (OR, 4.6 [95% CI: 1.73 to 12.22],  $p=0,002$ ,  $n=322$ ). Dies konnte weder für den Intron 4 a/b Polymorphismus (OR, 1.93 [95% CI: 0.82 to 4.57];  $p=0,101$ ) noch für den -786T3C (OR, 1.34 [95% CI, 0.50 to 3.51];  $p=0.524$ ) gezeigt werden.

In Japan zeigte sich ein gleichartiger Zusammenhang, der jedoch von Yoshimura et al. in einer Kontrollstudie an Müttern aus Bangladesh nicht reproduziert werden konnte (90). Auch in Korea konnte dieser Zusammenhang für das Glu298Asp Gen mit Parametern der Präeklampsie an 126 Müttern nicht gezeigt werden (88). Eine brasilianische Studie konnte ebenfalls keine Unterschiede der Genotypen bezüglich der drei Polymorphismen von gesunden und präeklampsischen Müttern nachweisen (92).

Die Anwendbarkeit der Erkenntnisse aus Assoziationsstudien für Präeklampsie und eNOS-Polymorphismen ist, zumal diese noch keine Eindeutigkeit hervorbringen, nur bedingt möglich. Zum einen zeigte gerade der Glu298Asp-Polymorphismus eher als die beiden anderen Polymorphismen eine Assoziation mit plazentaren Pathomechanismen und kommt daher als mögliche Regelstelle der eNOS-Proteinkonzentration in Frage. Zum anderen ist die eNOS-Proteinkonzentration maßgeblich von Scherkräften und

Mediatoren abhängig, sodass auch eine vollständige Entkopplung der Proteinexpression von dem Genotyp denkbar ist.

In nicht-endothelialen Zellen sind die Promotordomänen für eNOS stark methyliert. In Endothelzellen hingegen sind diese Abschnitte nicht methyliert was für epigenetische Aktivierung dieser Genabschnitte spricht (93). Die Analyse der Methylierungsprozesse, die zu einer veränderten Ablesewahrscheinlichkeit des eNOS-Gens führen und somit über die Transkription letztendlich die Proteinmenge beeinflussen, ist bisher noch Gegenstand andauernder Forschung. Neben der Methylierung scheinen auch zellspezifische Histonmodifikationen die eNOS-Expression zu steuern (94).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind hinsichtlich einer fetalen Programmierung somit schwierig zu beurteilen, da kein eindeutiger Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht in der gesamten Studienpopulation gezeigt werden konnte. Für die Gruppe der LBW-Geborenen lässt sich jedoch ein Einfluss von eNOS auf den Pathomechanismus der intrauterinen Wachstumsretardierung vermuten. Denkbar ist hier ein adaptiver Mechanismus, der über eNOS die Gefäße maximal dilatiert, um den Fetus vor drohender Hypoxie und Nährstoffmangel zu schützen.

Bezüglich anderer fetaler Parameter, etwa der Schwangerschaftsdauer und dem fetalen Allgemeinzustand, gemessen an der Aufenthaltsdauer auf der Neonatologie, konnten zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden. Obwohl diese auch als Indikatoren für eine mangelhafte Versorgung des Fetus gewertet werden können, werden diese bisher nicht als Parameter der fetalen Programmierung postuliert und deshalb hier gesondert als fetale Parameter diskutiert.



## **5.4 Zusammenhang zwischen plazerer eNOS-Proteinkonzentration und fetalen Parametern**

Die eNOS-Konzentration am Ende der Schwangerschaft lässt nur bedingte Aussagen über den gesamten Verlauf zu. So ist eine Verknüpfung dieser Momentaufnahme mit Parametern, welche eher die vaskuläre Situation der letzten Schwangerschaftstage widerspiegeln, einfacher zu diskutieren. Die Frühgeburtlichkeit stellt einen Zustand dar, in dem der Fetus aufgrund der Unreife potentiell in eine Hypoxie und Mangelversorgung gelangt. Es wird vermutet, dass das NO-System als relativ rasch adaptierendes System in Mangelsituationen des Fetus aktiviert wird, um durch Gefäßdilatation eine verbesserte Perfusion der Plazenta zu ermöglichen (56, 65, 85, 95).

### **5.4.1 eNOS und Schwangerschaftsdauer**

Der derzeitige Wissensstand lässt noch keine abschließende Bewertung über die Bedeutung des NOS-Systems in der Plazenta für den Ablauf physiologischer Geburtsmechanismen beim Menschen zu. Tierexperimente zeigen eine bis zur Spätschwangerschaft ansteigende eNOS-Proteinkonzentration, welche erst einige Tage vor der Geburtseinleitungsphase stark absinkt (61). Erklären lässt sich diese Beobachtung mit einem zunächst steigenden Nähr- und Sauerstoffbedarf des Fetus in der Wachstumsphase, welcher eine vermehrte Perfusion und somit hohe eNOS-Konzentrationen zu Folge hat. Vermutlich wird am Ende der Schwangerschaft dieser hohe Blutfluss jedoch durch verminderte eNOS-Expression gedrosselt, um die Geburt einzuleiten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich auch in der menschlichen Plazenta die eNOS-Proteinkonzentration abhängig von der Schwangerschaftsdauer betrachten lässt und ein dem Schafsmodell ähnlicher Effekt nachzuweisen ist. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die eNOS-Expression vor und in der 37. Schwangerschaftswoche signifikant höher ausfällt als zu späteren Zeitpunkten in der Schwangerschaft. Der Verlauf der

eNOS-Expression während der Trächtigkeit im Schafsmodell aus den Arbeiten von Zheng et al. ist hier graphisch dargestellt, um den Effekt zu verdeutlichen.

Geht man bezüglich der Entwicklung von Fetus und Plazenta von einem ähnlichen Schwangerschaftsverlauf bei Schaf und Mensch aus, so entspricht der 110. Tag der Trächtigkeit beim Schaf etwa der 30. Schwangerschaftswoche beim Menschen. Der errechnete Geburtstermin in der 40. Schwangerschaftswoche beim Menschen entspricht dem Tag 145 der Trächtigkeit.

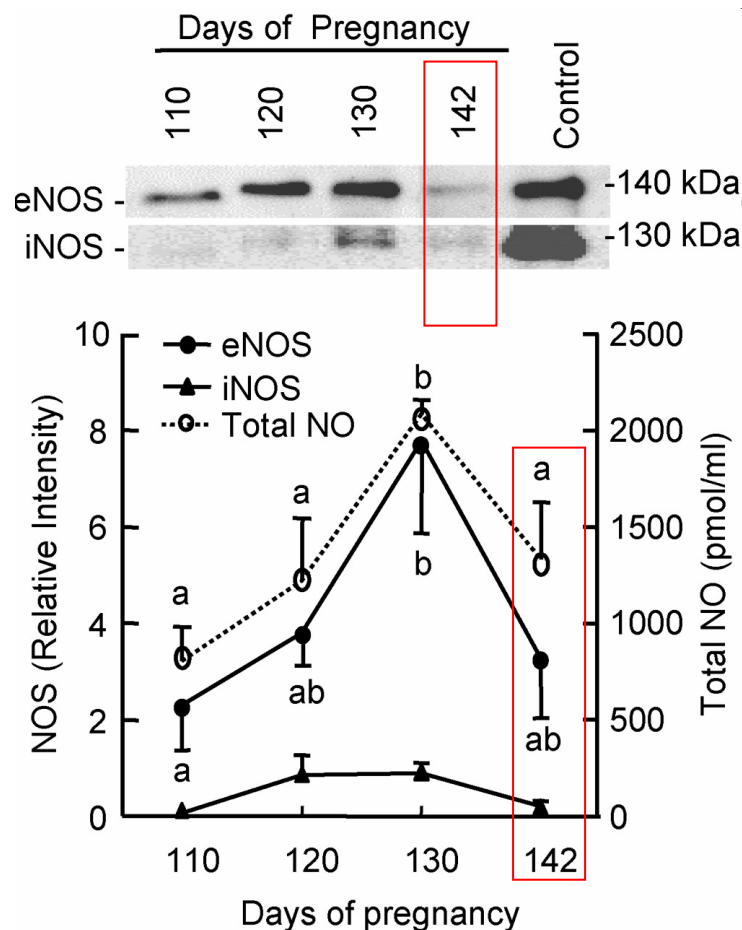


Abb. 14: eNOS-Proteinkonzentration im Schafsmodell im Verlauf der Trächtigkeit  
 Gezeigt ist die Expression der eNOS und iNOS (Western Blot) und die NO Produktion (Chemilumineszenz) in ovinem Kotyledonengewebe mit einer deutlichen Senkung der eNOS-Konzentration bei 142d. Proteinkonzentrationen sind relative Werte im Vergleich zu der alpha-Aktin Proteinkonzentration. Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen. Normale Trächtigkeitsdauer beim Schaf 145d (61).

Die Daten dieser Arbeit lassen sich jedoch nicht über den gesamten Versuchszeitraum aus dem Tierversuch verfolgen. Frühe Zeitpunkte, können anhand der geringen Zahl von Frühgeborenen aus der Studienpopulation nicht betrachtet werden. Abgebildet werden kann jedoch die Absenkung der eNOS-Proteinkonzentration nach dem Erreichen eines Maximums um die 37. Schwangerschaftswoche (entsprechend dem 142. Tag der Trächtigkeit im Schafsmodell).

Die ermittelten Daten weisen darauf hin, dass im letzten Trimenon der Schwangerschaft ähnliche Mechanismen des NO-Systems in Schafsplazenten und menschlichen Plazenten ablaufen. In dieser Hinsicht ist das Schafsmodell, welches seit über 40 Jahren genutzt wird, aufgrund ähnlicher plazentarer Mechanismen der Gefäßregulation reproduktiver Gewebe anderen Modellen (Maus, Ratte) überlegen. Insgesamt ließen sich die Beobachtungen der eNOS in dieser Arbeit am besten mit Ergebnissen aus dem Schafsmodell erklären. Das Modell scheint die humanen Mechanismen am präzisesten abzubilden und sollte in Zukunft bei vaskulären Fragestellungen bezüglich eNOS als entscheidendem Gefäßregulator anderen Modellen vorgezogen werden. Die Ähnlichkeit der Mechanismen zeigt sich auch bei der Alveolarisierung der Lunge, welche bei Mensch und Schaf zu den Zeitpunkten 0,8 bzw. 0,75 (entsprechend der 30. Schwangerschaftswoche) eintritt, während Mäuse und Ratten unreif zur Welt kommen (96).

Für das RAAS-System stellt sich die Situation etwas differenzierter dar, da sich die Expression insbesondere der Angiotensin-II-Rezeptoren zwischen verschiedenen Spezies (auch im Schafsmodell) teilweise deutlich unterscheidet (68). Die Rolle des RAAS-Systems wird in dem Kapitel zu Interaktionen von eNOS und anderen Proteinen der Gefäßregulation diskutiert.

#### 5.4.2 eNOS-Proteinkonzentration und Aufenthalt auf der Neonatologie

Aus den Daten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Plazenten eine höhere eNOS-Konzentration aufwiesen, wenn die Neugeborenen länger als 10 Tage intensivmedizinisch behandelt werden mussten.

Über die klinische Einschätzung der Vitalität mittels APGAR-Score nach fünf und zehn Minuten konnte noch kein signifikanter Zusammenhang zu eNOS hergestellt werden. Die Erhebung des APGAR-Scores gilt zwar als zuverlässige erste Bewertung des Gesundheitszustandes Neugeborener, ist aber nicht sehr differenziert. Dies ist unter anderem daran zu erkennen, dass nur 10 Neugeborene mit einem APGAR-Wert unter 8 eingeschätzt wurden, jedoch 126 auf die Neonatologie aufgenommen wurden. So wurde die Fragestellung auf einen längeren Zeitraum ausgeweitet und die Aufnahme sowie Behandlungsdauer auf der Neonatologie als Merkmal einer Entwicklungsstörung und möglicher intrauteriner Mangelversorgung gewertet.

#### **eNOS unter asphyxischen Bedingungen**

Über den Zusammenhang von plazentarer eNOS mit der neonatologischen Behandlungsdauer oder dem Atemnotsyndrom des Neugeborenen (ANS) ist in der Literatur bisher nicht berichtet worden.

Von den 19 Neugeborenen in dieser Studie, die länger als 10 Tage auf der Neonatologie behandelt wurden, zeigten 15 Anzeichen eines neonatalen Atemnotsyndroms und 7 mussten einer Beatmungstherapie zugeführt werden. Infektzeichen wurden bei 7 Neugeborenen beobachtet. Bei diesen Neugeborenen ist eine schon intrauterin aufgetretene Entwicklungsstörung anzunehmen, welche mit einer erhöhten eNOS-Expression einhergeht. Möglicherweise ist diese als Anpassung an asphyxische intrauterine Bedingungen zu werten.

Die eNOS wurde unter hypoxischen Bedingungen in einer humanen Endothelzellen-Kultur über 24h untersucht (97). Hier zeigte sich zunächst eine Abnahme der Expression über 48h. In der hypoxischen Phase fehlt Sauerstoff als wichtiges Substrat für die eNOS. Bei Sauerstoffmangel werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie  $O_2^-$  von proinflammatorischen Enzymen (eNOS und iNOS) gebildet. Unter Hypoxie produzieren diese neben NO besonders große Mengen von ROS und erzeugen oxidativen Stress (98). Oxidativer Stress (ROS) in der Plazenta in Verbindung mit hohen Mengen von NO ist verantwortlich für die Bildung von Peroxynitrit und damit nitrosativem Stress, welcher die wichtige Balance eines physiologischen NO-Levels stört (71). Im Sinne einer eNOS-Entkopplung, wie bei der Genese der Arteriosklerose oder pulmonalen Hypertonie vermutet (99, 100), könnte eine Endotheldysfunktion für die fetale Entwicklungsstörung verantwortlich sein. Möglicherweise ist die später zum Geburtszeitpunkt gemessene gesteigerte eNOS-Konzentration Ausdruck eines adaptiven/protektiven Mechanismus gegen die eNOS-Entkopplung.

Ein weiterer Erklärungsansatz für hohe eNOS-Konzentration kann in der Regulation einer vermehrten Reperfusion nach einer hypoxischen Phase bestehen. Die eNOS scheint nach ischämischer Gewebeschädigung etwa in Nerven- oder Herzmuskelgewebe eine protektive Funktion einzunehmen. In der Schlaganfallforschung wurde eine erhöhte eNOS-Expression als protektiver Faktor ausgemacht, welcher eine Reperfusion des ischämischen Areals steuert (101).

Wie die Ergebnisse bisheriger Arbeiten zeigen, führen unterschiedlichste Stimuli zu einer veränderten Regulation der eNOS in fetalen Geweben. Eine erhöhte plazentare eNOS-Konzentration konnte in dieser Studie bei Neugeborenen mit langer Behand-

lungsdauer auf der Neonatologie gefunden werden. Es lässt sich ein Zusammenhang mit einer gestörten fetalen Entwicklung aufzeigen, die möglicherweise mit einer Asphyxie/Hypoxie bzw. Nährstoffmangel in Verbindung stehen.

In dieser Arbeit wurden keine Methoden verwendet, welche die zellulären Ursachen einer gesteigerten eNOS-Expression aufdecken. Es kann damit nicht geschlussfolgert werden, ob dieses als Zeichen eines adaptiven oder protektiven Prozesses zu werten ist, bei der eine Mangelsituation (Asphyxie) zu eNOS-gesteuerter Vasodilatation führt oder es sich um eine entzündliche Reaktion in Form einer eNOS-Entkopplung handelt.

Die Aufdeckung dieser Prozesse könnte am ehesten im Tiermodell (Schafsmodell) gelingen und sollte weiter erforscht werden. Pharmakologisch werden bereits Forschungen unternommen die einer eNOS-Entkopplung entgegenwirken und perspektivisch in der Therapie der Plazentainsuffizienz oder drohender IUGR Anwendung finden könnten (102).

## **5.5 Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und maternalen Parametern**

### **Rauchen**

In dieser Arbeit wurden durch das systematische Interview auch Daten bezüglich des Gesundheitsverhaltens der Mütter in die Analyse aufgenommen. Besonders durch den relativ hohen Anteil rauchender Mütter mit fast 30% und immerhin noch 13,4% während der Schwangerschaft, hätte man mit einem Einfluss dieses Risikofaktors auf die vaskuläre Regulation rechnen können, zumal ein eindeutiger vasokonstriktorischer Effekt durch Nikotinkonsum nachweisbar ist.

Wang et al. untersuchten post-partum 33 Plazenten und fanden eine erniedrigte eNOS-Menge bei rauchenden Müttern (103). Clausen et al. analysierten in einer dänischen Studie die Plazenten von starken Raucherinnen (>15 Zigaretten/Tag während der Schwangerschaft) mit einer nicht rauchenden Kontrollgruppe und fanden nach verblindeter Immunhistochemie keine signifikanten Unterschiede für Endothelin (Et-1) und eNOS (104).

In einer Vorarbeit dieser Dissertation konnte zudem eine Absenkung des mit Alterungsprozessen in Verbindung stehenden Klotho-Proteins gesehen werden. Zigarettenrauchen führte bei diesen Müttern nachweislich zu einem Klothomangel im Plazentagewebe. Dieser Effekt konnte sich in dem bis auf wenige Proben identischen Untersuchungsmaterial für eNOS nicht abbilden.

Verantwortlich für dieses Zustandekommen ist eine mögliche raschere Normalisierung der eNOS-Konzentration nach unterbrochenem Zigarettenkonsum, wie er für die Mehrzahl der werdenden Mütter typisch ist. Möglich ist auch ein sich aufhebender Effekt, in dem bei rauchenden Müttern initial eine Abnahme der eNOS-Konzentration stattfindet, welche später durch oxidativen Stress in Form von ROS und eNOS-Entkopplung normalisiert wird.

### **Hypertonus und Diabetes**

Auf die Auswirkungen hypertensiver Erkrankungen während der Schwangerschaft (Präeklampsie) wurde schon in der Diskussion des vorigen Kapitels eingegangen. Die klinischen Daten bezüglich hypertensiven Erkrankungen konnten in dieser Studienpopulation nicht signifikant mit einer Veränderung der plazentaren eNOS-Konzentration in Verbindung gebracht werden. In einem Präeklampsie-Modell des Schafes wurden

ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der eNOS-Proteinmenge bei hypertensiven Versuchstieren gesehen (87).

Da aus einer aktuellen Übersichtsarbeit Hinweise für die Entstehung einer plazentaren vaskulären Dysfunktion und die Entstehung von oxidativem Stress bei diabetischen Müttern bestehen (105), wurde die eNOS-Konzentration auch diesbezüglich betrachtet. Es konnte jedoch keine erhöhte eNOS-Menge bei Müttern mit Gestationsdiabetes festgestellt werden, wie dies bei oxidativem Stress zu erwarten gewesen wäre. Dieses Ergebnis wurde auch von einer schottischen Arbeitsgruppe beobachtet, die ebenfalls keine eNOS-Veränderungen fanden (106).

## **5.6 Zusammenhang zwischen eNOS-Proteinkonzentration und anderen Proteinen der Gefäßregulation**

### **eNOS und RAAS-System**

Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT-1) ist beim Menschen der dominierende Angiotensinrezeptor in der Plazenta. Neben eNOS ist die Expressierung der Angiotensinrezeptoren wahrscheinlich an der Regulation des lokalen Blutflusses beteiligt (68).

Es wurde gezeigt, dass hohe ACE Aktivität einen Risikofaktor in der Schwangerschaft für Komplikationen wie Präeklampsie, Wachstumsretardierung (IUGR) und Fehlgeburten darstellt (107).

Die positive Korrelation eines vasorelaxierenden Faktors wie eNOS und eines tonuserhaltenden Proteins wie ACE irritiert auf den ersten Blick. ACE katalysiert die Reaktion von Angiotensin I in dessen biologisch wirksame Form Angiotensin II. So kann über ACE ein Rückschluss auf die Menge von Angiotensin II gezogen werden. Dieses wirkt



an Gefäßen vasokonstriktorisch und dient der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beziehungsweise des systemischen Blutdrucks.

Die Wirkung von Angiotensin II wird durch den AT-1 und den AT-2 Rezeptor vermittelt. Da der AT-2 Rezeptor in der humanen Plazenta bisher nicht bzw. nur durch Radio-graphie gefunden wurde, kann von einer untergeordneten Rolle ausgegangen werden. Der AT-1 vermittelt die vasokonstriktorische und proliferative Wirkung von Angiotensin II. Cooper et al. konnten in der humanen Plazenta eine Expression des AT-1 im gesamten Verlauf der Schwangerschaft zeigen (68).

Eine detaillierte Arbeit zu den Interaktionen von eNOS und dem RAAS wurde von Zheng et al. im Schafsmodell erstellt (108). Sie fanden eine durch Angiotensin II initiierte starke Vaskularisierung der Plazenta auf der fetoplazentaren Seite. Dieser Effekt wurde von der Arbeitsgruppe weiter untersucht und eine Stimulation der Zellproliferation sowie eine Steigerung der eNOS-Proteinmenge durch Angiotensin II nachgewiesen. Li et al. fanden zudem einen direkten Angiotensin II Effekt der NO-Freisetzung durch eNOS über einen non-AT1/non-AT2 Rezeptor an humanen Zytotrophoblasten (84). Beide Beobachtungen könnten eine Erklärung für die positive Korrelation der Proteinkonzentrationen von eNOS und RAAS-Proteinen geben.

### **eNOS und Klotho**

In dieser Arbeit ergab sich eine positive lineare Korrelation zwischen eNOS und Klotho in humanem Plazentagewebe.

Direkte Interaktionen der beiden Proteine wurden bisher noch nicht im Plazentagewebe untersucht. Trotzdem ist diese Beobachtung nachzuvollziehen. Aus einer pharmakologischen Studie konnten kürzlich eine vermehrte eNOS-Bildung durch Klotho in Endothelzellen gezeigt werden (109). Dabei wurde beobachtet, dass Statine eine Induktion der eNOS-Expression über das Klotho-Protein bewirken. Diese pharmakologische In-

tervention ist zeigt neben der Lipidsenkung somit einen antiatherogenen Effekt an Endothelzellen. Klotho könnte somit ein potentieller Regulator der eNOS sein, der die Endothelfunktion verbessert.

Auch im Tiermodell wurde die Wirkung von Klotho auf die Endothelfunktion untersucht. In einem Klotho-defizienten Mausmodell wurde eine stark ausgeprägte endotheliale Dysfunktion durch die verminderte Expression des Klotho-Gens festgestellt (110). Eine weitere Beobachtung dieser Arbeitsgruppe erlaubt den Rückschluss einer direkten Beeinflussung der eNOS durch Klotho, indem exogen adenoviral zugeführtes Klotho-Gen im Rattenmodell zu einer verbesserten Gefäßrelaxation (post-mortem im Aortenpräparat durch Acetylcholinstimulus) und zum Anstieg von NO-Metaboliten im Urin führte (111). Gleiches wurde auch von Nakamura et al. in Klotho-defizienten Mäusen beobachtet (112).

Die Ursachen der endothelialen Dysfunktion bei Klothomangel wurden bisher kontrovers diskutiert. Möglich ist ein Ausbleiben des durch Klotho vermittelten antioxidativen Effekts, welcher so zu oxidativem Stress führt. Dieser könnte eine Endotheldysfunktion hervorrufen, die nicht mit einer eNOS-Entkopplung einher geht. Eine weitere Hypothese wurde von Saito et al. aufgestellt, die vermuten, dass Klotho über seine enzymatische Funktion eine inaktive Vorstufe der eNOS spalten und damit zu aktivieren vermag (110). Detaillierte Aussagen über die molekularen Mechanismen der eNOS Aktivierung durch Klotho bedürfen weiterer Forschung.

### **eNOS und PPAR $\gamma$**

Der Peroxisom-Proliferator-aktivierer-Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ist ein ligandengesteuerter nukleärer Transkriptionsfaktor. Eine Stimulation bewirkt unter physiologischen Bedingungen eine Regulation des Glukose- und Lipidstoffwechsels unter anderem durch Insulinsekretion. Eine veränderte Expression des PPAR $\gamma$  wurde mit der Entstehung von Insulinresistenz (Diabetes mellitus Typ 2), Hypertonie und Adipositas, also dem meta-

bolischen Syndrom, in Verbindung gebracht (113). Glitazone, welche agonistisch am PPAR $\gamma$  wirken, haben in Studien neben einer anitdiabetogenen auch eine vasoprotektive Wirkung und sogar einen antiproliferativen Effekt in der arteriosklerotisch veränderten Gefäßwand gezeigt. Von Lu et al. konnte sogar eine Umkehr der endothelialen Dysfunktion durch Rosiglitazon im diabetischen Rattenmodell gezeigt werden (114). Diese Erkenntnisse lassen eine Beeinflussung der eNOS durch PPAR $\gamma$  vermuten, die auch von Polikandriotis et al. an Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen (HUVEC) gezeigt werden (75). Dort wurde eine PPAR $\gamma$  abhängige Steuerung der eNOS-Expression durch Hitzeschockproteine und PPAR $\gamma$ -Liganden gefunden.

In dem untersuchten Plazentagewebe wäre eine positive Korrelation der PPAR $\gamma$ -Expression mit der eNOS-Proteinmenge zu erwarten gewesen. Dies ließ sich nicht durch die Daten dieser Arbeit bestätigen, die keine signifikanten Zusammenhänge darstellten.

Als Ursache könnte man eine differenzierte Regulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder auf unterschiedlichen Zellebenen vermuten. So wurde von einer Schweizer Arbeitsgruppe, die an einem caninen Plazentamodell arbeiten, die Vermutung einer post-transkriptionellen Regulation von PPAR $\gamma$  geäußert, die möglicherweise durch epigenetische Effekte beeinflussbar ist (115).

Für einen fehlenden Zusammenhang von eNOS und PPAR $\gamma$ -Expression kann auch eine unverhältnismäßige Konzentration der beiden Proteine verantwortlich sein. Während eNOS als Enzym stärkeren Veränderungen und Schwankungen ausgesetzt ist, scheint PPAR $\gamma$  relativ konstant reguliert zu sein. Dies zeigt sich auch an der zu Aktin relativ gemessenen niedrigeren Proteinmenge und kleinerer Standardabweichung.

## 5.7 Ausblick

Die intrauterinen Wachstumsprozesse bieten noch viel Raum für weitere Forschung. Mit der Einführung der Lungenreifung durch Dexamethason konnte bereits eine wirksame pharmakologische Intervention noch während der intrauterinen Phase etabliert werden. Die Frühgeburtlichkeit an sich kann damit jedoch nicht ursächlich behandelt werden. Vaskuläre Mechanismen des uteroplazentaren Systems könnten als nächste bedeutende Regelstelle dienen, um einer intrauterinen Mangelversorgung des Fetus vorzubeugen.

Durch die weitergeführte Forschung an der Aufdeckung molekularer Mechanismen des NO-Systems bietet sich die Möglichkeit, dieses System pharmakologisch zu beeinflussen und somit neue Anwendungsgebiete zu erschließen.

Erste Schritte sind mit der Inhibierung einer eNOS-Entkopplung getan (102), welche in Zukunft die zytotoxischen Effekte durch unphysiologisch hohe NO-Mengen begrenzen könnte. Der Schwerpunkt bei der Erforschung der Endothelfunktion liegt dabei gewiss im kardiologischen oder neurologischen Bereich. Eine Verträglichkeit dieser neuen Substanzen während der Schwangerschaft vorausgesetzt, ließe sich aber auch eine Erweiterung der Indikation auf Krankheitsbilder der Schwangerschaft wie Plazentainsuffizienz, IUGR oder Präeklampsie vorstellen.

## 6 Zusammenfassung

Die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) bewirkt in Endothelzellen durch parakrine NO-Freisetzung eine Herabsetzung des Gefäßtonus. In der Plazenta konnte gezeigt werden, dass eNOS neben anderen gefäßaktiven Mediatoren aufgrund der fehlenden vaskulären Innervation eine entscheidende Rolle in der Regulation des fetoplazentaren Blutflusses spielt.

Ziel dieser Arbeit war es mögliche Zusammenhänge der eNOS-Proteinkonzentration in humanem Plazentagewebe mit fetalen und maternalen Parametern aufzudecken. Zudem sollte eine Beeinflussung des bedeutendsten Surrogatparameters der fetalen Programmierung, dem Geburtsgewicht, durch die eNOS analysiert werden.

Eine Beeinflussung des Geburtsgewichts ließ sich durch die Betrachtung der gesamten Studienpopulation nicht herausstellen. In einer Gruppe mit niedrigem Geburtsgewicht konnte jedoch eine signifikant höhere eNOS-Proteinkonzentration als in der normgewichtigen Vergleichsgruppe gefunden werden. Weiterhin konnte eine Abhängigkeit der eNOS-Konzentration vom Gestationsalter gezeigt werden. Eine deutliche Absenkung der eNOS-Menge in der Plazenta nach der 37. Schwangerschaftswoche konnte vormals nur im Schafsmodell demonstriert werden.

Eine weitere Erkenntnis ergab die Betrachtung klinischer Parameter. Neugeborene, die mehr als zehn Tage auf der neonatologischen Intensivstation behandelt wurden, wiesen in den korrespondierenden Plazenten eine erhöhte eNOS-Proteinkonzentration auf. In der Zusammenschau konnten so weitere Anhaltspunkte für eine über eNOS regulierte Veränderung des intrauterinen Milieus und damit mögliche epigenetische Effekte gesammelt werden.

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Assoziationsstudie, welche aus einem klinischen und einem experimentellen Teil besteht und deren Ziel das Testen sowie weiterentwickeln von Hypothesen ist. Ein kausaler Zusammenhang zur Wirkung von eNOS auf den Phänotyp lässt sich aus diesen Daten nicht generieren.

## 7 Abstract

The endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) of endothelial cells lowers the vascular tone through a paracrine NO release. Within the placenta eNOS, among other vasoactive mediators, plays an important role in the regulation of the fetoplacental blood flow due to a lacking vascular innervation.

The aim of this study was to show associations between the eNOS protein concentration in human placental tissue and neonatal as well as maternal parameters. Furthermore, the influence of eNOS on one of the most important surrogate parameters of the fetal programming hypothesis, birthweight, should be analysed.

A significant influence could not be shown regarding the entire study population. However, a significantly higher expression of eNOS was seen when only comparing LBW-group placentas with the control group. In addition, eNOS concentration was found to be dependent on gestational age. A significant decrease of eNOS expression in placental tissue after the 37<sup>th</sup> week of pregnancy was previously only shown in the ovine model.

Further findings were gathered regarding clinical parameters. Newborns that were treated at the neonatal intensive care unit for longer than ten days showed elevated eNOS protein concentration in the placenta. In conclusion, further evidence of an eNOS regulated change in the intrauterine milieu accounting for possible epigenetic effects was seen.

This study is set up as an association study with a clinical as well as an experimental part aiming to test and develop hypotheses. A causality showing the effect of eNOS on the phenotype can not be displayed in this context.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der humanen nNOS, eNOS und iNOS.....	13
Abb. 2: Rolle von Stickstoffmonoxid in Endothel- und glatten Muskelzellen.....	16
Abb. 3: Beladungsplan der Gele in der SDS-PAGE .....	34
Abb. 4: Fotofilm der Western Blots aus Plazentalysaten, eNOS und Aktin.....	37
Abb. 5: Referenzgerade zur Berechnung der eNOS-Konzentration .....	38
Abb. 6: Abhängigkeit des Geburtsgewichts von der eNOS-Konzentration.....	43
Abb. 7: eNOS und geringes Geburtsgewicht.....	44
Abb. 8: eNOS-Proteinkonzentration bei unterschiedlicher Schwangerschaftsdauer .....	45
Abb. 9: eNOS-Proteinkonzentration in Abhängigkeit vom APGAR-Score.....	47
Abb. 10: eNOS-Konzentration und Aufenthaltsdauer auf der Neonatologie.....	48
Abb. 11: Abhängigkeit der ACE-Konzentration von plazentarem eNOS .....	53
Abb. 12: Abhängigkeit der AT1-Konzentration von plazentarem eNOS .....	54
Abb. 13: Abhängigkeit der Klotho-Konzentration von plazentarem eNOS.....	55
Abb. 14: eNOS-Proteinkonzentration im Schafsmodell im Verlauf der Trächtigkeit .....	68



## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Begriffsdefinitionen zu Schwangerschaftsparametern.....	6
Tab. 2: Risikofaktoren intrauteriner Wachstumsretardierung .....	7
Tab. 3: Übersicht der NOS-Isoformen.....	14
Tab. 4: Datenerhebung der Studienteilnehmer, systematisches Interview .....	24
Tab. 5: Datenerhebung aus dem Mutterpass.....	24
Tab. 6: Deskriptive Merkmale der Studienpopulation.....	40
Tab. 7: Mittelwerte und zweifache Standardabweichungen der Konzentration der untersuchten Proteine im Plazentagewebe .....	41

## 10 Literaturverzeichnis

1. Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res* 1975;9(3):154-6.
2. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr MM, McNamara J, Metcalfe NB, Monaghan P, Spencer HG, Sultan SE. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004;430(6998):419-21.
3. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986;1(8489):1077-81.
4. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2(8663):577-80.
5. Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ, Wield GA. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *Bmj* 1993;306(6875):422-6.
6. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *Bmj* 1995;311(6998):171-4.
7. Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med* 2009;27(5):358-68.
8. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35(7):595-601.
9. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.
10. Law CM, Barker DJ, Osmond C, Fall CH, Simmonds SJ. Early growth and abdominal fatness in adult life. *J Epidemiol Community Health* 1992;46(3):184-6.
11. Barker DJP. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* 1997;13(9):807-13.
12. Ong KK, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *Bmj* 2000;320(7240):967-71.
13. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol* 2007;19(1):1-19.
14. Catalano PM. Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome. *Reproduction* 2010;140(3):365-71.

15. Jones KL. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*. 5 ed. Michigan: Saunders; 1997.
16. Wollmann HA. Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Horm Res* 1998;49 Suppl 2:1-6.
17. Wilcox AJ. Birth Weight and Perinatal Mortality: The Effect of Maternal Smoking. *Am J Epidemiol* 1993;137(10):1098-104.
18. Aufdenblatten M, Baumann M, Raio L, Dick B, Frey BM, Schneider H, Surbek D, Hocher B, Mohaupt MG. Prematurity is related to high placental cortisol in preeclampsia. *Pediatr Res* 2009;65(2):198-202.
19. Tegethoff M, Greene N, Olsen J, Meyer AH, Meinlschmidt G. Maternal psychosocial stress during pregnancy and placenta weight: evidence from a national cohort study. *PLoS One* 2011;5(12):e14478.
20. Hattersley AT, Tooke JE. The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *Lancet* 1999;353(9166):1789-92.
21. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(44):17046-9.
22. Bo S, Cavallo-Perin P, Scaglione L, Ciccone G, Pagano G. Low birthweight and metabolic abnormalities in twins with increased susceptibility to Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2000;17(5):365-70.
23. Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GH, Wong AH, Feldcamp LA, Virtanen C, Halfvarson J, Tysk C, McRae AF, Visscher PM, Montgomery GW, Gottesman, II, Martin NG, Petronis A. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet* 2009;41(2):240-5.
24. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288(5789):373-6.
25. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327(6122):524-6.
26. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(24):9265-9.
27. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 1992;6(12):3051-64.
28. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990;347(6295):768-70.

29. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43(2):109-42.
30. Hakim TS, Sugimori K, Camporesi EM, Anderson G. Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiol Meas* 1996;17(4):267-77.
31. Dusting GJ, Fennessy P, Yin ZL, Gurevich V. Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1998;25:S34-41.
32. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 2005;26(1-2):33-65.
33. Poston L. The control of blood flow to the placenta. *Exp Physiol* 1997;82(2):377-87.
34. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(13):5193-7.
35. Bath PM, Hassall DG, Gladwin AM, Palmer RM, Martin JF. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb* 1991;11(2):254-60.
36. Skarzynski G, Khamaisi M, Bursztyrn M, Mekler J, Lan D, Evdokimov P, Ariel I. Intrauterine growth restriction and shallower implantation site in rats with maternal hyperinsulinemia are associated with altered NOS expression. *Placenta* 2009;30(10):898-906.
37. Bultinck J, Sips P, Vakaet L, Brouckaert P, Cauwels A. Systemic NO production during (septic) shock depends on parenchymal and not on hematopoietic cells: in vivo iNOS expression pattern in (septic) shock. *Faseb J* 2006;20(13):2363-5.
38. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994;23(6 Pt 2):1121-31.
39. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357(Pt 3):593-615.
40. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(17):7773-7.
41. Vincent VA, Tilders FJ, Van Dam AM. Production, regulation and role of nitric oxide in glial cells. *Mediators Inflamm* 1998;7(4):239-55.
42. Gebicke-Haerter PJ, Van Calker D, Norenberg W, Illes P. Molecular mechanisms of microglial activation. A. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 1996;29(1):1-12.

43. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26(4):190-5.
44. Shaul PW. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol* 2003;547(Pt 1):21-33.
45. Yang XP, Liu YH, Shesely EG, Bulagannawar M, Liu F, Carretero OA. Endothelial nitric oxide gene knockout mice: cardiac phenotypes and the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Hypertension* 1999;34(1):24-30.
46. Kuchan MJ, Jo H, Frangos JA. Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am J Physiol* 1994;267(3 Pt 1):C753-8.
47. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, Wang XL. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol* 2005;24(4):218-24.
48. Takizawa T, Yoshikawa H, Yamada M, Morita H. Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of nitric oxide in rat placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(4):C762-7.
49. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;43(3):562-71.
50. Bartosz G. Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Biochim Pol* 1996;43(4):645-59.
51. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268(23):17478-88.
52. Hocher B, Chen YP, Hugle S, Repey J, Krause K, Slowinski T, Godes M, Schaeffeler E, Guthmann F, Wauer R, Halle H, Gossing G, Pfab T. Impact of maternal endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy. *J Hum Hypertens* 2008;22(9):641-7.
53. Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(7):361-8.
54. Myatt L, Brockman DE, Eis AL, Pollock JS. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta* 1993;14(5):487-95.
55. Schiessl B, Mylonas I, Hantschmann P, Kuhn C, Schulze S, Kunze S, Friese K, Jeschke U. Expression of endothelial NO synthase, inducible NO synthase, and estrogen receptors alpha and beta in placental tissue of normal, preeclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Histochem Cytochem* 2005;53(12):1441-9.

56. Nasiell J, Nisell H, Blanck A, Lunell NO, Faxen M. Placental expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase mRNA in pregnancy complicated by preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77(5):492-6.
57. Sexton AJ, Loesch A, Turmaine M, Miah S, Burnstock G. Nitric oxide and human umbilical vessels: pharmacological and immunohistochemical studies. *Placenta* 1995;16(3):277-88.
58. Learmont JG, Poston L. Nitric oxide is involved in flow-induced dilation of isolated human small fetoplacental arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174(2):583-8.
59. Izumi H, Makino Y, Shirakawa K, Garfield RE. Role of nitric oxide on vasorelaxation in human umbilical artery. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(5):1477-84.
60. Giles W, O'Callaghan S, Read M, Gude N, King R, Brennecke S. Placental nitric oxide synthase activity and abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Obstet Gynecol* 1997;89(1):49-52.
61. Zheng J, Li Y, Weiss AR, Bird IM, Magness RR. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthases and nitric oxide production in ovine placental and uterine tissues during late pregnancy. *Placenta* 2000;21(5-6):516-24.
62. Schiessl B, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Spannagl M, Ugele B, Kainer F. Decreasing resistance in the maternal uterine and peripheral arterial system is apparently unrelated to plasma and urinary levels of nitrite/nitrate and cyclic-guanosinmonophosphate during the course of normal pregnancies. *J Perinat Med* 2003;31(4):281-6.
63. Buhimschi I, Yallampalli C, Dong YL, Garfield RE. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(5):1577-84.
64. Purcell TL, Buhimschi IA, Given R, Chwalisz K, Garfield RE. Inducible nitric oxide synthase is present in the rat placenta at the fetal-maternal interface and decreases prior to labour. *Mol Hum Reprod* 1997;3(6):485-91.
65. Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, Lyall F. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Hum Reprod* 1997;12(1):167-72.
66. Nanetti L, Giannubilo SR, Raffaelli F, Curzi CM, Vignini A, Moroni C, Tanase L, Carboni E, Turi A, Mazzanti L, Tranquilli AL. Nitric oxide and peroxynitrite platelet levels in women with small-for-gestational-age fetuses. *Bjog* 2008;115(1):14-21.
67. Beinder E, Mohaupt MG, Schlembach D, Fischer T, Sterzel RB, Lang N, Baylis C. Nitric oxide synthase activity and Doppler parameters in the fetoplacental and uteroplacental circulation in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1999;18(2):115-27.

68. Cooper AC, Robinson G, Vinson GP, Cheung WT, Broughton Pipkin F. The localization and expression of the renin-angiotensin system in the human placenta throughout pregnancy. *Placenta* 1999;20(5-6):467-74.
69. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Kida I, Takemura Y, Ohishi M, Katsuya T, Rakugi H. Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine* 2009;35(3):341-6.
70. Jawerbaum A, Capobianco E. Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: implications in maternal diabetes. *Placenta* 2010;32 Suppl 2:S212-7.
71. Forstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem* 2006;387(12):1521-33.
72. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76-85.
73. Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 1988;175(1):231-7.
74. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
75. Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(9):1810-6.
76. Lyall F, Young A, Greer IA. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(3 Pt 1):714-8.
77. Norris LA, Higgins JR, Darling MR, Walshe JJ, Bonnar J. Nitric oxide in the uteroplacental, fetoplacental, and peripheral circulations in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1999;93(6):958-63.
78. Ayuk PT, Theophanous D, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD. L-arginine transport by the microvillous plasma membrane of the syncytiotrophoblast from human placenta in relation to nitric oxide production: effects of gestation, preeclampsia, and intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(2):747-51.
79. Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291(5):C803-16.
80. James JL, Whitley GS, Cartwright JE. Shear stress and spiral artery remodelling: the effects of low shear stress on trophoblast-induced endothelial cell apoptosis. *Cardiovasc Res* 2011;90(1):130-9.

81. Aggarwal PK, Jain V, Jha V. Endothelial nitric oxide synthase, angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res* 2010;33(5):473-7.
82. Dye JF, Jablenska R, Donnelly JL, Lawrence L, Leach L, Clark P, Firth JA. Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta* 2001;22(1):32-43.
83. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(23):10663-7.
84. Li X, Shams M, Zhu J, Khalig A, Wilkes M, Whittle M, Barnes N, Ahmed A. Cellular localization of AT1 receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxants. *J Clin Invest* 1998;101(2):442-54.
85. Blomberg LA, Schreier LL, Guthrie HD, Sample GL, Vallet J, Caperna T, Ramsay T. The effect of intrauterine growth retardation on the expression of developmental factors in porcine placenta subsequent to the initiation of placentation. *Placenta* 2010;31(6):549-52.
86. Andronowska A, Chrusciel M. Expression and cellular distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthases in the porcine uterus during early pregnancy. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45(4):375-80.
87. Arroyo JA, Anthony RV, Parker TA, Galan HL. eNOS, NO, and the activation of ERK and AKT signaling at mid-gestation and near-term in an ovine model of intrauterine growth restriction. *Syst Biol Reprod Med* 2010;56(1):62-73.
88. Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, Yoo HS. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta* 2006;27(4-5):438-44.
89. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003;361(9368):1511-7.
90. Yoshimura T, Chowdhury FA, Yoshimura M, Okamura H. Genetic and environmental contributions to severe preeclampsia: lack of association with the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp variant in a developing country. *Gynecol Obstet Invest* 2003;56(1):10-3.
91. Serrano NC, Casas JP, Diaz LA, Paez C, Mesa CM, Cifuentes R, Monterrosa A, Bautista A, Hawe E, Hingorani AD, Vallance P, Lopez-Jaramillo P. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension* 2004;44(5):702-7.
92. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte G, Tanus-Santos JE. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics* 2008;9(10):1467-73.



93. Chan Y, Fish JE, D'Abreo C, Lin S, Robb GB, Teichert AM, Karantzoulis-Fegaras F, Keightley A, Steer BM, Marsden PA. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. *J Biol Chem* 2004;279(33):35087-100.
94. Fish JE, Matouk CC, Rachlis A, Lin S, Tai SC, D'Abreo C, Marsden PA. The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J Biol Chem* 2005;280(26):24824-38.
95. Barut F, Barut A, Gun BD, Kandemir NO, Harma MI, Harma M, Aktunc E, Ozdamar SO. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagn Pathol* 2010;5:24.
96. Jobe AH. Animal models of antenatal corticosteroids: clinical implications. *Clin Obstet Gynecol* 2003;46(1):174-89.
97. McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* 1994;267(5 Pt 2):H1921-7.
98. Rus A, Peinado MA, Castro L, Del Moral ML. Lung eNOS and iNOS are reoxygenation time-dependent upregulated after acute hypoxia. *Anat Rec (Hoboken)* 2010;293(6):1089-98.
99. Konduri GG, Bakhutashvili I, Eis A, Pritchard K, Jr. Oxidant stress from uncoupled nitric oxide synthase impairs vasodilation in fetal lambs with persistent pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(4):H1812-20.
100. Sood BG, Wykes S, Landa M, De Jesus L, Rabah R. Expression of eNOS in the lungs of neonates with pulmonary hypertension. *Exp Mol Pathol* 2011;90(1):9-12.
101. Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci* 2004;27(5):283-9.
102. Forstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol* 2010.
103. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett* 2000;471(1):45-50.
104. Clausen HV, Larsen LG, Jorgensen A, Bzorek M. The human placenta from heavy smokers: evaluation of vasoactive peptides by immunohistochemistry. *Apmis* 2007;115(1):22-9.
105. Sobrevia L, Abarzua F, Nien JK, Salomon C, Westermeier F, Puebla C, Cifuentes F, Guzman-Gutierrez E, Leiva A, Casanello P. Review: Differential placental macrovascular and microvascular endothelial dysfunction in gestational diabetes. *Placenta* 2011;32 Suppl 2:S159-64.
106. Lyall F, Gibson JL, Greer IA, Brockman DE, Eis AL, Myatt L. Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta: evidence for oxidative stress. *Diabetes Care* 1998;21(10):1753-8.

107. Uma R, Forsyth JS, Struthers AD, Fraser CG, Godfrey V, Murphy DJ. Correlation of angiotensin converting enzyme activity and the genotypes of the I/D polymorphism in the ACE gene with preterm birth and birth weight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;141(1):27-30.
108. Zheng J, Bird IM, Chen DB, Magness RR. Angiotensin II regulation of ovine fetoplacental artery endothelial functions: interactions with nitric oxide. *J Physiol* 2005;565(Pt 1):59-69.
109. Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadis C. Statins ameliorate atherosclerosis induced by inhibition of nitric oxide synthase: another novel vascular protective mechanism? *Int J Cardiol* 2008;123(2):91-3.
110. Saito Y, Kuroo M, Nabeshima Y, Nagai R. [The protective role of Klotho gene on vascular endothelium]. *Nihon Rinsho* 1999;57(7):1514-8.
111. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276(2):767-72.
112. Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y, Masuda H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R, Kurabayashi M. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol* 2002;89(2):149-56.
113. Oyekan A. PPARs and their Effects on the Cardiovascular System. *Clin Exp Hypertens* 2011;33(5):287-93.
114. Lu X, Guo X, Karathanasis SK, Zimmerman KM, Onyia JE, Peterson RG, Kassab GS. Rosiglitazone reverses endothelial dysfunction but not remodeling of femoral artery in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Diabetol* 2010;9:19.
115. Kowalewski MP, Meyer A, Hoffmann B, Aslan S, Boos A. Expression and functional implications of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in canine reproductive tissues during normal pregnancy and parturition and at antiprogestin induced abortion. *Theriogenology* 2011;75(5):877-86.

## **A Lebenslauf**

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

## **B Danksagung**

Diese Arbeit wurde am Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Berthold Hoher für die Initiierung und die Möglichkeit der Durchführung der Studie bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Thiemo Pfab für die konstruktive Kritik und die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die gute und kollegiale Zusammenarbeit danken. Insbesondere danke ich Herrn Dipl. Ing. Jan Rahnenführer für Einweisung in die Laborarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft, sowie Herrn Dr. med. Ludwig Schlemm und Herrn Dr. med. Christoph Reichetzer für die freundschaftliche und produktive Arbeit im Labor, während der statistischen Auswertung und für die Durchsicht der Arbeit.

Danken möchte ich auch den Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Geburtsmedizin am Campus Mitte der Charité Universitätsmedizin Berlin auf deren Stationen wir die klinischen Daten erheben und das Probenmaterial sammeln durften.

Sehr dankbar bin ich meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich stets unterstützt, mir Wertschätzung und Menschlichkeit vermittelt haben.

## **C Erklärung**

„Ich, Tim Andermann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Zusammenhänge zwischen der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase in der humanen Plazenta und fetalen sowie maternalen Parametern“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 25.10.2013

Tim Andermann