

Universität Rostock

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz

unter Anleitung von
Prof. Dr. rer. nat. Stefan Oswald

**Expression von Arzneistofftransportern in der humanen
Plazenta**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Oke Stückrad

geboren am 12.09.1990 in Rostock

Rostock, August 2022

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Oswald, Universitätsmedizin Rostock,
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernhard Rauch, Carl von Ossietzky Universität
Oldenburg, Fakultät VI, Pharmakologie & Toxikologie
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi, Universitäts-
klinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Institut für
Experimentelle und Klinische Pharmakologie

Jahr der Einreichung: 2022

Jahr der Verteidigung: 2023

Inhaltsverzeichnis

<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
1. Einleitung	1
1.1 Blut-Plazenta-Schranke	2
1.2 Gestationsdiabetes	9
1.3 (Prä-)Eklampsie	10
2. Aufgabenstellung	11
3. Material und Methoden	12
3.1 Probengewinnung	12
3.2 RNA-Isolation	12
3.3 RNA-Qualitätsanalyse	13
3.4 Genexpressionsanalyse	14
3.4.1 Reverse Transkription	14
3.4.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
3.5 Housekeeping Gene	17
3.6 Auswahl der Zielgene und -Proteine	18
3.6.1 TLDA	19
3.6.2 <i>SLC47A1</i> (MATE1)	21
3.6.3 <i>SLCO1A2</i> (OATP1A2)	22
3.7 RIN-Grenzwert Bestimmung	24
3.8 Proteinanalytische Methoden	29
3.8.1 Isolation der Membranproteine	30
3.8.2 Verdau der Proteine	31
3.8.3 LC-MS/MS-Methode	31
3.8.4 Peptidsequenzen	32
3.9 Statistische Analyse	33
3.10 Material	34
3.10.1 Geräte	34
3.10.2 Reaktionskits für die Molekularbiologie	35
3.10.3 Verbrauchsmaterial	35
3.10.4 Chemikalien	36
3.10.5 TaqMan® Assays	36
3.10.6 Software	37
4. Ergebnisse	38
4.1 Genexpression bei termingerechter Entbindung und gesunden Probandinnen	38
4.2 Genexpression im zeitlichen Verlauf der Gestation	40
4.2.1 Tokolyse und Respiratory Distress Syndrome Prophylaxe	44

4.3 Genexpression bei Gestationsdiabetes	46
4.4 Genexpression bei (Prä-)Eklampsie	47
4.5 Proteingehalt bei termingerechter Entbindung und gesunden Probandinnen	50
4.5.1 Korrelation von Genexpression und Proteingehalt bei termingerechter Entbindung und gesunden Probandinnen	53
5. Diskussion	55
5.1 Genexpression im zeitlichen Verlauf der Gestation	58
5.2 Genexpression bei Gestationsdiabetes	65
5.3 Genexpression bei (Prä-)Eklampsie	67
6. Zusammenfassung	74
7. Thesen	76
8. Literaturverzeichnis	77
Lebenslauf	VII
Eidesstattliche Erklärung	VIII
Danksagung	IX

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1.1:</i>	<i>Ausgewählte Substrate der Arzneistofftransporter der humanen Plazenta</i>	<i>8</i>
<i>Tab. 3.1:</i>	<i>Pipettierschema der Reversen Transkription mittels High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies GmbH)</i>	<i>15</i>
<i>Tab. 3.2:</i>	<i>Pipettierschema der Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR</i>	<i>16</i>
<i>Tab. 3.3:</i>	<i>Untersuchung möglicher Housekeeping Gene der humanen Plazenta</i>	<i>18</i>
<i>Tab. 3.4:</i>	<i>Übersicht auf der TLDA Micro Fluidic Card enthaltenen Genassays</i>	<i>20</i>
<i>Tab. 3.5:</i>	<i>Ergebnisse der Varianzanalyse der Genexpression in Abhängigkeit der RIN</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 3.6:</i>	<i>Peptidsequenzen der Zielproteine für die Quantifizierung mithilfe der LC-MS/MS-Methode</i>	<i>32</i>
<i>Tab. 4.1:</i>	<i>Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei gesunden Probandinnen und termingerechter Entbindung (37. - 42. SSW)</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 4.2:</i>	<i>Proteinexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei gesunden Probandinnen und termingerechter Entbindung (37. – 42. SSW)</i>	<i>52</i>
<i>Tab. 4.3:</i>	<i>Korrelationsanalyse von Genexpression und Proteingehalt von Arzneistofftransportern der humanen Plazenta</i>	<i>54</i>
<i>Tab. 5.1:</i>	<i>Ausgewählte Substrate der relevanten Arzneistofftransporter der humanen Plazenta</i>	<i>57</i>

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1:</i>	<i>Aufbau der reifen Plazenta</i>	3
<i>Abb. 1.2:</i>	<i>Blut-Plazenta-Schranke</i>	4
<i>Abb. 1.3:</i>	<i>ABC-Transporter der Blut-Plazenta-Schranke</i>	6
<i>Abb. 1.4:</i>	<i>SLC-Transporter der Blut-Plazenta-Schranke</i>	8
<i>Abb. 3.1:</i>	<i>Elektropherogramm der RIN-Messung</i>	14
<i>Abb. 3.2:</i>	<i>Genexpression ausgewählter Transporter in der humanen Plazenta mittels TLDA Micro Fluidic Cards</i>	20
<i>Abb. 3.3:</i>	<i>Genexpression von SLC47A1 im zeitlichen Verlauf der Gestation</i>	21
<i>Abb. 3.4:</i>	<i>Genexpression von SLC47A1 bei (Prä-)Eklampsie und Gestationsdiabetes</i>	22
<i>Abb. 3.5:</i>	<i>Genexpression von SLC01A2 im zeitlichen Verlauf der Gestation</i>	23
<i>Abb. 3.6:</i>	<i>Genexpression von SLC01A2 bei (Prä-)Eklampsie und Gestationsdiabetes</i>	24
<i>Abb. 3.7:</i>	<i>Genexpression von ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3 in der humanen Plazenta in Abhängigkeit der RIN</i>	27
<i>Abb. 3.8:</i>	<i>Genexpression von ABCG2, SLC22A3, SLC22A5, SLC02B1 in der humanen Plazenta in Abhängigkeit der RIN</i>	28
<i>Abb. 4.1:</i>	<i>Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei gesunden Probandinnen und termingerechter Entbindung (37. – 42. SSW)</i>	39
<i>Abb. 4.2:</i>	<i>Genexpression von ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3 in der humanen Plazenta im zeitlichen Verlauf</i>	42
<i>Abb. 4.3:</i>	<i>Genexpression von ABCG2, SLC22A3, SLC22A5, SLC02B1 in der humanen Plazenta im zeitlichen Verlauf</i>	43
<i>Abb. 4.4:</i>	<i>Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei Tokolyse/RDS-Prophylaxe</i>	45
<i>Abb. 4.5:</i>	<i>Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei Gestationsdiabetes</i>	47
<i>Abb. 4.6:</i>	<i>Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei (Prä-)Eklampsie</i>	49
<i>Abb. 4.7:</i>	<i>Proteinexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei gesunden Probandinnen und termingerechter Entbindung (37. - 42. SSW)</i>	51
<i>Abb. 4.8:</i>	<i>Korrelation der Genexpression von ABCB1 und des Proteingehalts von P-gp</i>	53
<i>Abb. 5.1:</i>	<i>Relevante Arzneistofftransporter der Blut-Plazenta-Schranke</i>	57

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin/5-Hydroxytryptamin
18S	18S ribosomale Ribonukleinsäure
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCRP	<i>breast-cancer-resistant-protein</i>
BI	<i>Best-Keeper-Index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CT	<i>Cycle Treshold</i>
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E3S	Estron-3-Sulfat
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GSSG	Glutathiondisulfid
GLUT	<i>glucose transporter</i>
HELLP	<i>haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count</i>
HKG	<i>housekeeping gene</i>
IRS1	Insulinrezeptor-Substrat 1
LAT	<i>L-type aminoacid transporter</i>
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektometrie/Massenspektometrie
MAO-A	Monoaminoxidase-A
MATE	<i>multidrug and toxin extrusion protein</i>
MCT	<i>monocarboxylat transporter</i>
MDR	<i>multidrug resistance protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
MTX	Methotrexat
OAT	<i>organic anion transporter</i>
OATP	<i>organic anion transporting polypeptid</i>
OCT	<i>organic cation transporter</i>

OCTN	<i>organic cation/carnitine transporte</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PepT	<i>peptide transporter</i>
P-gp	P-Glykoprotein
PI3	Phosphoinositid-3
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PUPP	<i>pruritic urticarial papules and plaques</i>
rDNAse	rekombinante Desoxyribonuklease
RDS	<i>respiratory distress syndrom</i>
RIN	<i>RNA-Integrity Number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RR _{syst}	systolischer Blutdruck
RT-qPCR	<i>real time quantitative PCR</i>
SD	Standartabweichung
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex
sENG	<i>soluble endoglin</i>
SERT	<i>serotonin transporter</i>
sFLT1	<i>soluble fms-like tyrosine kinase-1</i>
SLC	<i>solute carrier</i>
SLCO	<i>solute carrier organic anion transporter</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
SUR	<i>sulfonylurea receptor</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TGF-β1	<i>transforming growth factor β1</i>
TLDA	<i>TaqMan[®] Low Density Array</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor α
u.a.	unter anderem
UTR	<i>untranslated regions</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
YWAHZ	<i>tyrosin 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase aktivationsprotein Z</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die Pharmakotherapie bei Schwangeren mit chronischen oder akuten Erkrankungen stellt in der klinischen Praxis ein stetiges Problem dar. Egen-Lappe et al. (2004) zeigten in einer epidemiologischen Studie, welche sich auf Daten von 41.293 Frauen aus dem Zeitraum von Juni 2000 bis Mai 2001 beziehen, dass 96,4 % der Patientinnen während ihrer Schwangerschaft ein Medikament verschrieben bekamen. Davon erfolgte die Gabe einer Substanz mit potenziell teratogenen Effekt bei 1,3 % der Frauen (1). Ähnliche Resultate konnten durch verschiedene unabhängige Forschungsgruppen reproduziert werden (2,3).

Das historisch bedeutsamste Ereignis, welches die Notwendigkeit einer suffizienten Testung von Medikamenten bezüglich ihrer Teratogenität aufzeigt, stellte der „Contergan-Skandal“ dar. Hierbei kam es nach der maternalen Einnahme des Wirkstoffes Thalidomid zu Fehlbildungen der Neugeborenen (4). Die Frage, ob vor der Marktzulassung des Wirkstoffes eine Testung am Tiermodell bezüglich der fruchtschädigenden Wirkung durchgeführt wurde, kann aufgrund der Vernichtung sämtlicher Aufzeichnungen der damals vertreibenden Firma Grünenthal bis heute nicht sicher beantwortet werden (5). Dies führte in den folgenden Jahren zu einer ausgiebigen Testung der Substanz auf potenzielle teratogene Effekte in unterschiedlichen Tiermodellen (6–10). Hierbei zeigte sich, dass durch keine der untersuchten Spezies eine verlässliche Prädiktion möglich war. Selbst die diesbezüglich am häufigsten zitierte Tierart der Kaninchenrasse des „Weißen Neuseeländer“ wird durch die Höhe der benötigten Dosis zum Erhalt eines fruchtschädigenden Effektes, die das 25- bis 300-fache der beim Menschen verwendeten Menge beträgt, stark kompromittiert (11).

Die steigende Brisanz der Thematik in den folgenden Jahrzehnten veranlasste die amerikanische Arzneimittelbehörde FDA zur Erstellung einer Übersichtsarbeit, die eine Evaluierung der Verwendung von Tiermodellen bzw. dem notwendigen Studiendesign zur Frage hatte. Das Ergebnis zeigte auf, dass eine suffiziente Vorhersage auch unter Verwendung mehrere Spezies nicht möglich ist. Als mögliche Ursachen wurden vor allem physiologische und biochemische Unterschiede bezüglich Substanzabsorption, Metabolismus und Exkretion auf maternaler und fetaler Seite benannt (12).

Hierdurch wird deutlich, dass die isolierte Testung von Medikamenten im Tiermodell bezüglich ihrer potenziellen teratogenen Effekte im menschlichen Organismus nicht ausreichend ist. Folgend ergibt sich hieraus die Notwendigkeit eines molekularbiologischen Verständnisses der Blut-Plazenta-Schranke, um mögliche fruchtschädigende Auswirkungen einer Substanz abschätzen zu können.

1.1 Blut-Plazenta-Schranke

Die Plazenta ist ein transient ausgebildetes Organ, das während der Schwangerschaft die Verbindung zwischen mütterlichem und fetalem Organismus darstellt. Ihre Hauptfunktion liegt in der Versorgung des Fetus mit Nährstoffen, dem Abtransport von Stoffwechselprodukten sowie dem materno-fetalen Gasaustausch (13). Weitergehend erfüllt die Plazenta wichtige endokrine Aufgaben, die u.a. für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft notwendig sind (14). Darüber hinaus bildet die Blut-Plazenta-Schranke, unter Beteiligung von Transport- und Stoffwechselproteinen, ein komplexes Schutzsystem des Fetus gegenüber Xenobiotika und Krankheitserregern (15).

Die ausgereiften Plazenta lässt sich makroskopisch in drei Bereiche einteilen: Der zum Uterus ausgerichteten Basalplatte, der fetal gelegenen Chorionplatte, sowie den zwischen den Platten bestehenden intervillösen Raum mit den aus der Chorionplatte gewachsenen Chorionzotten (16).

Die Chorionplatte gliedert sich wiederum in sechs Abschnitte (17). Fetalseitig befindet sich das Amnionepithel mit dem Amnionmesenchym, welches aus einer azellulären Kollagenschicht und einer zweifachen Lage an Fibroblasten besteht. Durch eine lockere Zwischenschicht getrennt liegt das Chorionbindegewebe. Der Abschluss zum intravillösen Raum wird durch die Zellen des Trophoblasten gebildet. Diese Schicht setzt sich aus den Zytotrophoblasten und einer nur teilweise ausgebildeten Synzytiotrophoblasten zusammen (17–19).

Die Basalplatte teilt sich ebenfalls in sechs Abschnitte. Die Grenzschicht zum Uterus wird durch die aus dem Endometrium stammenden Dezidualzellen gebildet. Untergelagert befindet sich das Nitabuch-Fibrinoid, welches neben der physikalischen Verankerung der Plazenta auch einen wichtigen Bestandteil der immunologischen Abgrenzung des Fetus zur Mutter darstellt. Ihm folgt eine Schicht aus mehrkernigen Zellen die sich aus der Fusion mehrerer Zytotrophoblasten gebildet haben, den sogenannten X-Zellen (20). Das Rohr-Fibrinoid stellt den nächsten Abschnitt dar. Er ähnelt in seiner Zusammensetzung dem Nitabuch-Fibrinoid und dient den Chorionzotten als Befestigung. Durch eine Bindegewebeschiebt getrennt wird die Abgrenzung zum intervillösen Raum wiederum durch den Synzytiotrophoblasten gebildet. (16,21).

Der Zwischen den Platten befindliche intervillöse Raum stellt das Hauptkompartiment des materno-fetalen Stoffaustausches dar. Die aus der Chorionplatte gewachsenen vaskularisierten Zotten werden dabei von mütterlichem Blut aus den Spiralarterien umspült. An den Enden der Zottenbäume befindet sich im Bereich der Tertiärzotten die Blut-Plazenta-Schranke. Die

Tertiärzotten stellen ab der 20. SSW den größten Anteil der Zotten und nehmen mit zunehmenden Gestationsalter prozentual weiter zu (22).

In der folgenden Abb. 1.1 ist der Aufbau der reifen humanen Plazenta anschaulich dargestellt.

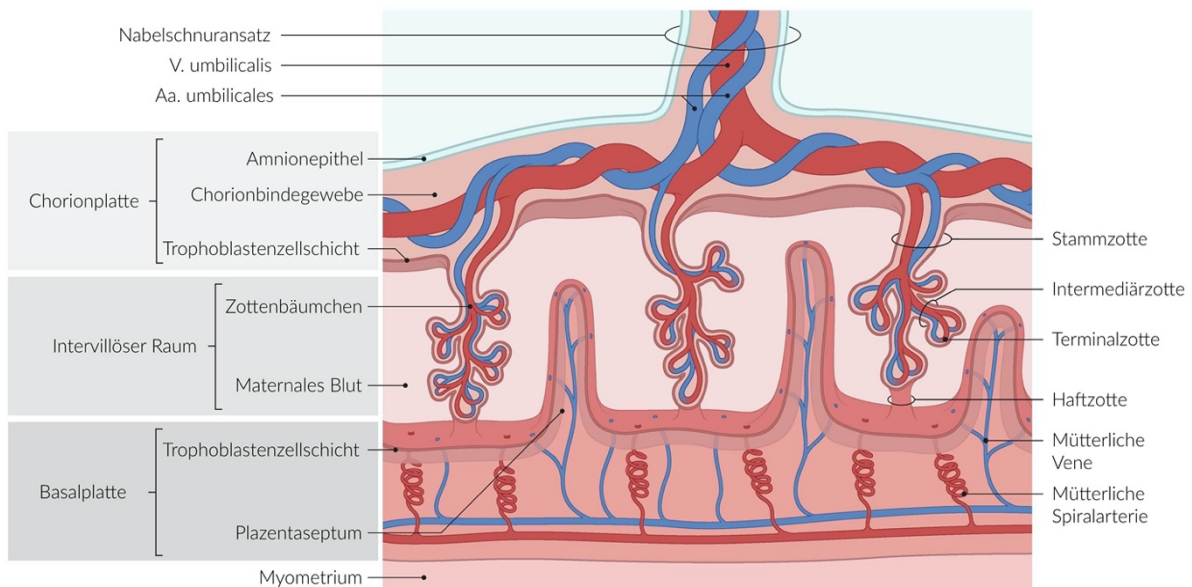


Abb. 1.1: *Aufbau der reifen Plazenta* Darstellung der reifen Plazenta mit Basalplatte, intervillösen Raum, Chorionplatte und Nabelschnur (23).

Die Blut-Plazenta-Schranke ist aus vier Schichten aufgebaut und misst im Durchmesser stellenweise unter 2 μm (24). Die äußerste Schicht bildet der Synzytiotrophoblast, der im direkten Kontakt mit dem mütterlichen Blut steht. Ihm untergelagert ist eine inkonstant ausgeprägte Zelllage des Zytotrophoblasten, die mittels Proliferation die Grundlage des Wachstums des Synzytiotrophoblasten bildet (25). Durch eine dünne Bindegewebeschicht getrennt findet man abschließend das Endothel der fetalen Kapillaren (15,19,26,27).

Eine ergänzende schematische Übersicht über die Blut-Plazenta-Schranke im Bereich der Tertiärzotten gibt Abb. 1.2 wieder.

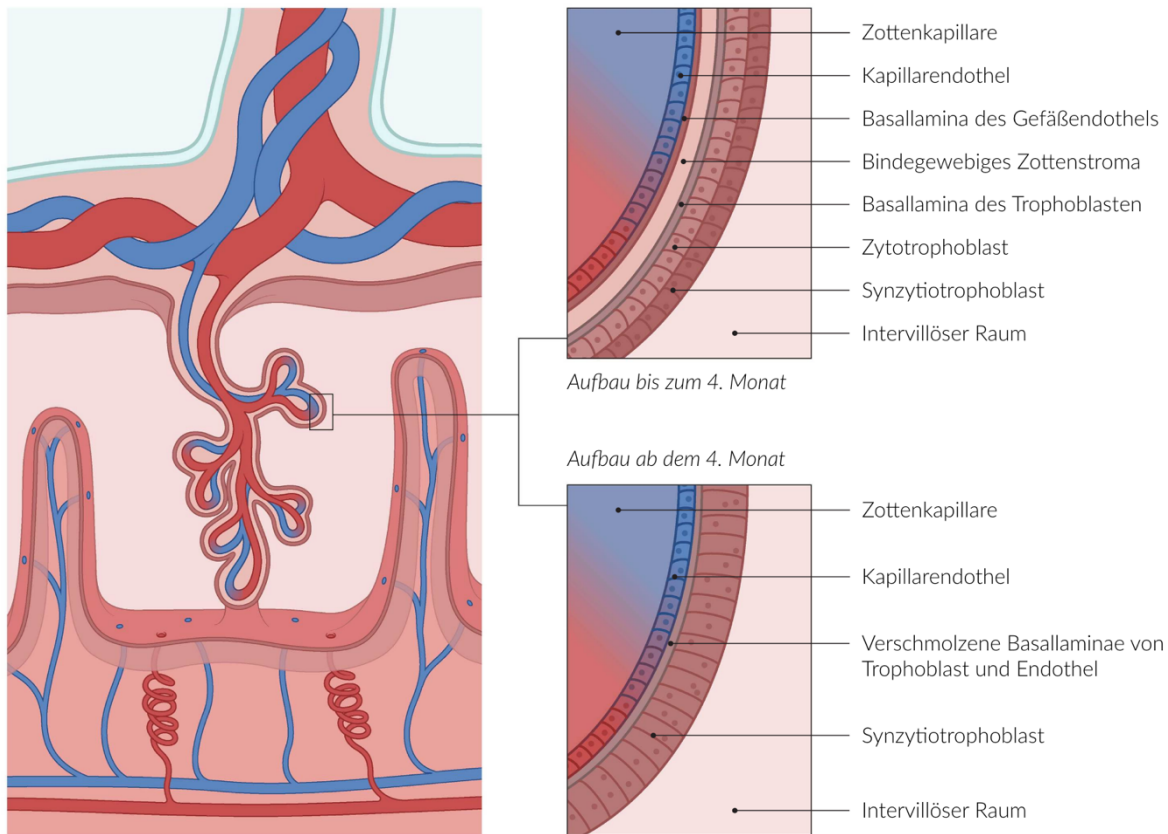


Abb. 1.2: *Blut-Plazenta-Schranke* Darstellung der Blut-Plazenta-Schranke vor und nach dem 4. Monat im Bereich der Tertiärzotten (28).

Die Transportprozesse zwischen dem maternalen und fetalen Kreislauf umfassen neben Diffusion, erleichterter Diffusion und der Pinozytose hochmolekularer Stoffe auch den aktiven energieabhängigen Transport mithilfe von spezialisierten Proteinen (16). Von zahlreichen Transportproteinen ist hierbei bekannt, dass sie einerseits endogene Substanzen andererseits aber auch Fremdstoffe und deren Metaboliten aus den Zellen befördern. Somit dienen sie einerseits der endogenen Homöostase und andererseits dem Schutz vor potenziell schädlichen Xenobiotika (29).

Eine große Gruppe der Transportproteine wird durch die *ATP binding cassette* (ABC)-Transporter-Familie gebildet, deren etwa 50 Mitglieder unter Hydrolyse des energiereichen Substrates ATP zu einem aktiven Efflux von Substraten aus der Zelle führen. Nachfolgend werden die bisher in der Plazenta exprimierten ABC-Transporter kurz eingeführt. Darüber hinaus liefert Tabelle 1.1 am Ende des Abschnittes einen Überblick über klinisch relevante Arzneistoffe, die als Substrate der Transporter identifiziert wurden.

Der bekannteste Vertreter ist das P-Glykoprotein (P-gp) oder MDR1, welches durch das Gen *ABCB1* kodiert wird. Es ist gut untersucht, dass dieses Transportprotein in der

Blut-Plazenta-Schranke in der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten exprimiert wird (30–32). Lye et al. (2013) konnten zudem erstmals auch geringere Mengen von P-gp in Zytotrophoblastenzellen nachweisen (33).

Ein weiteres Transportprotein der ABC-Familie mit einem breiten Spektrum an Substraten ist das *breast cancer resistance protein* (BCRP) (*ABCG2*-Gen). Es wird in der Plazenta hauptsächlich in der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten ausgebildet (34,35). Weiterhin konnten kleinere Mengen von BCRP in den fetalen Gefäßen der Chorionzotten dargestellt werden (34).

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten ABC-Transportern ist das *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1) (*ABCC1*-Gen) in der basalen Membran des Synzytiotrophoblasten und abluminal im fetalen Endothel lokalisiert. Die von St. Pierre et al. (2000) zusätzlich beschriebene apikale Expression konnte bisher durch weitere Arbeitsgruppen nicht verifiziert werden (31,36,37).

Das *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2) (*ABCC2*-Gen) weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu MRP 1 auf. In der Blut-Plazenta-Schranke wird es in der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten und in geringen Mengen auch in der apikalen Seite des Amnionepithels exprimiert (36,38).

Die Expression vom *multidrug resistance-associated protein 3* (MRP 3) (*ABCC3*-Gen) konnte im fetalen Endothel und in der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten dargestellt werden (36). Das *multidrug resistance-associated protein 4* (MRP4) (*ABCC4*-Gen) wird ebenfalls in der apikalen Membran der Synzytiotrophoblasten ausgebildet (39).

Multidrug resistance-associated protein 5 (MRP5) (*ABCC5*-Gen) hingegen wird vor allem in der basalen Membran des Synzytiotrophoblasten und dem fetalen Endothel ausgebildet. Weitergehend konnte um den Zeitpunkt des errechneten Geburtstermins eine diskrete Expression in der apikalen Synzytiotrophoblastenmembran nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte MRP5 auch basal und apikal im Amnionepithel nachgewiesen werden (38,40).

Weitere Transporter der ABC-Familie, die in der Plazenta nachgewiesen wurden, sind das *multidrug resistance-associated protein 6* (MRP6) (*ABCC6*- Gen) und das *multidrug resistance-associated protein 8* (MRP8) (*ABCC11*-Gen) (41,42).

Ein schematischen Überblick des Expressionsmusters von ABC-Transportern in der humanen Plazenta wird in der Abb. 1.3 dargestellt.

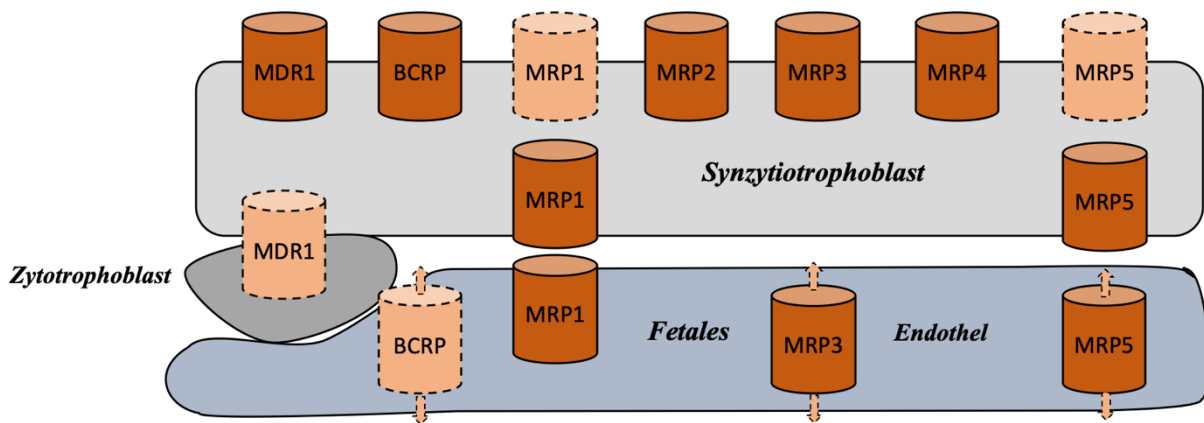


Abb. 1.3: *ABC-Transporter der Blut-Plazenta-Schranke* Darstellung der ABC-Transporter der humanen Blut-Plazenta-Schranke und deren Lokalisation, Transporter mit schwacher Expression bzw. widersprüchlicher Datenlage sind hellbraun mit gepunkteter Umrandung dargestellt. Die Lokalisation von BCRP, MRP3 und MRP5 im Endothel sind bisher nicht bekannt

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Blut-Plazenta-Schranke, der insbesondere für den Aufnahmetransport von zumeist niedermolekularen und hydrophilen Xenobiotika und endogenen Substanzen verantwortlich ist, wird durch organische An- und Kationentransporter aus der *solute carrier* (SLC)-Familie gestellt.

Eine herausragende Rolle für den Transport von Kationen stellt dabei der *organic cation transporter 3* (OCT3) (*SLC22A3*-Gen) dar, welcher in Gegensatz zum *organic cation transporter 1* (OCT1) und dem *organic cation transporter 2* (OCT2) in der Plazenta reichlich exprimiert wird (43). Der Transporter ist in der basalen Membran des Synzytiotrophoblasten sowie in den fetalen Endothelzellen lokalisiert (44). Der in Analogie zum Rattenmodell postulierte Effluxtransport von OCT3 Substraten durch das *multidrug and toxin extrusion protein 1* (MATE1) (*SLC47A1*-Gen) an der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten konnte bisher nicht auf die humane Plazenta übertragen werden (45). Mehrere Arbeitsgruppen konnten bisher allenfalls eine minimale Expression des Transporters auf mRNA- und Proteinebene zeigen, sodass MATE1 gegenwärtig keine große Relevanz in der Analyse der Blut-Plazenta-Schranke zugesprochen wird (44,46,47).

Ein weiteres essenzielles Membranprotein der Plazenta ist der *organic cation/carnitine transporter 2* (OCTN2) (*SLC22A5*-Gen), dass neben seiner Hauptaufgabe, den Influx von Carnitin, auch organische Kationen transportiert. OCTN2 ist in der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten lokalisiert (48,49). Der *organic cation/carnitine transporter 1* (OCTN1) (*SLC22A4*-Gen) konnte ebenfalls mehrfach in humanem plazentarem Gewebe auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Ihm wird aufgrund der deutlich niedrigen

Konzentration bei ähnlichem Spektrum an transportierten Substraten keine größere Bedeutung beigemessen (50,51).

Ein Großteil organischer Anionen wird durch die *organic anion transporter* (OAT) und *organic anion transporting polypeptides* (OATP) der SLC-Familie transportiert. Eine der am besten untersuchten Transporter ist das *organic anion transporting polypeptide 1A2* (OATP1A2) (*SLCO1A2*-Gen). Der Transporter wird sowohl an der basalen als auch an der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten ausgebildet (52). Weitergehend konnte auch eine untergeordnete Expression in villösen und extravillösen Throphoblasten nachgewiesen werden (53).

Das *organic anion transporting polypeptide 1B3* (OATP1B3) (*SLCO1B3*-Gen), ein ursprünglich als leberspezifisch beschriebener Transporter für Gallensäuren und Xenobiotika, konnte durch mehrere Arbeitsgruppen in der Plazenta nachgewiesen werden (52,54,55). Er zeigt ein fokales Expressionsmuster, und wird vor allen in Bereichen ausgebildet in der die Blut-Plazenta-Schranke die geringsten Durchmesser aufweist (52). Hierbei befindet sich der Transporter in der basalen Membran des Synzytiotrophoblasten und zu geringen Anteil im fetalen Endothel (55).

Das *organic anion transporting polypeptide 2B1* (OATP2B1) (*SLCO2B1*-Gen) ist für den Transport von endogenen gebildeten Sexualhormonen zuständig. Weiterhin konnte vor allen die Medikamentengruppe der Statine als exogene Substrate des Transporters dargestellt werden (56). Er wird in der basalen Membran des Synzytiotrophoblasten, sowie in geringem Ausmaß im Zytotrophoblasten exprimiert, und unterliegt großen interindividuellen Unterschieden (57,58).

Ebenfalls erfolgte durch Ugele et al. (2003) der Nachweis vom *organic anion transporting polypeptide 3A1* (OATP3A1) (*SLCO3A1*-Gen) in humanem plazentarem Gewebe in Form von mRNA (54). Untersuchungen bezüglich der zellulären Lokalisation sowie der Nachweis des Transporters auf Proteinebenen sind gegenwärtig in der Literatur nicht vorhanden.

Ein weiterer in der Plazenta exprimierter Transporter ist OATP4A1 (*SLCO4A1*-Gen). Die Ausbildung des Proteins erfolgt an der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten (59).

Organic anion transporter 4 (OAT4) (*SLC22A11*-Gen) ist ein stark exprimierter Transporter in der humanen Plazenta. Er ist an der basalen Membran des Synzytiotrophoblasten von terminalen und intermediären Villi lokalisiert. Weiterhin konnte im ersten Trimester auch eine Ausbildung im Zytotrophoblasten gezeigt werden (54).

Die Abbildung Abb. 1.4 zeigt eine schematische Darstellung der Expression von SLC-Transportern in der humanen Plazenta.

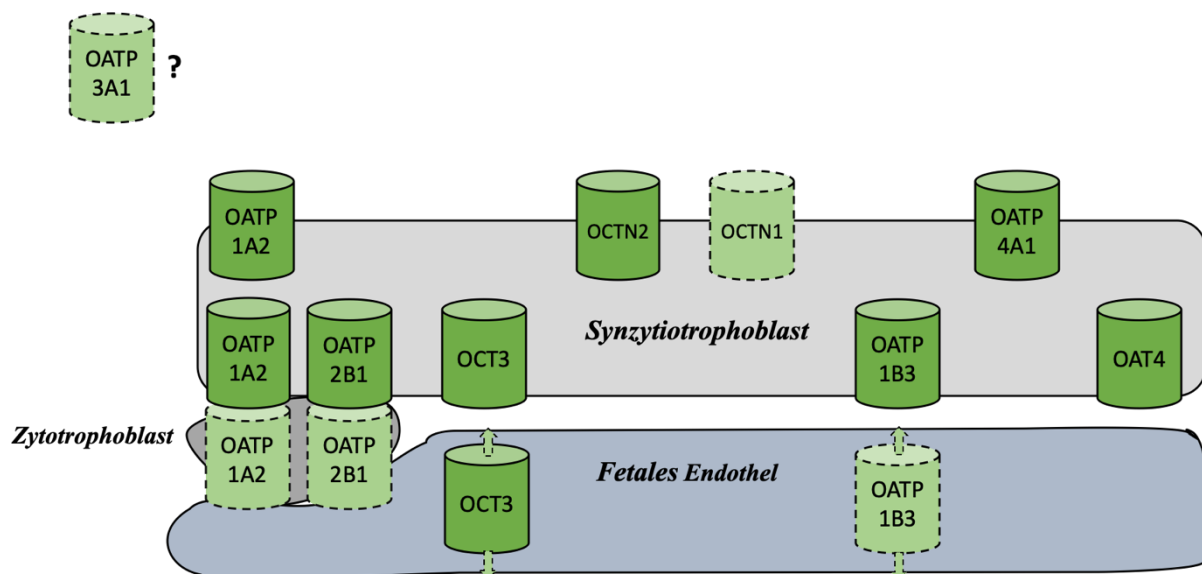


Abb. 1.4: *SLC-Transporter der Blut-Plazenta-Schranke* Darstellung der SLC-Transporter der humanen Blut-Plazenta-Schranke und deren Lokalisation, Transporter mit schwacher Expression bzw. widersprüchlicher Datenlage sind hellgrün mit gepunkteter Umrandung dargestellt. Die Lokalisation von OCT3 und OATP1B3 im fetalen Endothel wurde bisher nicht beschrieben.

Tab. 1.1: *Ausgewählte Substrate der Arzneistofftransporter der humanen Plazenta* (29,60–72)

Transporter	Ausgewählte Substrate
P-gp	Digoxin, Loperamid, Irinotecan, Doxorubicin, Vinblastin, Paclitaxel, Fexofenadin
BCRP	Statine, MTX, Irinotecan, Topotecan, Mitoxantrone, Imatinib, Sulfat-Konjugate
MRP1	Difloxacin, MTX, Irinotecan, Topotecan, Ritonavir, Glucuronid/Sulfat-Konjugate
MRP2	Valsartan, Olmesartan, MTX, Mitoxantron, Etoposide, Gluthation/Glucuronid-Konjugate
MRP3	MTX, Fexofenadin, Glucuronid-Konjugate
MRP4	Furosemid, MTX, Topotecan, Adefovir, Tenofovir, Gallensäuren
MRP5	MTX, 5-Fluoruracil, Gemcitabin, Cytarabin
MRP6	Etoposide, Doxorubicin, Daunorubicin, Gluthation-Konjugate
MRP8	MTX, 5-Fluoruracil, Steroidsulfate, Gallensäuren
OCT3	Metformin, Cimetidin, Atropin, Lidocain, Oxaliplatin, Lamivudine, Katecholamine
OCTN1	Verapamil, Pregabalin, Donepezil, Oxaliplatin, Mitoxantron, Doxorubicin
OCTN2	Verapamil, Amisulpirid, Colistin, Etoposide, Oxaliplatin, Imatinib, L-Carnitin
OATP1A2	Statine, Levofloxacin, MTX, Digoxin, Fexofenadin, Gallensäuren
OATP1B3	Statine, Telmisartan, Valsartan, Olmesartan, Digoxin, Fexofenadin, Gallensäuren
OATP2B1	Statine, Sartane, Triptane, Sulfasalazin, Glyburide, MTX, Doxorubicin, Imatinib
OATP3A1	Benzylpenicillin, Thyroxin, Vasopressin, Östrogen-3-Sulfat
OATP4A1	Benzylpenicillin, Trijodthyronin, Thyroxin, Vasopressin, Östrogen-3-Sulfat

Die beschriebenen Daten zur Expression und Lokalisation der genannten ABC- und SLC-Transporter haben jedoch mehrere Nachteile, die zuverlässige Aussagen über die tatsächliche Relevanz der genannten Transporter erschweren:

1. zahlreiche Studien betrachteten nur wenige Transporter gleichzeitig, so dass die Zusammenführung der Daten unterschiedlicher Studien Fragen der direkten Vergleichbarkeit aufkommen lässt;
2. die meisten Studien umfassten nur eine relativ geringe Anzahl an Proben aus plazentarem Gewebe und
3. viele Expressionsstudien basieren ausschließlich auf der Analyse der mRNA, die nicht zwingend ein gutes Surrogat für das jeweils kodierte Protein ist.

Des Weiteren ist bisher nur wenig bekannt über die Einflüsse vorliegender Erkrankungen der Mütter, die möglicherweise die Expression und Funktion der Transporter beeinflussen können.

1.2 Gestationsdiabetes

Der Gestationsdiabetes ist definiert durch eine während der Schwangerschaft neu aufgetretene meist postpartum reversible orale Glucosetoleranzstörung, die durch Bestimmung der nüchtern Blutglukosewerte oder einen oralen Glukosetoleranztest nachgewiesen wurde. Es sollte eine Differenzierung zu einem während der Schwangerschaft erstmalig diagnostizierten manifesten Diabetes mellitus erfolgen (73).

Nach gegenwärtigem Wissensstand wird ätiologisch die Exazerbation einer latenten Dysfunktion der pankreatischen β -Zellen durch eine Zunahme der peripheren Insulinresistenz angenommen. Diese wird durch physiologische Anpassungsprozesse im Rahmen der Schwangerschaft mit einer vermehrten Ausbildung von lokalen und plazentaren Zytokinen und Hormonen (z.B. Östrogen, Adiponektin, *placental growth hormon*) begünstigt (74).

Catalano et al. (1993) konnten darstellen, dass es im Zeitraum der Gestation zu einer 50 - 60 % Abnahme der Insulin-Sensitivität kommt (75). Eine zentrale Rolle in der Genese der Insulinresistenz wird aufgrund seiner starken Korrelation dem Zytokin TNF- α zugesprochen, welches im Verlauf der Schwangerschaft zunehmend in der Plazenta gebildet wird (76,77). Durch die Wirkung von TNF- α an peripheren Zellen kommt es innerhalb der Insulin-Rezeptor-Signalkaskade zu einer reduzierten Phosphorylierung von Tyrosin am Insulinrezeptor und dem Insulinrezeptor-Substrat 1(IRS-1) (78). Hierdurch wird der weitere intrazelluläre Signalweg unterbrochen, in dem u.a. die PI3-Kinase durch die fehlende Bindung ihrer p85 α -Untereinheit an dem IRS-1 nicht mehr aktiviert werden kann (79). Die PI3-Kinase fungiert weitergehend als wichtiger Mediator der zellulären Insulinantwort mit Wirkung auf Enzyme und Proteine des Glukosetransports und Metabolismus (74).

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass unterschwellige inflammatorische Prozesse innerhalb von Schwangerschaften mit Gestationsdiabetes auftreten (77,80,81). Hieraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass Veränderungen der Blut-Plazenta-Schranke bzw. plazentarer Transportproteine durch die Ausschüttung systemisch wirksamer Zytokine und Hormone möglich sind.

1.3 (Prä-)Eklampsie

Die Präeklampsie bezeichnet eine schwangerschaftsbedingte Erkrankung, die durch die Symptomentrias arterielle Hypertonie, Proteinurie und Ödemen nach Beendigung der 20. SSW gekennzeichnet ist. Auch bei fehlender Proteinurie kann nach der überarbeiteten Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe von 2019 bei neu aufgetretenen Schäden weiterer Organsysteme (Leber, respiratorisches System, hämatologisches System, Plazenta, ZNS) eine Präeklampsie diagnostiziert werden.

Die Eklampsie ist definiert durch einen in der Schwangerschaft aufgetretenen generalisierten tonisch-klonischen epileptischen Anfall mit Ausschluss einer zugrundeliegenden neurologischen Pathologie meist auf Grundlage einer vorbestehenden Präeklampsie (82).

Die Pathophysiologie der Erkrankung lässt sich in zwei Phasen unterteilen. Die erste Phase verläuft lokal und ist durch eine anormale Plazentation geprägt. Bedingt durch den fehlenden Wechsel des Zytotrophoblasten von der proliferativ-epithelialen in die invasiv-endotheliale Form, kommt es zu einem unzureichenden Remodeling der Spiralarterien (83–85). Die in Folge entstandenen Gefäße zeigen im Vergleich zu Plazenten von gesunden Frauen einen verringerten Blutfluss. Weiterhin besitzen diese veränderten Gefäße eine größere Anfälligkeit für atherosklerotische Prozesse, wodurch ischämische Zustände begünstigt werden (86).

In der zweiten Phase kommt es durch die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen hypoxischen Zustände vermittelt über die Aktivierung des *hypoxie induced factor* und Reaktiven Sauerstoffspezies zu einem Ungleichgewicht von pro- und antiangiogenen Faktoren (87–94).

Insbesondere der Anstieg der antiangiogenen Tyrosinkinase sFLT1 und dem ebenfalls antiangiogen wirkenden Glykoprotein sENG im Serum führt durch die Inhibition der angiogenetischen Zytokine VEGF bzw. TGF- β 1 zu einer systemischen Störung der Endothelfunktion und damit verbundenen Endorganschäden (95–99). Auf plazentarer Ebene wird durch die Hemmung der Funktion vom proangiogenen PlGF die lokale Endothelfunktion beeinträchtigt(99–101).

2. Aufgabenstellung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargelegt werden konnte, stellt die Blut-Plazenta-Schranke den Interaktionsort für den materno-fetalen Stoffaustausch dar. Ihre Aufgabe besteht darin, dass essenzielle Substrate den Fetus erreichen können, während schädlichen Substanzen vom Übertritt in den fetalen Blutkreislauf abgehalten werden. Ein wichtiger Bestandteil dieser Schutzfunktion besteht aus den Transportern der ABC- und SLC-Familie.

Studien zur Expression und Lokalisation der Transporter, sowie die Veränderung im zeitlichen Verlauf der Gestation bzw. bei Auftreten von Gestosen sind rar und enthalten teils widersprüchliche Resultate. Weitergehend wird die allgemeine Aussagekraft der Ergebnisse durch die geringe Anzahl an verwendeten Proben, Betrachtung nur einzelner Transportproteine, sowie der isolierten Darstellung der Expression auf mRNA- oder Proteinebene kompromittiert.

Hieraus ergaben sich folgende Aufgabenstellungen dieser Arbeit:

1. Darstellung der Expression relevanter Transportproteine der humanen Plazenta zum Zeitpunkt des errechneten Geburtstermins bei gesunden Probandinnen auf mRNA- und Proteinebene.
2. Darstellung der Veränderung relevanter Transportproteinen der humanen Plazenta im Verlauf der Gestation.
3. Veränderung des Expressionsmusters relevanter Transportproteinen der humanen Plazenta bei Gestationsdiabetes.
4. Veränderung des Expressionsmusters relevanter Transportproteinen der humanen Plazenta bei (Prä-)Eklampsie.

3. Material und Methoden

3.1 Probengewinnung

Das verwendete Gewebe wurde von der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universitätsmedizin Greifswald, Deutschland, nach Spontangeburt oder Sectio caesarea zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde genehmigt durch das Ethik-Komitee der Universitätsmedizin Greifswald. Alle Spender gaben zuvor Ihr schriftliches Einverständnis. Die Gewinnung der Proben erfolgte aus 13 identischen Entnahmestellen über alle plazentare Gewebeschichten. Die erhaltenen Probenzylinder wurden anschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Zur Vorbereitung der weiteren analytischen Schritte wurden die Gewebestücke mithilfe der Kugelmühle *Mikro-Dismembrator U* (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mit einer Amplitude von 16 mm und einer Frequenz von 1500/min für 90 Sekunden vermahlen und homogenisiert und das entstandene Gewebepulver bis zur weiteren Verarbeitung in Polypropylen-Gefäßen bei -80 °C gelagert.

3.2 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte unter Nutzung des *NucleoSpinKit*[®] (Machery-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Zu Beginn der Isolation wurden jeweils 30 mg der vorbereiteten Gewebeprobe zur Lyse mit 350 µl des *Buffers RA1* sowie 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt und mithilfe eines Vortex vermischt. Das erhaltene Lysat wurde anschließend zur Reduktion der Viskosität und Säuberung von störenden organischen Bestandteilen durch den *NucleoSpin*[®]-Filter bei 11.000 x g für 60 Sekunden zentrifugiert. Zur Verbesserung der Bindungseigenschaften der RNA wurden 350 µl 70 %igen Ethanol zur Lösung hinzugefügt und durch fünfmaliges Pipettieren gemischt. Anschließend wurde das Lysat auf eine RNA-bindende Säule mit enthaltener Silica-Membran gegeben und bei 11.000 x g für 30 Sekunden bei 4 °C zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Hinzugabe von 350 µg *Membrane Desalting Buffer* zur Optimierung der rDNase Funktion und anschließenden Zentrifugation für 60 Sekunden bei 11.000 x g. Nachfolgend wurden 95 µg rDNase-haltiger Puffer auf die Silica-Membran pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte die Säuberung und Trocknung der Membran in drei Schritten mit jeweiliger Zugabe eines Puffers (200 µl RAW2, 600 µl RA3, 250 µl RA3) und anschließender Zentrifugation. Abschließend wurde die zuvor gebundene RNA durch Zentrifugation in 60 µL RNase-freien H₂O eluiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch die photometrische Messung am *Nano Drop*[™] *ND-1000 Spectrophotometer*

(PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). Weiterhin wurde durch die Berechnung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} , welcher bei RNA-Proben ca. 2,1 betragen sollte, die Reinheit der Lösung bestimmt. Proben die nicht im Bereich von 2,0 – 2,2 lagen wurden entsprechend verworfen (102).

3.3 RNA-Qualitätsanalyse

Die Qualität der isolierten RNA wurde durch Messung der *RNA Integrity Number* (RIN) überprüft. Die Bestimmung erfolgte mithilfe des *RNA 6000 Nano Kit* am *Agilent 2100 Bionanalyzer*[®] (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Das genutzte System verwendet eine automatisierte Kapillarelektrophorese in einer *Lab-on-Chip*-Technologie. Hierbei werden die vorhandenen RNA-Fractionen anhand der Bewegungseigenschaften in den mit Gel gefüllten Mikrokapillaren im elektrischen Feld der Größe nach aufgeteilt. Die Detektion erfolgt durch Laser-induzierte Fluoreszenz (103). Die anschließende Generierung der RIN erfolgt mithilfe eines komplexen Algorithmus. Die bedeutendsten Komponenten hierbei sind das Verhältnis der ribosomalen RNA (28S; 8S; 5,8S) bzw. der „Fast-Region“ zum gesamten Elektropherogramm, sowie die Amplitude des 18S-Gipfels und der *Marker*-Region, welche sowohl die interne Referenz als auch hochgradig degradierte RNA enthält (104). Die Segmente des Elektropherogramms sind in Abb. 3.1 dargestellt.

Die berechneten numerischen Werte für die RIN können zwischen 1 und 10 liegen. Ein Wert von 1 entspricht dabei der niedrigsten Qualitätsstufe mit hochgradig fragmentierter RNA, wohingegen ein Wert von 10 für hohe Qualität mit intakter RNA steht (103).

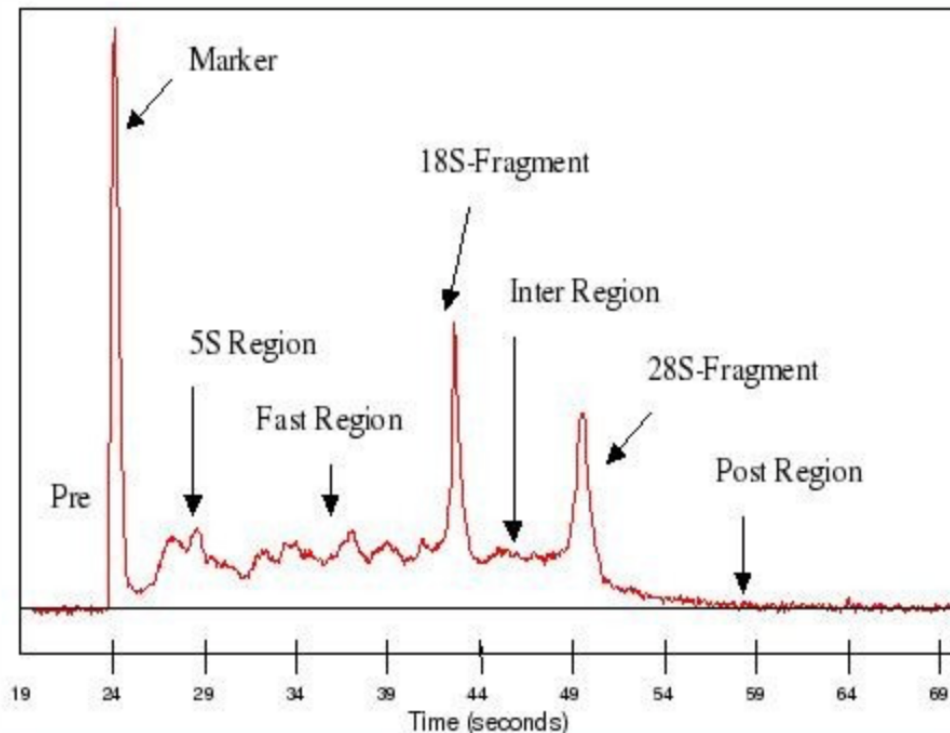


Abb. 3.1: *Elektropherogramm der RIN-Messung* Dargestellt sind die verschiedenen Segmente des Elektropherogramms der RIN-Messung. Der erste Gipfel wird durch den Marker und degradierte RNA erzeugt. Ihm folgen drei Gipfel, die jeweils durch intakte rRNA gebildet werden (5S-, 18S-, 28S-Region). Die Zwischen den 5S- und 18S-Gipfel bzw. 18S- und 28S-Gipfel befindlichen Abschnitte werden als *Fast-Region* und *Inter-Region* bezeichnet. Den Abschluss bildet die *Post-Region* (103).

3.4 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*real-time quantitative PCR*, qRT-PCR). Entsprechend war es notwendig zuerst die isolierte mRNA durch reverse Transkription in cDNA umzuschreiben.

3.4.1 Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA erfolgte mithilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wird die isolierte einzelsträngige RNA durch eine RNA-abhängige-DNA-Polymerase in eine komplementäre DNA umgeschrieben. Das System verwendet dabei zur Erfassung der gesamten mRNA-Abschnitte *Random-Hexamer-Primer* (105,106). Weiterhin erfolgte im Reaktionsansatz die Zugabe von Nucleotiden, RNase-Inhibitor und Reaktionspuffer zur der isolierten RNA nach dem in Tabelle Tab. 3.1 beschriebenen Pipettierschema. Der erhaltene Reaktionsansatz wurde umgehend in einen Thermocycler überführt. Im ersten Schritt erfolgte die Erwärmung auf 25 °C für 10 Minuten, wodurch die Hybridisierung der DNA-Primer

begünstigt wird. Folgend wird der Ansatz für 120 Minuten auf 37 °C gebracht. Dies entspricht dem Temperaturoptimum der eingesetzten Reverse-Transkriptase. Abschließend erfolgt zur Thermoaktivierung die Erwärmung auf 85 °C für fünf Minuten (106).

Tab. 3.1: *Pipettierschema der Reversen Transkription mittels High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies GmbH) bezogen auf 40 µL Gesamtvolumen*

	Volumen in µl
10x RT Buffer	4
25X dNTP Mix (100mM)	1,6
10x RT Random Primer	4
Multi-Scribe™ Reverse Transcriptase	2
RNase Inhibitor	2
Nuklease freies H ₂ O	6,4
RNA	20
Gesamtvolumen	40

3.4.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Real-Time PCR stellt das Standardverfahren zur Vervielfältigung von DNA dar und wird in drei Schritte eingeteilt. Im ersten Schritt wird die Probe auf eine Temperatur von ca. 94 °C erwärmt, wodurch es zu einer Denaturierung der doppelsträngigen DNA kommt. Anschließend erfolgt im zweiten Schritt die Hybridisierung der Primer und Sonden an die einzelsträngige DNA, welcher ein Temperaturoptimum von 55 °C aufweist. Dieser Prozess wird als *Annealing* bezeichnet. Im letzten Abschnitt der Elongation erfolgt durch eine thermostabile DNA-Polymerase die Bildung eines komplementären DNA-Stranges. Die oben beschriebenen Schritte können mehrfach wiederholt werden (107,108).

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte während der RT-qPCR mithilfe des *TaqMan*®-Sonden-Verfahren, das auch als Hydrolyse-Verfahren bezeichnet wird. Das zugrundeliegende Prinzip beruht auf den gleichnamigen physikalischen Prozess des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). Hierbei erfolgt nach Anregung eines Fluoreszenz-Donors, auch Reporter genannt, eine emissions- und absorptionsfreie Übertragung von Energie auf einen Akzeptor, auch Quencher genannt. Der beschriebene Prozess erfolgt nur über geringe Distanzen. Im Rahmen von *TaqMan*®-Sonden erfolgt die Verwendung eines Dark-Quenchers, der die erhaltene Energie in Wärme anstelle von Fluoreszenz umwandelt (109–111).

Die verwendeten *TaqMan*®-Sonden bestehen aus einem Oligonucleotid mit einer homologen Sequenz zu dem zu messenden Gen, wobei der Reporter am 5'-Ende und der Donor am 3'-Ende platziert wurde. Entsprechend befindet sich anfänglich die ausgesendete Fluoreszenz

aufgrund des FRET auf einem niedrigen Niveau. Enthält die verwendete Probe das Zielgen, so hybridisiert die Sonde mit der einzelsträngigen cDNA. Während der Elongation entlang des cDNA-Stranges wird die gebundene *TaqMan*[®]-Sonde durch die 5'-3' Exonucleaseaktivität der eingesetzten *Taq*-Polymerase abgebaut. Folglich kommt es zu einer Zunahme der Distanz von Reporter und Quencher mit konsekutiver proportionaler Zunahme der Signalstärke der ausgesendeten Fluoreszenz. Erreicht die ausgesendete Fluoreszenz des Reporters erstmalig einen Schwellenwert der signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt, wird dieser als CT-Wert (*Cycle Threshold*) bezeichnet. Mithilfe des erhaltenen Wertes erfolgt die Bestimmung der mRNA-Expression durch die $2^{-\Delta C_t}$ -Methode. Hierbei erfolgt die Normalisierung in Bezug auf ein zuvor ausgewähltes *Housekeeping*-Gen, das eine möglichst konstante Expression aufweisen muss (107,112).

Die Herstellung des Reaktionsansatzes erfolgte unter Verwendung des universellen *TaqMan*[®] *Gene Expression Mastermix*, welcher die benötigten Primer, Nucleotide, Puffer und die *Taq*-Polymerase enthält, sowie der jeweiligen spezifischen *TaqMan*[®]-Sonde nach dem in Tabelle 3.2 genannten Schema. Die cDNA wurde zuvor mithilfe von RNase-freiem Wasser auf einen Gehalt von 50 ng eingestellt.

Tab. 3.2: *Pipettierschema der Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR* bezogen auf 20 µL Gesamtvolumen

	Volumen in µl
20x <i>TaqMan</i> [®] Gene Expression Assay	1
2x <i>TaqMan</i> [®] Gene Expression Master Mix	10
cDNA	4
RNase freies H ₂ O	5
Gesamtvolumen	20

Der erhaltene Reaktionsansatz wurde in ein *Fast Real-Time PCR-System 7900 HT* (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt und analysiert. Das hierbei verwendete Programm bestand aus einem *hot start* bei 95 °C für 10 Minuten, welcher von 40 Zyklen eines zweistufigen Ablaufs, bestehend aus der Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden und dem *Annealing*-/Elongationsprozess bei 60 °C für 60 Sekunden, gefolgt wird.

3.5 Housekeeping Gene

Ein *Housekeeping* Gen (HKG) ist definiert als ein Gen, das unabhängig von Gewebeart, sowie externen als auch internen Einflüssen, von einer Zelle in konstanter Stärke exprimiert wird. Entsprechend sind HKG meist Strukturmoleküle oder Enzyme der basalen Stoffwechselfunktionen. In der Genexpressionsanalyse finden sie zur Normierung der RNA von Zielgenen Verwendung (113).

Eine Veränderung der Expression von HKGs unter pathologischen Zuständen (z.B. Hypoxie) ist jedoch möglich, sodass für jede Studie mit Genexpressionsanalyse die Bestimmung der Stabilität der verwendeten HKGs erfolgen sollte (114,115). Die Plazenta stellt diesbezüglich aufgrund der sich stetig verändernden Einflüsse eine besondere Herausforderung dar.

Meller et al. (2005) zeigten in ihrer Arbeit, dass SDHA, YWHAZ und TBP valide HKGs für Untersuchungen an plazentarem Gewebe darstellen könnten. Die Aussagekraft der Studie ist allerdings aufgrund der geringen Probenzahl (N = 20), sowie der nicht offen dargelegten Anzahl an plazentaren Proben mit Gestosen (z.B.Präeklampsie, Gestationsdiabetes) limitiert und nicht problemlos auf jedes Studiendesign übertragbar (116).

Dementsprechend wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit eine Validierung der HKG für die folgenden Versuche vorgenommen. Dabei wurden die von Meller et al. (2005) vorgeschlagenen HKGs SDHA, YWHAZ, TBP und ergänzend das häufig verwendete Gen 18S auf Ihre Stabilität in plazentaren Gewebe untersucht. Hierbei wurden die möglichen Veränderungen im zeitlichen Verlauf des Gestation bzw. bei Vorliegen von Gestosen mitbetrachtet.

Die Auswahl der untersuchten Proben (N = 60) erfolgte dafür aus sechs Gruppen. Hierbei bildeten vier Gruppen den zeitlichen Verlauf der Gestation anhand der WHO-Kategorien des Geburtstermins (*term, moderate preterm, very preterm, extremely preterm*) ab. Die weiteren zwei Gruppen enthielten Probenmaterial aus den in dieser Promotionsarbeit untersuchten Gestosen (Gestationsdiabetes, (Prä-)Eklampsie) bei termingerechter Entbindung. Jede Gruppe enthielt jeweils 10 Proben. Zunächst wurde für jedes potenzielle Gen der Schwellenwertzyklus (Ct) mittels RT-qPCR ermittelt. Die erhaltenen Daten wurden unter Verwendung der *BestKeeper*-Software ausgewertet. Hierbei erfolgt die Bewertung der Stabilität eines HKG auf Basis der Standardabweichung (SD) und dem Variationskoeffizienten (117).

Die deskriptive Statistik der Ergebnisse ist in Tabelle Tab. 3.3 dargestellt. Die erhaltenen Standardabweichungen lagen zwischen 0,38 (18S) und 0,48 (YWHAZ) und damit jeweils

unter dem geforderten Wert von $SD [\pm Ct] < 1,00$. Des Weiteren fiel bei 18S ein vergleichsweise hoher Variationskoeffizient [%Ct] von 4,37 auf, sodass dieses Gen von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde.

Zur weiteren Auswertung erfolgte zuerst die Bildung des *BestKeeper-Index* (BI), indem das geometrische Mittel der Ct-Werte aller verwendeten Gene gebildet wurde.

Anschließend wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen den BI und den einzelnen HKGs bestimmt. Hierbei zeigten allen drei verbliebenen HKGs eine signifikante positive Korrelation $0,709 < r < 0,758$ zwischen der Expressionsstärke und dem BI ($p < 0,001$). Die Normierung der mRNA kann somit unter Verwendung aller drei verbliebenen HKGs erfolgen, die als gleichwertig anzusehen sind. Es erfolgte die Verwendung von SDHA in den nachfolgenden Untersuchungen.

Tab. 3.3: *Untersuchung möglicher Housekeeping Gene der humanen Plazenta* Deskriptive Statistik der *Housekeeping Gen* Kandidaten SDHA, TBP, YWAHZ und 18S auf Grundlage des *Cycle Threshold* (Ct) in der RT-qPCR unter Anwendung des *BestKeeper*-Algorithmus (117)

	SDHA	TBP	YWAHZ	18S
Geometrisches Mittel [Ct]	26,05	28,79	27,55	8,68
Arithmetisches Mittel [Ct]	26,05	28,79	27,55	8,7
Minimalwert [Ct]	24,71	27,58	26,28	7,9
Maximalwert [Ct]	27,21	30,29	28,85	9,9
Standartabweichung [$\pm Ct$]	0,45	0,42	0,48	0,38
Variationskoeffizient [%Ct]	1,71	1,46	1,72	4,37
<hr/>				
BI vs. HKG Korrelationskoeffizient [r]	0,721	0,758	0,709	0,881
p-Wert	0,001	0,001	0,001	0,001

3.6 Auswahl der Zielgene und -Proteine

Um eine Auswahl der für die Untersuchungen relevanten Zielgene bzw. -proteine zu erhalten, wurde neben einer ausführlichen Literaturrecherche ergänzend eine Bestimmung der Genexpression klinisch relevanter Transporterproteine mittels *Custom TaqMan® Low Density Array (TLDA) Micro Fluidic Cards* (Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

3.6.1 TLDA

Die verwendeten *TLDA Micro Fluidic Cards* enthielten hierbei validierte Primer und Sonden für sechs ABC-Transporter und 21 SLC-Transporter, sowie für fünf nukleäre Rezeptoren und fünf *Housekeeping* Gene (Tab. 3.4).

Für die Durchführung der Messung wurde zuerst die vorher gebildete cDNA mithilfe von Nuclease-freiem Wasser auf ein Gehalt von 100 ng und ein Volumen von 50 µl verdünnt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 50 µl *TaqMan® Universal Master Mix II*. Der erhaltene Reaktionsansatz wurde anschließend in den Fill-Port der *TLDA® Micro Fluidic Cards* pipettiert. Nach zweimaligem Zentrifugieren und Versiegelung erfolgte die qRT-PCR am *Fast Real-Time PCR-System 7900 HT* (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach den im Abschnitt Genexpressionsanalyse angegebenen Einstellungen.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 3.2 dargestellt, hierbei wurde die Expression der Zielgene mithilfe der $2^{-\Delta Ct}$ -Methode im Bezug zum Mittelwert der fünf in Tabelle 3.4 genannten *Housekeeping* Gene verwendet. Es erfolgte ausschließlich die Darstellung von Genen die Transportproteine kodieren und in der humanen Plazenta nachweisbar waren.

Nachfolgend wurden die Gene mit der stärksten Expression und einem wichtigen Spektrum an transportierten Substraten für die weiterführenden Expressionsanalysen ausgewählt. Dabei handelte es sich um *ABCB1* (P-gp), *ABCC1* (MRP1), *ABCC2* (MRP2), *ABCC3* (MRP3), *ABCG2* (BCRP), *SLC22A3* (OCT3), *SLC22A5* (OCTN2) und *SLCO2B1* (OATP1B2).

SLC16A1 (MCT1) zeigte in der Plazenta ein hohes Expressionsniveau, allerdings erscheint es in Hinblick auf sein enges Substratspektrum (kurzkettige Monocarbonsäuren wie Pyruvat und Lactat) für den Transport von Xenobiotika weniger relevant. Analog fiel die Entscheidung gegen *SLC7A5* (LAT1), welches vor allem für den Transport von Aminosäuren zuständig ist. Weiterhin wurde sich gegen eine weitere Analyse von *SLC15A1* (PepT1) und *SLC15A2* (PepT2) aufgrund der eher schwachen Expression entschieden. Die Transporter *SLC47A1* (MATE1) und *SLCO1A2* (OATP1A2) wurden aufgrund der bestehenden Diskrepanzen der wissenschaftlichen Literatur und den dargestellten Ergebnissen gesondert betrachtet.

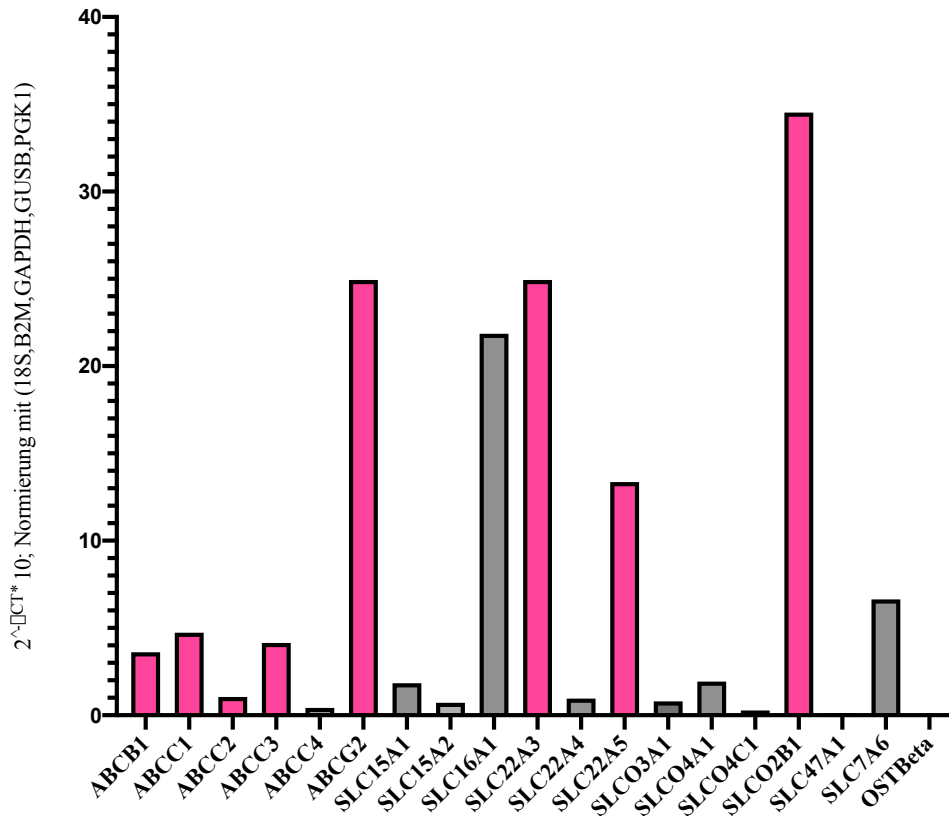


Abb. 3.2: *Genexpression ausgewählter Transporter in der humanen Plazenta mittels TLDA Micro Fluidic Cards.* Die rot markierten Gene wurden für die weiterführende Analyse ausgewählt. *SLC47A1* und *OSTBeta* waren nachweisbar, sind aber aufgrund der geringen Expression graphisch nicht als Säule darstellbar (N = 1)

Tab. 3.4: *Übersicht auf der TLDA Micro Fluidic Card enthaltenen Genassays*

Zielproteine	Gensymbol	Taqman®assay I.D.
ABC-Transporter		
P-gp, MDR1	ABCB1	Hs01067802_m1
MRP1	ABCC1	Hs00219905_m1
MRP2	ABCC2	Hs00166123_m1
MRP3	ABCC3	Hs00978473_m1
MRP4	ABCC4	Hs00988717_m1
BCRP	ABCG2	Hs01053790_m1
SLC-Transporter		
LAT1	SLC7A5	Hs00185826_m1
LAT2	SLC7A6	Hs00938056_m1
ASBT (IBAT)	SLC10A2	Hs01001557_m1
PEPT1	SLC15A1	Hs00192639_m1
PEPT2	SLC15A2	Hs01113665_m1
MCT1	SLC16A1	Hs00161826_m1
OCT1	SLC22A1	Hs00427552_m1
OCT3	SLC22A3	Hs01009568_m1
OCTN1	SLC22A4	Hs00268200_m1
OCTN2	SLC22A5	Hs00929869_m1
OATP1A2	SLC01A2	Hs00366488_m1
OATP3A1	SLCO3A1	Hs00203184_m1
OATP4A1	SLCO4A1	Hs00249583_m1
OATP4C1	SLCO4C1	Hs00698884_m1
OATP1B1	SLCO1B1	Hs00272374_m1
OATP1B3	SLCO1B3	Hs00251986_m1
OATP2B1	SLCO2B1	Hs00200670_m1
MATE1	SLC47A1	Hs00217320_m1
MATE2	SLC47A2	Hs00945650_m1

Zielproteine	Gensymbol	Taqman®assay I.D.
SLC-Transporter		
OSTalpha	SLC51A	Hs00380895_m1
OSTbeta	SLC51B	Hs00418306_m1
Enzyme		
CYP3A4	CYP3A4	Hs00430021_m1
CYP3A5	CYP3A5	Hs00241417_m1
CYP2B6	CYP2B6	Hs03044634_m1
CYP2C8	CYP2C8	Hs00258314_m1
CYP2C9	CYP2C9	Hs00426397_m1
CYP2C19	CYP2C19	Hs00426380_m1
CYP2D6	CYP2D6	Hs00164385_m1
UGT1, 3-10	UGT1A1, 3-10	Hs00153559_m1
UGT2B7	UGT2B7	Hs00426592_m1
UGT2B15	UGT2B15	Hs00870076_s1
SULT1A1-4	SULT1A1-4	Hs00236900_m1
Nukleäre Rezeptoren		
PXR	NR1I1	Hs00243666_m1
CAR	NR1A3	Hs00901571_m1
LXRβ	NR1H2	Hs00173195_m1
LXRα	NR1H3	Hs00172885_m1
FXR	NR1H4	Hs00231968_m1
HouseKeeping-Gen		
18s rRNA	18S	Hs99999901_s1
B2M	B2M	Hs00984230_m1
GAPDH	GAPDH	Hs99999905_m1
GUSB	GUSB	Hs99999908_m1
PGK1	PGK1	Hs99999906_m1

3.6.2 *SLC47A1* (MATE1)

Aufgrund der von Ahmadimoghaddam et al. (2012) vermuteten Transportfunktion von MATE1 im Kotransport mit OCT3 in der humanen Plazenta, wurden trotz geringer Genexpression in der initialen TLDA-basierten Genexpressionsanalyse auf mRNA- und Proteinebene weiterführende Untersuchungen durchgeführt (45). Die Analyse wurde an einer Stichprobe von Gewebe aus insgesamt 60 Plazenten durchgeführt. Hierbei erfolgte die Verwendung von Proben aus sechs Gruppen, die den zeitlichen Verlauf der Gestation (*term, moderate preterm, very preterm, extremely preterm*) bzw. Veränderungen im Rahmen der zwei wichtigsten Gestosen (Gestationsdiabetes, (Prä-)Eklampsie) darstellen. Jede Gruppe enthielt dabei Material von 10 Gewebeproben.

Die mRNA von *SLC47A1* konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Es zeigte sich im Vergleich zu den oben genannten Zielgenen jedoch eine deutlich niedrigere Expressionsstärke. Ein Nachweis von MATE1 auf Proteinebene gelang in keiner der untersuchten Proben.

In der statistischen Analyse der Gruppen konnten keine signifikanten Veränderungen der Genexpression aufgezeigt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 und Abb. 3.4 dargestellt.

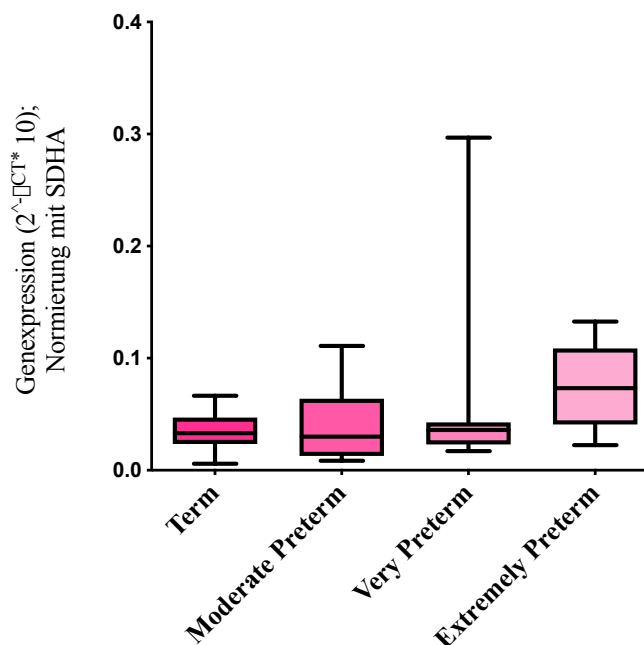


Abb. 3.3: *Genexpression von SLC47A1 im zeitlichen Verlauf der Gestation* Einteilung nach WHO in *term* (37. - 42. SSW) *moderate preterm* (32. – 37. SSW) *very preterm* (28. - 32. SSW) und *extremely preterm* (< 28. SSW). Dargestellt als *Box-Plot*. Die *Whisker* sind definiert mit der 5 bzw. 95 Perzentile. Statische Analyse mittels *Kruskal-Wallis-Test* ohne signifikante Unterschiede. (N = 40, p < 0.05)

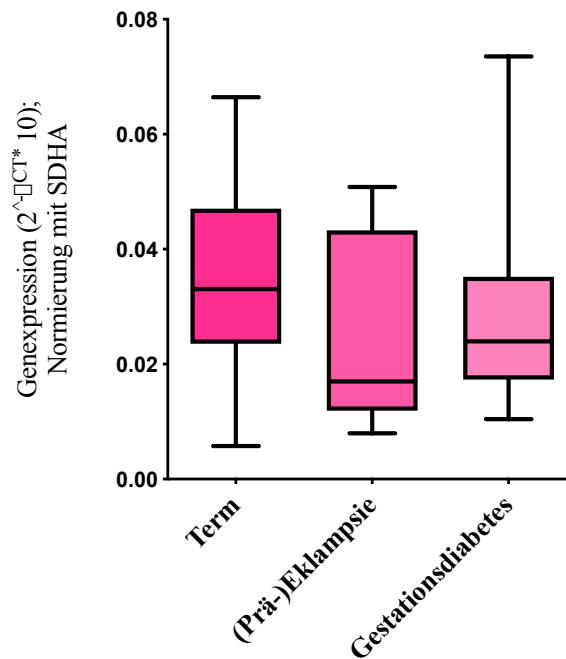


Abb. 3.4: *Genexpression von SLC47A1 bei (Prä-)Eklampsie und Gestationsdiabetes* Dargestellt als *Box-Plot*. Die *Whisker* sind definiert mit der 5 bzw. 95 Perzentile. Statistische Analyse mittels *Mann-Whitney U-Test* ohne signifikante Unterschiede. (N = 30, $p < 0,05$)

Aufgrund der minimalen Genexpression von *SLC47A1* und fehlendem Nachweis einer Proteinexpression von MATE1 ist von einer untergeordneten Relevanz des Transporters für die Transportvorgänge an der humanen Plazenta auszugehen. Weitergehend ergab sich bei fehlenden Veränderungen im Rahmen einer (Prä-)Eklampsie bzw. eines Gestationsdiabetes kein Anhalt für eine Beteiligung des Transporters in der Pathogenese der Erkrankungen oder eine Veränderung der plazentaren Transportfunktion bei Auftreten der genannten Gestosen. Entsprechend wurde sich gegen eine weitere Analyse von *SLC47A1* bzw. MATE1 in einer größeren Probenanzahl entschieden.

3.6.3 *SLCO1A2* (OATP1A2)

SLCO1A2 bzw. OATP1A2 stellt in der Literaturrecherche ebenfalls einen gut untersuchten Transporter der Blut-Plazenta-Schranke dar, dem eine hohe Bedeutsamkeit zugesprochen wird (52). Dies konnte anhand der Quantifizierung vom Zielgen mittels TLDA nicht bestätigt werden. Aufgrund dieser Diskrepanz erfolgte analog zum Vorgehen bei *SLC47A1* (MATE1) eine Expressionsanalyse auf mRNA- und Proteinebene inklusive der Betrachtung im zeitlichen Verlauf der Schwangerschaft und bei Vorliegen von (Prä-)Eklampsie und Gestationsdiabetes.

Die mRNA von *SLCO1A2* konnte in der Gruppe von termingerechten Entbindungen bei gesunden Probandinnen nur in neun von 10 Proben nachgewiesen werden. Im Vergleich zu

den primär ausgewählten Zielgenen zeigte *SLCO1A2* eine sehr geringe Expressionsstärke. Ein Nachweis von OATP1A2 auf Proteinebene gelang in keiner der untersuchten Proben.

Veränderung im zeitlichen Verlauf der Gestation oder im Rahmen von (Prä-)Eklampsie und Gestationsdiabetes konnten ebenfalls nicht aufgezeigt werden. Die Daten sind in Abb. 3.5 und Abb. 3.6 dargestellt.

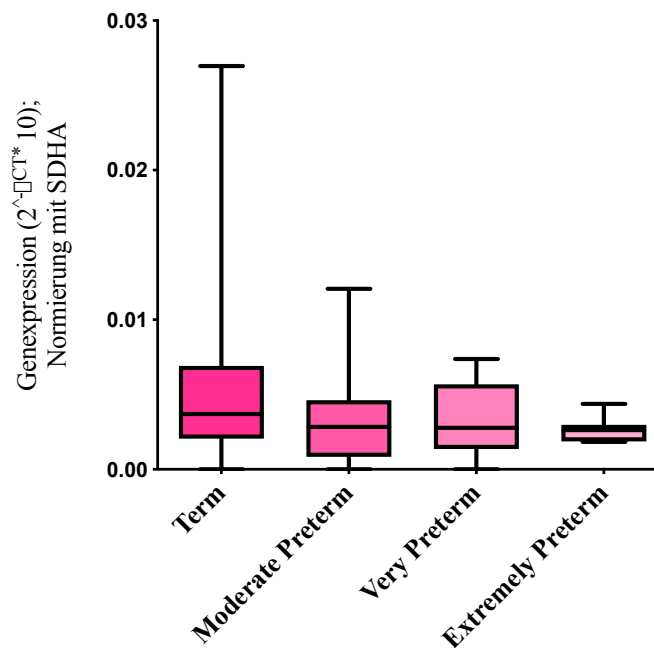


Abb. 3.5: *Genexpression von SLCO1A2 im zeitlichen Verlauf der Gestation* Einteilung nach WHO in term (37. - 42. SSW) moderate preterm (32. - 37. SSW) very preterm (28. - 32. SSW) und extremely preterm (< 28. SSW). Dargestellt als Box-Plot. Die Whisker sind definiert mit der 5 bzw. 95 Perzentile. Statische Analyse mittels *Kruskal-Wallis-Test* ohne signifikante Unterschiede. (N = 40, p < 0.05)

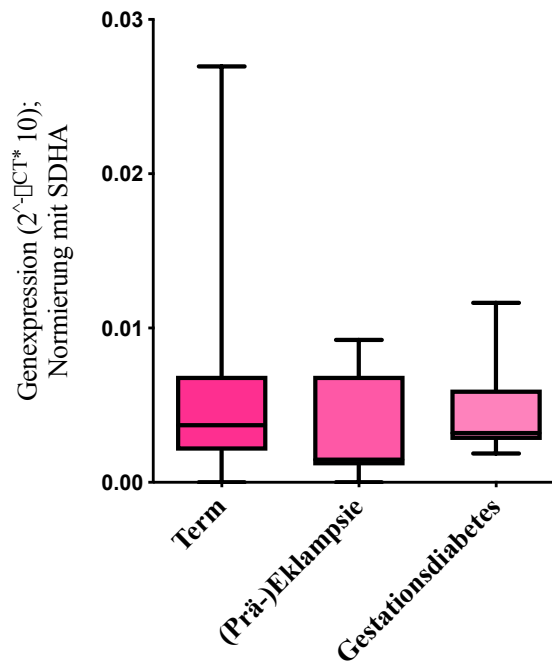


Abb. 3.6: *Genexpression von SLC01A2 bei (Prä-)Eklampsie und Gestationsdiabetes* Dargestellt als *Box-Plot*. Die *Whisker* sind definiert mit der 5 bzw. 95 Perzentile. Statistische Analyse mittels *Mann-Whitney U-Test* ohne signifikante Unterschiede. (N = 30, p < 0,05)

Der Transporter erscheint aufgrund der minimalen und teilweise sogar fehlenden Genexpression von *SLCO1A2* sowie fehlendem Nachweis einer Proteinexpression von OATP1A2 somit ebenfalls von untergeordneter Relevanz für die humane Blut-Plazenta-Schranke. Eine Veränderung im Rahmen von (Prä-)Eklampsie und Gestationsdiabetes konnte nicht aufgezeigt werden. Entsprechend wurde sich gegen eine weiterführende Analyse in einer größeren Probenanzahl entschieden.

3.7 RIN-Grenzwert Bestimmung

Reiman et al. (2017) konnten darstellen, dass 8,1 % aller Gene im placentaren Gewebe eine signifikante Veränderung der Expressionsstärke in Bezug auf die RNA-Integrität zeigen (118). Um die Geschwindigkeit des RNA-Abbaus einschätzen zu können, wurden mehrere prädiktive Faktoren (z.B. Exonlänge, Länge der 3'-UTR/5'-UTR, Anteil von Guanin/Cytosin Basenpaaren) postuliert (118–121). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen zeigten dabei allerdings widersprüchliche Aussagen bezüglich des Einflusses der verschiedenen Variablen, sodass bisher noch kein valides mathematisches Modell zur Korrektur der unterschiedlichen Integritätswerte entwickelt werden konnte.

Folgend sollte die Bestimmung eines Grenzwertes der RIN für die weitere Verwendung von Probenmaterial zur Expressionsanalyse individuelle für die im Versuchsablauf verwendeten Gene bzw. ihren Expressionssonden erfolgen. Ein anderweitiger Ansatz, nur Gewebeproben

mit der höchsten Qualitätsstufe (RIN > 9) zu verwenden, erscheint aufgrund der vorhandenen Ischämiezeit bei Entnahme von plazentarem Gewebe und der daraus resultierenden Abnahme der RNA-Integrität nicht realistisch.

Zur Bestimmung eines RIN-Grenzwertes für die weiterführenden Versuche dieser Dissertation erfolgte die Einteilung der gewonnen mRNA von zeitgerecht entbundenen Plazenten (37. - 42. SSW) gesunder Probandinnen ohne Einnahme von Medikamenten anhand der gemessenen RIN-Werte in fünf Gruppen (RIN: > 8; RIN: 8 - 7,1; RIN: 7 - 6,1; RIN: 6 - 5; RIN: < 5). Hierbei umfasste jede Gruppe Material aus 10 Gewebeproben.

Anschließend wurde die Genexpression der acht Zielgene gemessen. Die gewonnen Daten wurden einer Varianzanalyse durch den *Kruskal-Wallis-Test* und folgender *Post-hoc*-Analyse mithilfe *Dunn's Multiple Comparison Test* unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.5 aufgeführt.

Tab. 3.5: *Ergebnisse der Varianzanalyse der Genexpression in Abhängigkeit der RIN* Ergebnisse des *Kruskal-Wallis-Test* und der *Post-Hoc*-Analyse mithilfe des *Dunn's Multiple Comparison Test*. Signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) sind fett und kursiv hervorgehoben

		ABCB1	ABCC1	ABCC2	ABCC3	ABCG2	SLC22A3	SLC22A5	SLCO2B1
Kruskal-Wallis-Test	p	0,001	<0,0001	0,1077	0,3675	<0,0001	0,004	<0,0001	<0,0001
	U	18,38	25,26	7,593	4,296	32,45	15,36	29,44	52,93
Dunn's Multiple Comparison	>8 vs 8-7,1	>0,9999	0,0736	0,9792	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,1188	>0,9999
	>8 vs 7-6,1	>0,9999	0,0236	>0,9999	>0,9999	0,6974	0,6159	0,0127	>0,9999
	>8 vs 6-5,1	>0,9999	0,0534	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	>8 vs <5	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7861	0,1842	>0,9999	>0,9999	0,0009
	8-7,1 vs 7-6,1	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	8-7,1 vs 6-5,1	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,2056
	8-7,1 vs <5	0,0034	0,0123	0,3358	>0,9999	<0,0001	0,1808	0,0036	<0,0001
	7-6,1 vs 6-5,1	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,2976	0,8595
	6-5,1 vs <5	0,0057	0,0011	0,3168	>0,9999	<0,0001	0,003	<0,0001	<0,0001
7-6,1 vs <6	0,0442	0,0152	>0,9999	>0,9999	0,0062	0,1653	>0,9999	0,055	

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei sechs Genen ein signifikanter Unterschied der Genexpression in Abhängigkeit vom RIN-Wert vorliegt. *ABCB1*, *ABCG2*, *SCL22A3* und *SCLO2B1* zeigten dabei eine signifikante Abnahme der Expression der Zielgene bei einer RIN von < 5 auf. Dabei ist auffallend, dass nur bei *SCLO2B1* das Signifikanzniveau zwischen der niedrigsten und der höchsten Integritätskategorie aufgezeigt werden konnte.

ABCC1 und *SLC22A5* zeigten ebenfalls eine Abnahme der Expression bei höhergradiger Degradation der RNA. Allerdings konnte bei diesen Arzneistofftransportern zusätzlich jeweils ein signifikanter Unterschied der höchsten Integritätsstufe (RIN: > 8) zur Gruppe mit guter bis moderater Integrität (RIN: 7 - 6,1) dargestellt werden.

Bei *ABCC2* und *ABCC3* zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression im Bezug zur RIN.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt einzeln für jeden untersuchten Transporter in Abb. 3.7 und Abb. 3.8.

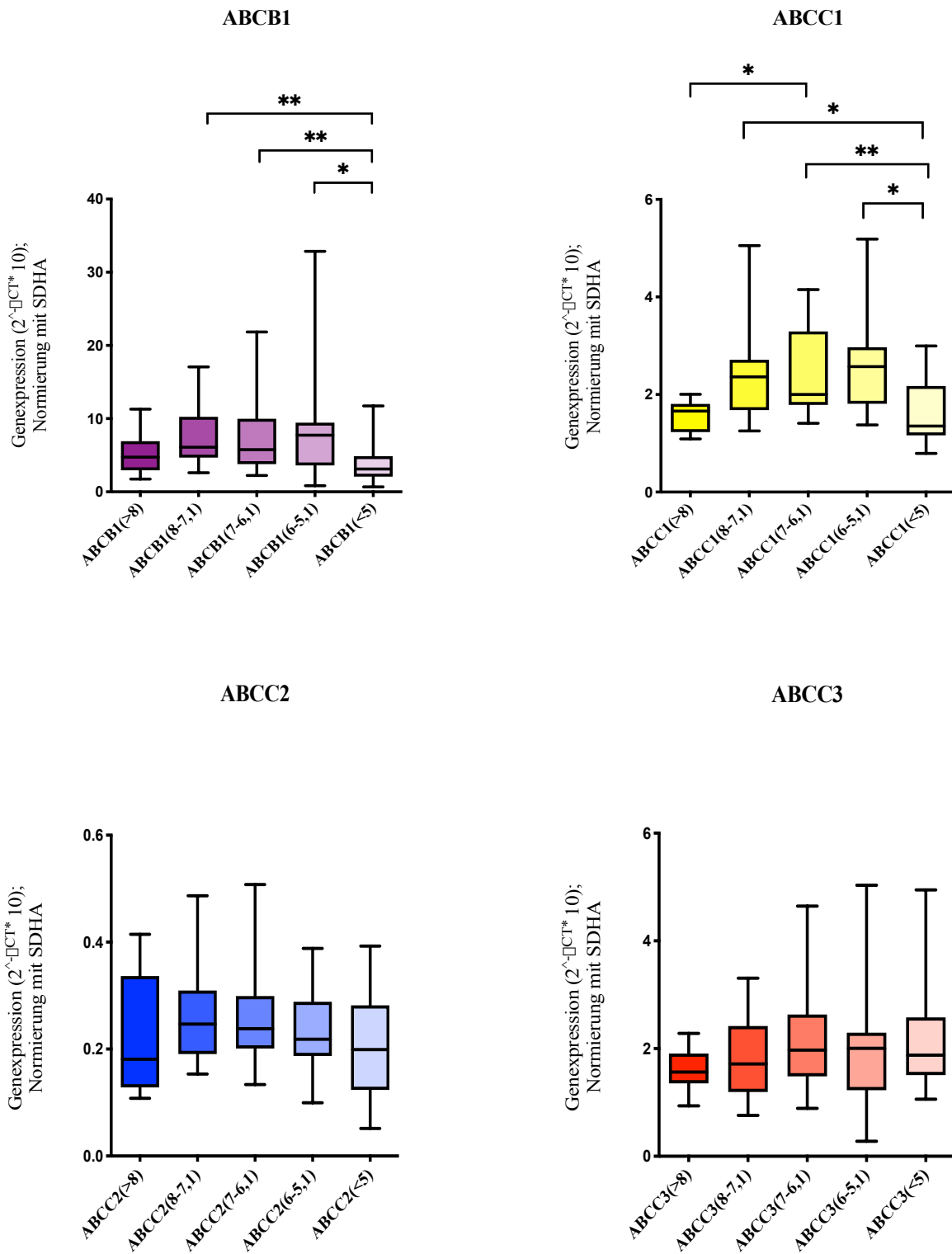


Abb. 3.7: Genexpression von *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3* in der humanen Plazenta in Abhängigkeit der RIN Darstellung als Box-Plot. Die Whisker sind definiert als 5 bzw. 95 Perzentile (N = 50; * p < 0,005; ** p < 0,001; *** p < 0,0001; **** p < 0,00001;)

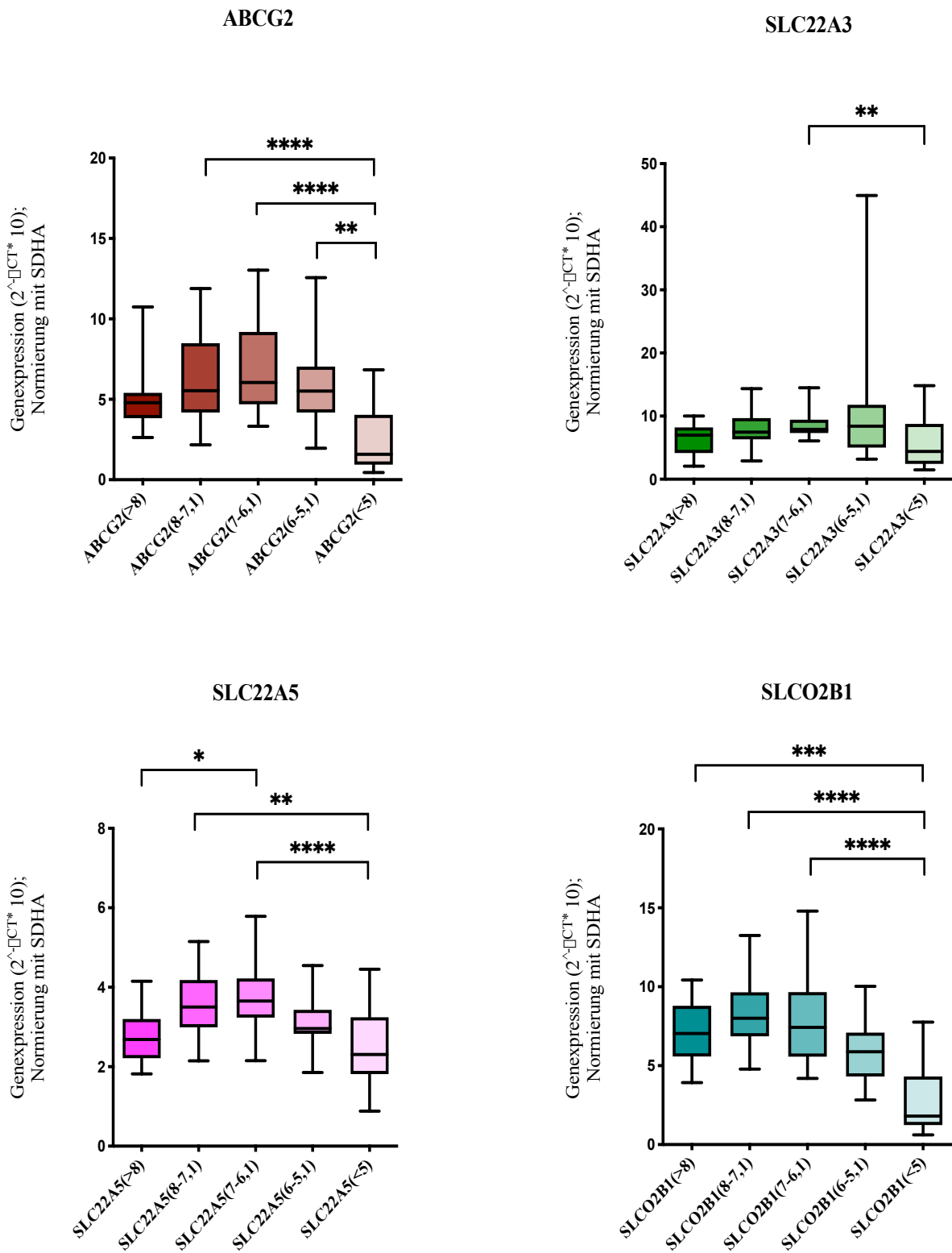


Abb. 3.8: *Genexpression von ABCG2, SLC22A3, SLC22A5, SLCO2B1 in der humanen Plazenta in Abhängigkeit der RIN* Darstellung als Box-Plot. Die Whisker sind definiert als 5 bzw. 95 Perzentile (N = 50; * p < 0,005; ** p < 0,001; *** p < 0,0001; **** p < 0,00001;)

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei niedriger RNA-Integrität ($RIN < 5$) der Großteil der untersuchten Zielgene eine Verringerung der gemessenen mRNA-Expression aufwiesen.

Die fehlende Abnahme der Expression bei *ABCC2* und *ABCC3* könnte einerseits an einer ausgeprägten Stabilität der mRNA dieser Gene oder aber an einem gleichmäßigen Abbau von Ziel- und *Housekeeping*-Gen liegen.

Weitergehend fiel bei *ABCC1* und *SLC22A5* ein signifikanter Anstieg der Expression im Bereich einer mittleren RNA-Integrität auf. Als mögliche Ursachen hierfür kommen eine Pseudoerhöhung durch einen verhältnismäßigen stärkeren Abbau der *Housekeeping*-Gen mRNA, interindividuelle Unterschiede (z.B. bei genetischen Polymorphismen der Probandinnen), als auch ein hypoxie-induzierter Anstieg der mRNA-Konzentration in Betracht (118,120).

Gallego Romero et al. (2014) konnten in ihren Untersuchungen darstellen, dass Unterschiede bei hoher und mittlerer RNA-Integrität am ehesten auf interindividuelle Expressionsmuster zurückzuführen sind und integritätsabhängige Veränderungen einen geringen Anteil ausmachen. Weitergehend wurde von den Autoren der gleichen Studie empfohlen, die Grenzwerte der RIN nicht zu hoch zu wählen, da es hierdurch zu einem Ausschluss einer Großzahl von Probenmaterial mit einem entsprechenden Verlust der Power der Studien kommen würde (120).

Folgend wurde der RIN-Grenzwert für die folgenden Genexpressionsanalysen dieser Promotionsarbeit bei ≥ 5 festgelegt, um eine systematische Veränderung der mRNA Expression möglichst auszuschließen, und gleichzeitig eine möglichst große Anzahl an Proben in die Studie zu integrieren.

Proben mit einer $RIN < 5$ wurden entsprechend verworfen und erneut isoliert. Zeigte sich auch nach mehrfacher Wiederholung der Isolation eine niedrige RNA-Integrität musste von einer vorrangegangenen Schädigung des Gewebes (z.B. prolongierte Ischämiezeit) ausgegangen werden. Entsprechend wurden diese Proben von einer weiteren Analyse ausgeschlossen.

3.8 Proteinanalytische Methoden

Für die Bestimmung des Proteingehalts relevanter Transportproteine wurde von den Plazentaprobe(n) zunächst die Membranfraktion isoliert, deren Gesamtproteingehalt bestimmt, das Protein-Lysat tryptisch verdaut und im Anschluss mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) quantifiziert. Alle folgend beschriebenen Arbeiten zur Aufarbeitung und Verdau der Proteine wurden auf Eis

unter Verwendung von Protein *LoBind*®-Spitzen und Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

3.8.1 Isolation der Membranproteine

Für die Ermittlung des Proteingehalts wurden im ersten Schritt die Membranfraktionen aus den plazentaren Proben mittels des *ProteoExtract*TM *Native Membrane Extraction Kit* (Merck, Darmstadt, Deutschland) isoliert. Hierfür wurde zunächst von den bei -80 °C gelagerten Plazenten jeweils 50 mg gefrorenes Gewebepulver mit 700 µl kaltem Extraktionspuffer I (mit 5 µl/ml Protease-Inhibitor) versetzt und anschließend für einen Zeitraum von 15 Minuten bei 40 rpm und 4 °C auf einem Plattformschüttler inkubiert und lysiert. Folgend wurden die Proben für weitere 15 Minuten bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und die erhaltenen Pellets in 300 µl Extraktionspuffer II (mit 5 µl/ml Protease-Inhibitor) resuspendiert. Anschließend erfolgte durch die Inkubation für eine Stunde bei 40 rpm und 4 °C auf dem Plattenschüttler die Extraktion der Membranproteine. Im Anschluss wurden die Proben erneut für 15 Minuten bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand, in dem die Membranfraktion enthalten sind, wurde abgenommen, einer Proteinbestimmung zugeführt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C eingefroren.

Der Gesamtproteingehalt der erhaltenen Gesamtmembranfraktion erfolgte mithilfe des *Pierce*TM *BCA Protein Assay Kits* (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland). Hierbei wird ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) verwendet, der auf der Eigenschaft beruht, dass Proteine Kupfer-II-Ionen unter Komplexbildung zu Kupfer-I-Ionen im alkalischen Milieu reduzieren. Die entstandenen Kupfer-I-Ionen bilden folgend mit der BCA einen violetten Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm, der zum Proteingehalt der Ausgangslösung proportional ist. Für die Proteinbestimmung wurden 7 µl jeder Probe mit 213 µl einer kalten Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS), die kein Calcium oder Magnesium beinhaltet, versetzt (\cong 3 % Extraktionspuffer II in Verdünnung). Im nächsten Schritt wurde, bestehend aus der Matrix der Proben und Lösungen aus bovinen Serumalbumin (BSA) als Referenzprotein mit aufsteigender Konzentration, eine Kalibrationsreihe erstellt. Anschließend wurden in eine 96-Well-Platte 100 µl der Probenmischung und 100 µl der Kalibratoren pipettiert, so dass ein Doppelsatz entstand. Die im Kit enthaltenen Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:50 gemischt. Folgend wurden jeweils 100 µl des erhaltenen Gemisches zu den Probenmischungen und Kalibratoren gegeben. Die photometrische Messung bei 562 nm erfolgte am *Microplate Reader Synergy HAT* (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, U.S.A.). Zuvor wurden die Proben und Kalibratoren bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert. Der Gesamtproteingehalt wurde schlussendlich unter Verwendung von *Gen5*TM (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, U.S.A.) und *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation, Redmont, Washington, U.S.A.) berechnet. Für die folgenden Versuche durfte dabei der Gehalt an Protein 2 mg/ml nicht

überschreiten, sodass entsprechend Proben mit einem höheren Proteingehalt mithilfe von Ammonium Bikarbonat Puffer (50 mM, pH 7,8) auf 2 mg/ml verdünnt wurden.

3.8.2 Verdau der Proteine

Zum Verdau der Proteinfraction wurden zunächst zu 100 µl des isolierten Membranextraktes 10 µl Dithiothreitol (DTT; 200 mM), 40 µl Ammoniumbikarbonat Puffer (50 mM, 7,8 pH) und 10 µl *Protease MaxTM Surfactant* (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.A.) gegeben. Das erhaltene Gemisch wurde anschließend im Heizblock für 20 Minuten bei 60 °C erhitzt, wodurch die enthaltenen Proteine denaturiert wurden. DTT führt hierbei zu einer Auffaltung der Proteine durch Spaltung von Disulfidbrücken, in dem es eine Reduktion von Thiol erzeugt. *Protease MaxTM Surfactant* ist eine Lösung, die die enzymatische Aktivität von Trypsin verstärkt, und damit zu einem verbesserten und beschleunigten Proteinverdau führt. Nach Abkühlung der Proben wurde 10 µl Iodacetamid (400 mM) hinzugefügt und die erhaltene Mischung bei 37 °C im abgedunkelten Wasserbad 15 Minuten inkubiert. Dieser Schritt führt zu einer Stabilisierung der Proteine durch Alkylierung. Im Anschluss an die beschriebenen Vorbereitungen erfolgte durch die Zugabe von 10 µl Trypsin-Lösung (0,05 µg/ µl) und die Inkubation für 16 Stunden bei 37° C der eigentliche Proteinverdau. Entsprechend bestand somit bei einem Proteingehalt von 2 mg/ml ein Trypsin/Protein-Verhältnis von 1:40. Bei Proben mit geringerer Proteinmenge wurde zur Wahrung des Verhältnisses weniger Trypsin eingesetzt und das fehlende Volumen durch Ammoniumbikarbonat aufgefüllt. Abschließend wurde der Verdau durch die Hinzugabe von 20 µl Ameisensäure beendet. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben durch Einfrieren auf -80 °C konserviert.

3.8.3 LC-MS/MS-Methode

Die Proteinquantifizierung erfolgte mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode, die den simultanen Nachweis einzelner Proteine bzw. den zugehörigen proteospezifischen Peptiden anhand des Molekulargewichtes aus einem Probengemisch ermöglicht. Dafür erfolgte zunächst mithilfe des Hochleistungsflüssigkeitschromatographen *Agilent Technologies 1260 Infinity* (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) die Auftrennung der aus dem Proteinverdau erhaltenen Peptide unter Nutzung der chromatographischen Trennsäule *Kinetex[®]* (Phenomex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland) anhand der physikochemischen Eigenschaften. Im Anschluss wurden die aufgetrennten Peptide in das *Triple Quadrupol*-Massenspektrometer *QTRAP[®] 5500 System* (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt. Anschließend wurde zuerst die Flüssigkeit mit den enthaltenen Peptiden durch eine Elektrospray-Ionenquelle in den gasförmigen Aggregatzustand gebracht und Moleküle ionisiert. Die entstandenen Peptid-Ionen wurden im nächsten Schritt in den eigentlichen Analysator, welcher insgesamt drei Quadrupole darstellt, verbracht. Hier erfolgte auf

Grundlage der verschiedenen Massen-Ladungsverhältnisse die Trennung und Detektion der einzelnen Peptid-Ionen. Im ersten Quadrupol wurde das im vorangegangenen Schritt entstandene Peptid-Ion, welches auch als Mutterion bezeichnet wird, anhand seines Massen-Ladungsverhältnisses selektiert. Im nachgeschalteten zweiten Quadrupol, der sogenannten Kollisionszelle, erfolgte durch den Zusammenstoß des Mutterion mit einem Stoßgas eine Fragmentierung. Die nun entstandenen Bruchstücke werden als Tochterionen bezeichnet und in das dritte Quadrupol überführt. Hier erfolgte wiederum anhand der Massen-Ladungsverhältnisse eine erneute Selektion und schlussendlich die Detektion mittels Photomultiplier. Die erhaltenen Messdaten verhalten sich dabei proportional zur eingesetzten Analytmenge. Zur Quantifizierung der Proben wurde eine am Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald etablierte und validierte Methode verwendet (122). Die in dieser Promotionsarbeit verwendeten Quantifizierungspeptide der untersuchten Transportproteine sind in der Tab. 3.6 ersichtlich.

3.8.4 Peptidsequenzen

Tab. 3.6: *Peptidsequenzen der Zielproteine für die Quantifizierung mithilfe der LC-MS/MS-Methode* Angegeben sind die jeweiligen Peptidsequenzen der Zielproteine der acht untersuchten Arzneistofftransporter der humanen Blut-Plazenta-Schranke und die in der Voruntersuchung betrachteten Transporter OATP1A2 und MATE1. Die Angabe erfolgt mithilfe der Einbuchstaben-Nomenklatur der *International Union of Pure and Applied Chemistry*.

Zielprotein	Peptidsequenz
P-gp (MDR1)	AGAVAEEVLAAIR
MRP1	DGAFAEFLR
MRP2	LTIPQDPILFSGSLR
MRP3	IDGLNVADIGLHDLR
OCT3	GIALPETVDDVEK
OCTN2	FEEAEVIIR
OATP2B1	SSPAVEEQQLLVSGPGK
OATP1A2	EGLETNADIHK
MATE1	GGPEATLEVR

3.9 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung und die grafische Darstellung der Abbildungen erfolgte mithilfe der Software *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, U.S.A.).

Zur Varianzanalyse der mRNA- und Proteindaten, die den zeitlichen Verlauf der Gestation darstellen, wurde bei unabhängigen Stichproben mit mehr als zwei Gruppen, der nicht parametrische *Kruskal-Wallis-Test* durchgeführt. Bei Vorliegen signifikanter Unterschiede erfolgte eine *Post-Hoc-Analyse* durch *Dunn's Multiple Comparison Test*, um eine genauere Einordnung der Varianz zwischen den Gruppen vornehmen zu können.

Die Auswertung der mRNA-Datensätze zwischen gesunden Probandinnen und Personen mit einer (Prä-)Eklampsie bzw. Gestationsdiabetes erfolgte durch den *Mann-Whitney U-Test*.

Zur Beantwortung der Frage, ob zwischen der Genexpression der Zielgene und der Expression auf Proteinebene eine Korrelation besteht wurde die Rangkorrelationsanalyse nach *Spearman* verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Testverfahren zur Darstellung ungerichteter linearer Zusammenhänge für nichtparametrische Daten. Der erhaltene Korrelationskoeffizient r_s kann Werte von 1 bis -1 annehmen. Ein Ergebnis gegen 0 spricht dabei für eine geringe, ein Ergebnis von 1 bzw. -1 für einen starken Zusammenhang.

Das Signifikanzniveau wurde für die oben genannten Analysen auf $p < 0.05$ festgelegt.

Sämtliche Messdaten wurden als *Box-Plot* visualisiert. Innerhalb der *Box* befinden sich dabei 50 % der erhaltenen Messdaten, wodurch der Interquartilsabstand dargestellt ist. Durch den in der *Box* liegenden durchgehenden Strich wird der Median angegeben. Die *Whisker* sind in allen Abbildungen mit der 5. und der 95. Perzentile definiert, sodass sich 90 % aller Messungen in dem abgegrenzten Bereich befinden. Die restlichen 10 % der Daten sind als separate Punkte dargestellt.

3.10 Material

3.10.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agilent 2100 Bionalyzer®	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Agilent Technologies 1260 Infinity	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Eppendorf-Pipetten: Eppendorf Reference® (10/100/250/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fast Real-Time PCR-System 7900 HT (Applied Biosystems®)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Kinetex®, chromatographischen Trennsäule	Phenomex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland
Kugelmühle, Mikro-Dismembrator U	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Mikrozentrifuge, MiniStar Silverline	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp™ Snap-On Optical Film Compression Pad (Applied Biosystems®)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Microplate Reader Synergy HAT	BioTek, Winooski, Vermont, U.S.A.
M-Pact Analytenswaage AX 124	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
M-Pact Präzisionswaage A4202	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Nano Drop™ ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pocket Bloc Heizblock	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
QTRAP® 5500 System	AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Steril-Werkbank HERAsafe® KS	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabenbach, Deutschland
Vortexer IKA MS 3 Basic	IKA® Works Inc., Wilmington, North Carolina, U.S.A.
Vortex Schüttler NeoLab 7-2020	NeoLab®, Heidelberg, Deutschland

3.10.2 Reaktionskits für die Molekularbiologie

Reaktionskit	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano (Part Number: 5067 1511)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems® Part Number: 4368814)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
NucleoSpin miRNA (Art. - Nr. 740971.50)	Machery-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
NucleoSpin RNA (Art. - Nr. 740955.50)	Machery-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Katalognummer: 23227)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
ProteoExtract™ Native Membrane Extraction Kit (Cat. No.444810)	Merck, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems® Part Number: 4369016)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems® Part Number: 4440047)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.10.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorf Tubes® 0,5/1,5/2,0/5,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe Lock Tubes® 0,5/1,5/2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ep T.I.P.S.® Standart (10/20/200/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ep Dualfilter T.I.P.S.® (10/20/100/200 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TaqMan® Low Density Array (TLDA) Micro Fluidic Cards	Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems®, Part Number 4346906)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems®, Part Number 4311971)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.10.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
β - Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DL-Dithiotreitol (≥ 98% (HPLC), ≥ 99% (Titration))	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Ethanol 70 %	Universitätsapotheke, Greifswald, Deutschland
Ethanol >99,8 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Invitrogen™ UltraPure™ Dnase/Rnase-freies destilliertes Wasser	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
PBS	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Protease Max™ Surfactant	Promega, Madison, Wisconsin, U.S.A.
RNaseZap® RNase Decontamination Solution	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Seppro™ Ammoniumbikarbonat Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.
Sequencing Grade Modified Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.

3.10.5 TaqMan® Assays

Zielgen	TaqMan® Assay ID	Hersteller
ABCB1	Hs00184500_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
ABCC1	Hs01561502_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
ABCC2	Hs00166123_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
ABCC3	Hs00978473_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
ABCG2	Hs01053790_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SLC22A3	Hs01009568_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SLC22A5	Hs00929869_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SLC47A1	Hs00217320_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SLCO1A2	Hs00366488_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SLCO2B1	Hs00217320_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
18S	Hs99999901_s1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SDHA	Hs00417200_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
TBP	Hs99999910_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
YWHAZ	Hs00237047_m1	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.10.6 Software

Software	Hersteller
BestKeeper tool	http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html
Excel (Version: 2011, 2016, 2019)	Microsoft Corporation, Redmont, Washington, U.S.A.
Gen5 (Version: 2.01.14)	BioTek Instruments, Winooski, Vermont, U.S.A
GraphPad PRISM (Version: 5, 6, 8)	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, U.S.A.
PowerPoint (Version: 2019)	Microsoft Corporation, Redmont, Washington, U.S.A.
Word (Version: 2010, 2013, 2019)	Microsoft Corporation, Redmont, Washington, U.S.A.

4. Ergebnisse

4.1 Genexpression bei termingerechter Entbindung und gesunden Probandinnen

Die Darstellung der Expression relevanter Transporter bei termingerechter Entbindung sowie gesunden Probandinnen stellt die erste Aufgabenstellung dieser Arbeit dar.

Eine termingerechte Entbindung liegt nach der Definition der WHO vor, wenn die Geburt zwischen der 37. und der 42. SSW erfolgt (123). 355 Gewebeproben aus der Datenbank erfüllten diesen Aspekt. Hiervon wurden alle Proben von Plazenten mit Gestosen (z.B. Gestationsdiabetes, (Prä-)Eklampsie, Amnioninfektionssyndrom), systemischen maternalen Erkrankungen (z.B. arterielle Hypertonie, Asthma bronchiale), regelmäßiger Medikamenteneinnahme, Suchtstoffkonsum (z.B. Nikotin, Alkohol) sowie stattgehabter Tokolyse und/oder Lungenreifeinduktion ausgeschlossen, so dass schlussendlich Gewebe aus 156 Plazenten in die Betrachtung integriert werden konnte.

In Abb. 4.1 ist die Expression der acht ausgewählten Arzneistofftransporter auf mRNA-Ebene dargestellt.

Die stärkste Expression, in Bezug auf den Median des $2^{-\Delta C_t}$ -Wertes, zeigte *SLC22A3* (8,265). Ebenfalls stark exprimiert wurden *SLCO2B1* (7,819), *ABCB1* (6,657) und *ABCG2* (5,731). Die mRNA von *SLC22A5* (3,384), *ABCC1* (2,007) und *ABCC3* (1,894) konnte im mittleren Bereich nachgewiesen werden. *ABCC2* (0,2273) wies hingegen nur eine verhältnismäßig geringe Genexpression auf.

Weiterhin unterscheidet sich die Streuung der mRNA der Transportproteine, beschrieben durch den Interquartilabstand, von 6,175 (*ABCB1*) bis 0,1209 (*ABCC2*). Die weiteren deskriptiven statistischen Kenngrößen sind der Tab. 4.1 zu entnehmen.

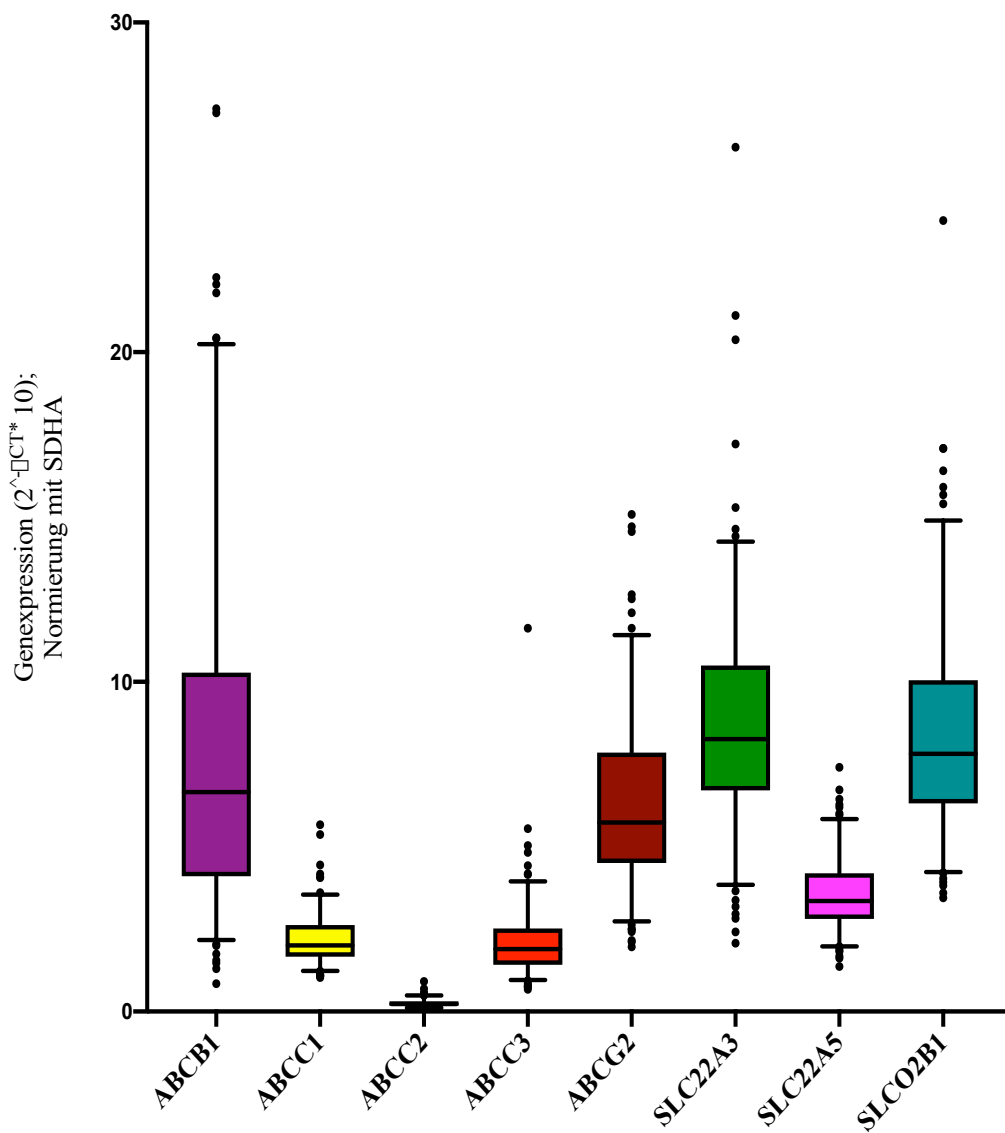


Abb. 4.1: *Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei gesunden Probandinnen und termingerechter Entbindung (37. – 42. SSW). Dargestellt als Box-Plot. Die Whisker sind definiert mit der 5 bzw. 95 Perzentile. (N = 156)*

Tab. 4.1: *Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei gesunden Probandinnen und termingerechter Entbindung (37. - 42. SSW)* Die Daten in der Tabelle sind als $[2^{-\Delta CT} * 10]$ angegeben. Die Normierung der Expression der Zielgene erfolgte mit SDHA

	ABCB1	ABCC1	ABCC2	ABCC3	ABCG2	SLC22A3	SLC22A5	SLCO2B1
Minimalwert	0,8426	1,027	0,09651	0,6758	1,962	2,071	1,364	3,451
Maximalwert	27,38	5,665	0,9113	11,63	15,08	26,22	7,405	23,99
Spannweite	26,54	4,638	0,8148	10,95	13,12	24,15	6,041	20,54
arithmetisches Mittel	8,103	2,203	0,2546	2,112	6,346	8,669	3,566	8,488
Standardabweichung	5,31	0,792	0,118	1,166	2,632	3,455	1,131	3,193
Variationskoeffizient	65,53%	35,95%	46,34%	55,20%	41,47%	39,85%	31,72%	37,62%
geometrisches Mittel	6,578	2,082	0,2327	1,906	5,838	8,026	3,398	7,957
25% Perzentile	4,105	1,661	0,1818	1,419	4,502	6,705	2,806	6,312
Median	6,657	2,007	0,2273	1,894	5,731	8,265	3,348	7,819
75% Perzentile	10,28	2,624	0,3027	2,516	7,852	10,5	4,191	10,05
Interquantilabstand	6,175	0,963	0,1209	1,097	3,35	3,795	1,385	3,738

4.2 Genexpression im zeitlichen Verlauf der Gestation

Der zeitliche Verlauf der Schwangerschaft wurde auf Grundlage des realen Geburtstermins in Relation zum errechneten Geburtstermin betrachtet. Hierbei erfolgte die Einteilung nach den Angaben der WHO in die Gruppen *term* (42. – 37. SSW), *moderate preterm* (37. - 32. SSW), *very preterm* (32. – 28. SSW) und *extremely preterm* (< 28. SSW) (123). Die früheste Geburt im Probenkollektiv erfolgte in der 24. SSW. Insgesamt lag die Stichprobengröße bei $N = 245$, wobei sich die Aufteilung auf die einzelnen Gruppen stark unterschied (*term*: $N = 156$; *moderate preterm*: $N = 58$; *very preterm*: $N = 19$; *extremely preterm*: $N = 12$). Das Gewebe stammt von Probandinnen ohne Gestosen, systemischen Erkrankungen, Medikamenteneinnahme oder Konsum von Suchtstoffen. Bei 24 Proben ist der Gewebeentnahme eine Tokolyse und/oder *respiratory distress syndrome* (RDS)-Prophylaxe vorausgegangen.

Der *Kruskal-Wallis-Test* zeigte bei *ABCB1*, dass sich die Genexpression im zeitlichen Verlauf verändert ($H = 37,65$; $p < 0,001$). Die anschließend durchgeführte *Post-hoc-Analyse* (*Dunn's Multiple Comparison Test*) konnte aufzeigen, dass zwischen termingerechter Entbindung und Frühgeburten der Kategorie *moderate preterm* ($p = 0,0002$) bzw. *very preterm* ($p < 0,0001$) das Signifikanzniveau erreicht wurde. Im Vergleich der Mediane zeigten alle Kategorien der Frühgeburtslichkeit ein ähnliches Niveau (*moderate preterm*: 12,1; *very preterm*: 16,9; *extremely preterm*: 11,33) welches zum errechneten Geburtstermin hin abfällt (*term*: 6,657)

In der Varianzanalyse von *SLC22A3* ($H = 13,22$; $p = 0,0042$) zeigte sich ein signifikanter Unterschied, wobei die folgende *Post-hoc*-Analyse zwischen termingerechten Entbindungen und *moderate preterm* eine signifikante Varianz zeigte ($p = 0,0042$). Die Medianwerte fielen im Verlauf zunächst von *extremely preterm* Plazenten (9,401) zu Proben aus den Gruppen *very preterm* (7,904) und *moderate preterm* (6,240) ab um schlussendlich in der *term*-Gruppe (8,265) wieder anzusteigen.

SLC22A5 zeigte im *Kruskal-Wallis-Test* ebenfalls eine signifikante Veränderung ($H = 20,56$; $p = 0,001$). Durch den *Dunn's Multiple Comparison Test* konnte weitergehend eine Varianz zwischen der Kategorie der *extremely preterm* Geburten mit *moderate preterm* Geburten ($p = 0,0171$) bzw. *term* Geburten ($p = 0,0004$) dargestellt werden. Die Medianwerte wiesen einen kontinuierlichen Anstieg im zeitlichen Verlauf der Gestation bis zum errechneten Geburtstermin auf (*extremely preterm*: 2,256; *very preterm*: 2,476; *moderate preterm*: 3,118; *term*: 3,384)

Bei drei weiteren Transportern konnte in der Varianzanalyse im *Kruskal-Wallis-Test* das Signifikanzniveau erreicht werden: *ABCC2* ($H = 8,423$; $p = 0,0380$) *ABCC3* ($H = 9,234$; $p = 0,00253$) *ABCG2* ($H = 9,825$; $p = 0,0201$). Der *Post-Hoc*-Test konnte bei der mRNA der genannten Proteine keine Unterschiede in der Genexpression der einzelnen Gruppen feststellen, so dass zum weiterführenden Vergleich die Medianwerte Verwendung fanden.

ABCC2 zeigte einen gipfelartigen Verlauf, wobei der Median von *extremely preterm* (0,2901) zu *very preterm* (0,3518) anstieg um anschließend wieder kontinuierlich zu fallen (*moderate preterm*: 0,286; *term*: 0,2273).

Die Genexpression von *ABCC3* wies einen stetigen Anstieg im zeitlichen Verlauf auf (*extremely preterm*: 1,359; *very preterm*: 1,564; *moderate preterm*: 1,57; *term*: 1,894).

ABCG2 zeigte von *extremely preterm* (4,798) zu *very preterm* (7,763) einen Anstieg. Im weiteren Verlauf verblieb die Expression bei *moderate preterm* (7,059) stabil, um zum errechneten Geburtstermin wieder zu sinken (*term*: 5,731).

Die Genexpression der Transporter *ABCC1* und *SLCO2B1* zeigten keine Veränderungen. Eine *Post-Hoc*-Analyse wurde folglich nicht durchgeführt.

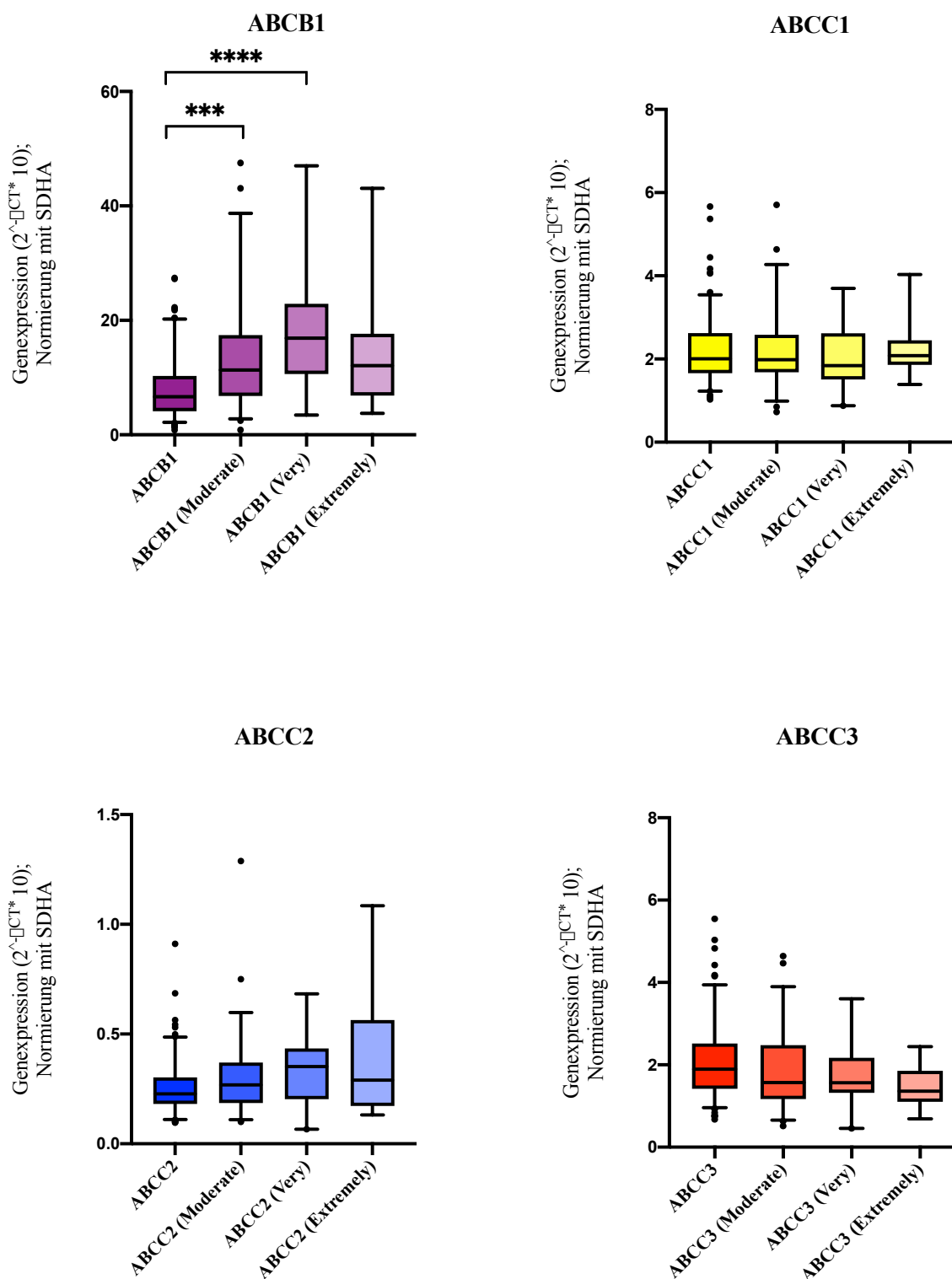


Abb. 4.2: Genexpression von ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3 in der humanen Plazenta im zeitlichen Verlauf Darstellung als Box-Plot. Die Whisker sind definiert als 5 bzw. 95 Perzentile (N = 245; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001;)

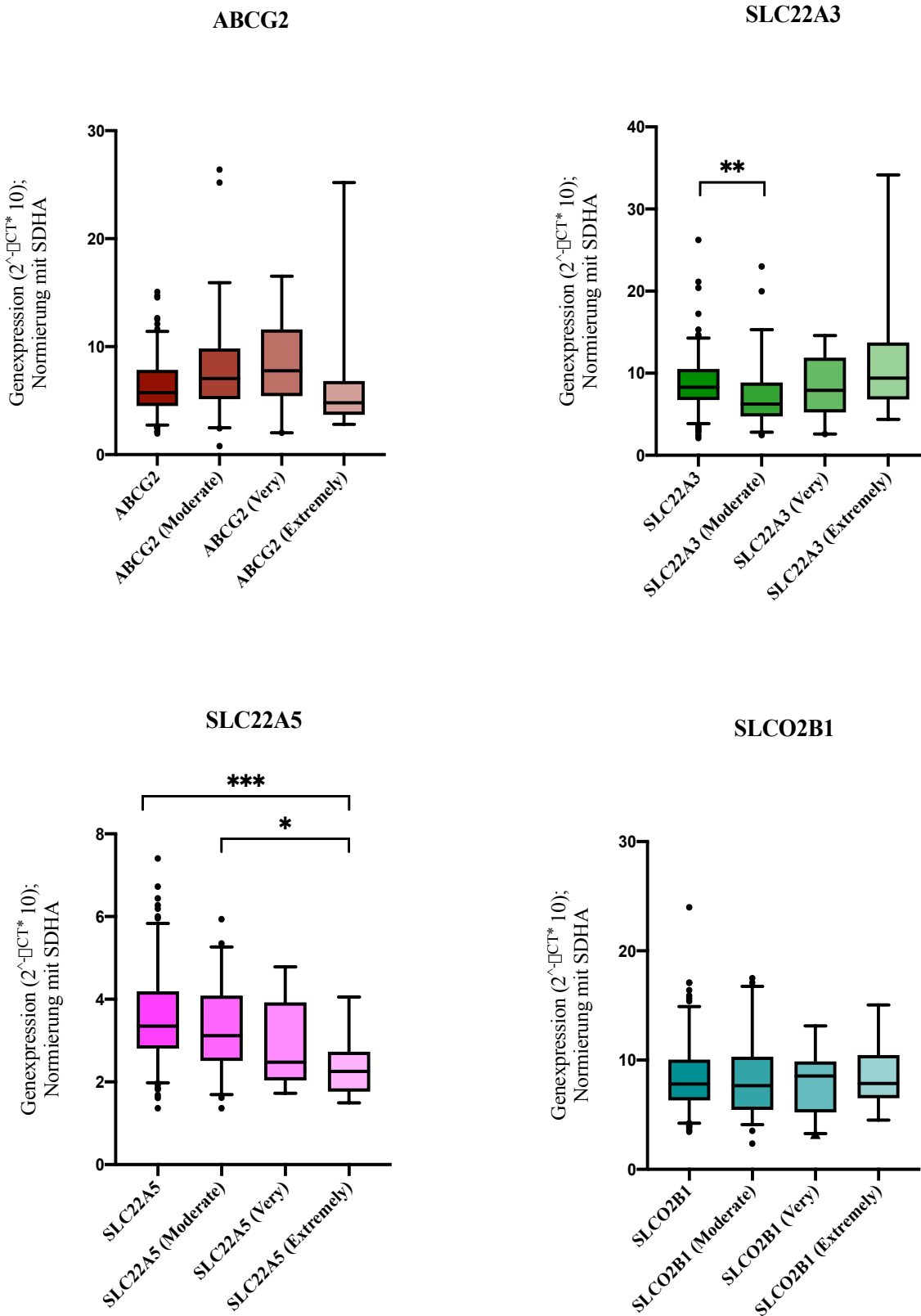


Abb. 4.3: Genexpression von *ABCG2*, *SLC22A3*, *ALC22A5*, *SLCO2B1* in der humanen Plazenta im zeitlichen Verlauf Darstellung als Box-Plot. Die Whisker sind definiert als 5 bzw. 95 Perzentile (N = 245; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)

4.2.1 Tokolyse und Respiratory Distress Syndrome Prophylaxe

In der klinischen Praxis wird bei drohender Frühgeburt meist eine Lungenreifungsinduktion durch die wiederholte Gabe von hochdosierten Glukokortikoiden initiiert. Hierdurch soll das Risiko eines neonatalen *respiratory distress syndrome* reduziert werden.

Des Weiteren erfolgt häufig simultan eine Hemmung der bestehenden Wehentätigkeit. Für die auch als Tokolyse bezeichnete Therapieform bestand für den Zeitraum der Probengewinnung in Deutschland eine Zulassung für zwei Präparate: den β -Blocker Fenoterol sowie den Oxytocin-Antagonisten Atosiban (124).

Hieraus entsteht die Fragestellung, ob plazentares Gewebe von Probandinnen die eine Tokolyse und/oder RDS-Prophylaxe erhalten haben in die allgemeine Analyse der Transporterexpression des zeitlichen Verlaufs der Gestation integriert werden kann oder sich durch die Therapie eine Veränderung der Expressionsmuster ergibt.

Folgend wurde zur Beantwortung Gewebe von Entbindungen die zwischen der 32. bis 37. SSW (*moderate preterm*) stattfanden verwendet. Die Proben wurde in die Gruppen „keine Tokolyse oder RDS-Prophylaxe“ bzw. „Tokolyse und/oder RDS-Prophylaxe“ aufgeteilt. Material mit anderweitigen systemischen Erkrankungen, Medikamenteneinnahme, Suchtstoffkonsum oder Gestosen wurde ausgeschlossen. Eine einzelne Betrachtung der Auswirkungen von Tokolyse oder RDS-Prophylaxe ist bei gleichzeitiger medikamentöser Therapie aus dem vorliegenden Daten nicht möglich. Darüber hinaus bestand keine genauere Spezifizierung bezüglich der Substanz mit der die Tokolyse durchgeführt wurde. Anhand von deutschlandweit erhobenen Daten, die in 95 % den Einsatz von Fenoterol zeigten, ist ebenfalls in den meisten Fällen von einer Wehenhemmung durch den genannten β -Blocker auszugehen (124).

Die statistische Analyse erfolgte für jeden Transporter unter Verwendung des *Mann-Whitney U-Test* ($p < 0,05$). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression, so dass Proben die eine Tokolyse und/oder RDS-Prophylaxe erhielten zur weiteren Analyse verwendet werden konnten. Die Darstellung der Daten erfolgt in Abb. 4.4.

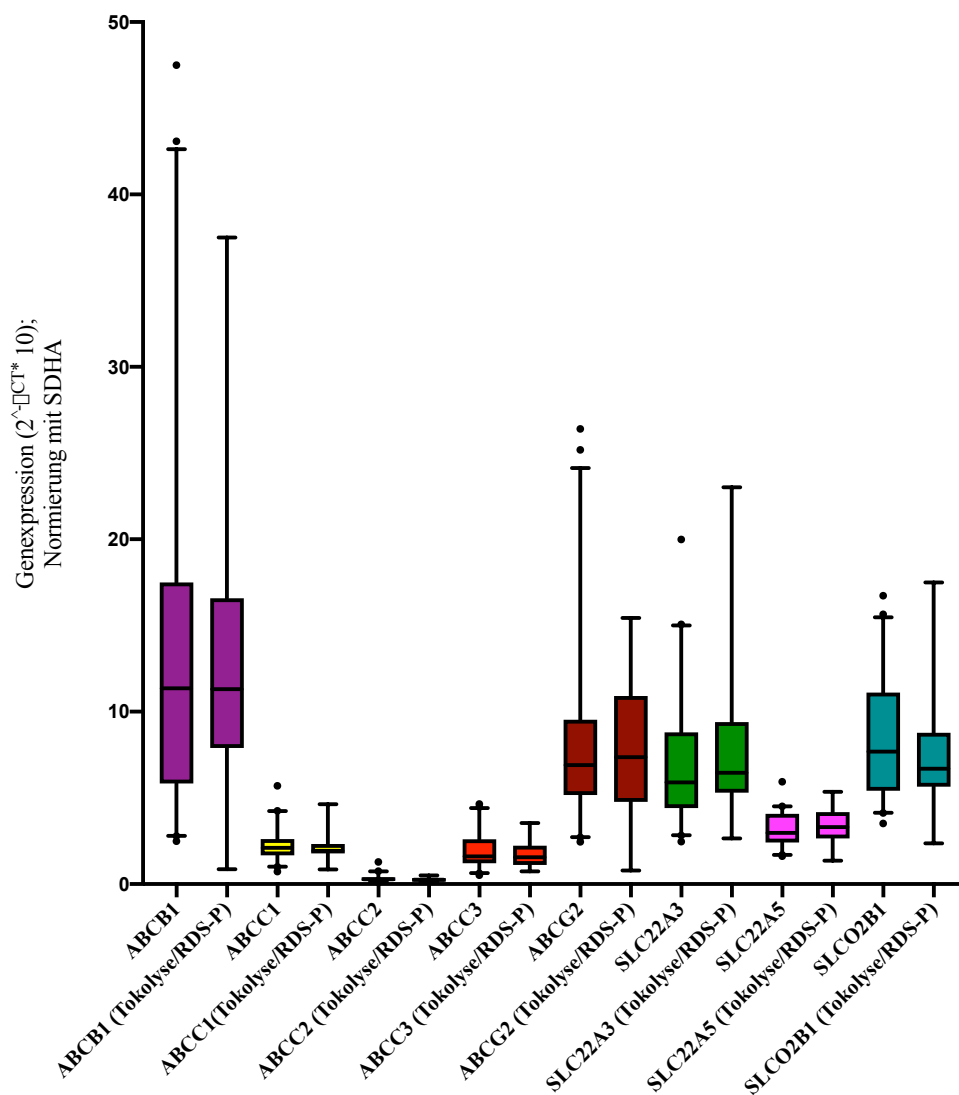


Abb. 4.4: *Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei Tokolyse/RDS-Prophylaxe* Darstellung als *Box-Plot*. Die *Whisker* sind definiert als 5 bzw. 95 Perzentile (N = 58; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)

4.3 Genexpression bei Gestationsdiabetes

Die Analyse bezüglich einer Veränderung der Genexpression relevanter Arzneistofftransporter bei Vorliegen eines Gestationsdiabetes erfolgte unter Einschluss von 173 Gewebeproben. Hierbei hatten 17 der verwendeten Proben einen Gestationsdiabetes, während 156 Proben der Kontrollgruppe angehörten. Es erfolgte in beiden Gruppen die Verwendung von Gewebe aus termingerechten Entbindungen (37. – 42. SSW) ohne weitere Gestosen, systemische maternale Erkrankungen, Medikamenteneinnahme (außer Insulin) oder Suchtstoffkonsum. Fünf Patientinnen mit Gestationsdiabetes erhielten als Medikation subkutan Insulin. Bei den übrigen 12 Probandinnen erfolgte eine diätische Therapie. Drei Neugeborene von Müttern mit Gestationsdiabetes wiesen eine fetale Makrosomie auf, die durch ein Geburtsgewicht von über 4000 g definiert ist (73).

Bei Vorliegen eines Gestationsdiabetes konnte bei drei der untersuchten Arzneistofftransporter auf mRNA-Ebene eine Veränderung aufgezeigt werden. Die Darstellung der Genexpression bei Gestationsdiabetes erfolgt in Abb. 4.5.

ABCC1 zeigte im *Mann-Whitney U-Test* eine signifikante Veränderung ($U = 839$; $p = 0,0122$). Im Vergleich der Medianwerte war eine Abnahme der Expressionsstärke bei Auftreten eines Gestationsdiabetes im Vergleich zu gesunden termingerechten Entbindungen ersichtlich (Gestationsdiabetes: 1,7; Kontrollgruppe: 2,007).

Weiterhin konnte in der Varianzanalyse eine Veränderung der Expression der mRNA von *SLC22A3* nachgewiesen werden ($U = 315$; $p = 0,0355$). Die Medianwerte zeigten hierbei eine Verringerung der Genexpression von *SLC22A3* in Plazenten von Schwangeren mit einem Gestationsdiabetes (Gestationsdiabetes: 2,827; Kontrollgruppe: 3,348).

SLCO2B1 erreichte ebenfalls das Signifikanzniveau im *Mann-Whitney U-Test* ($U = 821$; $p = 0,0092$) mit einem Abfall der mRNA Expression bei Gestationsdiabetes (Medianwerte: Gestationsdiabetes: 5,837; Kontrollgruppe: 7,819).

In der Varianzanalyse der Genexpression der fünf weiteren untersuchten Transportproteine zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

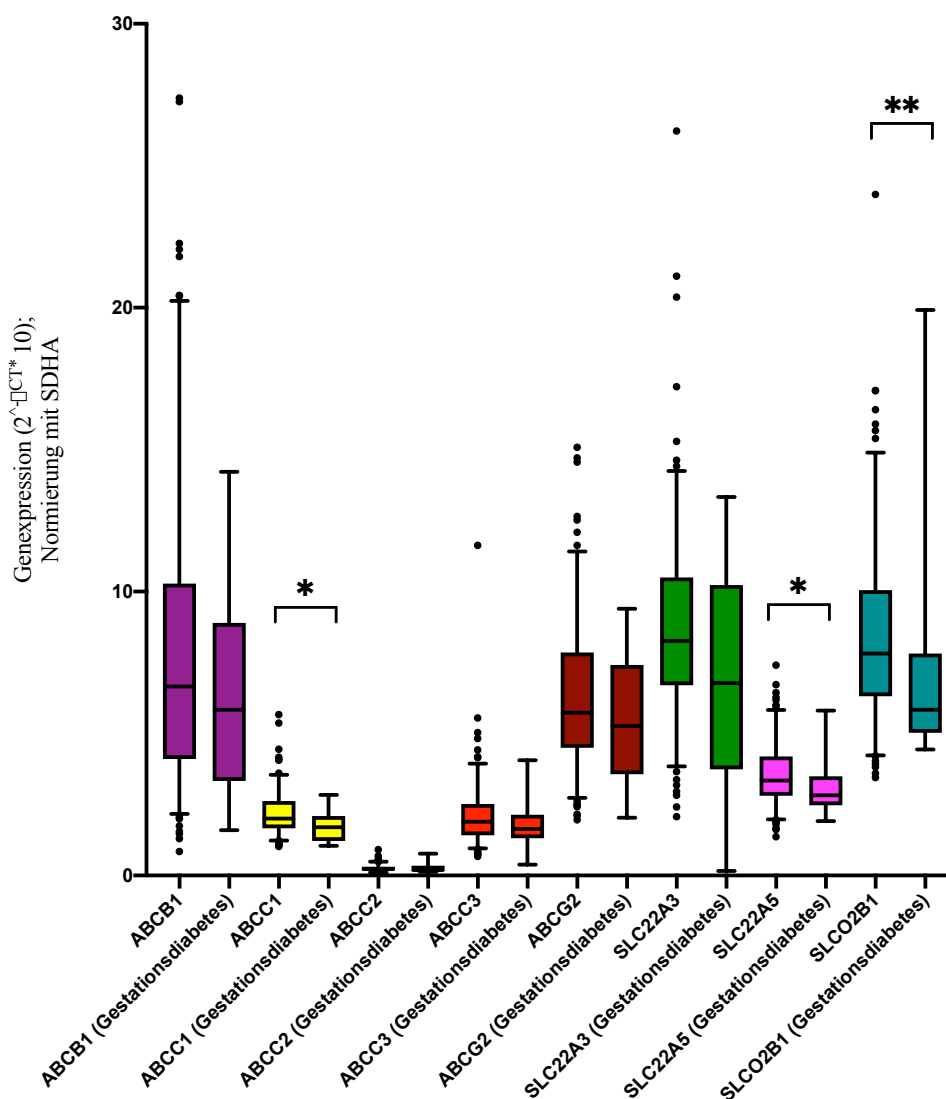


Abb. 4.5: Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei Gestationsdiabetes Darstellung als Box-Plot. Die Whisker sind definiert als 5 bzw. 95 Perzentile (N = 173; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)

4.4 Genexpression bei (Prä-)Eklampsie

Für die Analyse der Genexpressionsveränderungen bei Auftreten einer Eklampsie bzw. Präeklampsie während der Schwangerschaft standen insgesamt 165 Proben zur Verfügung. Hierbei entfielen 156 Proben auf die Kontrollgruppe, sowie neun Proben auf die Gruppe (Prä-)Eklampsie. In beiden Gruppen wurden jeweils nur Gewebe von termingerechten Entbindungen (37. – 42. SSW) verwendet. Zwei Patientin wiesen als Unterform der Präeklampsie ein HELLP (*Heamolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelet Count*) - Syndrom auf. Hierbei liegt neben den Diagnosekriterien einer Präeklampsie zusätzlich ein Symptomkomplex aus einer hämolytischen Anämie, erhöhten Leberenzymen und einer Thrombozytopenie vor. Eine Probandin mit Präeklampsie zeigte nebenbefundlich die

Diagnose des PUPP (*Pruritic Urticarial Papules and Plaques*)-Syndrom, einer polymorphen Schwangerschaftsdermatose ohne systemische Auswirkungen auf den Körper. Das Vorliegen anderer Gestosen, systemischer maternalen Erkrankungen, Medikamenteneinnahme oder Suchstoffkonsum stellten ein Ausschlusskriterium dar.

Drei der acht untersuchten Arzneistofftransporter zeigten bei Vorliegen einer (Prä-)Eklampsie eine Veränderung der Genexpression. Die Darstellung der Genexpression bei (Prä-)Eklampsie erfolgt in Abb. 4.6.

Die Varianzanalyse zeigte bei *ABCC2* eine signifikante Veränderung ($U = 417$; $p = 0,0398$). Im Vergleich der Medianwerte konnte dabei eine Abnahme der mRNA-Expression in Plazenten von Schwangeren mit (Prä-)Eklampsie nachgewiesen werden. ((Prä-)Eklampsie: 0,1691; Kontrollgruppe: 0,2273)

SLC22A3 wies im *Mann-Whitney U-Test* eine signifikante Varianz auf ($U = 400$; $p = 0,0288$). In Bezug auf die Medianwerte konnte hierbei eine Abnahme der Genexpression bei Auftreten einer (Prä-)Eklampsie dargestellt werden. ((Prä-)Eklampsie: 0,6796; Kontrollgruppe: 0,8,265)

Die Varianzanalyse der Genexpression erreichte bei *SLC22A5* das Signifikanzniveau. ($U = 421$; $p = 0,0428$). Im Vergleich der Medianwerte zeigte sich ebenfalls ein Abfall der mRNA bei Vorliegen einer (Prä-)Eklampsie. ((Prä-)Eklampsie: 2,860; Kontrollgruppe: 3,348)

Die statistische Auswertung der weiteren Arzneistofftransporter konnte keine weiteren Veränderungen der Genexpression aufzeigen.

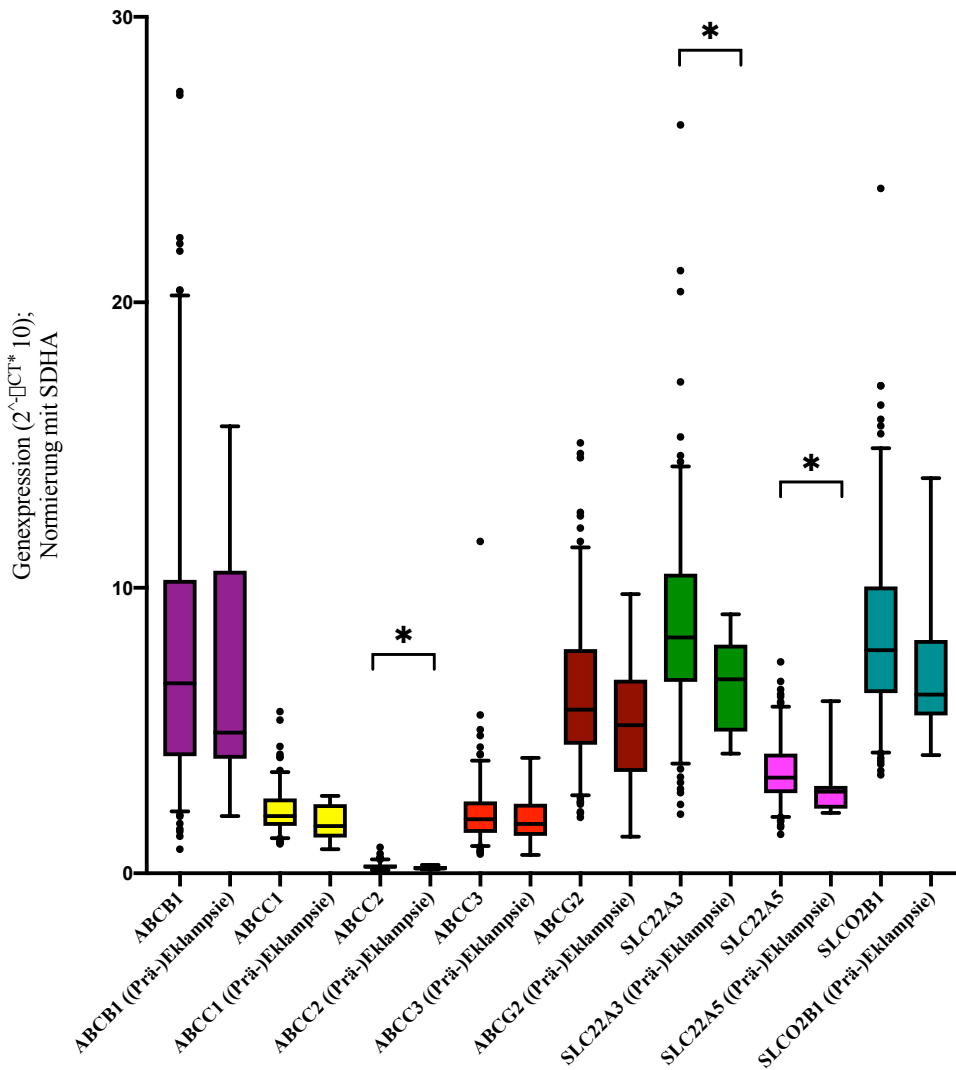


Abb. 4.6: *Genexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei (Prä-)Eklampsie* Darstellung als Box-Plot. Die Whisker sind definiert als 5 bzw. 95 Perzentile (N = 165; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)

4.5 Proteingehalt bei termingerechter Entbindung und gesunden Probandinnen

Die Darstellung des Proteingehalts relevanter Arzneistofftransporter bei termingerechter Entbindung sowie gesunden Probandinnen stellte eine weitere Aufgabe dieser Promotionsarbeit dar.

Analog zu den Einschlusskriterien der Genexpression wurden alle Proben einer termingerechten Entbindung, welche nach Definition der WHO zwischen der 37. bis 42. SSW lag, betrachtet (123). Ebenfalls wurden alle Plazentaprobe von Probandinnen mit Gestosen, systemischen maternalen Erkrankungen, regelmäßiger Medikamenteneinnahme, Suchtstoffkonsum, sowie stattgehabter Tokolyse und/oder Lungenreifeinduktion ausgeschlossen, so dass letztendlich Gewebe aus 145 Plazenten in die Betrachtung einbezogen werden konnte.

In Abb. 4.7 ist die Menge der acht ausgewählten Arzneistofftransporter auf Proteinebene dargestellt. Die Expressionsdaten sind dabei in pmol/mg angegeben.

In Bezug auf den Median zeigten BCRP mit 0,54 pmol/mg und OCTN2 mit 0,46 pmol/mg eine starke Expression. Eine mittlere Expressionsstärke war hingegen bei OCT3 (0,28 pmol/mg), OATP2B1 (0,22 pmol/mg) und P-gp (0,18 pmol/mg) festzustellen. MRP1, MRP2 und MRP3 zeigten im Median eine Expression die unter der methodischen Nachweisgrenze von 0,05 pmol/mg lag. Hieraus ließ sich eine sehr geringe bis fehlende Ausprägung auf Proteinebene ableiten. Auffallend ist zudem, dass bei MRP1 und MRP2 eine sehr ausgeprägte linksschiefe Verteilung vorlag, was durch das Auftreten weniger Proben mit sehr hoher Proteinkonzentrationen bei allgemein geringer Expressionsstärke bedingt sein könnte.

Darüber hinaus waren deutliche Unterschiede in der Streuung der Proteinexpression, dargestellt durch den Interquartilabstand, ersichtlich. Den größten Abstand besaß dabei MRP3 mit 0,845 pmol/mg und den geringsten P-gp mit lediglich 0,12 pmol/mg.

Die weiteren deskriptiven statistischen Kenngrößen der nachgewiesenen Proteinmengen sind in Tab. 4.2 angegeben.

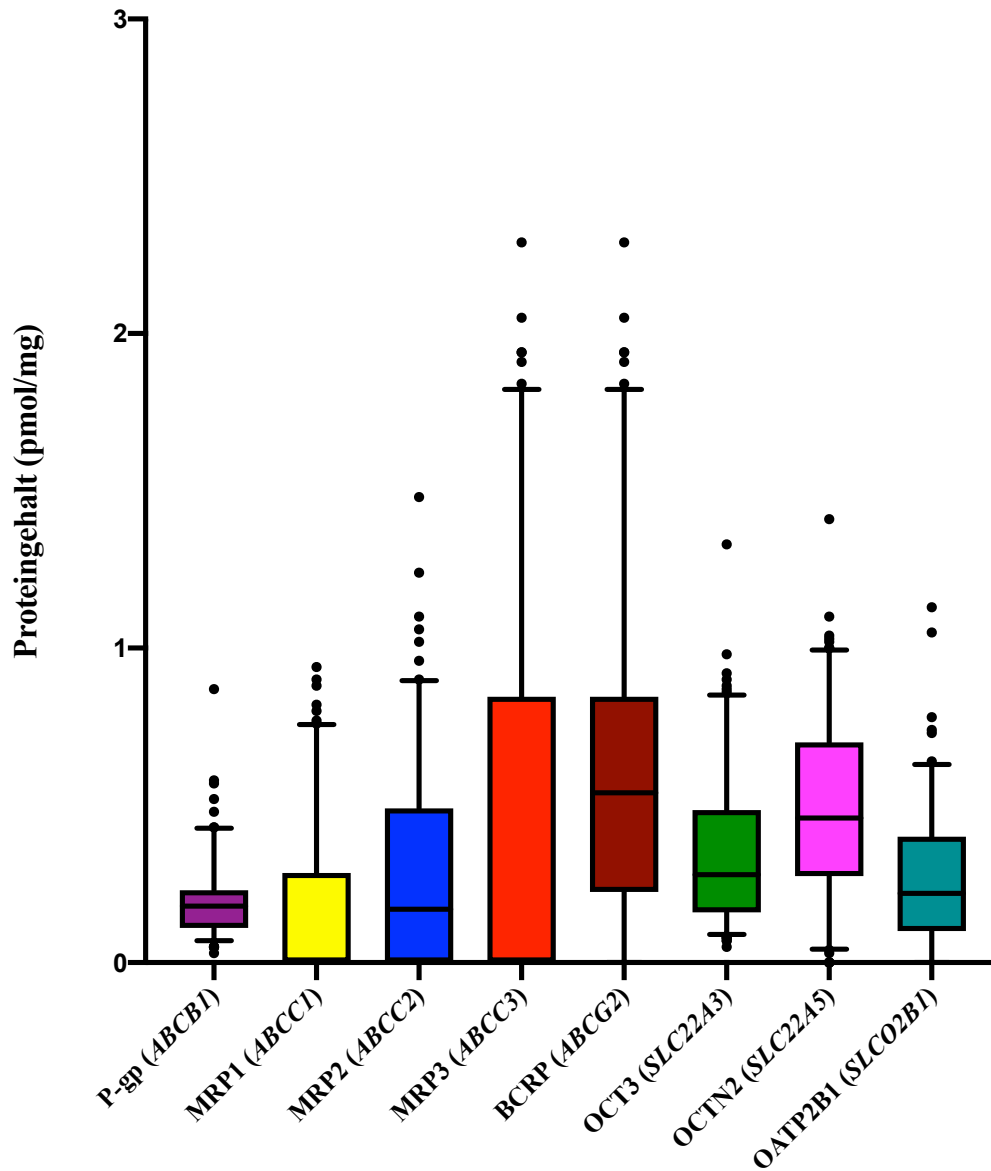


Abb. 4.7: *Proteinexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei gesunden Probandinnen und termingerechter Entbindung (37. - 42. SSW)* Dargestellt als *Box-Plot*. Die *Whisker* sind definiert mit der 5 bzw. 95 Perzentile. In Klammern sind die zum Protein zugehörigen Gene angegeben. (N = 145)

Tab. 4.2: *Proteinexpression von Arzneistofftransportern in der humanen Plazenta bei gesunden Probandinnen und termingerechter Entbindung (37. – 42. SSW)* Die Daten in der Tabelle sind als [pmol/mg] angegeben. Bei Daten die mit * markiert sind wurde bei vorliegenden eines zur Berechnung verwendeten Wertes unter der methodischen Nachweisgrenze von < 0,05 pmol/mg dieser als 0 definiert

	P-gp (<i>ABCB1</i>)	MRP1 (<i>ABCC1</i>)	MRP2 (<i>ABCC2</i>)	MRP3 (<i>ABCC3</i>)	BCRP (<i>ABCG2</i>)	OCT3 (<i>SLC22A3</i>)	OCTN2 (<i>SLC22A5</i>)	OATP2B1 (<i>SLCO2B1</i>)
Minimalwert	0,03	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,05	< 0,05	< 0,05
Maximalwert	0,87	0,94	1,48	4,82	4,82	1,33	1,41	1,13
Spannweite	0,84	0,89*	1,43*	4,77*	4,77*	1,28	1,36*	1,08*
arithmetisches Mittel	0,1948	0,1684	0,2694	0,5161	0,6394	0,3435	0,4932	0,2654
Standartabweichung	0,1209	0,262	0,3175	0,6777	0,5993	0,2344	0,2841	0,2116
Variationskoeffizient	62,09%	155,60%	117,80%	131,30%	93,72%	68,23%	57,60%	80,00%
geometrisches Mittel	0,1654	-	-	-	-	0,2729	-	-
25% Perzentile	0,11	0	0	0	0,225	0,16	0,275	0,1
Median	0,18	0	0	0	0,54	0,28	0,46	0,22
75% Perzentile	0,23	0,285	0,49	0,845	0,845	0,485	0,7	0,4
Interquantilabstand	0,12	0,285*	0,49*	0,845*	0,62	0,325	0,425	0,3

4.5.1 Korrelation von Genexpression und Proteingehalt bei termingerechter Entbindung und gesunden Probandinnen

Für die Analyse einer möglichen Korrelation von Genexpression und Proteingehalt relevanter Arzneistofftransporter in der humanen Plazenta wurde die *Spearman* Rangkorrelation verwendet. Im Gegensatz zu der Darstellung des reinen Proteingehalts wurden Proben, die in der LC-MS/MS-Analytik unter der Bestimmungsgrenze von $< 0,05$ pmol/mg lagen, aufgrund von mathematisch statistischen Aspekten aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Entsprechend ergaben sich für die einzelnen Arzneistofftransporter unterschiedliche Stichprobengrößen, die in Tab. 4.3 aufgeführt sind.

Nur einer der acht untersuchten Transportproteine wies eine signifikante Korrelation von Genexpression und Proteingehalt auf. *ABCB1* bzw. P-gp (MDR1) zeigte hierbei einen positiv linearen Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von $r_s = 0,2293$ ($p = 0,006$). Die Effektstärke der Korrelation kann nach Cohen (1992) als schwach bis mittel angegeben werden (125). Die Korrelation ist in Abb. 4.8 dargestellt.

Die weiteren Ergebnisse der statistischen Analyse sind in der Tab 4.3 enthalten.

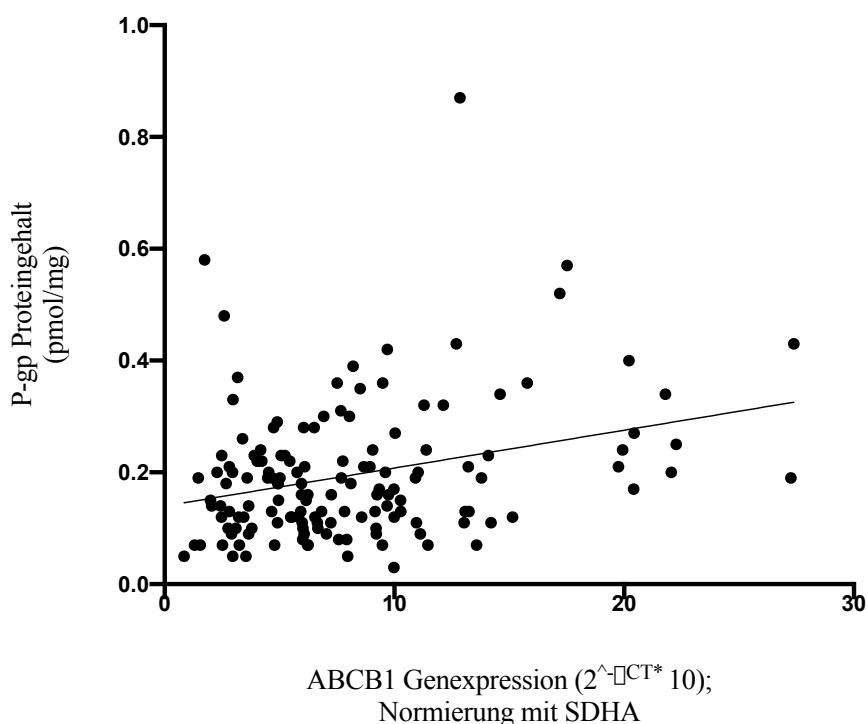


Abb. 4.8: Korrelation der Genexpression von *ABCB1* und des Proteingehalts von P-gp (N = 144)

Tab. 4.3: *Korrelationsanalyse von Genexpression und Proteingehalt von Arzneistofftransportern der humanen Plazenta* Ergebnisse der Rangkorrelation nach Spearman. Signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) sind fett und kursiv hervorgehoben

	ABCB1 P-gp	ABCC1 MRP1	ABCC2 MRP2	ABCC3 MRP3	ABCG2 BCRP	SLC22A3 OCT3	SLC22A5 OCTN2	SLCO2B1 OATP2B1
Spearman Korrelations- koeffizient	0,2293	0,2404	(-0,03503)	(-0,09185)	0,1448	0,1328	-0,07762	0,0767
95% Konfidenz- intervall	0,06346 - 0,3829	(-0,03457) - 0,4816	(-0,2511) - 0,1843	(-0,3246) - 0,1514	(- 0,02912) - 0,3102	(- 0,03574) - 0,2940	(-0,2433) - 0,09250	(- 0,09781) - 0,2466
p-Wert	0,006	0,077	0,7488	0,446	0,093	0,113	0,3568	0,3748
N	144	55	86	71	136	145	143	136

5. Diskussion

Die Blut-Plazenta-Schranke stellt die molekularbiologische Struktur dar, die den Stoff- und Informationsaustausch zwischen dem maternalen und fetalen Organismus ermöglicht. Die Mechanismen, die zur Überwindung der drei bis vier Schichten umfassenden Barriere zur Verfügung stehen, beinhalten neben den passiven Transportprozessen der Diffusion und der erleichterten Diffusion auch die aktiven Vorgänge der Pinozytose und Phagozytose, sowie den spezifischen Stofftransfer durch Transportproteine, der sowohl passiv als auch energieabhängig stattfinden kann (16).

Beispiele für Substrate, die passiv mithilfe von den oben genannten Prozessen transportiert werden, sind Glukose, welches mithilfe von verschiedene Glukosetransportern (GLUT1, GLUT3, GLUT4) durch erleichterte Diffusion in den fetalen Blutkreislauf gelangt, als auch Eisen, das gebunden an Transferrin und vermittelt durch den Transferrin-Rezeptor 1 durch Endozytose aufgenommen wird (13).

Beispiele für physiologische Substrate, die mithilfe eines energieabhängigen Transporters die Blut-Plazenta-Schranke überwinden sind das proinflammatorische Eikosanoid Leukotrien C₄, das durch das Protein MRP1 in den fetalen Blutkreislauf transportiert werden kann. Weitere Stoffe die durch MRP1 ebenfalls im Stande sind die Zellmembran in maternofetaler Richtung zu überschreiten sind sulfonierte Steroidhormone wie Estron-3-Sulfat (E3S) oder exogen zugeführte Substanzen wie Folsäure (126).

Die zuvor beschriebenen Wege des transplazentaren Stofftransportes mithilfe passiver als auch aktiver Prozesse ermöglichen es neben Nährstoffen, Spurenelementen und Hormonen allerdings auch potenziell teratogenen Substanzen, wie etwa die in der Therapie verschiedenster Erkrankungen eingesetzten Medikamente, den Fetus zu erreichen. Auf der anderen Seite stellen insbesondere die energieabhängigen Transporter auch ein effektives System zum Efflux von Xenobiotika dar, und dienen damit dem Schutz. Die möglichen Interaktionen sind dabei vor allem von der Richtung des durch den jeweiligen Transporter vermittelten Prozesses abhängig.

Beispielhaft transportieren die apikal gelegenen Arzneistofftransporter P-gp und BCRP Substrate vom Synzytiotrophoblasten in die mütterliche Blutzirkulation bzw. der basal lokalisierten Transporter OCT3 Stoffe aus dem fetalen Blut in den Synzytiotrophoblasten, wodurch der Fetus vor schädlichen Substanzen geschützt wird. Im Gegensatz dazu vermitteln OCTN2 und MRP1 einen Influx von Substraten in den Synzytiotrophoblasten bzw. in den fetalen Blutkreislauf und könnten damit akzidentiell den Fetus gegenüber teratogenen oder toxischen Substanzen exponieren (127).

Die relevanten Arzneistofftransporter der humanen Plazenta können anhand ihrer molekularbiologischen Struktur bzw. dem Spektrum transportierter Substrate in verschiedene Familien eingeteilt werden.

Die erste Familie ist die der ABC-Membranproteine, deren Gemeinsamkeit der aktive Transport von Substraten auch gegen bestehende Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch durch Hydrolyse von ATP ist. Eine Ausnahme diesbezüglich bilden drei ATP-abhängige Ionenkanäle (SUR1, SUR2, CFTR), die im Bereich der humanen Blut-Plazenta-Schranke allerdings keine Bedeutung haben (128). Die in dieser Promotionsarbeit dargestellten ABC-Membranproteine mit einer hohen Relevanz für den Transport von Arzneistoffen in der humanen Plazenta sind P-gp (*ABCB1*), MRP1 (*ABCC1*), MRP2 (*ABCC2*), MRP3 (*ABCC3*) und BCRP (*ABCG2*).

Eine zweite große Gruppe wird durch die SLC-Transporter gebildet, die sich in über 50 Genfamilien gliedern. Die SLC-Membranproteine nutzen entweder einen elektrochemischen Gradienten oder ein Konzentrationsgefälle aus, damit ihre jeweiligen Substrate die Zellmembran überwinden können (129). Im Gegensatz zu den ABC-Transportern weisen die SLC-Membranproteine in ihrer molekularen Struktur und ihren Transportmechanismen erhebliche Unterschiede auf, so dass die Einteilung in die jeweiligen Familien auf einem ähnlichen Spektrum an transportierten Substraten beruht (130). Die für den Arzneistofftransport der Blut-Plazenta-Schranke bedeutsamen SLC-Membranproteine umfassen drei Transporter die zwei verschiedenen Genfamilien entspringen. Aus der Familie *SLCO* (ehem. *SLC21*) konnte in dieser Arbeit der Transporter OATP2B1 (*SLCO2B1*) in hohen Mengen im placentaren Gewebe nachgewiesen werden. Mitglieder dieser Genfamilie umfassen die *organic anion transporting polypeptides* (OATP), welche vornehmlich hydrophilen organischen Anionen mit einer Größe von über 300Da das Überwinden der Zellmembran ermöglichen (131). Aus der Familie *SLC22* stammen zwei plazentarelevante Transportproteine. Das erste Transmembranproteine ist OCT3 (*SLC22A3*), welches zur Subfamilie der *organic cation transporter* (OCT) gehört. Transporter dieser Subfamilie sind Uniporter, die vornehmlich organischen Kationen mittels erleichterter Diffusion den Zellmembranübertritt ermöglichen. Insbesondere Monoamin - Neurotransmitter wie Serotonin, Dopamin und Noradrenalin werden durch OCT3 transportiert (132). Das zweite Transportprotein stellt OCTN2 (*SLC22A5*) dar, das der Subfamilie der *organic cation transporter novel* bzw. *organic cation/carnitine transporter* (OCTN) angehört. Interessanterweise besitzt OCTN2 zwei verschiedene Transportmechanismen. Der erste ist ein Natrium/Carnitin - Kotransport, der zweite ein natriumunabhängiger Uniport durch erleichterte Diffusion (133).

In der Abbildung Abb. 5.1 sind die in dieser Promotionsarbeit untersuchten und für den Arzneistofftransport relevant betrachteten Transporter mit ihrer Lokalisation innerhalb der Blut-Plazenta-Schranke abgebildet. Die Tabelle Tab. 5.1 zeigt nochmals ausgewählte Substrate der untersuchten Transportproteine.

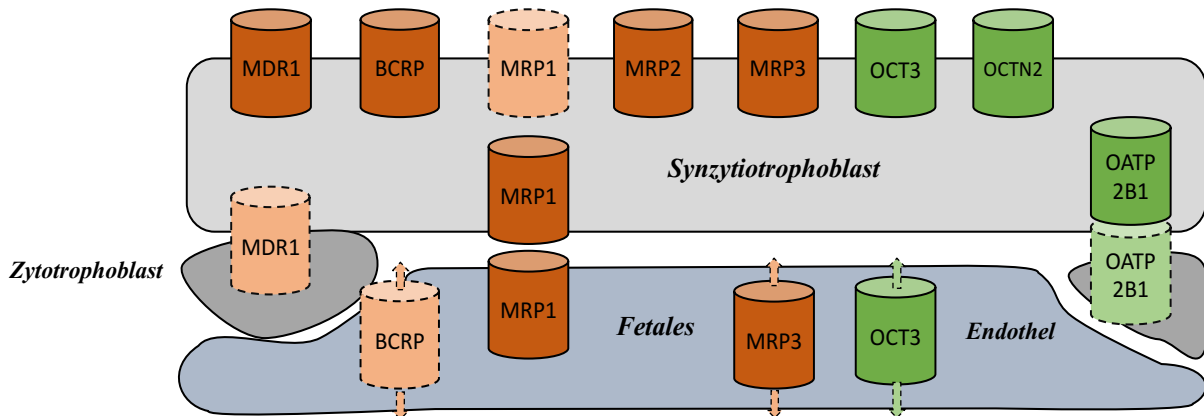


Abb. 5.1: *Relevante Arzneistofftransporter der Blut-Plazenta-Schranke* Darstellung der für den Arzneistofftransport relevanten ABC (braun) - und SLC (grün) - Transporter der humanen Blut-Plazenta-Schranke. Transporter mit schwacher Expression sind hellbraun/- grün mit gepunkteter Umrandung dargestellt. Die Lokalisation von BCRP, MRP3 und OCT3 im fetalen Endothel sind bisher nicht bekannt.

Tab. 5.1: *Ausgewählte Substrate der relevanten Arzneistofftransporter der humanen Plazenta*

Transporter	Ausgewählte Substrate
MDR1	Digoxin, Loperamid, Irinotecan, Doxorubicin, Vinblastin, Paclitaxel, Fexofenadin
BCRP	Statine, MTX, Irinotecan, Topotecan, Mitoxantrone, Imatinib, Sulfat-Konjugate
MRP1	Difloxacin, MTX, Irinotecan, Topotecan, Ritonavir, Glucuronid/Sulfat-Konjugate
MRP2	Valsartan, Olmesartan, MTX, Mitoxantron, Etoposide, Gluthation/Glucuronid-Konjugate
MRP3	MTX, Fexofenadin, Glucuronid-Konjugate
OCT3	Metformin, Cimetidin, Atropin, Lidocain, Oxaliplatin, Lamivudine, Katecholamine
OCTN2	Verapamil, Amisulpirid, Colistin, Etoposide, Oxaliplatin, Imatinib, L-Carnitin
OATP2B1	Statine, Sartane, Triptane, Sulfasalazin, Glyburide, MTX, Doxorubicin, Imatinib

5.1 Genexpression im zeitlichen Verlauf der Gestation

Die im vorherigen Abschnitt genannten acht Transportproteine konnten durch diese Promotionsarbeit in der Blut-Plazenta-Schranke in relevanter Menge auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden, und stellen damit potenziell wichtige Strukturen für den Influx und Efflux von Arzneistoffen dar. Der dadurch vermittelte Kontakt bzw. Schutz des Fetus gegenüber den jeweiligen Substratspektren der einzelnen Transportproteine kann dabei entscheidend für die Teratogenität einer Substanz sein.

Die Anzahl der Studien bezüglich der Expression der genannten Arzneistofftransporter in der humanen Plazenta zum Zeitpunkt des errechneten Geburtstermins, sowie der Veränderung von Expressionsmustern im Verlauf der Gestation oder bei Diagnose bedeutsamer Schwangerschaftserkrankungen wie Gestationsdiabetes oder (Prä-)Eklampsie ist, wie es in der folgenden Diskussion im Einzelnen aufgezeigt wird, gering und enthält teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Weitergehend ist die Aussagekraft der Arbeiten aufgrund der häufig sehr geringen Probenanzahl deutlich eingeschränkt. Die Aufgabe dieser Promotionsarbeit war entsprechend, die systematische Darstellung der Expressionsmuster auf mRNA- und Proteinebene und die mögliche Korrelation der erhaltenen Daten. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sollen in den folgenden Abschnitten mit der gegenwärtigen Studienlage verglichen und diskutiert werden. Es erfolgt dabei zunächst die einzelne Betrachtung der untersuchten Arzneistofftransporter für den Verlauf einer komplikationslosen Gestation und abschließend die Diskussion der Veränderungen im Rahmen der Gestosen des Gestationsdiabetes und der (Prä-)Eklampsie.

ABCB1, welches das Transportprotein P-gp (MDR1) kodiert, stellt das am drittstärksten exprimierte Gen der untersuchten Arzneistofftransporter dar. Es konnte in dieser Promotionsarbeit gezeigt werden, dass die Expressionsstärke bei gesunden Probandinnen große interindividuelle Unterschiede aufweist. Diese Resultate stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Gil et al. (2005) die ebenfalls eine große Variabilität zwischen den einzelnen Probandinnen aufzeigten (134).

Ursächlich hierfür könnte das Vorliegen von verschiedenen *single nucleotid polymorphism* (SNP) innerhalb der Studienpopulation mit konsekutiven Veränderungen der Expressionsstärke sein. Tanabe et al. (2001) konnten hierbei zeigen, dass das Auftreten der Mutationen T-129C und G2677A/T zu einer Abnahme des Proteingehaltes von P-gp in der humanen Plazenta führt. Der häufigste Polymorphismus C3435T hingegen führte zu keiner Veränderung des Proteingehaltes (135). Eine weitere Arbeit bezüglich der Auswirkung von SNP im *ABCB1*-Gen in der humanen Plazenta von Hitzl et al. (2004) zeigte ein konträres Ergebnis. Hier wurde eine Abnahme von P-gp bei Vorliegen der Mutation C3435T

festgestellt. G2677A/T hingegen führte nur bei zusätzlichem Auftreten einer C3435T-Mutation zu einer weiteren Abnahme der Proteinkonzentration. Des Weiteren untersuchten die Autoren auch mögliche Veränderungen der mRNA von *ABCB* bei den SNP C3435T und G2677A/T, wobei keine signifikanten Alterationen des Expressionsmusters nachgewiesen werden konnte (136). Das *Exome Sequencing Project* des *National Heart, Lung and Blood Institute* weist in seiner Datenbank mit Stand vom 22.04.2021 171 SNP in der kaukasisch und 138 SNP in der afrikanisch-stämmigen amerikanischen Bevölkerung auf (137). Die Auswirkung der meisten dieser genetischen Polymorphismen auf die Expressionsstärke der mRNA von *ABCB1* bzw. des Proteins P-gp ist bisher nicht bekannt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Auftreten von SNP in der Studienpopulation wahrscheinlich einen Anteil zu den erheblichen interindividuellen Unterschieden der Expressionsstärke beigetragen hat, wobei zur genauen Einschätzung der Effekte weitere Studien notwendig sind.

Weitergehend könnten die starken Unterschiede auch durch eine zirkadiane Veränderung der Expression von *ABCB1*, die Einnahme bestimmter Nahrungsmittel (z.B. Grapefruitsaft, Grüner Tee), subklinisch verlaufende Infektionen und Krankheiten oder lokale Ischämien begünstigt sein (138–146). Für die genannten Einflussfaktoren muss einschränkend bemerkt werden, dass ein Großteil der Studien Tiermodelle verwendet hat und die Expression in intestinalen, hepatischen bzw. renalen Geweben untersucht wurde. Darüber hinaus wurde in einigen Studien nicht die direkte Expression, sondern die Aufnahme von P-gp-spezifischen Substraten gemessen, so dass keine Unterscheidung getroffen werden kann, ob eine Veränderung der Gen- bzw. Proteinexpression, posttranslationale Modifikationen oder kompetitive bzw. nicht-kompetitive Hemmungen für die Unterschiede ursächlich waren.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine Abnahme des mRNA-Gehaltes im Verlauf des letzten Trimesters der Schwangerschaft von *ABCB1* zum errechneten Geburtstermin. Hierdurch konnten die Beobachtungen mehrerer Arbeitsgruppen, die auf mRNA- und Proteinebene einen progredienten Abfall der Expressionsstärke im Verlauf der Gestation beginnend vom Maximum in der 6. SSW beschrieben haben, gestützt werden (32,134,147,148).

Die Funktion von P-gp mit seinem breiten Spektrum an Substraten (Tab. 5.1) liegt im Schutz des Fetus vor potenziell teratogenen bzw. toxischen Substanzen. Die in Mausmodellen gewonnen Erkenntnisse, dass ein Verlust von den in Nagetieren äquivalenten Genen *mdr1a/mdr1b* zu einem Anstieg von P-gp-Substraten im Fetus führt und daraus folgend ein essentieller Bestandteil der Blut-Plazenta-Schranke ist, konnte durch mehrere Arbeitsgruppen anhand von humanen Plazenta-Perfusions-Modellen bestätigt werden (149–151). Warum es im Verlauf der Gestation zu einer Abnahme des Gehalts von *ABCB1* und P-gp kommt, ist derzeit unklar. Als mögliche Ursache kann angenommen werden, dass der Fetus zu Beginn

der Schwangerschaft eine höhere Vulnerabilität für teratogene Effekte aufweist und entsprechend einen stärkeren Schutz benötigt, der durch einen höheren Gehalt an P-gp geleistet werden könnte.

ABCG2 wird stark in der humanen Plazenta zum termingerechten Entbindungszeitpunkt exprimiert, und stellt das viertstärkste der acht betrachteten Transporter dar. Es kodiert für das Transportprotein BCRP. Die anhand dieser Studie gewonnenen Daten zeigen weiterhin im Verlauf des letzten Trimesters einen Trend zu einem Abfall der mRNA zum errechneten Geburtstermin hin, wobei keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten. Diese Resultate stimmen mit den Ergebnissen von Meyer zu Schwabedissen et al. (2006) überein, in der ebenfalls ein Abfall der mRNA von *ABCG2* und simultan von BCRP im dritten Trimester gezeigt werden konnte (152). Zwei weitere Studien, die den Verlauf der mRNA von *ABCG2* über die gesamte Schwangerschaft betrachteten, zeigten eine stabile Expressionsstärke ohne signifikante Unterschiede zwischen den Trimestern. Bezüglich der Veränderungen von BCRP ergaben diese Arbeiten allerdings gegensätzliche Ergebnisse. Während Mathias et al. (2005) eine konstante Expression über die gesamte Gestation zeigten, konnte die Arbeitsgruppe von Yeboah et al. (2006) einen signifikanten Anstieg des Transportproteins zum Zeitpunkt einer termingerechten Entbindung nachweisen (34,147). Wiederum andere Resultate wurden durch die Arbeitsgruppe von Anoshchenko et al. (2020) generiert. Hier konnte ein signifikanter Abfall des Proteingehalts von BCRP um 55 % vom ersten zum dritten Trimester und um 42 % vom zweiten zum dritten Trimester nachgewiesen werden (148).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die aktuelle Studienlage als sehr inhomogen darstellt. Entsprechend wurden die vorhandenen Arbeiten kritisch auf vorliegende Limitationen geprüft, um die Veränderungen von *ABCG2* und BCRP im zeitlichen Verlauf der Gestation besser einschätzen zu können.

Bei Mathias et al. (2005) und Yeboah et al. (2006) werden die Resultate vorrangig durch die geringe Größe der Studienpopulation (N = 16 bzw. N = 29) kompromittiert. Weitergehend fehlten in beiden Studien Angaben, ob termingerecht oder frühgebärende Probandinnen unter Gestosen wie z.B. (Prä-)Eklampsie, Gestationsdiabetes oder einer systemischen Infektion mit potenziellen Auswirkungen auf die Gen- und Proteinexpression litten. Darüber hinaus existieren bei Yeboah et al. (2006) keine Daten bezüglich der Gewebeproben aus Schwangerschaftsabbrüchen, ob diese aus medizinischer Indikation oder elektiv durchgeführt wurden. Bezogen auf die Probenanzahl weisen die Publikationen von Anoshchenko et al. (2020) und Meyer zu Schwabedissen et al. (2006) mit N = 49 bzw. N = 58 eine ausreichende Größe auf. Bei Anoshchenko et al. (2020) fehlt bezüglich des Probenmaterials aus

Frühschwangerschaften die Information, wodurch diese erhalten wurden (z.B. elektiver Abort, spontan Abort, Biopsiematerial).

Auf die Genexpressionsanalyse bezogen, wurde in den Arbeiten von Mathias et al. (2005) und Yeboah et al. (2006) keine Kontrolle der RNA-Integrität nach erfolgter Isolation durchgeführt. Hierdurch besteht die Möglichkeit, dass die erhaltenen Resultate durch eine schwankende RNA-Qualität beeinflusst wurden. Die isolierte mRNA in der Studie von Meyer zu Schwabedissen et al. (2006) wurde hingegen mittels einer Elektrophorese in Agarose-Gel nach Ethidium-Bromid-Färbung kontrolliert, so dass die erhaltenen Ergebnisse der Genexpression eine höhere Validität besitzen.

Bezüglich der Proteinexpression ist anzumerken, dass die Analyse ausschließlich bei Anoshchenko et al. (2020) mittels dem aktuellen Goldstandard der LC-MS/MS-Technik erfolgte, wohingegen Mathias et al. (2005), Yeboah et al. (2006) und Meyer zu Schwabedissen et al. (2006) die semiquantitative Bestimmung durch ein Western-Blot durchgeführt haben.

Abschließend ist nach der kritischen Betrachtung der einzelnen Studien von einer Abnahme der Konzentration von *ABCG2* und *BCRP* über die Gestation und vor allem im dritten Trimester auszugehen. Zur weiteren Validierung dieser Annahme sind ergänzende Studien mit einer entsprechend großen Anzahl an Proben und systemischen Erhebungen von Komorbiditäten als mögliche Einflussfaktoren erforderlich.

Die ABC-Transporter *ABCC1*, *ABCC2* und *ABCC3* zeigten in der Blut-Plazenta-Schranke die geringste mRNA-Expression von den als für den Arzneistofftransport relevant eingestuften Transportproteinen.

ABCC1 weist in den Proben, die für dieser Arbeit ausgewertet wurden, im Verlauf des letzten Trimesters keine Änderung der Expressionsstärke auf. Mason et al. (2011) konnten ebenfalls aufzeigen, dass es zu keinem Abfall oder Anstieg der Genexpression im Vergleich von plazentarem Gewebe aus Frühgeburten (25. – 33. SSW) zu Termingeburten kommt. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe die Ergebnisse auch auf Proteinebene reproduzieren (153). Pascolo et al. (2003) zeigten jedoch, dass die mRNA von *ABCC1* vom ersten (9. – 10. SSW) zum dritten Trimester (38. – 42. SSW) um das Vierfache ansteigt (154). Zusammenfassend spricht die aktuelle Studienlage für einen Anstieg der Genexpression zu Beginn der Schwangerschaft um im letzten Trimester wiederum eine konstante Stärke zu behalten.

Die Genexpression von *ABCC2* zeigt nach gegenwärtiger Studienlage laut Meyer zu Schwabedissen et al. (2005) sowohl im letzten Trimester, und nach Pascolo et al. (2003) auch über den gesamten Zeitraum der Gestation einen Anstieg der Expressionsstärke (154,155).

Die in dieser Promotionsarbeit generierten Daten konnten innerhalb des dritten Trimesters hingegen keine signifikanten Veränderungen der mRNA von *ABCC2* nachweisen. Entsprechend dieser kontroversen Datenlage sind weitere Expressionsstudien von *ABCC2* notwendig. Dabei sollte eine besondere Betrachtung möglicher exogener bzw. endogener beeinflussender Faktoren stattfinden. Beispielhaft führt das Flavonoid Hesperidin, welches in vielen Zitrusfrüchten enthalten ist, im Tiermodell zu einem Abfall des mRNA-Gehaltes von *ABCC2* in Leber und gastrointestinalem Gewebe (156). Extrakte von Ginkgo biloba hingegen verursachten im *in vitro* Zellmodell einen Anstieg der Genexpression (157). Entsprechend sind in Analogie Veränderungen der Expression im Bereich der humanen Plazenta denkbar.

In den generierten Daten weist die mRNA von *ABCC3* im Verlauf des dritten Trimesters einen leichten Anstieg der Expressionsstärke auf, ohne dabei das Signifikanzniveau zu erreichen. Der in dieser Promotionsarbeit dargestellte leichte Anstieg unterstützt die von Imperio et al. (2019) gefundene deutliche Zunahme des mRNA-Gehaltes vom ersten (7. - 9. SSW) bis zum dritten Trimester (> 37. SSW) um mehr als das Vierfache (158). Die Ergebnisse von Pascolo et al. (2003) hingegen konnten keine Änderung der Genexpression von *ABCC3* im zeitlichen Verlauf der Gestation zeigen (9. - 10. SSW; 38. - 42. SSW) (154). Zusammenfassend spricht die gegenwärtige Datenlage für einen Anstieg der Genexpression von *ABCC3* in der humanen Plazenta im Verlauf der Gestation.

Bei den in dieser Promotionsarbeit ausgewerteten Proben zeigte *SLC22A3* die stärkste Genexpression zum Zeitpunkt der termingerechten Entbindung. Weitergehend konnte dargestellt werden, dass der mRNA-Gehalt von *SLC22A3* in der humanen Plazenta im Verlauf des dritten Trimesters zunächst eine Tendenz zur Abnahme der Expression zeigt, wobei allerdings das Signifikanzniveau nicht erreicht wird. Am errechneten Geburtstermin hingegen kommt es wieder zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression. Zwei weitere Studien untersuchten ebenfalls den Verlauf der Expression der mRNA innerhalb der Gestation. Ahmadimoghaddam et al. (2013) konnten dabei zwischen dem ersten Trimester (9. - 12. SSW) und dem dritten Trimester (38. - 40. SSW) einen Abfall der Genexpression darstellen (159). Lee et al. (2013) hingegen konnten über die gesamte Schwangerschaft in den einzelnen Trimestern (6. - 12 SSW; 13. - 25. SSW; 38. - 42. SSW) keine Veränderung nachweisen (160). Bezüglich des Verlaufes der Proteinexpression zeigten Anoshchenko et al. (2020) einen signifikanten Anstieg des kodierten Transporters OCT3 im Vergleich vom ersten Trimester zur termingerechten Entbindungen um den Faktor 2 (148). Insgesamt ist die Studienlage der Genexpression sehr widersprüchlich. Nimmt man ein ähnliches Verhalten von Gen- und Proteinexpression an, so zeichnet sich gegenwärtig eher ein Anstieg von *SLC22A3*/OCT3 im zeitlichen Verlauf der Schwangerschaft ab. Abschließend kann festgehalten werden, dass weitere Studien auf mRNA- und Proteinebene zur Bestätigung dieser Annahme zwingend notwendig sind.

Die Genexpression von *SLC22A5*, welches für das Transportprotein OCTN2 kodiert, zeigte im Vergleich der untersuchten Gene dieser Studie eine mittelgradige Expressionsstärke und liegt zum Zeitpunkt der termingerechten Entbindung auf Platz fünf der untersuchten Arzneistofftransporter. In dieser Studie zeigte der mRNA-Gehalt im Verlauf des letzten Trimesters einen kontinuierlichen und signifikanten Anstieg. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von Bai et al. (2019), die auf mRNA- und Proteinebene einen Anstieg zwischen dem ersten Trimester (8. - 10. SSW) und dem dritten Trimester (38. - 40. SSW) feststellen konnten (161). Grube et al. (2005) publizierten hingegen widersprüchliche Daten, die für das letzte Trimester im Vergleich von Frühgeburten (< 37. SSW) und Termingeburten (38. - 42. SSW) eine leichte Abnahme der mRNA um 15 % beschreiben. Hierbei wurde allerdings das Signifikanzniveau nicht erreicht (48). Zusammenfassend spricht die gegenwärtige Studienlage für eine kontinuierliche Zunahme der Gen- und Proteinexpression im zeitlichen Verlauf der Gestation.

Der Grund für den Anstieg von *SLC22A5* und OCTN2 ist höchstwahrscheinlich durch seine Funktion als Transporter für L-Carnitin begründet. Das Transmembranprotein stellt in der Blut-Plazenta-Schranke den bedeutsamsten Transporter für L-Carnitin dar (48,49,161). Eine ausreichende perinatale Versorgung mit L-Carnitin ist für den Fetus essenziell. Es wird vor allem nach der Entbindung für eine ausreichende Deckung des gestiegenen Energiebedarfs des Neugeborenen, welcher postnatal hauptsächlich durch β -Oxidation gewonnen wird, benötigt. Weitergehend ist L-Carnitin ein wichtiger Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette und spielt durch seine Beteiligung in der Surfactant-Produktion eine entscheidende Rolle für die pränatale Lungenreifung (162). Die Studien von Nakano et al. (1989) und Shenai et al. (1984) konnten aufzeigen, dass der Gehalt von L-Carnitin im fetalen Gewebe im Verlauf der Schwangerschaft zunimmt und zum errechneten Geburtstermin sein Maximum erreicht (163,164).

Ein Anstieg der Expression von *SCL22A5* bzw. OCTN2 im Verlauf der Gestation ermöglicht es allerdings auch, aufgrund der maternofetalen Richtung des Transportes, dass vermehrt kationischen Xenobiotika mit potenziell toxisch oder teratogenen Effekten den Fetus erreichen können. Überraschend ist, wie in dieser Promotionsarbeit auch dargestellt, dass es im gleichen Zeitintervall zu einem Abfall der *ABCB1*- bzw. P-gp-Expression in der humanen Plazenta mit konsekutivem Verlust von Transportkapazitäten auf der Seite der Effluxtransporter kommt, wodurch die Schutzfunktion der Blut-Plazenta-Schranke zusätzlich geschwächt wird.

Abschließend kann konstatiert werden, dass ein Anstieg der Expression von *SLC22A5* und OCTN2 aus physiologischen Aspekten für eine ausreichende Versorgung des Fetus mit L-Carnitin sinnvoll erscheint. Der durch den höheren Expressionslevel des Transporters

möglicherweise ebenfalls gestiegene Influx von Xenobiotika erscheint durch die verminderte Vulnerabilität des Fetus für teratogene Effekte im Verlauf der Gestation als tolerabel.

SLCO2B1, welches das Transportprotein OATP2B1 kodiert, zeigte zum Zeitpunkt des errechneten Geburtstermins unter den untersuchten Transportern die zweithöchste Genexpression. Im Verlauf des letzten Trimesters der Schwangerschaft konnte in dieser Promotionsarbeit eine konstante Expressionsstärke der mRNA aufgezeigt werden. Widersprüchliche Resultate wurden von Petrovic et al. (2015) erzielt. Hier zeigte sich eine Abnahme der Genexpression von *SLCO2B1* von Frühgeburten ($32,8 \pm 2,5$ SSW) zu Termingeburten ($39,0 \pm 0,8$ SSW) auf mRNA-Ebene. In der simultan durchgeführten Bestimmung des kodierten Transporters OATP2B1 konnte hingegen keine signifikanten Veränderungen aufgezeigt werden (165). Eine weitere Untersuchung von Anoschenko et al. (2020) verglich die Expression von OATP2B1 auf Proteinebene in den einzelnen Trimestern. Hierbei konnte dargestellt werden, dass der Probengehalt vom ersten ($9 \pm 1,5$ SSW) zum zweiten Trimester ($16,7 \pm 2,8$ SSW) signifikant abfiel und im weiteren Verlauf bis zum termingerechten Geburtstermin konstant blieb (148). Die gegenwärtige Studienlage zur Expression von *SLCO2B1* bzw. OATP2B1 in der humanen Plazenta ist sehr begrenzt. Zusätzlich weisen die bisher veröffentlichten Arbeiten von Petrovic et al. (2015) und Anoshchenko et al. (2020) mit $N = 29$ bzw. $N = 49$ im Vergleich zu dieser Promotionsarbeit mit $N = 245$ eine vergleichsweise geringe Probenzahl auf. Trotzdem unterstützen die Ergebnisse von Anoschenko et al. (2020) die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate, dass die Expression von *SLCO2B* und OATP2B1 im letzten Trimester keine Veränderung aufweist. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die aktuelle Studienlage einen Abfall von OATP2B1 vom ersten zum zweiten Trimester beschreibt und sich im Verlauf des letzten Trimesters eine konstante Expression von *SLCO2B1* und OATP2B1 einstellt. Weiterführende Studien, die sowohl die Expression der mRNA von *SLCO2B1* als auch des Transportproteins OATP2B1 betrachten, sind für die Bestätigung dieser Annahme unabdingbar.

Die starke Expression von *SLCO2B1* und OATP2B1 kann zum einen darin begründet sein, dass der im Synzytiotrophoblasten basal exprimierte Transporter mit seinem breiten Spektrum an transportierten Substraten einen wichtigen Anteil der Barrierefunktion der Blut-Plazenta-Schranke bildet, um den fetalen Organismus vor potenziell schädlichen Xenobiotika zu schützen. Andererseits stellt OATP2B1 zusammen mit OAT4 die in der humanen Plazenta wichtigsten Transporter für sulfonierte Steroide, wie z.B. E3S und DHEAS, dar (57,166). Beide Substrate müssen aktiv in die Plazenta transportiert werden, damit sie dort zu Östrogenen weiter verstoffwechselt werden können. Das plazentare Gewebe ist aufgrund des Fehlens des Enzyms Steroid-17 α -Hydroxylase/17,20 Lyase nicht imstande selbständig die genannten Vorstufen zu produzieren, so dass der Transport von E3S und

DHEAS ein essenzieller Teilprozess ist, damit die Plazenta ihre Aufgabe eines endokrinen Organs erfüllen kann (167).

Ein weiterer Teil dieser Promotion befasste sich mit der Veränderung der Genexpression von relevanten Arzneistofftransportern bei den häufigsten Gestosen.

5.2 Genexpression bei Gestationsdiabetes

In der Einleitung wurde bereits dargestellt, dass bei Auftreten eines Gestationsdiabetes über inflammatorisch wirksame Zytokine eine komplexe Signalkaskade aktiviert wird, in deren Rahmen eine Veränderung von relevanten Transportproteinen im Bereich der Blut-Plazenta-Schranke als möglich erscheint.

Die in dieser Dissertation erzeugten Ergebnisse konnten diese Annahme bestätigen. Hierbei ist ersichtlich, dass bei Vorliegen eines Gestationsdiabetes eine signifikante Veränderung des mRNA-Gehaltes bei drei der acht untersuchten Transporter auftrat.

ABCC1 wies hierbei eine Abnahme der Genexpression im humanen placentaren Gewebe auf. Die Resultate der Arbeitsgruppe von Kozłowska-Rup et al. (2014), die immunhistochemisch den von *ABCC1* kodierten Transporter MRP1 in gesunden und an Gestationsdiabetes erkrankten Probandinnen dargestellt haben, unterstützen diese Ergebnisse. In der genannten Arbeit konnte eine Abnahme der Expression des Transportproteins im Bereich des Synzytiotrophoblasten bei Vorliegen eines Gestationsdiabetes gezeigt werden (168). Eine mögliche Erklärung für die Abnahme des Gehalts von *ABCC1* bzw. MRP1 könnte die zelluläre Antwort auf die Zunahme von oxidativem Stress und damit reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen eines Gestationsdiabetes sein. Mueller et al. (2005) konnten exemplarisch in Endothelzellen feststellen, dass MRP1 für die Exkretion von Glutathion-Disulfid (GSSG) aus der Zelle verantwortlich ist. Durch eine Abnahme des Transportproteins würde folglich GSSG in der Zelle akkumulieren und aufgrund der beschriebenen gleichzeitigen Zunahme der Aktivität der Glutathion-Reduktase, das Redoxpotential der Zelle durch einen höheren Gehalt von Glutathion vergrößern, wodurch der oxidative Stress auf zellulärer Ebene abgefangen werden könnte (169).

Weiterhin zeigte sich im placentaren Gewebe der Probandinnen bei vorliegenden Gestationsdiabetes ein signifikanter Abfall der Expression von *SLC22A3*. Weitere Studien, die die Veränderung von *SLC22A3* bzw. OCT3 bei Gestationsdiabetes bzw. die Expression in der humanen Plazenta betrachten, sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht vorhanden.

Publikationen zu *SLC22A3* bzw. OCT3 bei Diabetes mellitus Typ 2 hingegen sind reichlich vorhanden. Das Interesse für diesen Transporter beruht auf dem ubiquitären Vorkommen des

Proteins und seinen Transportfähigkeiten für das orale antidiabetische First-Line-Medikament Metformin (170). Infolge der zunehmenden Bedeutsamkeit einer individualisierten Arzneimitteltherapie entstanden entsprechend mehrere Studien, die sich mit genetischen Polymorphismen von *SLC22A3* in Bezug auf einen Diabetes mellitus beschäftigten. In einer genetischen Studie innerhalb einer iranischen Population konnten Mahrooz et al. (2016) zeigen, dass der SNP rs3088442 G>A, der sich in der 3'-UTR-Region des *SLC22A3*-Gens befindet, mit einem signifikant geringeren Risiko für das Auftreten eines Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist (171). Durch die Mutation wird die 3'-UTR-Region in ihrer Struktur so verändert, dass die microRNA-147 eine höhere Bindungsaffinität besitzt (172). Diese Interaktion bewirkt dabei eine Verringerung der Expression der mRNA von *SLC22A3* sowie des Gehaltes des Transportproteins OCT3 im Gewebe (62). Entsprechend ist bei vorliegender diabetischer Stoffwechsellage eher von einer Erhöhung der Expression von *SLC22A3* und OCT3 auszugehen. Auf dieser Grundlage ist es überraschend, dass *SLC22A3* in der humanen Plazenta bei Gestationsdiabetes erniedrigt ist. Wenn man allerdings die hieraus folgenden Veränderungen für das Gewebe – Reduktion des proinflammatorischen Zytokin IL6, Verringerung der Interaktion von Leukozyten und Endothel, verminderte Monozyteninfiltration – in Betracht zieht, erscheint die Abnahme der Konzentration von *SLC22A3* bzw. des Gehalts von OCT3 nachvollziehbar. Hierdurch könnten die in der Einleitung beschriebenen proinflammatorischen Prozesse, die im Rahmen des Gestationsdiabetes auftreten im Gewebe der Plazenta abgemildert werden (172).

SLCO2B1 zeigte ebenfalls in der humanen Plazenta einen signifikanten Abfall der Expression bei Vorliegen eines Gestationsdiabetes. Auch für diesen Transporter gibt es aktuell keine weiteren Publikationen, welche die Veränderung im Rahmen eines Gestationsdiabetes betrachten. Eine Studie von Gravel et al. (2019), die die Veränderung von Enzymen und Transportern im humanen Duodenum bei Auftreten eines Diabetes mellitus Typ 2 betrachtet, konnte einen Anstieg der *SLCO2B1*-Expression um ca. 20 % zeigen (173). In Analogie zu *SLC22A3* bzw. OCT3 zeigt sich eine inverse Veränderung der Expression bei Auftreten eines Gestationsdiabetes in der Plazenta im Vergleich zu der Reaktion von Gewebe bei Diabetes mellitus Typ 2. Studien, welche die molekularbiologischen Auswirkungen bzw. Ursachen des Anstiegs von *SLCO2B1* bei Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 betrachten, existieren derzeit nicht. Folgend kann auch keine Ableitung bezüglich der Abnahme der Expression von *SLCO2B1* in der humanen Plazenta vorgenommen werden.

Für die fünf weiteren Transportproteine zeigte sich keine signifikante Veränderung der Genexpression. Diese Ergebnisse werden durch die Resultate von Anger et al. (2012) für zwei Arzneistofftransporter unterstützt. Die Arbeitsgruppe konnte darstellen, dass die mRNA von *ABCG2* und *ABCC2* keine quantitativen Veränderungen bei Auftreten eines Gestationsdiabetes erfahren. Weitergehend konnte aufgezeigt werden, dass die kodierten

Transporter BCRP bzw. MRP2 keine Änderung ihrer Expressionsstärke aufwiesen. Widersprüchlich hingegen sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe zur Expression von *ABCB1*, welche im Gegensatz zu den Resultaten dieser Promotionsarbeit einen signifikanten Anstieg der mRNA von *ABCB1* nachweisen konnte. Dieses führte allerdings zu keiner Veränderung des Proteingehaltes von P-gp, so dass anzunehmen ist, dass die Transportfunktion der Blut-Plazenta-Schranke unbeeinflusst bleibt (174). Demzufolge sind weitere Studien nötig, die die Änderung der mRNA von *ABCB1* betrachten, um eine endgültige Aussage treffen zu können.

In Zusammenschau der in dieser Promotionsarbeit generierten Daten zur Veränderung des Expressionsmusters relevanter Arzneistofftransporter in der humanen Plazenta mit den in der Literatur bekannten Auswirkung der Veränderung der beschriebenen Transportproteine bei Diabetes mellitus Typ 2 ergibt sich Anhalt, dass die Abnahme der Expression der Transporter MRP1 (*ABCC1*) und OCT3 (*SLC22A3*) dazu dienen, die im Rahmen der diabetischen Stoffwechsellage entstehenden negativen Auswirkungen auf das plazentare Gewebe durch oxidativen Stress bzw. proinflammatorische Reaktionen abzdämpfen. Weitere Studien, die sich explizit den molekularbiologischen Folgen der beschriebenen Änderungen der Expression im plazentaren Gewebe bei Diagnose eines Gestationsdiabetes widmen sind notwendig um diese Annahme zu bestätigen. Ebenso werden weitere Studien benötigt, um die Ursache bzw. Auswirkung der Abnahme der Expression von *SLCO2B1* bzw. *OATP2B1* einzuschätzen.

5.3 Genexpression bei (Prä-)Eklampsie

Die zweite Gestose, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit auf Veränderungen der Genexpression relevanter Arzneistofftransporter untersucht wurde, ist die Eklampsie bzw. deren Vorstufe die Präeklampsie. Bei Vorliegen dieser Erkrankungen kommt es, wie bereits in der Einleitung erörtert, zu einer anomalen Plazentation mit hypoxischen Zuständen, die im Endeffekt zu einer Inhibition von Signalmolekülen wie TFG- β 1, VEGF und PlGF führen. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Aktivierung von Tyrosinkinasen und damit der Signalübertragung in die jeweilige Zelle, so dass eine Veränderung von relevanten Transportproteinen im Bereich der Blut-Plazenta-Schranke im Rahmen einer fehlenden Aktivierung von Signalkaskaden als möglich erscheint.

Die Resultate, die in dieser Promotionsarbeit erzeugt wurden, konnten diese Annahme bestätigen. Bei Vorliegen einer (Prä-)Eklampsie zeigten sich signifikante Veränderungen des mRNA-Gehaltes von drei der acht untersuchten Arzneistofftransporter.

Aus der Familie der ABC-Transporter wies lediglich *ABCC2* eine Veränderung der Genexpression auf. Die mRNA des Genes, welches für den Transporter MRP2 kodiert, zeigte

bei Auftreten einer (Prä-)Eklampsie eine Abnahme der Expression im plazentaren Gewebe. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Yu et al. (2019) unterstützen diese Resultate. In der genannten Publikation konnte sowohl eine Reduktion der Genexpression von *ABCC2* als auch eine Verringerung des Proteingehalts von MRP2 dargestellt werden (175). Gegensätzliche Ergebnisse hingegen wurden durch Williams et al. (2012) generiert, die im Rahmen einer (Prä-)Eklampsie keine Veränderungen der mRNA von *ABCC2* oder des Proteingehalts von MRP2 zeigen konnten. Die Aussagekraft dieser Arbeit ist allerdings aufgrund signifikanter Unterschiede der beiden Stichproben in Bezug auf Geburtstermin (Kontrollgruppe: $39,4 \pm 1,1$ SSW; (Prä-)Eklampsie: $37,6 \pm 2,6$ SSW; $p < 0,05$) und dem Homocystein-Spiegel im fetalen (Kontrollgruppe: $12,3 \pm 1,7$ $\mu\text{mol/L}$; (Prä-)Eklampsie: $7,6 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,05$) und maternalen Blut (Kontrollgruppe: $9,9 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/L}$; (Prä-)Eklampsie: $7,6 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,05$) kritisch zu bewerten (176). Die unterschiedlichen Entbindungszeitpunkte dürften zu mindestens für die Genexpression von *ABCC2* irrelevant sein, da, wie in dieser Promotionsarbeit bereits dargestellt, es zu keiner signifikanten Änderung der Expressionsstärke der mRNA im letzten Trimester kommt.

In Würdigung der aktuellen Studienlage ist bei Diagnose einer (Prä-)Eklampsie gegenwärtig von einer Reduktion der Genexpression von *ABCC2* und der Proteinfraction von MRP2 auszugehen. Folgend käme es zu einer Abnahme der Effluxkapazitäten des Synzytiotrophoblasten, wodurch die Schutzfunktion der Plazenta eingeschränkt würde. In Betrachtung weiterer pathophysiologischer Aspekte könnte eine Reduktion von *ABCC2*/MRP2 allerdings auch den Schutz von Plazenta und Fetus verbessern. Zu den Substraten von MRP2 gehört neben Arzneistoffen auch Folsäure, welches durch das Transmembranprotein aus der Zelle transportiert wird (177). Eine Abnahme des Proteingehalts von MRP2 könnte somit eine Reaktion der Zelle auf den verminderten Influx von Folsäure, welcher durch eine Abnahme der Folsäuretransporter Folat-Rezeptor- α und Protonengekoppelter Folattransporter im Rahmen einer (Prä-)Eklampsie auftritt, sein und helfen, den intrazellulären Folatgehalt aufrecht zu erhalten. Folsäure und seine Derivate agieren dabei nicht nur als Radikalfänger und Antioxidant, sondern scheinen auch ein wichtiger Kofaktor der Angiogenese zu sein, und könnten so den ischämiebedingten Schädigungen der Plazenta entgegenwirken (176,178).

Für die genaue Feststellung der Veränderung der Transporterexpression im Rahmen dieser Gestose, insbesondere auf Proteinebene, und die Einordnung der Auswirkungen der Veränderungen auf die Schutzfunktion, Folsäuregehalt und Angiogenese der Plazenta sind weiteren Studien unerlässlich.

SLC22A3, welches den Arzneistofftransporter OCT3 kodiert, wies in der humanen Plazenta ebenfalls einen signifikanten Abfall der Genexpression bei Vorliegen einer (Prä-)Eklampsie

auf. Ähnliche Resultate konnten durch die Arbeit von Botallico et al. (2004) und Kojovic et al. (2020) generiert werden, die ebenfalls eine verminderte Genexpression von *SLC22A3* aufzeigten (179,180). Überraschend dazu sind die von Kojovic et al. (2020) erzeugten Daten zu dem Verhalten von OCT3 im Rahmen einer (Prä-)Eklampsie, die einen signifikanten Anstieg des Transportproteins darstellen konnten (180).

OCT3 stellt durch sein Spektrum an transportierten Substraten, die neben exogenen Arzneistoffen auch körpereigene Monoamine und insbesondere Serotonin (5-HT) beinhalten, für die Pathophysiologie der (Prä-)Eklampsie einen interessanten Gesichtspunkt dar. 5-HT konnte wiederholend als ein potenter Vasokonstriktor plazentarer Gefäße dargestellt werden (181,182). Weitergehend zeigt sich im Plasma von Schwangeren, bei denen eine (Prä-)Eklampsie diagnostiziert wurde, eine deutlich erhöhte Konzentration von 5-HT (183,184). Karahoda et al. (2020) konnten in ihrer Arbeit darlegen, dass die Plazenta zur Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Serotoninspiegels, 5-HT sowohl aus der maternalen als auch aus der fetalen Blutzirkulation aufnehmen kann, um dieses durch die in den Synzytiotrophoblasten exprimierte Monoaminoxidase-A (MAO-A) abzubauen. Hierbei erfolgt der Transport aus dem mütterlichen Blut mithilfe des Serotonintransporters (SERT) und aus dem fetalen Blut durch OCT3 (185). Durch mehrere Arbeitsgruppen konnte bereits eine Verminderung der Expression von MAO-A aufgezeigt werden, der aufgrund des dadurch entstehenden verminderten Abbaus von Monoaminen als Ursache für den erhöhten Gehalt an 5-HT diskutiert wurde (184,186). Die durch Botallico et al. (2004), Kojovic et al. (2020) und dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse konnten eine Abnahme der mRNA von *SLC22A3* nachweisen. Auf Proteinebene zeigt sich paradoxerweise bei Kojovic et al. (2020) ein Anstieg des Proteingehalts von OCT3. Sollte sich in weiteren Studien ein Anstieg des Proteingehaltes bestätigen, könnte es sich dabei um eine Reaktion der Zellen handeln, die 5-HT-Hämostase durch eine verstärkte Aufnahme in den Synzytiotrophoblasten und Abbau von 5-HT aufrecht zu erhalten. Auch aus pharmakologischen Gesichtspunkten wäre eine Beteiligung von OCT3 interessant, da dieses Transportprotein durch verschiedene Substanzen aus der Wirkstoffklasse der Antidepressiva inhibiert wird (187). Aus dem weitverbreiteten Einsatz von Antidepressiva bei jüngeren Menschen, und damit auch bei Frauen im gebärfähigen Alter, ergibt sich hiermit ein relevantes Interaktionspotential bezüglich der Entstehung einer (Prä-)Eklampsie bzw. der Auswirkungen einer fortbestehenden Pharmakotherapie bei Patientinnen mit einer (Prä-)Eklampsie.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl durch einen Abfall von SERT als auch MAO-A die Regulation den Serotoninspiegels im Bereich der Plazenta empfindlich gestört werden kann. Um die 5-HT Hämostase aufrecht zu erhalten, erscheint ein Anstieg von OCT 3 sinnvoll. Folgend sind weitere Studien, die dieses Verhalten des Transportproteins bei Diagnose einer (Prä-)Eklampsie bestätigen unabdingbar. Darüber hinaus sind ebenfalls

weitere Arbeiten notwendig, um die Regulationsmechanismen darzustellen, die bei verringerter Genexpression von *SLC22A3* einen Anstieg von OCT3 ermöglichen.

Ein weiteres Gen aus der SLC-Familie, dass bei aufgetretener (Prä-)Eklampsie eine signifikante Veränderung aufwies, ist *SLC22A5*. Das den Transporter OCTN2 kodierende Gen zeigte hierbei einen Abfall der mRNA Konzentration im Vergleich zu gesunden Probandinnen. Die in dieser Promotionsarbeit erzeugten Daten werden durch die Ergebnisse von Chang et al. (2011) gestützt. Die Arbeitsgruppe zeigte bei einer deutlich kleineren Probandenanzahl (N = 18) ebenfalls eine signifikant verringerte Genexpression von *SLC22A5*. Weiterführend konnte in der gleichen Publikation auch eine Abnahme des Proteingehalts des Arzneistofftransporters OCTN2 nachgewiesen werden (188). Die zuvor von Rytting et al. (2007) postulierte konträre Annahme, dass die mRNA von *SLC22A5* im Rahmen einer (Prä-)Eklampsie ansteigt und die Proteinmenge von OCTN2 keine Veränderung erfährt, welches durch die von der Arbeitsgruppe durchgeführten *in vitro*-Versuche mit BeWo-Zellkulturen unter hypoxischen Bedingungen begründet wurde, konnte damit *in vivo* gegenwärtig nicht bestätigt werden (189).

In Zusammenschau der vorliegenden Publikationen und den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit ist von einer Abnahme der Expression von *SLC22A3* und OCTN2 bei (Prä-)Eklampsie auszugehen.

Weitergehend kann konstatiert werden, dass eine Verringerung von OCTN2, der in der humanen Blut-Plazenta-Schranke den wichtigsten L-Carnitin Transporter stellt, zu einem Carnitindefizit mit weitreichenden Folgen (z.B. eingeschränkte postnatale β -Oxidation, eingeschränkte Surfactantproduktion) für den fetalen Organismus führen kann (48,49,161,162).

Für die weiteren fünf Transportproteine, die in dieser Promotionsarbeit untersucht wurden, zeigte sich keine signifikante Veränderung der Genexpression. Diese Ergebnisse können allerdings durch die gegenwärtig vorhandenen Publikationen nicht vollumfänglich bestätigt werden.

ABCB1 zeigte in der Arbeit von Yu et al. (2019) einen signifikanten Abfall des mRNA-Gehalts sowie korrespondierend eine Verringerung der Proteinmenge von P-gp in der humanen Plazenta. Die Aussagekraft der Studie wird allerdings durch die geringe Anzahl an Probandinnen (N = 17) eingeschränkt (175). Die Publikation von Mason et al. (2011), welche die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit stützen, konnten hingegen keine signifikanten Veränderungen von *ABCB1* und P-gp darstellen. Auch die Resultate dieser Publikation sind aufgrund geringer Probandenanzahl (N = 6 - 10) sowie Entnahme von Probenmaterial in der

Gruppe der (Prä-)Eklampsie von Probandinnen mit Frühgeburten (Median: 30,3 SSW; entsprechend “*very preterm*“) mit deutlichen Limitationen behaftet (153). Eine weitere Studie von Dunk et al. (2018) wiederum erzielte differenziert Resultate, wobei die Expression der mRNA von *ABCC1* keine Veränderungen aufwies, der Gehalt des Transportproteins P-gp dagegen einen deutlichen Abfall zeigte (190).

Anhand der aktuellen Studienlage mit widersprüchlichen Ergebnissen, teilweise geringen Stichprobengrößen und starken methodischen Einschränkungen kann das Verhalten von *ABCB1* und P-gp bei Schwangeren mit diagnostizierter (Prä-)Eklampsie schwer eingeschätzt werden, so dass weitere Studien unabdingbar sind.

Ein weiterer Arzneistofftransporter, dessen Veränderungen der Gen- und Proteinexpression bei diagnostizierter (Prä-)Eklampsie der Probandinnen gut untersucht ist, stellt BCRP (*ABCG2*) dar. In dieser Promotionsarbeit konnte bezüglich der Genexpression keine Veränderung im Vergleich zu unkomplizierten Schwangerschaften gezeigt werden. Ähnliche Resultate wurden durch die Arbeitsgruppen von Jebbink et al. (2015), Afrouzian et al. (2018), Williams et al. (2012) und Ruebner et al. (2012) erbracht. Jebbink et al. (2015) und Williams et al. (2012) konnten ergänzend auch zeigen, dass sich ebenfalls die Proteinexpression bei Schwangeren mit einer (Prä-)Eklampsie nicht verändert. Afrouzian et al. (2018) hingegen konnten in ihrer Publikation einen Anstieg des Arzneistofftransporters BCRP aufzeigen (176,191–193). Gegenläufige Ergebnisse ergaben die Arbeiten von Yu et al. (2019) und Kojovic et al. (2020) die jeweils einen signifikanten Abfall von mRNA und Protein darstellen konnten (175,180). Allen Veröffentlichungen gemein ist eine für Studien an plazentaren Geweben relativ hohe Stichprobengröße die von 17 (Yu et al.) bis 104 (Jebbink et al.) Probandinnen reicht.

In Zusammenschau der vorliegenden Arbeiten deutet sich gegenwärtig an, dass keine Veränderungen der Genexpression von *ABCG2* bei Diagnose einer (Prä-)Eklampsie in der humanen Plazenta auftreten. Die Ergebnisse der Proteinexpression sind deutlich widersprüchlicher, so dass keine abschließende Aussage getroffen werden kann und weitere Studien benötigt werden.

Die Genexpression von *ABCC1* zeigte in dieser Promotionsarbeit keine signifikante Veränderung in der Expressionsstärke. Diese Ergebnisse stehen damit nicht in Einklang mit den Resultaten anderer Publikationen. Die Arbeitsgruppen von Yu et al. (2019) und Kojovic et al. (2020) konnten jeweils eine Abnahme der mRNA von *ABCC1* im Rahmen einer (Prä-)Eklampsie darstellen, wobei Yu et al. (2019) ergänzend auch einen Abfall des kodierten Transportproteins MRP1 aufzeigte (175,180). Die Arbeitsgruppe von Afrouzian et al. (2018)

erzielte wiederum gegensätzliche Ergebnisse, die einen Anstieg der Gen- und Proteinexpression von *ABCC1* und MRP1 nachwiesen (192).

Innerhalb der gegenwärtigen Studienlage bestehen deutliche Diskrepanzen zu dem Verhalten der Gen- bzw. Proteinexpression von *ABCC1* bzw. MRP1 in der humanen Plazenta bei Diagnose einer (Prä-)Eklampsie, so dass weitere Studien zwingend erforderlich sind.

Ein weiterer Transporter, für den in dieser Arbeit keine Änderung der Genexpression dargestellt werden konnte, ist *ABCC3*, welcher das Transportprotein MRP3 kodiert. Die Daten, die aus der Literaturrecherche gewonnen werden konnten, sind auf wenige Ergebnisse aus *Microarray*-Experimenten begrenzt. Sitras et al. (2009) gelang es diesbezüglich einen signifikanten Unterschied der Genexpression von *ABCC3* in Probandinnen mit Präeklampsie aufzuzeigen, der durch eine 2,3-fache Abnahme der Konzentration der mRNA gekennzeichnet war. Für die Ergebnisse der Studie in Bezug auf *ABCC3* bleibt allerdings kritisch anzumerken, dass eine Überprüfung der Resultate mittels RT-qPCR nicht erfolgte. Weiterhin ist die Aussagekraft der Studie durch die Auswahl der Studienpopulation, die nur schwere Verlaufsformen der Präeklampsie ($RR_{\text{Syst}} > 160\text{mmHg}$; schwere Proteinurie, Diagnosekriterien des HELLP-Syndroms) berücksichtigte, deutlich eingeschränkt (194). Die Arbeitsgruppe von Enquobahrie et al. (2008) konnte in einer Studienpopulation, die das gesamte Spektrum der Präeklampsie umfasste, übereinstimmend mit den Resultaten dieser Promotionsarbeit, keine signifikanten Veränderungen der Genexpression aufzeigen. Wiederum muss erwähnt werden, dass auch in dieser Arbeit keine Überprüfung der Ergebnisse für *ABCC3* aus *Microarray*-Analyse durch RT-qPCR erfolgte (195). Zusammenfassend ist gegenwärtig nicht von einer geänderten Genexpression von *ABCC3* in humanen plazentaren Geweben bei (Prä-)Eklampsie auszugehen. Zur weiteren Verifikation dieser Aussage und ob eine Übertragung der Ergebnisse auf die Proteinexpression von MRP3 vorhanden ist, sind weiterführenden Studien unabdingbar.

Bezüglich der Veränderungen von *SLCO2B1* und dem zugehörigen Transportprotein OATP2B1 im Rahmen einer (Prä-)Eklampsie ist die Datenlage äußerst rar. Neben den in dieser Promotionsarbeit erhobenen Daten existiert nur eine weitere Studie aus dem Jahr 2020. In dieser zeigte die Arbeitsgruppe von Kojovic et al. (2020) einen signifikanten Anstieg sowohl der mRNA von *SLCO2B1* als auch des kodierten Transporters OATP2B1 im Gewebe der humanen Plazenta (180). Die Ergebnisse der Genexpression stehen damit im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der keine Veränderung aufgezeigt werden konnte. Wenn man die Arbeiten vergleicht, fällt auf, dass die bei Kojovic et al. (2020) verwendeten Proben von Probandinnen mit einer Entbindung in der $32,8 \pm 2,1$ SSW in der Kontrollgruppe bzw. 31 ± 2 SSW in der (Prä-)Eklampsie-Gruppe verwendet wurden. Somit findet bei Kojovic et al. (2020) der Vergleich der Expressionsmuster in dem Übergangszeitraum,

zwischen den von der WHO definierten Gestationszeiträumen „*very preterm*“ und „*moderate preterm*“ statt (123). Hiermit ergibt sich die Möglichkeit, dass sich etwaige Expressionsunterschiede von *SLCO2B1* und *OATP2B1*, die in einem früheren Stadium der Schwangerschaft vorhanden sind, bis zum Erreichen des errechneten Geburtstermins in dem Gewebe der humanen Plazenta wieder aufheben. Folgend sind weitere Arbeiten bezüglich der Einschätzung des Expressionsverhaltens von *SLCO2B1* bzw. *OATP2B1* im Rahmen einer (Prä-)Eklampsie zwingend erforderlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich das Profil relevanter Arzneistofftransporter in der humanen Blut-Plazenta-Schranke bei Diagnose einer (Prä-)Eklampsie erheblich verändert. Folgend ergibt sich hieraus, dass der Efflux und Influx von Xenobiotika und damit auch Medikamenten bei Vorliegen der genannten Gestose im Vergleich zu gesunden Schwangeren erheblich unterscheiden kann. Hieraus lässt sich ableiten, dass Pharmazeutika bezüglich der Verträglichkeit in dieser Kohorte eine besondere Testung benötigen bzw. der behandelnde Arzt bei der Verschreibung von Medikamenten einer besonderen Aufsichts- und Aufklärungspflicht unterliegt.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Blut-Plazenta-Schranke als Interaktionsstelle zwischen dem maternalen und fetalen Organismus interindividuell, im zeitlichen Verlauf der Gestation als auch bei Auftreten den Schwangerschaftserkrankungen der (Prä-)Eklampsie und des Gestationsdiabetes, signifikante Unterschiede in der Expression von relevanten Transportproteinen aufweist. Hieraus lässt sich ableiten, dass auch bezüglich der Fähigkeit der Plazenta zur Aufnahme und Ausscheidung von Xenobiotika, und damit verbunden Arzneistoffen, bedeutsame Differenzen bestehen. Entsprechend ergibt sich hieraus eine besondere Herausforderung für die Testung von Medikamenten bezüglich ihrer Möglichkeit die Blut-Plazenta-Schranke zu überwinden und damit potenziell teratogene Effekte am Fetus zu erzeugen. Weitergehend sollte die sich verändernde Plazentagängigkeit im Rahmen von Aufklärungsgesprächen bei Neubeginn oder Fortführung eines medikamentösen Therapieschemas während der Schwangerschaft entsprechend gewürdigt werden.

Die in dieser Promotionsarbeit generierten Daten, die im Vergleich mit den bisher veröffentlichten Publikationen vor allen durch eine bedeutend größere Probenanzahl sowie der simultanen Betrachtung der wichtigsten Arzneistofftransporter der Plazenta heraussticht, konnten dabei einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Transporterexpression in der humanen Blut-Plazenta-Schranke leisten.

6. Zusammenfassung

Die Blut-Plazenta-Schranke ist im Menschen die Interaktionsstelle zwischen dem mütterlichen und dem fetalen Organismus. Ein wichtiger Bestandteil dieser Barriere wird durch Transportproteine gestellt, die für die Aufnahme und Exkretion von Nährstoffen, endogenen Substraten, Arzneistoffen und Xenobiotika eine entscheidende Rolle spielen. Aus mehreren Studien ergaben sich Hinweise, dass die Expression von Transportern, und entsprechend der kodierenden mRNA, im Verlauf der Gestation, sowie bei Diagnose eines Gestationsdiabetes oder einer (Prä-)Eklampsie erhebliche Unterschiede aufweisen. Die Aussagekraft eines Großteils dieser Studien ist allerdings aufgrund der geringen Anzahl an verwendeten Proben eingeschränkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der genannten Faktoren auf die Genexpression von relevanten Arzneistofftransportern sowie die Korrelation der Gen- mit der Proteinexpression in der humanen Plazenta untersucht. Zuerst erfolgte mithilfe von *TaqMan*[®] *Low Density Array (TLDA) Micro Fluidic Cards* (37 Gene) die Auswahl von acht relevanten Transportproteinen anhand der Expressionsstärke. Mit Probenmaterial von 156 gesunden Probandinnen (*term*: N = 156; *moderate preterm*: N = 58; *very preterm*: N = 19; *extremely preterm*: N = 12), 17 Schwangeren mit Gestationsdiabetes und termingerechter Entbindung sowie neun Schwangeren mit (Prä-)Eklampsie und termingerechter Entbindung erfolgte die mRNA-Expressionsanalyse mittels *real time quantitativ* PCR für die acht zuvor ausgewählten Gene (fünf ABC-Transporter und drei SLC-Transporter). Durch validierte HLPC-MS/MS *targeted proteomics* Messverfahren wurde der Proteingehalt der Transporter bestimmt.

Quantitativ zeigte sich für die Genexpression gesunder Probandinnen mit termingerechter Entbindung folgende Reihenfolge: *SLC22A3* > *SLCO2B1* > *ABCB1* > *ABCG2* > *SLC22A5* > *ABCG2* > *ABCC3* > *ABCC2*. Im zeitlichen Verlauf des dritten Trimesters der Schwangerschaft zeigte die Expression der mRNA von sechs Transportproteinen signifikante Veränderungen. *ABCC3* und *SLC22A5* wiesen einen kontinuierlichen Anstieg der mRNA auf. *ABCB1* zeigte einen stetigen Abfall der Genexpression. Die mRNA-Level von *ABCC2* und *ABCG2* zeigten einen bogenförmigen Verlauf mit initialem Anstieg und anschließenden Abfall. *SLC22A3* wies ebenfalls einen bogenförmigen Verlauf mit anfänglichem Abfall der Genexpression und wiedereintretendem Anstieg zum zeitgerechten Geburtstermin auf. Im Rahmen eines Gestationsdiabetes konnte für drei Transporter eine signifikante Veränderung der Genexpression aufgezeigt werden. *ABCC1*, *SLC22A3* sowie *SLCO2B1* zeigten dabei einen Abfall der mRNA-Expression. Bei Diagnose einer (Prä-)Eklampsie wiesen drei

Transporter Veränderungen der mRNA-Expression auf, die das Signifikanzniveau erreichten. *ABCC2*, *SLC22A3* und *SLC22A5* zeigten dabei einen Abfall der Genexpression.

Für die Proteinexpression von Probandinnen mit termingerechter Entbindung ergab sich quantitativ folgende Reihenfolge: BCRP > OCTN2 > OCT3 > OATP2B1 > MDR1(P-gp) > MRP1 = MRP2 = MRP3. Eine signifikante Korrelation der Genexpression auf den Proteingehalt konnte nur für *ABCB1*/MDR1 (P-gp) mit einem positiv linearen Zusammenhang bei schwacher bis mittlerer Effektstärke dargestellt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es unter den acht relevantesten Arzneistofftransportern der humanen Blut-Plazenta-Schranke im zeitlichen Verlauf der Schwangerschaft, sowie bei Diagnose eines Gestationsdiabetes bzw. einer (Prä-)Eklampsie zu komplexen Veränderungen im Genexpressionsmuster kommt. Hieraus resultiert, dass der Influx- und Effluxkapazität von Xenobiotika die über diese Proteine transportiert werden stetigen Änderungen unterliegt.

In folgenden Studien sollten, aufgrund der geringen Korrelation, die Ergebnisse der Veränderungen der mRNA auf Proteinebene mit entsprechender Probenanzahl reproduziert werden.

7. Thesen

1. Die Genexpression relevanter Arzneistofftransporter gesunder Probandinnen zeigte quantitativ die Reihenfolge: *SLC22A3* > *SLCO2B1* > *ABCB1* > *ABCG2* > *SLC22A5* > *ABCG2* > *ABCC3* > *ABCC2*.
2. Innerhalb des dritten Trimesters zeigte die Genexpression von *ABCC3* und *SLC22A5* in gesunden Probandinnen einen kontinuierlichen Anstieg.
3. Innerhalb des dritten Trimesters zeigte die Genexpression von *ABCB1* in gesunden Probandinnen einen kontinuierlichen Abfall.
4. Innerhalb des dritten Trimesters zeigten *ABCC2* und *ABCG2* in gesunden Probandinnen nach initialem Anstieg wieder einen Abfall der Genexpression.
5. Innerhalb des dritten Trimesters zeigte *SCL22A3* in gesunden Probandinnen nach initialem Abfall wieder einen Anstieg der Genexpression.
6. Die Genexpression von *ABCC1*, *SLC22A3* und *SLCO2B1* zeigten bei Gestationsdiabetes einen signifikanten Abfall.
7. Die Genexpression von *ABCC2*, *SLC22A3* und *SLC22A5* zeigten bei (Prä-)Eklampsie einen signifikanten Abfall.
8. Die Proteinexpression relevanter Arzneistofftransporter gesunder Probandinnen zeigte quantitativ die Reihenfolge: BCRP > OCTN2 > OCT3 > OATP2B1 > MDR1(P-gp) > MRP1 = MRP2 = MRP3.
9. Eine Korrelation der untersuchten Arzneistofftransporter zwischen Genexpression und Proteingehalt konnte nur für *ABCB1*/P-gp (MDR1) mit einer positiv linearen Korrelation und schwacher bis mittlerer Effektstärke aufgezeigt werden.
10. Die Transporter OATP1A2 (*SLCO1A2*) und MATE1 (*SLC47A1*) zeigten weder auf mRNA- oder Proteinebene eine relevante Expression.

8. Literaturverzeichnis

1. Egen-Lappe V, Hasford J. Drug prescription in pregnancy: analysis of a large statutory sickness fund population. *Eur J Clin Pharmacol*. November 2004;60(9):659–66.
2. Bérard A, Abbas-Chorfa F, Kassai B, Vial T, Nguyen KA, Sheehy O, u. a. The French Pregnancy Cohort: Medication use during pregnancy in the French population. *PloS One*. 2019;14(7):e0219095.
3. Headley J, Northstone K, Simmons H, Golding J, and the ALSPAC Study Team. Medication use during pregnancy: data from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Eur J Clin Pharmacol*. 1. Juli 2004;60(5):355–61.
4. Speirs AL. THALIDOMIDE AND CONGENITAL ABNORMALITIES. *The Lancet*. 10. Februar 1962;279(7224):303–5.
5. Schulz M. Dark Remedy: The Impact of Thalidomide and its Revival as a Vital Medicine. *BMJ*. 30. Juni 2001;322(7302):1608.
6. Hendrickx AG, Axelrod LR, Clayborn LD. „Thalidomide“ syndrome in baboons. *Nature*. 28. Mai 1966;210(5039):958–9.
7. Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2015;105(2):140–56.
8. Homburger F, Chaube S, Eppenberger M, Bogdonoff PD, Nixon CW. Susceptibility of certain inbred strains of hamsters to teratogenic effects of thalidomide. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1. September 1965;7(5):686–93.
9. Vorhees CV, Weisenburger WP, Minck DR. Neurobehavioral teratogenic effects of thalidomide in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 1. Mai 2001;23(3):255–64.
10. DiPaolo JA. Congenital Malformation in Strain A Mice: Its Experimental Production by Thalidomide. *JAMA*. 12. Januar 1963;183(2):139–41.
11. Drobeck HP, Coulston F, Cornelius D. Effects of thalidomide on fetal development in rabbits and on establishment of pregnancy in monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1. März 1965;7(2):165–78.
12. Frankos VH. FDA perspectives on the use of teratology data for human risk assessment. *Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol*. August 1985;5(4):615–25.
13. Gruber M, Hirschmugl B, Schlieffsteiner C, Wadsack C. Plazentafunktion – Nährstofftransport – Gasaustausch. In: Huppertz B, Schleichner E, Herausgeber. *Die Plazenta*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. S. 75–88.
14. Schleichner E. Endokrinologie der Plazenta. In: Huppertz B, Schleichner E, Herausgeber. *Die Plazenta*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. S. 76–90.
15. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*. 1. Januar 2004;114(5):397–407.
16. Holzgreve W, Geipel A, Ludwig M, Schneider KTM, Schultze-Mosgau A. Normale Schwangerschaft und Geburt. In: Diedrich K, Schultze-Mosgau A, Holzgreve W, Jonat W, Schneider KTM, Weiss JM, Herausgeber. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. S. 336–9.
17. Wiese KH. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Chorionplatte der reifen menschlichen Plazenta. *Arch Für Gynäkol*. 1. September 1975;218(3):243–59.

18. Weser H, Kaufmann P. Lichtmikroskopische und histochemische Untersuchungen an der Chorionplatte der reifen menschlichen Placenta. *Arch Für Gynäkol.* 1. März 1978;225(1):15–30.
19. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 19. Juli 2008;61(12):1296–302.
20. Maidman JE, Thorpe LW, Harris JA, Wynn RM. Fetal Origin of X-Cells in Human Placental Septa and Basal Plate. *Obstet Gynecol.* April 1973;41(4):547–52.
21. Hein K. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Basalplatte der reifen menschlichen Plazenta. *Z Für Zellforsch Mikrosk Anat.* 1. September 1971;122(3):323–49.
22. Jackson MR, Mayhew TM, Boyd PA. Quantitative description of the elaboration and maturation of villi from 10 weeks of gestation to term. *Placenta.* August 1992;13(4):357–70.
23. AMBOSS GmbH. Aufbau der reifen Plazenta. [zitiert 27. August 2020]; Verfügbar unter:
<https://next.amboss.com/de/article/Cp0q7S#Z1f29040b9d86e565337f7270caead8b5>
24. Jones CJ, Fox H. Ultrastructure of the normal human placenta. *Electron Microsc Rev.* 1991;4(1):129–78.
25. Simpson RA, Mayhew TM, Barnes PR. From 13 weeks to term, the trophoblast of human placenta grows by the continuous recruitment of new proliferative units: a study of nuclear number using the disector. *Placenta.* Oktober 1992;13(5):501–12.
26. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 5. März 2015;370(1663):20140066.
27. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Dev Camb Engl.* 27 2019;146(22).
28. AMBOSS GmbH. Aufbau der Plazentaschranke. [zitiert 27. August 2020]; Verfügbar unter:
<https://next.amboss.com/de/article/Cp0q7S#Z1f29040b9d86e565337f7270caead8b5>
29. International Transporter Consortium, Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, u. a. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* März 2010;9(3):215–36.
30. MacFarland A, Abramovich DR, Ewen SW, Pearson CK. Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta. *Histochem J.* Mai 1994;26(5):417–23.
31. Atkinson DE, Greenwood SL, Sibley CP, Glazier JD, Fairbairn LJ. Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 1. September 2003;285(3):C584–91.
32. Sun M, Kingdom J, Baczyk D, Lye SJ, Matthews SG, Gibb W. Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the human placenta decreases with advancing gestation. *Placenta.* Juli 2006;27(6–7):602–9.
33. Lye P, Bloise E, Dunk C, Javam M, Gibb W, Lye SJ, u. a. Effect of oxygen on multidrug resistance in the first trimester human placenta. *Placenta.* September 2013;34(9):817–23.
34. Yeboah D, Sun M, Kingdom J, Baczyk D, Lye SJ, Matthews SG, u. a. Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor. *Can J Physiol Pharmacol.* Dezember 2006;84(12):1251–8.

35. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, u. a. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 15. April 2001;61(8):3458–64.
36. St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RIR, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, u. a. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 1. Oktober 2000;279(4):R1495–503.
37. Nagashige M, Ushigome F, Koyabu N, Hirata K, Kawabuchi M, Hirakawa T, u. a. Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. *Placenta.* November 2003;24(10):951–8.
38. Aye ILMH, Paxton JW, Evseenko DA, Keelan JA. Expression, localisation and activity of ATP binding cassette (ABC) family of drug transporters in human amnion membranes. *Placenta.* September 2007;28(8–9):868–77.
39. Azzaroli F, Mennone A, Feletti V, Simoni P, Baglivo E, Montagnani M, u. a. Clinical trial: modulation of human placental multidrug resistance proteins in cholestasis of pregnancy by ursodeoxycholic acid. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(8):1139–46.
40. Meyer zu Schwabedissen HEU, Grube M, Heydrich B, Linnemann K, Fusch C, Kroemer HK, u. a. Expression, Localization, and Function of MRP5 (ABCC5), a Transporter for Cyclic Nucleotides, in Human Placenta and Cultured Human Trophoblasts. *Am J Pathol.* Januar 2005;166(1):39–48.
41. Yabuuchi H, Shimizu H, Takayanagi S, Ishikawa T. Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12. *Biochem Biophys Res Commun.* 9. November 2001;288(4):933–9.
42. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet.* Dezember 2005;20(6):452–77.
43. Sata R, Ohtani H, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Nakamura T, u. a. Functional Analysis of Organic Cation Transporter 3 Expressed in Human Placenta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1. November 2005;315(2):888–95.
44. Lee N, Hebert MF, Wagner DJ, Easterling TR, Liang CJ, Rice K, u. a. Organic Cation Transporter 3 Facilitates Fetal Exposure to Metformin during Pregnancy. *Mol Pharmacol.* Oktober 2018;94(4):1125–31.
45. Ahmadimoghaddam D, Hofman J, Zemankova L, Nachtigal P, Dolezelova E, Cervený L, u. a. Synchronized activity of organic cation transporter 3 (Oct3/Slc22a3) and multidrug and toxin extrusion 1 (Mate1/Slc47a1) transporter in transplacental passage of MPP⁺ in rat. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* August 2012;128(2):471–81.
46. Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13. Dezember 2005;102(50):17923–8.
47. Ceckova M, Reznicek J, Ptackova Z, Cervený L, Müller F, Kacerovsky M, u. a. Role of ABC and Solute Carrier Transporters in the Placental Transport of Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother.* 22. August 2016;60(9):5563–72.
48. Grube M, Schwabedissen HM zu, Draber K, Präger D, Möritz KU, Linnemann K, u. a. Expression, Localization, and Function of the Carnitine Transporter Octn2 (slc22a5) in Human Placenta. *Drug Metab Dispos.* 1. Januar 2005;33(1):31–7.
49. Lahjouji K, Elimrani I, Lafond J, Leduc L, Qureshi IA, Mitchell GA. l-Carnitine

- transport in human placental brush-border membranes is mediated by the sodium-dependent organic cation transporter OCTN2. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 1. August 2004;287(2):C263–9.
50. Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J ichi, Sai Y, Oku A, Shimane M, u. a. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett.* 1997;419(1):107–11.
 51. Karahoda R, Ceckova M, Staud F. The inhibitory effect of antiretroviral drugs on the L-carnitine uptake in human placenta. *Toxicol Appl Pharmacol.* 01 2019;368:18–25.
 52. Wang H, Yan Z, Dong M, Zhu X, Wang H, Wang Z. Alteration in placental expression of bile acids transporters OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 1. Juni 2012;285(6):1535–40.
 53. Loubière LS, Vasilopoulou E, Bulmer JN, Taylor PM, Stieger B, Verrey F, u. a. Expression of thyroid hormone transporters in the human placenta and changes associated with intrauterine growth restriction. *Placenta.* 1. April 2010;31(4):295–304.
 54. Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 1. Februar 2003;284(2):E390–8.
 55. Tupova L, Hirschmugl B, Sucha S, Pilarova V, Székely V, Bakos É, u. a. Interplay of drug transporters P-glycoprotein (MDR1), MRP1, OATP1A2 and OATP1B3 in passage of maraviroc across human placenta. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 12. Juli 2020;129:110506.
 56. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* Oktober 2009;158(3):693–705.
 57. Grube M, Reuther S, Schwabedissen HM zu, Köck K, Draber K, Ritter CA, u. a. Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1 and Breast Cancer Resistance Protein Interact in the Transepithelial Transport of Steroid Sulfates in Human Placenta. *Drug Metab Dispos.* 1. Januar 2007;35(1):30–5.
 58. St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T. Characterization of an Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP-B) in Human Placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1. April 2002;87(4):1856–63.
 59. Sato K, Sugawara J, Sato T, Mizutamari H, Suzuki T, Ito A, u. a. Expression of Organic Anion Transporting Polypeptide E (OATP-E) in Human Placenta. *Placenta.* 1. Februar 2003;24(2):144–8.
 60. Ritter CA, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Grube M, Köck K, Kroemer HK. Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev.* 2005;37(1):253–78.
 61. Belinsky MG, Chen ZS, Shchhaveleva I, Zeng H, Kruh GD. Characterization of the Drug Resistance and Transport Properties of Multidrug Resistance Protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res.* 1. November 2002;62(21):6172–7.
 62. Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, Kerb R, u. a. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *HepatoL Baltim Md.* Oktober 2009;50(4):1227–40.
 63. Sugiura T, Kato S, Shimizu T, Wakayama T, Nakamichi N, Kubo Y, u. a. Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in mouse small intestine and liver. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* Oktober 2010;38(10):1665–

- 72.
64. Yu J, Zhou Z, Tay-Sontheimer J, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I. Intestinal Drug Interactions Mediated by OATPs: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Findings. *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2312–25.
65. Jiye YIN, Jianting Z. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: from discovery to clinical application. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* Oktober 2011;36(10):927.
66. Borst P, de Wolf C, van de Wetering K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflug Arch - Eur J Physiol.* 1. Februar 2007;453(5):661–73.
67. Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C. OCTN cation transporters in health and disease: role as drug targets and assay development. *J Biomol Screen.* September 2013;18(8):851–67.
68. Bednarczyk D, Sanghvi MV. Organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1), an expanded substrate profile, does it align with OATP2B1's hypothesized function? *Xenobiotica.* 1. September 2020;50(9):1128–37.
69. Li J, Chen X, Lu X, Zhang C, Shi Q, Feng L. PREGABALIN TREATMENT OF PERIPHERAL NERVE DAMAGE IN A MURINE DIABETIC PERIPHERAL NEUROPATHY MODEL. *Acta Endocrinol Buchar.* 2018;14(3):294–9.
70. Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, u. a. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem.* 2008;15(20):1981–2039.
71. Hagenbuch B, Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst.* Juli 2008;38(7–8):778–801.
72. Juraszek B, Nałęcz KA. SLC22A5 (OCTN2) Carnitine Transporter-Indispensable for Cell Metabolism, a Jekyll and Hyde of Human Cancer. *Mol Basel Switz.* 19. Dezember 2019;25(1):E14.
73. S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 2. Auflage. 2018;91.
74. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 26. Oktober 2018;19(11).
75. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, Calles J, Roman NM, Amini SB, u. a. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 1. Januar 1993;264(1):E60–7.
76. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, u. a. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes.* Juli 2002;51(7):2207–13.
77. Chen HL, Yang YP, Hu XL, Yelavarthi KK, Fishback JL, Hunt JS. Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am J Pathol.* August 1991;139(2):327–35.
78. Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem.* 15. Dezember 1993;268(35):26055–8.
79. Chu Y, Liu W, Cui Q, Feng G, Wang Y, Jiang X. Analysis of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the adipose tissue of gestational diabetes mellitus patients and insulin resistance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 1. August 2010;30(4):505–8.

80. Wolf M, Sandler L, Hsu K, Vossen-Smirnakis K, Ecker JL, Thadhani R. First-Trimester C-Reactive Protein and Subsequent Gestational Diabetes. *Diabetes Care*. 1. März 2003;26(3):819–24.
81. Wolf M, Sauk J, Shah A, Smirnakis KV, Jimenez-Kimble R, Ecker JL, u. a. Inflammation and Glucose Intolerance: A prospective study of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1. Januar 2004;27(1):21–7.
82. Hypertensive Pregnancy Disorders: Diagnosis and Therapy. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (S2k-Level, AWMF-Registry No. 015/018, March 2019). <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-018.html>.
83. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, u. a. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*. 1. Mai 1997;99(9):2139–51.
84. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*. 1. Mai 1997;99(9):2152–64.
85. Brosens I, Renaer M. On the Pathogenesis of Placental Infarcts in Pre-Eclampsia. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 1972;79(9):794–9.
86. Wolf FD, Robertson WB, Brosens I. The ultrastructure of acute atherosclerosis in hypertensive pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 15. September 1975;123(2):164–74.
87. Iwagaki S, Yokoyama Y, Tang L, Takahashi Y, Nakagawa Y, Tamaya T. Augmentation of leptin and hypoxia-inducible factor 1 α mRNAs in the pre-eclamptic placenta. *Gynecol Endocrinol*. 1. Mai 2004;18(5):263–8.
88. Rajakumar A, Brandon HM, Daftary A, Ness R, Conrad KP. Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta*. 1. November 2004;25(10):763–9.
89. Tal R, Shaish A, Barshack I, Polak-Charcon S, Afek A, Volkov A, u. a. Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Overexpression in Pregnant Mice: Possible Implications for Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *Am J Pathol*. 1. Dezember 2010;177(6):2950–62.
90. Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. Invasive Cytotrophoblasts Manifest Evidence of Oxidative Stress in Preeclampsia. *Am J Pathol*. 1. Januar 2000;156(1):321–31.
91. Vaughan J, Walsh S. Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy Off J Int Soc Study Hypertens Pregnancy*. 1. Februar 2002;21:205–23.
92. Wang Y, Walsh SW. Antioxidant activities and mRNA expression of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and preeclamptic placentas. *J Soc Gynecol Investig*. August 1996;3(4):179–84.
93. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, u. a. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*. 7. September 2006;355(10):992–1005.
94. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, u. a. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. Januar 2008;21(1):9–23.

95. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 15. November 1993;90(22):10705–9.
96. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, u. a. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 1. März 2003;111(5):649–58.
97. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, u. a. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. November 2003;88(11):5555–63.
98. Eremina V, Quaggin SE. The role of VEGF-A in glomerular development and function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Januar 2004;13(1):9–15.
99. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 21. Juni 2011;123(24):2856–69.
100. Torry DS, Wang HS, Wang TH, Caudle MR, Torry RJ. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol*. Dezember 1998;179(6 Pt 1):1539–44.
101. Livingston JC, Chin R, Haddad B, McKinney ET, Ahokas R, Sibai BM. Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. Dezember 2000;183(6):1554–7.
102. Koetsier G, Cantor E. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. Technical Note, New England Biolabs, Inc. 2019;
103. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, u. a. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 31. Januar 2006;7(1):3.
104. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, u. a. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res*. 1. April 2005;33(6):e56–e56.
105. Rio DC. Reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc*. 3. November 2014;2014(11):1207–16.
106. Mülhardt C. In: *RNA in Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomic 6 Auflage*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (Experimentator); 2009. S. 126–7.
107. Mülhardt C. In: *Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomic 6 Auflage*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (Experimentator); 2009. S. 84–120.
108. Arnemann J. Taq-Polymerase. In: Gressner AM, Arndt T, Herausgeber. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. S. 2260–1. (Springer Reference Medizin).
109. Reynisson E, Josefsen MH, Krause M, Hoorfar J. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 1. August 2006;66(2):206–16.
110. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. Juni 1995;4(6):357–62.

111. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dezember 1988;85(23):8790–4.
112. Arnemann J. (2019) Taq-Polymerase in Gressner A.M., Arndt T. (eds) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. In Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg.;
113. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet*. 1. Oktober 2013;29(10):569–74.
114. Moein S, Javanmard SH, Abedi M, Izadpanahi MH, Gheisari Y. Identification of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Long-term Hypoxia-treated Kidney Cells. *Adv Biomed Res*. 1. Januar 2017;6(1):15.
115. Caradec J, Sirab N, Keumeugni C, Moutereau S, Chimingqi M, Matar C, u. a. ‘Desperate house genes’: the dramatic example of hypoxia. *Br J Cancer*. 16. März 2010;102(6):1037–43.
116. Meller M, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA. Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta*. Oktober 2005;26(8–9):601–7.
117. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 1. März 2004;26(6):509–15.
118. Reiman M, Laan M, Rull K, Söber S. Effects of RNA integrity on transcript quantification by total RNA sequencing of clinically collected human placental samples. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2017;31(8):3298–308.
119. Feng H, Zhang X, Zhang C. mRIN for direct assessment of genome-wide and gene-specific mRNA integrity from large-scale RNA-sequencing data. *Nat Commun*. 3. August 2015;6(1):7816.
120. Gallego Romero I, Pai AA, Tung J, Gilad Y. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biol*. 30. Mai 2014;12(1):42.
121. Duan J, Shi J, Ge et al. X. Genome-wide survey of interindividual differences of RNA stability in human lymphoblastoid cell lines. *Sci Rep*. 2013;3, 1318.
122. Gröer C, Brück S, Lai Y, Paulick A, Busemann A, Heidecke CD, u. a. LC-MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux transporter proteins. *J Pharm Biomed Anal*. November 2013;85:253–61.
123. World Health Organization (WHO). Preterm birth [Internet]. who.int. 2018 [zitiert 10. April 2022]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
124. Schlußner E. The Prevention, Diagnosis and Treatment of Premature Labor. *Dtsch Arztebl Int* 2013. :110(13): 227-36.
125. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull*. 1992;112(1):155–9.
126. Deeley RG, Cole SPC. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett*. 13. Februar 2006;580(4):1103–11.
127. Staud F, Cerveny L, Ceckova M. Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. *J Drug Target*. November 2012;20(9):736–63.
128. Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat*

- Struct Mol Biol. 7. Juni 2016;23(6):487–93.
129. DeGorter MK, Xia CQ, Yang JJ, Kim RB. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:249–73.
 130. Colas C, Ung PMU, Schlessinger A. SLC Transporters: Structure, Function, and Drug Discovery. *MedChemComm.* 1. Juni 2016;7(6):1069–81.
 131. Hagenbuch B, Stieger B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol Aspects Med.* Juni 2013;34(2–3):396–412.
 132. Duan H, Wang J. Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther.* Dezember 2010;335(3):743–53.
 133. Koepsell H, Endou H. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* Februar 2004;447(5):666–76.
 134. Gil S, Saura R, Forestier F, Farinotti R. P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy. *Placenta.* 1. Februar 2005;26(2):268–70.
 135. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, u. a. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther.* Juni 2001;297(3):1137–43.
 136. Hitzl M, Schaeffeler E, Hocher B, Slowinski T, Halle H, Eichelbaum M, u. a. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics.* Mai 2004;14(5):309–18.
 137. NHLBI (National Heart, Lung and Blood Institute. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) [Internet]. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>. [zitiert 22. April 2021]. Verfügbar unter: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
 138. Iwasaki M, Koyanagi S, Suzuki N, Katamune C, Matsunaga N, Watanabe N, u. a. Circadian modulation in the intestinal absorption of P-glycoprotein substrates in monkeys. *Mol Pharmacol.* Juli 2015;88(1):29–37.
 139. Yokooji T, Kameda Y, Utsumi M, Mori N, Murakami T. Interaction of hydrophobic components in female urine before and after childbirth with P-glycoprotein in vitro. *Pharm.* Juni 2014;69(6):430–6.
 140. Tian R, Koyabu N, Takanaga H, Matsuo H, Ohtani H, Sawada Y. Effects of Grapefruit Juice and Orange Juice on the Intestinal Efflux of P-Glycoprotein Substrates. *Pharm Res.* 1. Juli 2002;19:802–9.
 141. Edwards DJ, Fitzsimmons ME, Schuetz EG, Yasuda K, Ducharme MP, Warbasse LH, u. a. 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther.* März 1999;65(3):237–44.
 142. Dash RP, Ellendula B, Agarwal M, Nivsarkar M. Increased intestinal P-glycoprotein expression and activity with progression of diabetes and its modulation by epigallocatechin-3-gallate: Evidence from pharmacokinetic studies. *Eur J Pharmacol.* 15. November 2015;767:67–76.
 143. Evers R, Piquette-Miller M, Polli JW, Russel FGM, Sprowl JA, Tohyama K, u. a. Disease-Associated Changes in Drug Transporters May Impact the Pharmacokinetics and/or Toxicity of Drugs: A White Paper From the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther.* November 2018;104(5):900–15.
 144. Omae T, Goto M, Shimomura M, Masuda S, Ito K, Okuda M, u. a. Transient up-regulation of P-glycoprotein reduces tacrolimus absorption after ischemia-reperfusion

- injury in rat ileum. *Biochem Pharmacol.* 15. Februar 2005;69(4):561–8.
145. Ogura J, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Alteration of Mrp2 and P-gp expression, including expression in remote organs, after intestinal ischemia-reperfusion. *Life Sci.* 20. Juni 2008;82(25–26):1242–8.
 146. Tomita M, Takizawa Y, Kishimoto H, Hayashi M. Assessment of ileal epithelial P-glycoprotein dysfunction induced by ischemia/reperfusion using in vivo animal model. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;23(5):356–63.
 147. Mathias AA, Hitti J, Unadkat JD. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression in human placentae of various gestational ages. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 1. Oktober 2005;289(4):R963–9.
 148. Anoshchenko O, Prasad B, Neradugomma NK, Wang J, Mao Q, Unadkat JD. Gestational Age-Dependent Abundance of Human Placental Transporters as Determined by Quantitative Targeted Proteomics. *Drug Metab Dispos.* 1. September 2020;48(9):735–41.
 149. Sudhakaran S, Ghabrial H, Nation RL, Kong DCM, Gude NM, Angus PW, u. a. Differential Bidirectional Transfer of Indinavir in the Isolated Perfused Human Placenta. *Antimicrob Agents Chemother.* März 2005;49(3):1023–8.
 150. Mölsä M, Heikkinen T, Hakkola J, Hakala K, Wallerman O, Wadelius M, u. a. Functional role of P-glycoprotein in the human blood-placental barrier. *Clin Pharmacol Ther.* August 2005;78(2):123–31.
 151. Smit JW, Huisman MT, van Tellingen O, Wiltshire HR, Schinkel AH. Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J Clin Invest.* November 1999;104(10):1441–7.
 152. Meyer zu Schwabedissen HE, Grube M, Dreisbach A, Jedlitschky G, Meissner K, Linnemann K, u. a. Epidermal growth factor-mediated activation of the map kinase cascade results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP). *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* April 2006;34(4):524–33.
 153. Mason CW, Buhimschi IA, Buhimschi CS, Dong Y, Weiner CP, Swaan PW. ATP-binding cassette transporter expression in human placenta as a function of pregnancy condition. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* Juni 2011;39(6):1000–7.
 154. Pascolo L, Ferneti C, Pirulli D, Crovella S, Amoroso A, Tiribelli C. Effects of maturation on RNA transcription and protein expression of four MRP genes in human placenta and in BeWo cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 28. März 2003;303(1):259–65.
 155. Schwabedissen HEM zu, Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C, u. a. Variable Expression of Mrp2 (abcc2) in Human Placenta: Influence of Gestational Age and Cellular Differentiation. *Drug Metab Dispos.* 1. Juli 2005;33(7):896–904.
 156. Watanabe M, Matsumoto N, Takeba Y, Kumai T, Tanaka M, Tatsunami S, u. a. Orange juice and its component, hesperidin, decrease the expression of multidrug resistance-associated protein 2 in rat small intestine and liver. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:502057.
 157. Li L, Stanton JD, Tolson AH, Luo Y, Wang H. Bioactive terpenoids and flavonoids from Ginkgo biloba extract induce the expression of hepatic drug-metabolizing enzymes through pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor-mediated pathways. *Pharm Res.* April 2009;26(4):872–82.
 158. Imperio GE, Javam M, Lye P, Constantinof A, Dunk CE, Reis FM, u. a. Gestational

- age-dependent gene expression profiling of ATP-binding cassette transporters in the healthy human placenta. *J Cell Mol Med.* Januar 2019;23(1):610–8.
159. Ahmadimoghaddam D, Zemankova L, Nachtigal P, Dolezelova E, Neumanova Z, Cerveny L, u. a. Organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter in the placenta and fetal tissues: expression profile and fetus protective role at different stages of gestation. *Biol Reprod.* März 2013;88(3):55.
160. Lee N, Hebert MF, Prasad B, Easterling TR, Kelly EJ, Unadkat JD, u. a. Effect of Gestational Age on mRNA and Protein Expression of Polyspecific Organic Cation Transporters during Pregnancy. *Drug Metab Dispos.* Dezember 2013;41(12):2225–32.
161. Bai M, Zeng Q, Chen Y, Chen M, Li P, Ma Z, u. a. Maternal Plasma l-Carnitine Reduction During Pregnancy Is Mainly Attributed to OCTN2-Mediated Placental Uptake and Does Not Result in Maternal Hepatic Fatty Acid β -Oxidation Decline. *Drug Metab Dispos.* 1. Juni 2019;47(6):582–91.
162. Arenas J, Rubio JC, Martín MA, Campos Y. Biological roles of L-carnitine in perinatal metabolism. *Early Hum Dev.* Dezember 1998;53 Suppl:S43-50.
163. Nakano C, Takashima S, Takeshita K. Carnitine concentration during the development of human tissues. *Early Hum Dev.* April 1989;19(1):21–7.
164. Shenai JP, Borum PR. Tissue carnitine reserves of newborn infants. *Pediatr Res.* Juli 1984;18(7):679–82.
165. Petrovic V, Kojovic D, Cressman A, Piquette-Miller M. Maternal bacterial infections impact expression of drug transporters in human placenta. *Int Immunopharmacol.* Juni 2015;26(2):349–56.
166. Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Februar 2003;284(2):E390-398.
167. Kallen CB. Steroid hormone synthesis in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* Dezember 2004;31(4):795–816, x.
168. Kozłowska-Rup D, Czekaj P, Plewka D, Sikora J. Immunolocalization of ABC drug transporters in human placenta from normal and gestational diabetic pregnancies. *Ginekol Pol.* Juni 2014;85(6):410–9.
169. Mueller CFH, Widder JD, McNally JS, McCann L, Jones DP, Harrison DG. The role of the multidrug resistance protein-1 in modulation of endothelial cell oxidative stress. *Circ Res.* 30. September 2005;97(7):637–44.
170. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Typ-2-Diabetes – Teilpublikation der Langfassung, 2. Auflage. Version 1. 2021 [cited: 2022-02-16]. DOI: 10.6101/AZQ/000475. www.leitlinien.de/diabetes.
171. Mahrooz A, Alizadeh A, Hashemi-Soteh MB, Ghaffari-Cherati M, Hosseini-Talei SR. Polymorphic Variants rs3088442 and rs2292334 in the Organic Cation Transporter 3 (OCT3) Gene and Susceptibility Against Type 2 Diabetes: Role of their Interaction. *Arch Med Res.* Februar 2017;48(2):162–8.
172. Li L, He M, Zhou L, Miao X, Wu F, Huang S, u. a. A Solute Carrier Family 22 Member 3 Variant rs3088442 G→A Associated with Coronary Heart Disease Inhibits Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Response. *J Biol Chem.* 27. Februar 2015;290(9):5328–40.

173. Gravel S, Panzini B, Belanger F, Turgeon J, Michaud V. A Pilot Study towards the Impact of Type 2 Diabetes on the Expression and Activities of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters in Human Duodenum. *Int J Mol Sci.* 2. Juli 2019;20(13):E3257.
174. Anger GJ, Cressman AM, Piquette-Miller M. Expression of ABC Efflux transporters in placenta from women with insulin-managed diabetes. *PLoS One.* 2012;7(4):e35027.
175. Yu L, Wang T, Que R, Yang J, Wang Z, Jiang X, u. a. The potentially protective role of ATP-binding cassette transporters in preeclampsia via Nrf2. *Pregnancy Hypertens.* Oktober 2019;18:21–8.
176. Williams PJ, Mistry HD, Morgan L. Folate transporter expression decreases in the human placenta throughout pregnancy and in pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* April 2012;2(2):123–31.
177. Hooijberg JH, Peters GJ, Assaraf YG, Kathmann I, Priest DG, Bunni MA, u. a. The role of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2 and MRP3 in cellular folate homeostasis. *Biochem Pharmacol.* 1. März 2003;65(5):765–71.
178. Sasaki K ichiro, Duan J, Murohara T, Ikeda H, Shintani S, Shimada T, u. a. Rescue of hypercholesterolemia-related impairment of angiogenesis by oral folate supplementation. *J Am Coll Cardiol.* 16. Juli 2003;42(2):364–72.
179. Bottalico B, Larsson I, Brodzki J, Hernandez-Andrade E, Casslén B, Marsál K, u. a. Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta.* Juli 2004;25(6):518–29.
180. Kojovic D, V. Workewych N, Piquette-Miller M. Role of Elevated SFLT-1 on the Regulation of Placental Transporters in Women With Pre-Eclampsia. *Clin Transl Sci.* Mai 2020;13(3):580–8.
181. Eltherington LG, Stoff J, Hughes T, Melmon KL. Constriction of human umbilical arteries. Interaction between oxygen and bradykinin. *Circ Res.* Juni 1968;22(6):747–52.
182. Bjørø K, Stray-Pedersen S. In vitro perfusion studies on human umbilical arteries. I. Vasoactive effects of serotonin, PGF₂ alpha and PGE₂. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1986;65(4):351–5.
183. Middelkoop CM, Dekker GA, Kraayenbrink AA, Popp-Snijders C. Platelet-poor plasma serotonin in normal and preeclamptic pregnancy. *Clin Chem.* 1. August 1993;39(8):1675–8.
184. Gujrati VR, Shanker K, Vrat S, Chandravati null, Parmar SS. Novel appearance of placental nuclear monoamine oxidase: biochemical and histochemical evidence for hyperserotonomic state in preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* Dezember 1996;175(6):1543–50.
185. Karahoda R, Horackova H, Kastner P, Matthios A, Cerveny L, Kucera R, u. a. Serotonin homeostasis in the materno-foetal interface at term: Role of transporters (SERT/SLC6A4 and OCT3/SLC22A3) and monoamine oxidase A (MAO-A) in uptake and degradation of serotonin by human and rat term placenta. *Acta Physiol Oxf Engl.* August 2020;229(4):e13478.
186. Carrasco G, Cruz MA, Gallardo V, Miguel P, Dominguez A, González C. Transport and metabolism of serotonin in the human placenta from normal and severely pre-eclamptic pregnancies. *Gynecol Obstet Invest.* 2000;49(3):150–5.

187. Zhu HJ, Appel DI, Gründemann D, Richelson E, Markowitz JS. Evaluation of organic cation transporter 3 (SLC22A3) inhibition as a potential mechanism of antidepressant action. *Pharmacol Res.* April 2012;65(4):491–6.
188. Chang TT, Shyu MK, Huang MC, Hsu CC, Yeh SY, Chen MR, u. a. Hypoxia-mediated down-regulation of OCTN2 and PPAR α expression in human placentas and in BeWo cells. *Mol Pharm.* 7. Februar 2011;8(1):117–25.
189. Rytting E, Audus KL. Effects of low oxygen levels on the expression and function of transporter OCTN2 in BeWo cells. *J Pharm Pharmacol.* August 2007;59(8):1095–102.
190. Dunk CE, Pappas JJ, Lye P, Kibschull M, Javam M, Bloise E, u. a. P-Glycoprotein (P-gp)/ABCB1 plays a functional role in extravillous trophoblast (EVT) invasion and is decreased in the pre-eclamptic placenta. *J Cell Mol Med.* November 2018;22(11):5378–93.
191. Jebbink J, Veenboer G, Boussata S, Keijser R, Kremer AE, Elferink RO, u. a. Total bile acids in the maternal and fetal compartment in relation to placental ABCG2 expression in preeclamptic pregnancies complicated by HELLP syndrome. *Biochim Biophys Acta.* Januar 2015;1852(1):131–6.
192. Afrouzian M, Al-Lahham R, Patrikeeva S, Xu M, Fokina V, Fischer WG, u. a. Role of the Efflux Transporters BCRP and MRP1 in Human Placental Bio-disposition of Pravastatin. *Biochem Pharmacol.* Oktober 2018;156:467–78.
193. Ruebner M, Langbein M, Strissel PL, Henke C, Schmidt D, Goecke TW, u. a. Regulation of the human endogenous retroviral Syncytin-1 and cell-cell fusion by the nuclear hormone receptors PPAR γ /RXR α in placentogenesis. *J Cell Biochem.* Juli 2012;113(7):2383–96.
194. Sitras V, Paulssen RH, Grønaas H, Leirvik J, Hanssen TA, Vårtun A, u. a. Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta.* Mai 2009;30(5):424–33.
195. Enquobahrie DA, Meller M, Rice K, Psaty BM, Siscovick DS, Williams MA. Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* November 2008;199(5):566.e1-11.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Oke Stückrad
Anschrift: Schulenburgstraße 22 in 18069 Rostock
Telefon: 0157 79025613
E-Mail: oke.stueckrad@med.uni-rostock.de
Geburtsdatum/-ort.: 12.09.1990 in Rostock
Familienstand: verheiratet

Beruf

Seit 08/2019 Assistenzarzt der Neurologie in der Universitätsmedizin Rostock
08/2018 – 07/2019 Assistenzarzt der Psychiatrie in der Universitätsmedizin Rostock

Berufsbezogene Praktika

02/2017 – 04/2018 3. PJ-Tertial: Neurologie, Klinikum Altenburger Land
09/2017 – 12/2017 2. PJ-Tertial: Innere Medizin, Klinikum Altenburger Land
05/2017 – 09/2017 1. PJ-Tertial: Chirurgie, Centre Hospitalier de Luxembourg
04/2016 4-wöchige Famulatur Allgemeinmedizin, Hausärztliche
Gemeinschaftspraxis Schmarl, Rostock
10/2014 4-wöchige Famulatur Gastroenterologie, Universitätsmedizin
Greifswald
09/2014 4-wöchige Famulatur Kardiologische Ambulanz und Diagnostik,
Universitätsmedizin Greifswald
07/2014 4-wöchige Famulatur Neurologie, Universitätsmedizin Greifswald

Studium

2010 - 2018 Studium der Humanmedizin an der Universität Greifswald
05/2018 Abschluss 3. Staatsexamen mit der Note „gut“
06/2017 Abschluss 2. Staatsexamen mit der Note „gut“
09/2012 Abschluss 1. Staatsexamen mit der Note „sehr gut“

Schulbildung

2001 - 2009 Innerstädtisches Gymnasium Rostock
1997 - 2001 Grundschule „Juri Gagarin“ in Rostock

Sprachkenntnisse

Englisch Verhandlungssicher
Französisch Gute Kenntnisse in Wort und Schrift (DELF A2)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Oke Stückrad, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Rostock den

Oke Stückrad

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Stefan Oswald bedanken, der es mir ermöglichte in seinen Arbeitskreis dies Promotionsarbeit anzufertigen und mich immer wieder ermunterte das Projekt fortzuführen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen - insbesondere bei Dr. rer. nat. Susanne Brück, Christian Gröer und Marten Möller - für die Einführung in die wissenschaftlichen und labortechnischen Arbeitsmethoden.

Einen Dank an meine Kommilitonen Daniel Schulz und Pascal Erdmann für eure immer aufmunternden Worte und die Freundschaft die sich während der Zeit des Studiums entwickelt hat.

Der letzte Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern Diana und Holm Stückrad für die Unterstützung während meines Studiums und der Promotion, sowie der Hilfe auch fernab von akademischen Problemen. Meiner Verlobten Peggy Berndt, die es mir ermöglichte diese wissenschaftliche Arbeit zu verfassen. Meiner Tochter Ylvie Ida Stückrad, deren Freude und Neugier mir immer wieder Kraft schenkte.