

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

**Die Einflüsse von Übergewicht und
Gestationsdiabetes auf die Plazenta und das Kind
im Hinblick auf Cortisol, den Glucocorticoid-
Rezeptor NR3C1, den Transporter ABCB1 und die
Enzyme 11 β -HSD1 und 11 β -HSD2**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Jana Thomas
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 28. Mai 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch
2. Gutachter: Privatdozent Dr. Dr. med. Y. Garnier

Erklärung

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

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

Universitätsprofessor Dr. med. Jörg Dötsch
Dr. rer. nat. Sarah Appel
Dr. med. Eva-Maria Turnwald
Maria Wohlfahrt
Dr. rer. nat. Tobias Kretschmer
Dr. rer. nat. Dr. rer. medic. Kija Shah

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

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

Das Studiendesign der Cologne Placenta Cohort wurde durch Dr. Sarah Appel und Dr. Eva-Maria Turnwald erarbeitet. Die Aufklärungsgespräche sowie die Präparation der Plazenten sind für die Patientinnen Nr. 81-141 von Frau Catharina Gündel und mir selbst nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. Sarah Appel und Frau Dr. Eva-Maria Turnwald eigenständig ausgeführt worden.

An der Sammlung der gesamten Studienkohorte waren folgende Personen außerdem beteiligt: Judith Fischbach, Chiara Faridi, Lisa Marie Sgonina, Pavel Pavlov, Marie Woite und Franziska Neu. Die Entnahme der maternalen Blutproben erfolgte durch die Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, genauer durch das Kreissaalteam unter Leitung von Dr. med. Berthold Grüttner bzw. der Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin der Uniklinik Köln.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente der Proteinisolation bis hin zur Analyse der Proteine in Western Blots wie auch der RNA-Isolation bis hin zur Analyse der cDNA mittels qRT-PCR sind nach entsprechender Anleitung durch die Biologielaborantin Frau Maria Wohlfarth von mir eigenständig ausgeführt worden.

Die Durchführung der Immunhistochemie erfolgte eigenständig nach entsprechender Anleitung durch Dr. Tobias Kretschmer.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Blutuntersuchungen wurden in meinem Auftrag und meiner Vorbereitung, aber ohne meine Mitarbeit, vom Zentrallabor der Uniklinik Köln ermittelt. Für die statistische Auswertung erfolgte eine Beratung durch Dr. Dr. Kija Shah vom Institut für medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 27.12.2024

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an all jene aussprechen, die mich während meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater und Chefarzt, Professor Dötsch. Ihre inspirierenden Ideen haben maßgeblich zu meinem wissenschaftlichen Werdegang beigetragen. Ich schätze Ihre Geduld und Ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten sehr.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Sarah Appel und Eva-Maria Turnwald für die Betreuung dieser Arbeit, der ganzen Studie und für jede doofe Frage, auf die ihr immer eine Antwort gefunden habt. Eure fachliche Expertise und eure wertvolle Anleitung und auch euer konstruktives Feedback waren für mich von unschätzbarem Wert. Ihr habt mir stets zur Seite gestanden und mich motiviert, mein Bestes zu geben.

Mein Dank richtet sich ebenso an das gesamte Laborteam, besonders Maria und Tobias Kretschmer für Eure geduldige Anleitung und Unterstützung in den Experimenten. Euer Teamgeist und Hilfsbereitschaft haben die Laborarbeit zu einer wertvollen Erfahrung gemacht.

Ein besonderer Dank gebührt dem Kreißsaalteam, das mir während meiner Forschung wertvolle Einblicke gewährt hat. Eure Unterstützung hat es uns ermöglicht, die Plazentastudie erfolgreich durchzuführen. Ich möchte auch den anderen Doktorandinnen der Plazentastudie danken. Das gemeinsame ‚Plazenten sammeln‘, der Austausch von Ideen und Erfahrungen haben mir oft neue Perspektiven eröffnet. Ohne Euch wäre die Durchführung der Plazentastudie und dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte auch dem Team des CECAD danken für die Überlassung der Geräte unter anderem für die Gewebeschnitte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir immer den Rücken gestärkt haben. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich unterstützt.

Ich danke meinem Mann, Aaron, für jedes unterstützende Wort, jede Umarmung und dass Du den Glauben an mich und dieses Projekt nie aufgegeben hast. Du hast mir die Freiheit und den Rückhalt gegeben, um mich voll und ganz auf diese Arbeit zu konzentrieren, wann immer es notwendig war. Und ich danke Mylo, für jedes Babylachen, was mich wieder hat abschalten lassen.

Mein Dank gilt Nadine Jürgens und Catharina Gündel als meine „Leidensgenossinnen“ von der ersten Plazenta bis zu der Veröffentlichung dieser Arbeit. Eure Freundschaft war eine große Stütze während dieser intensiven Zeit.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	11
2. EINLEITUNG	14
2.1 Übergewicht und Adipositas	14
2.2 Gestationsdiabetes (GDM)	14
2.3 Plazentarer Aufbau	16
2.4 Cortisol	16
2.4.1 Cortisol in der Schwangerschaft	17
2.4.2 Die maternale HPA-Achse in der Schwangerschaft	18
2.4.3 Transport des Cortisols	19
2.4.4 Fetales Cortisol und Geburtsmodus	19
2.4.5 Die Rolle der 11 β -HSD Typ 1 und 2	19
2.4.6 Die GR und ihre Isoformen	21
2.4.7 Die GR und ihre Funktion	22
2.4.8 Die Rolle des p-Glykoproteins im transplazentären Cortisol- Transport	22
2.5 Die HPA-Achse und GC-Plazentaschranke unter maternalem Übergewicht und GDM (aktueller Stand der Forschung)	24
2.6 Fragestellung der Arbeit	25
3. MATERIALIEN UND METHODEN	27
3.1 Materialien und Geräte	27
3.1.1 Geräte	27
3.1.2 Verbrauchs- und Gebrauchsgegenstände	29
3.1.3 Chemikalien	30
3.1.4 Lösungen und Puffer	32
3.1.5 Antikörper	33
3.1.6 Primer	34
3.1.7 Software	35
3.2 Patientinnen-Kollektiv und Methoden der Probenasservierung	36
3.2.1 Patientinnen-Kollektiv	36

3.2.2	Datenerhebung der Patientinnen	36
3.2.3	Maternale Blutproben	37
3.2.4	Fetale Blutproben	37
3.2.5	Plazenta-Präparation	38
3.3	Immunhistochemie	39
3.4	Molekularbiologische Methoden	41
3.4.1	RNA-Isolation	41
3.4.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA	42
3.4.3	cDNA-Synthese	42
3.4.4	qRT-PCR-TaqMan®	43
3.4.5	qRT-PCR-SYBR®-Green	44
3.4.6	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.4.7	qRT-PCR-Fehleranalyse	46
3.5	Proteinanalytische Methoden	47
3.5.1	Protein-Isolation	47
3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.5.4	Western Blot	49
3.5.5	Stripping	50
3.6	Statistische Auswertung	50
4.	ERGEBNISSE	52
4.1	Beschreibung der Studienkohorte	52
4.1.1	Studienpopulation – Maternale Daten	52
4.1.2	Studienpopulation – Plazentare Informationen	54
4.1.3	Studienpopulation – Fetale Daten	54
4.2	Cortisol	57
4.2.1	Maternale Cortisolspiegel	57
4.2.2	Fetale Cortisolspiegel	58
4.2.3	Fetale und maternale Cortisolspiegel und die fetale und plazentare Gewichtsentwicklung	59
4.3	Immunhistochemie- Vorversuch	60
4.4	qRT-PCR-Fehleranalyse	62
4.5	Die plazentaren GR	62
4.5.1	NR3C1-mRNA-Expression in der Plazenta	62

4.5.2	Die GR auf Protein-Ebene in der Plazenta	63
4.5.3	Maternales Cortisol und die plazentaren GR	65
4.6	11 β -HSD, eine Komponente der GC-Plazentaschranke	66
4.6.1	Plazentare HSD11B1 mRNA-Genexpression	66
4.6.2	HSD11B2-mRNA-Expression in der Plazenta	67
4.6.1	11 β -HSD2-Proteinlevel in der Plazenta	68
4.7	p-GP	68
4.7.1	p-GP und der fetale Kopfumfang	69
5.	DISKUSSION	71
5.1	Interpretation der Ergebnisse aus der Studienkohorte	71
5.2	Die peripartalen Cortisolspiegel der Schwangeren und ihres Fetus unter GDM und Übergewicht	73
5.3	Die GC-Plazenta-Schranke unter maternalem Übergewicht und GDM	75
5.3.1	11 β -HSD2	75
5.3.2	11 β -HSD1	76
5.3.3	p-GP	77
5.4	Die GR unter GDM und Übergewicht	77
5.5	Stärken und Limitationen	78
5.6	Fazit und Ausblick	79
6.	LITERATURVERZEICHNIS	81
7.	ANHANG	94
7.1	Abbildungsverzeichnis	94
7.2	Tabellenverzeichnis	94

Abkürzungsverzeichnis

Dieses Verzeichnis ist alphabetisch geordnet und nicht in Reihenfolge der ersten Erwähnung der jeweiligen Abkürzung.

%	Prozent
°C	Grad Celsius
11β-HSD1	11-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase 1
11β-HSD2	11-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase 2
18S-RNA	18S ribosomale RNA
A	Adenin
α	Alpha
Abb.	Abbildung
ABCB1	ABC-Transporter Klasse B 1/ Multidrug-Resistance-Protein 1/ p-Glykoprotein
ACTH	Adrenocortikotropes Hormon
AD	Adipositas
AG	Aktiengesellschaft
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP-1	Aktivator Protein 1
β	Beta
bp	Basenpaare
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CBG	Transcortin (Corticosteroid Binding Globulin) DNA
cDNA	Komplementäre DNA (Complementary DNA)
cm	Zentimeter
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
CT	Schwellenzyklus (Cycle Threshold)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	errechneter Termin
et al.	et alii
for	forward
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glucocorticoid(e)
GDM	GDM (Diabetes mellitus Typ IV)
ges	gesamt
GILZ	Glucocorticoid-induced leucine zipper-Protein

ggf.	gegebenenfalls
GR α	Glucocorticoid-Rezeptor Alpha
GR ges	Glucocorticoid-Rezeptor gesamt
FGR	fetale Wachstumsrestriktion (fetal growth restriction)
h	Stunde/n
HAPO	Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome
H ₂ O	Wasser
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Hypothalamus-pituitary-adrenal-axis)
HOMA-Index	Homeostasis Model Assessment- Index
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IL	Interleukin
IOM	Institute of Medicine
IQR	Interquartilsabstand
kDa	Kilo Dalton
KI	Konfidenzintervall
Konz.	Konzentration
LGA	Groß für Gestationsalter (Large for Gestational Age)
Lsg	Lösung
m/v	Gewicht pro Volumen
mA	Milliampere
MDR1	P-Glykoprotein/ABCB1-Transporter/Multidrug-Resistance-Protein 1
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Mol
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nitrozellulose
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nGDM	kein GDM
nmol	Nanomol
NR3C1 α	Glucocorticoid-Rezeptor α (Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1 alpha)
NR3C1ges	Glucocorticoid-Rezeptor gesamt (Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1)
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
p	Signifikanzwert
p-GP	P-Glykoprotein/ABCB1-Transporter/Multidrug-Resistance-Protein 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Polyacryamide Gel Electrophoresis)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	phosphatgepufferte Formaldehydlösung
PVK	Peripherer Venenverweilkatheter
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction)
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per Minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDHA	Succinate-Dehydrogenase-Komplex Flavoprotein Untereinheit A
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SGA	Klein für Gestationsalter (Small for Gestational Age)
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche(n)
STAT	Signaltransduktor und -aktivator der Transkription
Tab.	Tabelle
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine
taq	Taqman-Sonde
TBP	TATA-Box Binding Protein
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
ÜG	Übergewicht
V	Volt
vs.	im Vergleich zu (versus)
v/v	Volumen pro Volumen
VE H ₂ O	Vollentsalztes Wasser
Vgl.	Vergleich(e)
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
YWHAZ	3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta
β-2-MG	β ₂ -Mikroglobulin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
*	Signifikant ($\alpha \leq 0,05$)
**	Hochsignifikant ($\alpha \leq 0,01$)

1. Zusammenfassung

In dieser Dissertationsschrift soll der Einfluss des maternalen Übergewichts mit und ohne gleichzeitiges Vorliegen eines Gestationsdiabetes (GDM) auf den maternofetalen Cortisol-Transport beleuchtet werden. Hierfür wurden die Patientinnen und ihre Kinder in 3 Gruppen eingeteilt, die normalgewichtige Schwangerschaft ohne GDM (Gruppe I), die übergewichtige Schwangerschaft ohne GDM (Gruppe II) und die übergewichtige Schwangerschaft mit GDM (Gruppe III).

Der Cortisolspiegel und damit die fetale Cortisol-Exposition ist unmittelbar wichtig für das fetale Outcome, z.B. besteht durch eine vermehrte fetale Cortisol-Exposition ein erhöhtes Risiko eine fetale Wachstumsrestriktion (FGR) zu entwickeln. Bei FGR können dementsprechend signifikant höhere fetale Cortisolspiegel nachgewiesen werden.

Das maternale Übergewicht ist insofern interessant, als dass bei Adipositas des Erwachsenen unabhängig einer vorliegenden Schwangerschaft höhere Cortisolspiegel bestehen, während in der Schwangerschaft eine veränderte Cortisol-Ausschüttung bei Adipositas besteht. Mit Höhe des BMI steigt auch das allgemeine Risiko einen Diabetes mellitus Typ II bzw. einen GDM in der Schwangerschaft zu entwickeln. Gleichzeitig besteht bei Adipositas wie auch bei GDM eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein fetales LGA (Large for Gestational Age).

Im Rahmen der Analyse der Studienkohorte zeigte sich bei übergewichtiger, diabetischer Schwangerschaft (Gruppe III) im Vergleich zur nicht-diabetischen Schwangerschaft mit und ohne Übergewicht (Gruppen I und II) eine deutliche Erhöhung der fetometrischen Daten Kopfumfang, Körpergewicht und -länge; es kam außerdem signifikant häufiger zu einem (very) LGA und einer Makrosomie in übergewichtiger, diabetischer Schwangerschaft. Beim Plazentagewicht zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Weiterhin wurde das maternale Cortisol peripartal nüchtern vor Sectio caesarea untersucht. Hierbei zeigte sich ein bei übergewichtiger, diabetischer Schwangerschaft (Gruppe III) gegenüber der normalgewichtigen Schwangerschaft (Gruppe I) erniedrigter Cortisolspiegel. Der maternale Cortisolspiegel korrelierte weiterhin negativ mit dem präpartalen, maternalen BMI. Zum Vergleich wurde aus dem Nabelschnurblut unmittelbar nach der Sectiones-Entbindung das neonatale Blut gewonnen, hier zeigte sich ein Cortisolspiegel, der sich in den Untersuchungsgruppen nicht signifikant unterschied. Der maternale Cortisolspiegel zeigte sich um den Faktor 7,5 höher als der neonatale Cortisolspiegel.

Die sogenannte Glucocorticoid-Plazenta-Schranke reguliert den Übergang des Cortisols auf den Fetus. Entscheidende Enzyme und Transporter dieser Schranke sind die 11 β -HSD1 für die Aktivierung des Cortisols, vorrangig in der Dezidua und 11 β -HSD2 für Inaktivierung des Cortisols im Chorion/Synzytiotrophoblasten, sowie das p-Glykoprotein, welches hauptsächlich im Synzytiotrophoblasten exprimiert wird und als Efflux-Transporter seine Substrate, zu denen auch Cortisol gehört, aktiv vom fetalen in das maternale Kompartiment zurücktransportiert.

Während in übergewichtiger Schwangerschaft (Gruppen II sowie III) das Schranken-Protein 11 β -HSD2 keine Veränderungen im plazentaren Gewebe gegenüber der normalgewichtigen Schwangerschaft (Gruppe I) auf mRNA-Ebene zeigte, ließ sich ein Unterschied mit dem Vorliegen eines GDM bei Übergewicht nachweisen (Gruppe II zu Gruppe III), so kam es bei gleichzeitigem Vorliegen eines GDM und Übergewicht zu einer signifikant höheren mRNA-Expression. Es ließ sich auf Protein-Ebene keine signifikante Veränderung der 11 β -HSD2 nachweisen. Eine andere Studie kommt zu einem ähnlichen Ergebnis mit einer erhöhten HSD11B2-mRNA Expression in diabetischer Schwangerschaft, auf Proteinebene ließ sich hier jedoch keine Veränderung mehr abbilden.

Für die Cortison-aktivierende 11 β -HSD1 konnte keine Veränderung auf mRNA-Ebene weder bei Vorliegen eines GDM noch bei maternalem Übergewicht (Gruppe II und III) im Vergleich zur nicht-diabetischen, normalgewichtigen Schwangerschaft (Gruppe I) im plazentaren Gewebe gefunden werden. Diese Aussage wird eingeschränkt durch einen frustranen Western Blot, in dem die 11 β -HSD1 nicht spezifisch dargestellt werden konnte. In anderen Studien zeigte sich vor allem eine Expression in der Dezidua sowie in den fetalen Geweben jenseits der Plazenta. Ein möglicher Effekt eines Übergewichts und GDM bezüglich des 11 β -HSD1-Proteinlevels in der maternalen Dezidua ist also im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht worden. Die Fragestellung der Aufhebung einer GC-Schutzfunktion in der Plazenta über eine erhöhte Cortison-Expression des Fetus, welches wiederum auf fetaler Seite mittels 11 β -HSD1 zu Cortisol aktiviert werden könnte, sollte Ziel zukünftiger Untersuchungen sein.

Leider gelang im Rahmen dieser Arbeit keine Darstellung der mRNA-Expression des p-Glykoprotein (p-GP) kodierenden ABCB1-Gens im untersuchten plazentaren Gewebe. Auf Proteinebene ließ sich kein signifikanter Unterschied nach Vorliegen eines höheren maternalen Gewichts oder eines GDM (Gruppe II und III vs. Gruppe I). Es zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen dem neonatalen Kopfumfang und des plazentaren p-GP-Proteinlevels.

Cortisol entfaltet seine Wirkung unter anderem über Glucocorticoid Rezeptoren (GR), welche auch in der Plazenta exprimiert werden. Um auch diese direkte plazentare Wirkung des Cortisols zu beleuchten, werden in dieser Arbeit vor allem der GR α und indirekt der inhibitorische GR β untersucht. Auf mRNA-Ebene zeigte sich bei der Expression des GR-kodierenden NR3C1-Gens kein signifikanter Unterschied, auf Proteinebene zeigte sich insbesondere beim GR α eine signifikante Erhöhung bei übergewichtiger, nicht-diabetischer Schwangerschaft gegenüber der normalgewichtigen Schwangerschaft (Gruppe I vs. II) im untersuchten plazentaren Gewebe. Diese Erhöhung zeigte sich in der Tendenz bei Vorliegen eines GDM (Gruppe III) wieder rückläufig. Ähnlich zeigten sich auch die Proteinlevel des GR (gesamt), hier zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Es

konnte weiterhin eine positive Korrelation zwischen dem plazentaren GR-Proteinlevel und dem Cortisolspiegel im maternalen Blut nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte ein höherer maternaler Cortisolspiegel mit steigendem maternalen BMI nachgewiesen werden sowie einen höheren maternalen Cortisolspiegel bei gemeinsamem Vorliegen von GDM und Übergewicht (Gruppe III im Vergleich zum Normalgewicht, Gruppe I). Ein höherer Cortisolspiegel korreliert auch mit dem plazentaren GR-Proteinlevel, welches sich vor allem bei übergewichtiger Schwangerschaft ohne GDM erhöht zeigte (Gruppe II im Vergleich zum Normalgewicht, Gruppe I). Die Funktion der plazentaren GR ist weitgehend unverstanden und sollte im Rahmen weiterer Studien näher analysiert werden.

Während ein erhöhter maternaler Cortisolspiegel auf plazentarer Ebene die GR beeinflussen mag, zeigte sich kein Unterschied der fetalen Cortisolspiegel. Die Glucocorticoid-Plazentaschranke, bestehend vorrangig aus dem 11 β -HSD2, zeigte sich also effektiv. Es gelang auf mRNA-Ebene eine Erhöhung der HSD11B2-Expression in übergewichtiger, diabetischer Schwangerschaft (Gruppe III) nachzuweisen (im Vergleich zur übergewichtigen, nicht-diabetischen Schwangerschaft, Gruppe II), was sich jedoch auf Proteinebene nicht abbilden ließ. Es konnte keine Veränderung des plazentaren p-GP auf Protein-Ebene nachweisen, ebenso wenig wie eine Veränderung der mRNA-Expression des HSD11B1-Gens.

2. Einleitung

2.1 Übergewicht und Adipositas

Das präpartale Gewicht der Mutter und die Gewichtszunahme während der Schwangerschaft haben Einfluss auf Schwangerschaftsrisiken und das fetale sowie maternale Outcome ².

Die WHO unterscheidet je nach Body-Mass-Index (BMI) eines Menschen verschiedene Kategorien (s. Tabelle 1) ³. Der BMI wird anhand des Quotienten aus Körpergewicht und der Körpergröße zum Quadrat berechnet. Übergewicht beginnt definitionsgemäß ab einem BMI $\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$, Adipositas ist definiert als eine Vermehrung des Körperfettanteils über das normale Maß hinaus (BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) ^{3,4}. Das Risiko für Komorbiditäten ist bereits bei Übergewicht erhöht und steigt mit dem BMI weiter an ³.

	BMI [kg/m ²]
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5-24,9
Übergewicht	25,0-29,9
Adipositas	Grad I 30,0-34,9
	Grad II 35,0-39,9
	Grad III > 40,0

Tabelle 1: Einteilung der Gewichtsgruppen anhand des Body-Mass-Index.

Während der Schwangerschaft steigt bei übergewichtigen und adipösen Frauen mit dem BMI das Risiko für eine erhöhte Insulinresistenz, die Ausbildung eines GDM sowie das Risiko für Fehlgeburten und die Entwicklung von fetalen Fehlbildungen wie Spina bifida oder Herzfehler ⁵⁻⁷.

Unterdessen wächst die Zahl der Schwangerschaften mit Adipositas in Deutschland jährlich und betraf 2022 bereits mehr als 15 % aller Schwangerschaften ⁸.

Um die Komplikationsraten prä-, peri- und postpartal zu senken, empfehlen das Institute of Medicine und die Deutsche Adipositas-Gesellschaft je nach BMI der Schwangeren eine unterschiedlich starke Gewichtszunahme im Schwangerschaftsverlauf, die nicht überschritten werden sollte: Für normalgewichtige Schwangere mit Einlingsgravidität werden 11,5-16 kg Gewichtszunahme empfohlen, für übergewichtige Frauen 7-11,5 kg und adipöse Frauen sollen gemäß der Empfehlung 5-9 kg zunehmen ^{4,9}.

2.2 Gestationsdiabetes (GDM)

GDM ist definiert als eine Störung der Glukose-Toleranz, die in der in der Schwangerschaft neu auftritt, und wird anhand der IADPSG-Kriterien diagnostiziert ¹⁰⁻¹².

Zur Diagnostik wird in der 25. bis 28. SSW ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT) eingesetzt. In Deutschland ist vor allem der 50 g oGTT verbreitet, hier erfolgt eine Ingestion von 50 g gelöster Glukose. Bei einer venösen Blutglukose > 200 mg/dl nach 60 Minuten kann die

Diagnose GDM direkt gestellt werden ¹³. Im Falle eines nicht eindeutigen Ergebnisses zwischen 135 mg/dl und 199 mg/dl wird ein 75 g oGTT durchgeführt (zweizeitiges Vorgehen) ¹³. Hierbei erfolgt eine Ingestion von 75 g gelöster Glukose und Kontrollen der venösen Blutglukose-Werte. Ein GDM liegt vor, wenn der Glukose-Wert nüchtern > 92 mg/dl (5,1 mmol/l) oder nach 1 Stunde \geq 180 mg/dl (10,0 mmol/l) oder nach 2 Stunden > 153 mg/dl (8,5 mmol/l) liegt ¹⁰⁻¹². Für die Diagnosekriterien eines GDM siehe auch Tabelle 2.

50 oGTT			
Werte	\leq 134 mg/dl	135-199 mg/dl	\geq 200 mg/dl
Interpretation	Kein Diabetes	pathologischer Wert → oGTT 75	Diabetes

75 oGTT		
Kriterien	nüchtern	> 92 mg/dl
	nach 1 Stunde	\geq 180 mg/dl
	nach 2 Stunden	> 153 mg/dl
Interpretation	Diabetes, sobald 1 Kriterium erfüllt ist	

Tabelle 2: Diagnostische Kriterien eines GDM in Deutschland.

Das Risiko für eine Schwangere einen GDM zu entwickeln steigt mit dem BMI auf das Doppelte bei Übergewicht, bis hin zum Achtfachen bei schwerer Adipositas ⁵. Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines GDM sind das maternale Alter, eine positive Familienanamnese oder ein GDM in einer vorangegangenen Schwangerschaft sowie die Ethnizität ¹⁴. Das Bestehen einer Adipositas ist somit der vermutlich stärkste beeinflussbare Risikofaktor für die Entwicklung eines GDM ¹⁵.

Ebenso wie die Adipositas-Prävalenz steigt auch die Inzidenz der Schwangerschaften mit GDM auf mittlerweile 9,4 % ⁸.

Wie die Gewichtszunahme scheint auch das Vorliegen einer Glukosetoleranzstörung in Abhängigkeit von der Ausprägung der maternalen Hyperglykämie zu einer Risikoerhöhung diverser Komplikationen wie einem LGA (Large for Gestational Age; Geburtsgewicht > 90. Perzentile), Sectiones Caesarea, wie auch sekundär zu erhöhtem neonatalem Versorgungsbedarf zu führen ^{12,16}.

Als Langzeitfolge eines GDM vor allem in Kombination mit einem erhöhten maternalen BMI zeigt sich ein erhöhtes metabolisches Risiko des Kindes. Hier zeigen sich vor allem die Parameter des Auftretens einer Adipositas im Kindes- und Jugendalter und die Wahrscheinlichkeit, eine diabetische Stoffwechsellage im weiteren Leben zu entwickeln, erhöht ¹⁷⁻²⁰. Als mögliche Langzeitfolgen bestehen für die Mutter unter anderem ein erhöhtes kardiovaskuläres Erkrankungsrisiko innerhalb von 12 Jahren postpartal ^{21,22}. Weiterhin besteht für die Mutter ein erhöhtes Risiko einen manifesten Diabetes mellitus Typ II im Verlauf zu

entwickeln wie auch ein erhöhtes Risiko in weiteren Schwangerschaften einen erneuten GDM zu entwickeln ^{13,14}.

2.3 Plazentarer Aufbau

Die humane Plazenta ist rundlich und misst bei der Geburt ungefähr 20 bis 25 cm im Durchmesser bei ungefähr 3 cm Höhe und einem Gewicht von 500-600 g ²³.

Sie entsteht aus dem Trophoblasten, der aus Synzytiotrophoblast und Zytotrophoblast später die Plazenta entwickelt. Ab dem vierten Monat besteht die Plazenta aus einem fetalen Anteil gebildet aus Chorionplatte und Chorionzotten und einem maternalem Anteil aus der Decidua basalis. Die Chorionplatte bildet die Begrenzung der Plazenta auf fetaler Seite, die Deziduaplatte die Begrenzung auf maternaler Seite. Bis zu 100 Spiralarterien durchbrechen die Deziduaplatte und transportieren das maternale Blut aus dem Uterus in die intervillösen Räume, wo sie die Chorionzottenbäume umspülen. Aus den Chorionzotten fließt das sauerstoffreiche Blut in der Nabelvene zum Fetus, das sauerstoffarme Blut wird durch die zwei Nabelarterien in die Plazenta zurückgeführt. Die äußerste Schicht der Chorionzotten bildet der villöse Trophoblast, der somit in direkten Kontakt mit dem maternalen Blut steht und einen wesentlichen Teil der Plazentaschranke darstellt. Er fusioniert im Verlauf der Schwangerschaft mit dem darunterliegenden Synzytiotrophoblasten ²⁴.

Mit Wachstum der Deziduasepten im vierten und fünften Schwangerschaftsmonat entstehen einzelne Funktionseinheiten, die Kotelydonen, die aber nicht vollständig voneinander getrennt sind. Die reife Plazenta hat 15-20 solcher Kotelydonen ²⁴.

Die wesentliche Funktion der Plazenta besteht im Gas- und Stoffaustausch zwischen maternalem und fetalem Blut bei gleichzeitiger Filterfunktion ebendieser. So wird der Fetus über sie mit Sauerstoff und wichtigen Stoffwechselprodukten wie Aminosäuren, Zucker und Fettsäuren versorgt, sowie Vitamine, Elektrolyte und auch IgG-Antikörper. Die Plazenta produziert Hormone wie Progesteron, hCG und Östrogene, die zur Erhaltung und Entwicklung der Schwangerschaft unerlässlich sind. Eine weitere essenzielle Funktion liegt in der Plazenta-Schranke, die zu Beginn aus Synzytium, Zytotrophoblast, Bindegewebe und Endothel besteht und mit Fortschreiten der Schwangerschaft durch die Rückbildung des Zytotrophoblasten einen erleichterten Stoffaustausch zulässt ²⁴.

2.4 Cortisol

Steroidhormone stellen eine umfangreiche Gruppe lipophiler Hormone mit unterschiedlichen Funktionen dar, die *de novo* in der Nebenniere sowie den Keimdrüsen aus Cholesterin synthetisiert werden und strukturell den Steran-Derivaten angehören ²⁵.

Cortisol, auch Hydrocortison, ist ein körpereigenes Steroidhormon, das von der Zona fasciculata der Nebennierenrinde *de novo* synthetisiert und ausgeschüttet wird. Die Cortisol-Synthese erfolgt aus Cholesterin und wird über das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) aus

der Adenohypophyse und so indirekt durch das Corticoid-Releasing-Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus gesteuert. Die Ausschüttung des CRH und ACTH erfolgt pulsatil, sodass die Cortisol Ausschüttung einer zirkadianen Rhythmik mit morgendlichem Höhepunkt unterliegt²⁵. Die CRH- und ACTH-Freisetzung wiederum werden über einen negativen Feedback-Mechanismus durch Cortisol gehemmt²⁵. Die gegenseitige Regulation von CRH, ACTH und Cortisol wird als Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) bezeichnet²⁵.

Die inaktive Form des Cortisols ist das Cortison, die reversible Aktivierung und Inaktivierung erfolgen durch die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Cortisol wird durch Oxidation mittels 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 β -HSD2) inaktiviert, die Aktivierung von Cortison erfolgt über die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1 (11 β -HSD1)^{26,27}.

Der Transport im Blut erfolgt überwiegend gebunden über Transcortin und Albumin²⁸.

Als Glucocorticoid wirkt Cortisol an Glucocorticoid Rezeptoren (GR) und, in sogar höherer Affinität, an Mineralcorticoid-Rezeptoren (MR). Aufgrund der vermehrten Expression der Cortisol-inaktivierenden 11 β -HSD2 in MR-typischen Geweben wird dieser Effekt allerdings deutlich reduziert. Auf der anderen Seite wird eine höhere GR-Bindung des Cortisols durch ein Vorschalten der Cortison-aktivierenden 11 β -HSD1 erreicht, sodass es dort seine Wirkung als Stresshormon entfalten kann. So steigen beispielsweise Blutzuckerspiegel durch eine Steigerung der Lipolyse und Gluconeogenese und durch die mineralcorticoide Wirkung auch der Blutdruck. Cortisol hemmt durch die Induktion einer geringeren Zytokin-Synthese und -Freisetzung und Lymphozyten-Hemmung weiterhin die Immunantwort, weshalb es auch therapeutisch als Immunsuppressivum eingesetzt wird^{25,29}.

2.4.1 Cortisol in der Schwangerschaft

In der Schwangerschaft spielen Glucocorticoide (GC) eine entscheidende Rolle. Bei der Lungenreifeinduktion wird der Fetus bei einer drohenden Frühgeburtlichkeit mit GC auf die Geburt vorbereitet, bei Verdacht auf ein adrenogenitales Syndrom des Fetus kommt ebenfalls eine GC-Therapie zum Einsatz²⁹.

Doch auch die körpereigenen GC-Wirkungen spielen eine entscheidende Rolle in der Schwangerschaft. In zahlreichen Studien wurde bisher belegt, dass in der Schwangerschaft bei erhaltener zirkadianer Rhythmik die Cortisolspiegel gegenüber nicht schwangeren Frauen deutlich erhöht sind, wobei sie im Verlauf der Schwangerschaft ansteigen³⁰⁻³⁷.

Zur Betrachtung und zum Vergleich der Cortisol-Werte gibt es verschiedene Methoden: Das totale Serum-Cortisol beschreibt sowohl das inaktive, Protein-gebundene Cortisol, wie auch den deutlich geringeren Anteil des freien Cortisols; um den Anteil des freien Cortisols zu ermitteln, wird zusätzlich Transcortin bestimmt^{30,38,39}. Eine weitere Methode, Rückschlüsse auf das freie Cortisol zu ziehen, ist mittels Bestimmung des Speichel-Cortisols, welches um ein Drittel des freien Serum-Cortisols verringert ist^{40,41}.

Scott et al. zeigen bereits zu Beginn des zweiten Trimenons (in SSW 12-16) eine signifikante Erhöhung des totalen Serum-Cortisols um den Faktor 1,8 und am Ende der Schwangerschaft (SSW 37-39) um den Faktor 2,5 sowie eine durchgängige Erhöhung des Cortisols im Speichel-Tagesprofil, die nach drei bis fünf Tagen postpartal fast vollständig rückläufig ist ³⁶.

Im 3. Trimenon ist der Cortisol-Wert je nach Tageszeit um den Faktor 1,8 (morgens) bis 4,0 (abends) gegenüber nicht schwangeren Frauen erhöht, während mit Fortschreiten der Schwangerschaft ein 3-facher Anstieg des Serum-Cortisols ermittelt wurde ^{30,31,35}.

In der Schwangerschaft steigt das freie Cortisol um das Zwei- bis Dreifache und damit ähnlich dem gebundenen Cortisol, proportional aufgrund der ebenfalls steigenden Transcortin-Konzentration ^{31,37}. Der Erhöhung liegen sowohl ein positiver Feedback-Mechanismus als auch ein Anstieg des Transcortins zugrunde ^{31,42}.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst auf die Regulation über CRH und ACTH und den positiven Feedback-Mechanismus eingegangen.

2.4.2 Die maternale HPA-Achse in der Schwangerschaft

Die Plazenta besitzt die Fähigkeit selbst ACTH und CRH zu produzieren ⁴³⁻⁴⁵. Im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus wird das plazentare CRH, im Gegensatz zum hypothalamischen CRH, mit steigender Glucocorticoid-Konzentration im maternalen Blut vermehrt durch die Plazenta sezerniert ⁴². Während sich ACTH im Laufe der Schwangerschaft verdoppelt, steigt der CRH-Spiegel ab dem zweiten Trimenon der Schwangerschaft exponentiell ^{30,43}.

Der geringe Anstieg von ACTH im Gegensatz zu CRH und gleichzeitig auch ein stärkerer Anstieg des Cortisols lässt sich durch die maternale Nebenniere erklären, die im 3. Trimenon für ACTH sensibler wird ^{46,47}. Außerdem besitzt die menschliche Nebenniere CRH-Rezeptoren, die selbst eine moderate Steigerung der Cortisol-Freisetzung bewirken können, allerdings fehlen hier Studien, inwiefern sich diese Aussage in der Schwangerschaft reproduzieren lässt ⁴⁸.

Zusätzlich zur indirekten Wirkung auf die maternale Cortisol-Freisetzung scheint die Höhe des CRH (2.-3. Trimenon) und Cortisols (2. Trimenon) wie eine „placental clock“ (deutsch: ‚plazentare Uhr‘) ⁴⁹ mit der Gestationsdauer negativ und dem Risiko der Frühgeburtlichkeit positiv zu korrelieren ^{30,49-51}.

GC beeinflussen das fetale Outcome. Erhöhte CRH und Cortisol-Werte sind mit verkürzter Schwangerschaftsdauer und Frühgeburtlichkeit sowie FGR assoziiert ^{30,32,49,50}. McLean et al. beschreibt eine plazentare Uhr, bei der die Höhe des CRH bereits zu Beginn des zweiten Trimenons (SSW 16-20) negativ mit der Gestationslänge korreliert und entdeckt eine direkte Korrelation des CRH mit der Geburtseinleitung ⁴⁹. Weitere Studien ergaben, dass Cortisol (erhöht ab 15. und 19. SSW) und CRH (31. SSW) negativ mit der Gestationslänge korrelieren, wie auch die Stärke des CRH-Anstiegs bis zur 31. SSW mit Frühgeburtlichkeit assoziiert ist ³⁰.

2.4.3 Transport des Cortisols

Der Transport des Cortisols im Blut erfolgt überwiegend gebunden über Transcortin und Albumin. Cortisol, welches an Transcortin, auch Cortisol-bindendes Globulin (CBG), gebunden ist, ist biologisch inaktiv³⁹.

Während der Schwangerschaft steigt die Transcortin-Bildung durch die Leber, woraus ab der 11. Schwangerschaftswoche proportional zum Cortisol steigende CBG-Spiegel resultieren, die zwischen dem 2. und 3. Trimenon ein Plateau erreichen und ab der 36. SSW abfallen^{31,34,37,52}. Zum Ende der Schwangerschaft sinkt die Bindungskapazität für Cortisol, wodurch mehr freies Cortisol zur Verfügung steht³⁴.

2.4.4 Fetales Cortisol und Geburtsmodus

Obgleich die maternalen Cortisolspiegel ungefähr um den Faktor 10 höher sind als die fetalen Cortisol-Werte, korrelieren maternaler und fetaler Spiegel miteinander^{53,54,55}.

Weiterhin ist eine deutliche Erhöhung des Verhältnisses von Cortison zu Cortisol im Neugeborenen beschrieben, was für eine Inaktivierung des maternalen Cortisols in der Plazenta spricht^{54,55}. Der Geburtsmodus Sectio Caesarea scheint im Vergleich zur vaginalen Geburt keinen Einfluss auf die HPA-Achse, die Cortisol- und Cortison-Spiegel maternal und fetal und die 11 β -HSD2-Aktivität oder GR-Expression zu haben, während eine andere aktuellere Studie einen signifikant niedrigeren fetalen Cortisolspiegel bei elektiver Sectio caesarea fand⁵⁶⁻⁶⁰.

2.4.5 Die Rolle der 11 β -HSD Typ 1 und 2

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Aktivität des Cortisols besteht über die 11 β -HSD, diese werden in vielfältigen Geweben exprimiert und wurden durch Osinski et al. auch in der Plazenta nachgewiesen^{27,61,62}.

Während die 11 β -HSD1 als Oxidoreduktase vor allem für die Aktivierung des Cortisols zuständig ist, deaktiviert die 11 β -HSD2 als Dehydrogenase das Cortisol und nimmt damit vielfältige Schutzfunktionen ein (siehe Abbildung 1)^{61,63-67}.

Die 11 β -HSD1 ist NADP⁺/NADPH abhängig, hat ein pH-Optimum bei 10,0, die 11 β -HSD2 dagegen ist NAD⁺ abhängig, hat ein pH-Optimum bei 7,7 und hat vor allem in der Plazenta eine sehr hohe Affinität zu GC⁶¹.

Die 11 β -HSD1 wurde hauptsächlich in der Dezidua nachgewiesen, während 11 β -HSD2 am stärksten im Trophoblasten exprimiert wird und auch in vielfältigen fetalen Geweben nachweisbar ist^{66,68-70}.

Das HSD11B2-Gen wird in der Plazenta stark exprimiert und die plazentare 11 β -HSD2-Aktivität beginnt bereits ab der frühen Schwangerschaft, steigt im Schwangerschaftsverlauf und ist zum Geburtsbeginn wieder rückläufig^{65,70-72}. Diese Beobachtung deckt sich mit weiteren Studien, die zum Schwangerschaftsende eine vermehrte Aktivität und 11 β -HSD1-

Genexpression in Plazenta und Chorion zeigten und damit die Vermutung nahelegen, dass zur Geburtseinleitung ein höherer Cortisol-Übertritt auf den Fetus physiologisch ist ⁷⁰⁻⁷³.

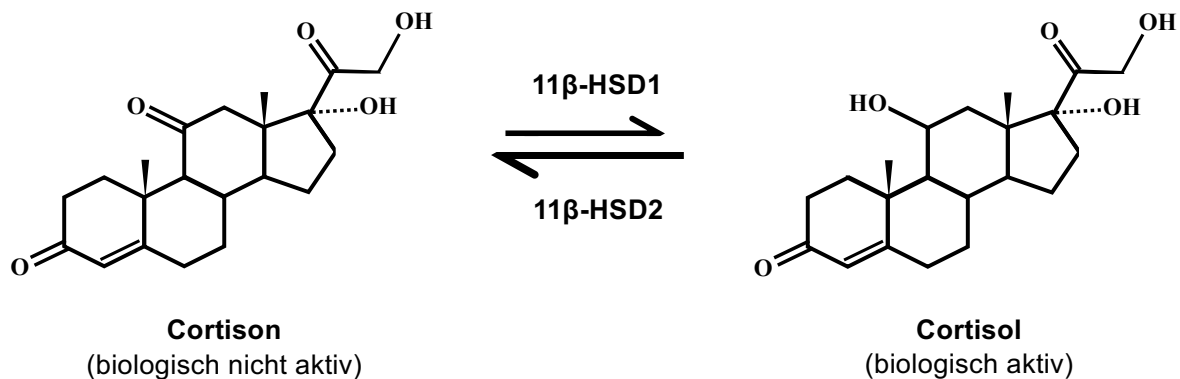


Abbildung 1: Aktivierung und Inhibierung von Cortisol durch die 11β-HSD nach Chatuphonprasert et al. ¹.

Die beiden 11β-HSD Enzyme werden durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst, so zeigte sich eine inhibitorische Wirkung von Katecholaminen, Prostaglandinen, Leukotrienen, TNFα und IL1β auf die Expression und Aktivität der 11β-HSD2, welche vor allem unter Bedingungen wie Hypoxie, Malnutrition und Entzündungsreaktionen wie der Chorioamnionitis vermehrt ausgeschüttet werden ⁷⁴⁻⁷⁷. Unterdessen wird die 11β-HSD1-Aktivität unter anderem durch TNFα und IL1β stimuliert ⁷⁸.

Die 11β-HSD2 scheint vorrangig eine GC-Schutzfunktion zu haben. 11β-HSD2 wird außerhalb der Plazenta vermehrt in Aldosteron-typischen Geweben exprimiert und dient hier vor allem der Spezifität des MR ^{64,79,80}. Das kongenitale Syndrom des apparenten Mineralcorticoid Exzess (AME) illustriert die 11β-HSD2-Defizienz sehr deutlich: durch die hohe MR-Affinität der GC können diese unbegrenzt den Rezeptor aktivieren, woraus unter anderem Hypokaliämie und arterielle Hypertonie resultieren ⁸¹⁻⁸³.

In der Plazenta und den fetalen Geweben hingegen wirkt die 11β-HSD2 vor allem schützend vor einer Überexposition an GC und bildet damit eine Plazenta-Schranke für den Cortisol-Übertritt zum Fetus (für die GC-Plazentaschranke siehe auch Abbildung 2) ^{66,72,84}. Auch in einer Plazentaperfusions-Studie von Benediktsson et al. zeigte sich eine hohe Inaktivierung des maternal infundierten Cortisols zu Cortison, die sich mit Inhibierung der 11β-HSD2 mittels Glycyrrhizinsäure aufheben ließ ⁸⁵.

Eine GC-Überexposition ist in zahlreichen Studien unter anderem mit einem geringeren Geburtsgewicht und arterieller Hypertonie bereits im Kindesalter assoziiert, die plazentare 11β-HSD2-Aktivität unmittelbar postpartal zeigte eine positive Korrelation mit dem Geburtsgewicht des Neugeborenen, während in Säuglingen mit FGR die HSD11B2-mRNA-Expression und -Aktivität signifikant reduziert war ^{68,84,86-90}.

Nach der Barker-Hypothese ist vor allem das SGA (Small for Gestational Age) mit einem erhöhten Risiko für arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 und Koronare Herzkrankheit im Erwachsenenalter assoziiert ⁹¹. Die Hypothese ist teilweise umstritten, da Störfaktoren über Langzeitstudien beim Menschen nie vollständig ausgeschlossen werden können, auch wenn weitere epidemiologische und Tierversuchsstudien zu ähnlichen Ergebnissen kommen ^{76,84,88,92}.

2.4.6 Die GR und ihre Isoformen

Cortisol entfaltet seine Wirkung vorrangig über intrazelluläre Glucocorticoid-Rezeptoren (GR). Der GR wird durch das NR3C1-Gen (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1) auf Chromosom 5 (5q31-32) kodiert und (nahezu) ubiquitär exprimiert ^{93,94}.

Der GR liegt in unterschiedlichen Isoformen vor, man unterscheidet vor allem zwischen den Hauptformen GR α und GR β , welche sich durch die Sequenzen am C'-Terminus unterscheiden ⁹³. Sie entstehen durch alternatives Splicing aus demselben NR3C1-Gen, wobei sich die Kodierung entscheidend in Exon 9 differenziert, entsprechend benannt als Exon 9 α und Exon 9 β ⁹⁵.

Das NR3C1-Gen besteht folglich aus einem nicht kodierenden Exon 1, dem das aminoterminal Ende kodierenden Exon 2 (NTD, N-terminale Domäne); Exon 3 und 4 kodieren die DNA-bindende Domäne (DBD), bestehend aus zwei Zinkfingerproteinen, während die weiteren Exone 5 bis 9 (9 α und 9 β) unter anderem für die GC-Bindung kodieren (Ligandenbindende Domäne, LBD) ⁹⁵.

Da der GR α dem direkten Einfluss der GC unterliegt, wird in dieser Arbeit, neben der Analyse eines allgemeinen, gesamten GR, der GR α separat analysiert (wie von Bamberger et al. empfohlen) ⁹⁶.

Aufgrund von mehreren Startcodons (N-terminal) in der GR α -mRNA während der Translation entstehen mindestens acht unterschiedliche GR α Isoformen aus derselben GR α -mRNA (aufgestellt nach der Länge): GR α A, GR α B, GR α C1-3 und GR α D1-3, welche je nach Gewebe unterschiedlich exprimiert wird ^{97,98}. Insbesondere der etwas kürzere (91 kDa) GR α B stellte sich als wirkungsvoller in der Genregulation dar, als der GR α A mit (94 kDa) ⁹⁸. Einige Gene präsentierten sich unter Regulation aller GR α Isoformen, einige wurden nur von einzelnen Unterformen reguliert ⁹⁷.

In der humanen Plazenta sind bisher 13 GR-Isoformen nachgewiesen worden, darunter die bekannten GR α -A, GR α -C, GR α -D1-3, GR β , GR γ , GR-A, GR-P, wobei die unterschiedlichen Formen über den Schwangerschaftsverlauf unterschiedlich häufig exprimiert werden ^{56,99,100}.

Am häufigsten wird die GR α -mRNA exprimiert, im Western Blot lässt sich am meisten GR α -D1 und eine 38 kDa Isoform nachweisen, während GR β nur schwach exprimiert wird ^{56,99}. GR α -C sinkt über den Schwangerschaftsverlauf, GR α -A steigt zum Ende der Schwangerschaft ^{56,99}. In SGA-Plazenten wird GR β und die 38 kDa-Isoform vermehrt exprimiert ¹⁰⁰.

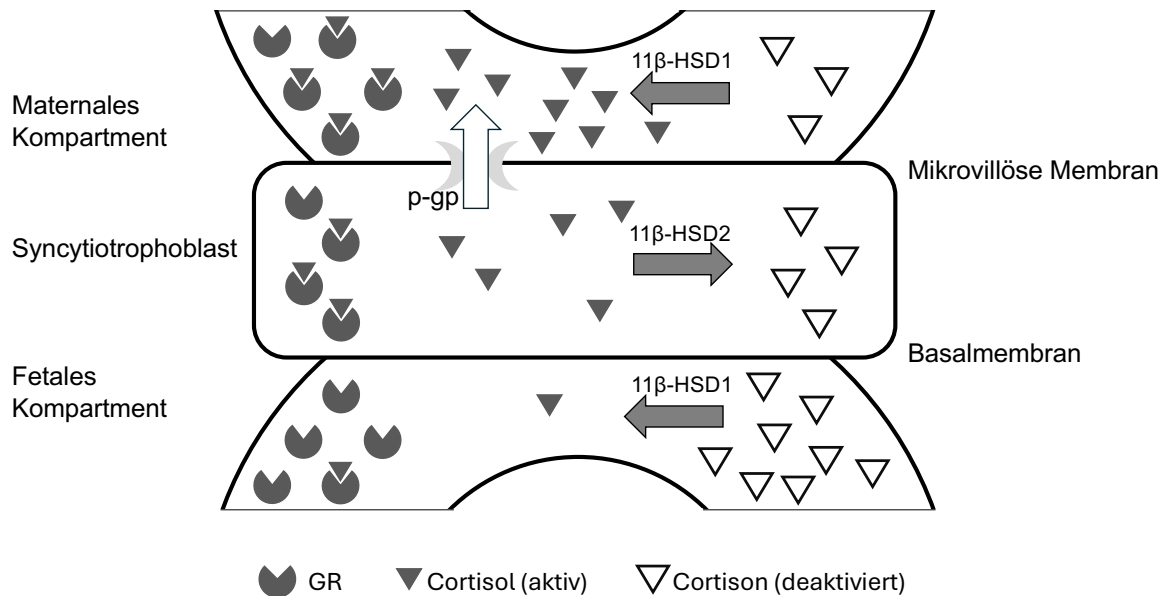


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glucocorticoid-Plazenta Schranke nach Seckl, 2004 und Johns et al., 2020 ^{101,102}.

Die Glucocorticoid-Plazenta-Schranke besteht aus mehreren beteiligten Transportern und Proteinen. Das aktive Cortisol (bzw. Corticosteron bei anderen Säugetieren) wird hauptsächlich durch die 11β-HSD2 inaktiviert zu Cortison (bzw. 11-Dehydrocorticosteron). Vorrangig auf der maternalen Seite der Plazenta (Dezidua) erfolgt eine Aktivierung des Cortisons mittels 11β-HSD1. Das aktive Cortisol kann dann über die ubiquitär exprimierte GR in der Plazenta seine Wirkung entfalten. Über die p-GP entsteht zusätzlich ein Transport des aktiven Cortisols von Synzytiotrophoblast in Richtung des maternalen Kompartiments, sodass insgesamt ein Konzentrationsgefälle vom maternalen Blut mit hohem Cortisol und niedrigem Cortison zum fetalen Blut mit deutlich erniedrigtem Cortisol und höherem inaktiven Cortison entsteht.

2.4.7 Die GR und ihre Funktion

Sobald Cortisol an den Rezeptor GR α bindet, induziert dieser durch Ausbildung von GR-Dimeren, die im Zellkern an sogenannte GRE (Glucocorticoid Response Elements) binden, eine verstärkte Expression des jeweiligen Steroid-abhängigen Gens über eine Transaktivierung ^{93,103-107}. Weiterhin wirkt ein aktivierter GR α supprimierend auf die NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und Aktivator Protein 1 (AP-1) abhängigen Gene über eine Interaktion mit dem jeweiligen Transkriptionsfaktor (Transrepression) ¹⁰⁸⁻¹¹¹.

Der GR β hingegen ist vorwiegend intranukleär lokalisiert, bindet keine GC und bindet die GRE mit höherer Affinität als GR α , erst durch die Bindung eines GCs wird die GR α -Affinität für die GRE erhöht ^{96,106,112}. Allein vorliegend erscheint der GR β inaktiv, während er als Heterodimer mit GR α vorliegend dessen Funktion hemmt/inhibiert ^{106,112}.

2.4.8 Die Rolle des p-Glykoproteins im transplazentären Cortisol-Transport

Die Gruppe der ABC-Transporter ist eine Großfamilie/Superfamilie aus membranständigen Proteinen, die in sieben Untergruppen eingeteilt werden ¹¹³. Der wohl bekannteste Transporter aus der ABCB-Gruppe ist das p-Glycoprotein (p-GP), welches durch das ABCB1- bzw.

MDR1-Gen (Multidrug Resistance Gen 1) kodiert wird ¹¹³. P-GP, ursprünglich entdeckt in Tumorzellen, nimmt viele Funktionen ein, hierunter auch einige Medikamenteninteraktionen, allerdings soll sich im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des p-GP im plazentaren GC-Stoffwechsel konzentriert werden ¹¹⁴⁻¹¹⁶.

P-GP entfaltet seine Hauptwirkungsweise als ATP-abhängiger Efflux-Transporter, der diverse Stoffe aktiv aus der Zelle heraus transportieren kann, wobei auch Cortisol ein Substrat des p-GPs ist ^{115,117,118}.

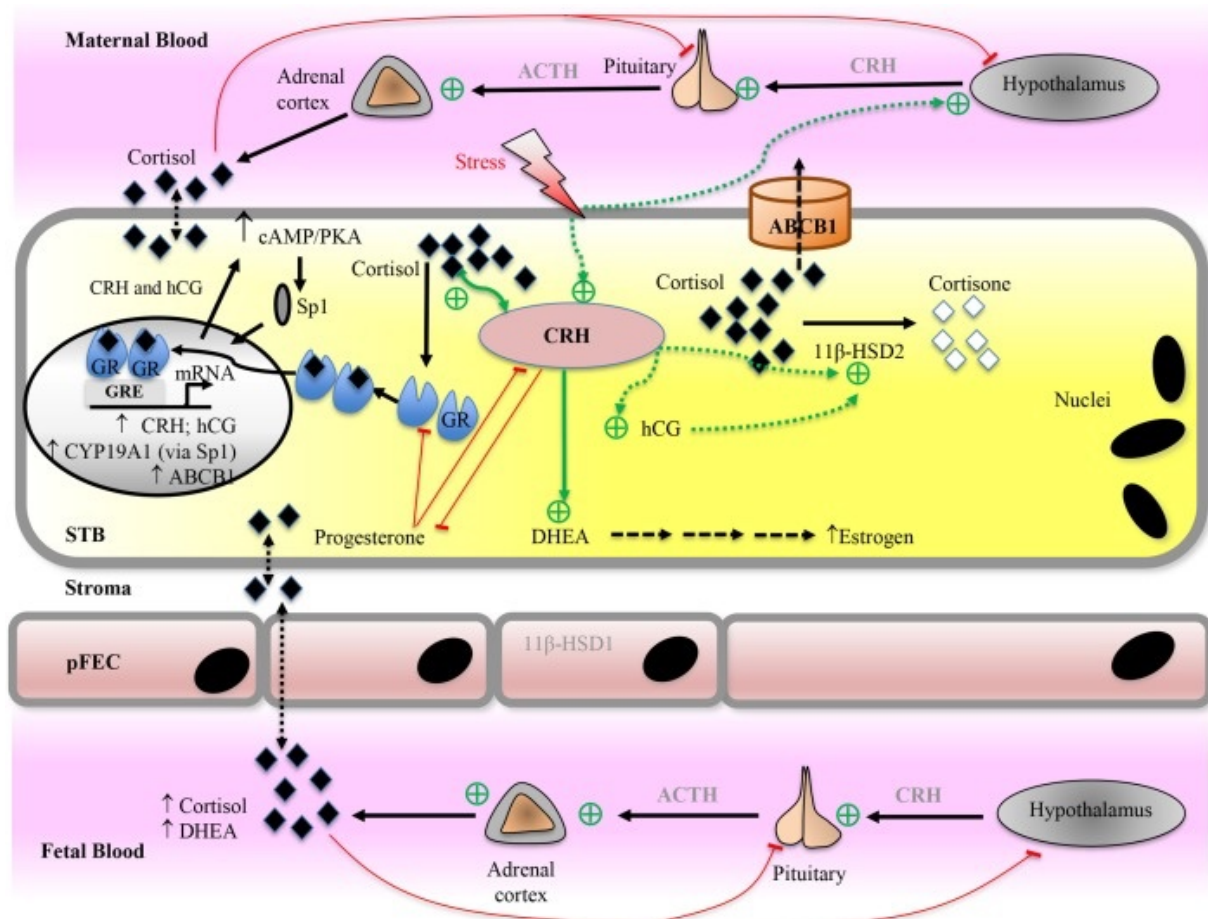


Abbildung 3: Cortisol von maternaler HPA-Achse über die Plazenta bis zum fetalen Blut ¹.

Über das ACTH und somit über das CRH erfolgt eine Cortisol-Ausschüttung im Körper. In der Schwangerschaft wird CRH sowohl über den Hypothalamus als auch über die Plazenta und im Verlauf der Fetogenese auch über den fetalen Hypothalamus gebildet. Dies führt schließlich zu einer höheren Cortisol-Ausschüttung in der maternalen und später auch fetalen Nebenniere. Es besteht ein positiver Feedback-Mechanismus, sodass Cortisol in der Plazenta die CRH-Ausschüttung anregt, die wiederum auch eine erhöhte Cortisol-Ausschüttung verursacht.

P-GP ist in der Plazenta membranständig im apikalen Synzytiotrophoblasten ab der 6. SSW nachweisbar und übernimmt so eine protektive Funktion gegenüber den mithilfe des p-GP in den maternalen Kreislauf zurückgeschleusten Substraten, siehe hierfür auch Abbildung 2 ¹¹⁹⁻¹²². Es sinkt zum Schwangerschaftsende stark ab, was eine erhöhte Anfälligkeit des Fetus gegenüber p-GP-Substraten zum Schwangerschaftsende suggeriert ^{119-121,123,124}. Für die Blut-Hirn-Schranke ist p-GP sowohl für Dexamethason wie auch für Cortisol ein essenzielles

Schlüsselhormon und ein p-GP-knockout resultiert in einer deutlich erhöhten intrazellulären GC-Aufnahme jenseits der murinen Blut-Hirn-Schranke ¹²⁵⁻¹²⁷.

Auch Cortisol und weitere GC werden aufgrund der Lokalisation des p-GP an der apikalen Trophoblasten-Membran aktiv in die maternale Richtung zurücktransportiert, was wiederum in einer niedrigeren GR-Aktivierung resultiert ^{118,119,128}. Aufgrund dieser Funktion gilt p-GP als Teil der GC-Plazenta-Barriere, auch wenn Plazenta-Perfusionsstudien den Hauptanteil der 11 β -HSD2 zuschreiben ^{119,128-130}. Für die GC-Plazenta-Schranke und den GC-Metabolismus in der Schwangerschaft siehe auch Abbildung 3.

2.5 Die HPA-Achse und GC-Plazentaschranke unter maternalem Übergewicht und GDM (aktueller Stand der Forschung)

Übergewicht allgemein ist mit einer höheren HPA-Achsen Aktivierung assoziiert, wobei aufgrund einer höheren Eliminierung die tatsächlichen Cortisolspiegel normal oder niedriger sind als bei normalgewichtigen Menschen ^{51,131-133}. Bei Schwangeren mit Adipositas Grad 3 wurde gezeigt, dass die maternalen Cortisolspiegel wie auch die Aktivität der HPA-Achse im Verlauf der Schwangerschaft signifikant weniger ansteigen als die normgewichtiger Schwangerer, sowohl des gesamten Cortisols (CBG-gebunden und frei) wie auch (stärker noch) des freien (CBG-unabhängigen) Cortisols ⁵¹. Unabhängig von der Adipositas steigt das basale Cortisol während der Schwangerschaft im Vergleich zum Cortisolspiegel vor der Schwangerschaft, wobei bei adipösen Schwangerschaften keine signifikante Steigerung zwischen der 18. und 31. SSW nachgewiesen werden konnte ¹²⁹.

Auch der CRH-Anstieg zum Zeitpunkt der 28. SSW ist signifikant geringer in übergewichtigen Schwangerschaften ⁵¹. Die renale Cortisol-Exkretion steigt bei Normgewichtigen mit der Schwangerschaft, wobei sich die Cortisol-Urin-Exkretion Übergewichtiger mit der Schwangerschaft nicht änderte ⁵¹. So erscheint der niedrigere Cortisolspiegel in einer geringeren HPA-Achsenaktivierung bei übergewichtigen Schwangeren begründet zu liegen ⁵¹. Tendenziell scheint dieser vergleichsweise Hypocortisolismus bei Adipositas wiederum ein erhöhtes fetales Geburtsgewicht auszulösen ⁵¹.

Zum Zeitpunkt der Geburt korreliert der maternale BMI negativ mit dem maternalen Cortisolspiegel. Während maternalen und fetalen Cortisolspiegel miteinander korrelieren, konnte für den fetalen Cortisolspiegel und den maternalen BMI zum Geburtszeitpunkt kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ¹³⁴.

Johns et al. erwähnt in einem Review unpublizierte Daten, die einen positiven Zusammenhang zwischen maternalem BMI und 11 β -HSD2 mRNA herstellen sollen ¹⁰². Mina et al. konnten auf plazentarer Ebene eine Reduktion der ABCB1-mRNA in der adipösen Schwangerschaft feststellen, während sich die placentare HSD11B2-mRNA-Expression nicht mit dem maternalen Gewicht wie auch nicht mit dem maternalen Cortisolspiegel zu verändern

schien ¹³⁵. Eine weitere Studie bestätigt die p-GP Reduktion auf Protein-Ebene in übergewichtiger Schwangerschaft ¹³⁶.

Weniger aussagekräftig ist die Datenlage zum GDM.

Eine einzelne, chinesische Studie beschreibt bei Geburt einen erhöhten maternalen Cortisolspiegel in diabetischer¹ Schwangerschaft, während sich die fetalen Cortisolspiegel und auch das Geburtsgewicht nicht unterschieden ¹³⁷. Die HSD11B1-mRNA-Expression und das 11 β -HSD-Proteinlevel in GDM zeigte eine Reduktion, während die HSD11B2-mRNA-Expression in GDM über dreifach erhöht war, letzteres ließ sich allerdings nicht auf Protein-Ebene abbilden ¹³⁷. Eine andere Studie konnte im dritten Trimenon keinen Unterschied zwischen den maternalen Cortisolspiegeln mit und ohne GDM feststellen ¹³⁸.

In der PREOBE Studie zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im fetalen Cortisolspiegel bei GDM, Übergewicht und normaler Schwangerschaft, während sich die maternalen Cortisolspiegel signifikant unterscheiden. Das Vorliegen eines GDM zeigte keinen signifikanten Effekt ¹³⁹.

2.6 Fragestellung der Arbeit

Die Zielsetzung der Arbeit ist die genauere Betrachtung von maternalem und fetalem Cortisol, sowie der plazentaren Glucocorticoid-Rezeptoren und an der GC-Plazentaschranke beteiligten Enzyme in der Schwangerschaft unter GDM und maternalem Übergewicht. Hierzu werden die Schwangeren in Normalgewicht und Übergewicht anhand des BMIs vor Beginn der Schwangerschaft eingeteilt. Weiterhin wird die übergewichtige Gruppe je nach Vorliegen eines GDM unterschieden. Es sollen sowohl die maternalen, peripartalen Cortisol-Konzentrationen sowie die Parameter der GC-Plazenta-Schranke und weiter auch das fetale Cortisol perinatal untersucht werden.

Hierzu stellen sich die Fragen:

1. Inwiefern unterscheiden sich die peripartalen Cortisolspiegel voneinander: Gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen normgewichtigen, übergewichtigen und übergewichtigen diabetischen Müttern oder ihren Kindern?
2. Inwiefern unterscheidet sich der transplazentaren Cortisol-Metabolismus bei Vorliegen von Übergewicht und GDM. Gibt es Unterschiede in der mRNA-Expression oder der Proteinlevel der Schlüsselenzyme und -Rezeptoren?
3. Sind die fetalen Risikofaktoren für LGA/ Makrosomie und SGA/ FGR, die sowohl bei Cortisol-Überexposition wie auch bei Übergewicht und GDM beschrieben wurden, ineinander begründet?

¹ Da in dieser Arbeit ausschließlich die Betrachtung des GDM erfolgt, wird nur der GDM bezeichnet, wenn ab jetzt zur sprachlichen Vereinfachung von ‚diabetisch‘ gesprochen wird; es sei denn, es wird anders angegeben.

Für die Glucocorticoid-Plazenta-Schranke wurden vor allem die 11 β -HSD Typ 1 und 2 und die GR betrachtet, wie auch das Transportprotein p-GP. Hierbei ist vor allem die gleichzeitige und differenzierte Betrachtung nach BMI und GDM einzigartig, denn keine einzige in der Literatur-Recherche entdeckte Studie differenzierte alle an der GC-Barriere beteiligten Enzyme und trennte dabei in der Betrachtung den Einfluss des maternalen präkonzeptionellen Gewichts und des Vorliegens eines GDM.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Absorptionsmessgerät	Nano Quant infinite® M200 Pro	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Absorptionsmessplatte	NanoQuant Platte™	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Bedienungselement	Mikroskop Joystick	Märzhäuser Sensotech GmbH, Wetzlar, Deutschland
Blotting-Kammer	PerfectBlue™ 'Semi-Dry'-Blotter, Sedec™ M	PeqLab / VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Chemiluminator	ChemiDoc XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Dampfgarer	3216	Braun GmbH unter der Lizenz von De'Longhi Deutschland GmbH, Neu-Ilseburg, Deutschland
Dampfgarer	Tristar RK-6114	Tristar Europe B.V., Tilburg, Niederlande
Elektrophorese-System	Mini plus horizontal	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Folienschweißgerät	FS 3604	Severin, Sundern, Deutschland
Gefrierschrank	MDF-U55V (-80 °C)	Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg, Deutschland
Gelsystem für kleine Gele	Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat	ASP300	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Heizblock	TK 23	Hettich Benelux B.V., Geldermalsen, Niederlande
Heizblock	ThermoMixer® Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Folienschweißgerät	HTA HT121TS 4titude 4s2	4titude® Limited, Wotton (Surrey), Vereinigtes Königreich
Kamera-Modul	BioDocAnalyze (BDA) +	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Kühlplatte	EG1150C	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Kühlschrank	KT1F	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
Magnetrührer	IKA topolino	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Magnetrührer	HeiMix S	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Medizindrucker	P93DW	Mitsubishi Electric Europe B.V., Uxbridge, Vereinigtes Königreich
Mikroskop	BX43	Olympus Europa Se & Co KG, Hamburg, Deutschland

Mikroskop	Dialux 20 EB	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Mikrotom	Shandon™ Finesse™ ME+	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Mikrowelle		Severin, Sundern, Deutschland
Mini Zentrifuge	ROTILABO® Uni-fuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Netzgerät	Power Supply Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Netzgerät	EV202 (PowerPack)	PeqLab / Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA
Netzgerät	EV231 (PowerPack)	PeqLab / Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA
Objektträgerscanner	Slide Scanner SCN 400	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG1150 H	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Platteninkubator	SkyLine DTS-4 (ELISA)	ELMI Ltd., Riga, Lettland
RT PCR System	7500 Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Schüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Schüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Schüttlerapparat (kreisend)	Typ 3005	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Schwingmühle	MM400	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
SDS-PAGE-Gelsystem	PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin ExW S	PeqLab / Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS HD 2070; Stab SH70G; MS73	Bandelin, Berlin, Deutschland
UV-Transilluminator	BioDocAnalyze	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortexmischer	V1 Vortex	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Wärmeschrank	UM100	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem	MILLIPORE Water Purification System Elix 15	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q® Advantage A10	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	TFB 55	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Wasserbad	WBN14	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	5424R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Rotina 420R Adapter: R10 4769A	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

Zentrifuge	Z216MK Adapter: 220.87	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
------------	---------------------------	--

Tabelle 3: Geräteliste.

3.1.2 Verbrauchs- und Gebrauchsgegenstände

Gegenstand	Bezeichnung	Firma
Adhäsionsobjektträger	SuperFrost® Plus, Menzel Gläser	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Bechergläser (hoch), verschiedene Größen		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Blutentnahme-Röhrchen (S-Monovetten: Serum, K3 EDTA, Citrat 3,2 %)	Li-Heparin,	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Doppelspatel	Edelstahl flexibel, 185 mm, 9 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassette Macro		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Falcons 15 ml, 50 ml	Schraubröhre, Polypropylen, Spitzboden, steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Gummiwalze	Mikrotiterplatten- Verschleißroller	Neolab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Klebefolie	Clear Seal als Blatt	4titude® Limited, Surrey, Vereinigtes Königreich
Mahlkugeln	Stahl, 5mm	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Magnetrührstab	KOMET, Ø: 9 mm, 15 mm	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Menzel Deckgläser	Stärke 1, 24 x 40 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikropistille	für Reaktionsgefäße 1,5 ml	WLB Laborbedarf, Möckmühl, Deutschland
Mikrotiterplatte	Nunc™ MicroWell™ 96- Well	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Mikrotiterplatte	FrameStar® 96 well Semi-skirted PCR Platte	4titude® Limited, Surrey, Vereinigtes Königreich
Mikrotomklinge	R35	pfm Medical AG, Köln, Deutschland
Objektträgerbehälter	Objektträger- Versandbehälter, rund	Kartell S.p.A. – LABWARE Division, Noviglio, Italien
Objektträgerkasten	rot, 100 Stellplätze	Avantor delivered by VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Pap-Pen	2 mm Schriftweite	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Pasteur-Pipette steril zum Einmalgebrauch		Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten	Research®, Research® plus und Reference®2; 0,25-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2- 20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 30-300 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, PP, verschiedene Größen		Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Pipettenspitzen mit Filter	epT.I.P.S. LoRetention Dualfilter, Racks	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus™	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Pipettierhilfe	Accurpette	Avantor / VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Spektralkalibrierungsskit	7500 Spektralkalibrierungsskits für Real-Time PCR-Systeme	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Stabpipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Serologische wattiert steril Pipette	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Transfermembran	Amersham™ Nitrozellulose Rolle Protran® 0,45 µm	Cytiva, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Waage	ES320A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
Whatman-Filterpapier	Gel-Blottingpapiere Whatman® GB005 Dicke 1,5 mm	Cytiva, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 4: Verbrauchs- und Gebrauchsgegenstände.

3.1.3 Chemikalien

Name	Firmensitz
2-Mercaptoethanol ≥ 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
6X DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Acrylamide Stammlösung ROTIPHORESE® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose LE	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Albumin Fraktion V ≥ 98 % Pulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents	Cytiva, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Ammoniumpersulfat (APS) ≥ 98 %	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Aprotinin (aus Rinderlunge)	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Bromphenolblau Natrium-Salz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform ROTIPURAN® ≥ 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Citratpuffer (Target Retrieval Solution) 10x pH 6,0	Dako / Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Dako Antibody Diluent	Dako / Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
dNTP Mix, 10 mmol/l each	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol ≥ 99,8 % vergällt mit 1 % MEK	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥ 99,5 % reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Glycerol ≥ 99,0 %	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Glycin PUFFERAN® ≥ 99,0 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GoTaq® qRT-PCR Master Mix 2X	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Hämatoxylin sauer (nach Mayer)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ImmPACT DAB Kit	Vector Laboratories, San Francisco Bay Area, Kalifornien, USA
Nonident P-40 (IGEPAL Ca-630)	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Isopropanol ROTIPURAN® ≥ 99,8 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Methanol ROTIPURAN® ≥ 99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Midori Green Advance	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
M-MLV (reverse Transkriptase) inkl. Puffer 200 U/µl	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Natriumchlorid (NaCl) ≥ 99,8 %, extra fein	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Natriumfluorid	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Neo-Clear™	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Neo-Mount®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oligo- (dT)Primer (16xT (Thymin))	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
PBS - Puffer (1X Dulbecco's) - Pulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin A	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Platinum® qRT-PCR SuperMix-UDG mit ROX	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Randomprimer	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
ROTI®Histofix - phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RQ1 RNase-Free DNase	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Salzsäure (HCl) 32 % ROTIPURAN® p.a., ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat) ≥ 99 %, Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SEA Blocking Buffer	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA

TEMED (Tetramethylethyldiamin) ≥ 99 % p.a., für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe, Alphen am Rhein, Niederlande
TRI Reagent®	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Trichloressigsäure-Lösung 20 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS, PUFFERAN® ≥ 99,3 %, Buffer Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TWEEN®20 Polyethylensorbitmonolaurate	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Harnstoff-Wasserstoffperoxid (Tabletten)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Chemikalien.

3.1.4 Lösungen und Puffer

Die im Folgenden aufgeführten Lösungen und Puffer wurden in vollentsalztem Wasser angesetzt, sofern nicht anders vermerkt.

Für RNA-Arbeiten wurde DEPC-Wasser verwendet, hierfür wurde vollentsalztes Wasser mit 0,2 % DEPC versetzt und nach 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur autoklaviert.

Puffer	Chemikalien	Konzentration
PBS	Na ₂ HPO ₄	8,06 mmol/l
	KH ₂ PO ₄	1,5 mmol/l
	NaCl	138 mmol/l
TBS-Puffer 10-fach	NaCl	100 mmol/l
	Tris	10 mmol/l
	Mit HCl 32 % pH-Wert einstellen	pH 7,5
TBS-T-Puffer	TBS-Puffer 1-fach:	10 mmol/l
	NaCl	1 mmol/l
	Tris	0,05 % (v/v)
	TWEEN® 20	
RIPA-Puffer	Tris	50 mmol/l
	NaCl	150 mmol/l
	Mit HCl 32 % pH-Wert einstellen	pH 7,4
	Igepal	1 % (v/v)
	Natrium-Desoxycholat	0,25 % (m/v)
	EDTA	1 mmol/l
modifizierter RIPA-Puffer (zusätzlich zum RIPA-Puffer hinzugeben)	Aprotinin	0,15 µmol/l
	Pepstatin A *	1,5 µmol/l
	Leupeptin	2,1 µmol/l
	PMSF **	1 mmol/l
	NaF	1 mmol/l
	Na ₃ VO ₄	1 mmol/l
Probenpuffer 5-fach	Sammelgelpuffer	82 mmol/l
	β-Mercaptoethanol	25 % (v/v)
	Glycerin	10 % (v/v)
	SDS	2,06 % (m/v)
	Bromphenolblau	0,0026 % (m/v)

Laemmli-Puffer 1-fach	Glycin Tris SDS	192 mmol/l 24 mmol/l 0,1 % (m/v)
Towbin-Puffer 10-fach	Glycin Tris	1.92 mol/l 250 mmol/l
Transfer-Puffer	Glycin Tris Methanol	19,2 mmol/l 2,5 mmol/l 10 % (v/v)
Sammelgelpuffer	Tris Mit HCl 32 % pH-Wert einstellen	0,5 mol/l pH 6,8
Trenngelpuffer	Tris Mit HCl 32 % pH-Wert einstellen	1,5 mol/l pH 8.0
Ponceau S	Ponceau S Trichloressigsäure	0,2 % (m/v) 3 % (v/v)
Stripping-Puffer	Tris Mit HCl 32 % pH-Wert einstellen SDS kurz vor Verwendung: 2-Mercaptoethanol	50 mmol/l 6,7 2 % (m/v) 100 mmol/l
TAE-Puffer 50-fach	Tris EDTA mit Essigsäure pH-Wert einstellen	2 mol/l 50 mmol/l pH 8.0
Isotone NaCl-Lösung	NaCl	154 mmol/l
DEPC-H₂O	DEPC	0,2 % (m/v)
* angesetzt in Methanol		
** angesetzt in Isopropanol		

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

3.1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Sie wurden für die Versuche der Immunhistochemie und der Western Blots verwendet.

Erstantikörper	Firma	Spezies	WB-Konz.	IHC-Konz.
Anti-β-Actin (#3700)	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA	Maus	1. AK: 1:5000 2. AK: 1:3000	-

Anti-GAPDH (#2118)	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA	Kaninchen	1. AK: 1:5000 2. AK: 1:3000	-
Anti-HPRT (ab10479)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Kaninchen	1. AK: 1:2000 2. AK: 1:2000	-
Anti- α -Tubulin (T9026)	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA	Maus	1. AK: 1:3000 2. AK: 1:3000	-
Anti-GR (#3660)	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA	Kaninchen	1. AK: 1:1000 2. AK: 1:2000	1:100
Anti-GR- α (ab3580)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Kaninchen	1. AK: 1:250 2. AK: 1:1000	1:50
Anti-HSD11B1 (ab83522)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Kaninchen	1. AK: 1:500 2. AK: 1:1000	1:50
Anti-11 β -HSD2 (MAB8630)	R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA	Maus	1. AK: 1:2000 2. AK: 1:2000	1:40
Anti-P-Glykoprotein (ab170904)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Kaninchen	1. AK: 1:2000 2. AK: 1:2000	1:250

Zweitantikörper	Firma	Spezies	Verwendung
Anti-Maus (#7076S)	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA	Maus	WB
Anti-Kaninchen (#7074S)	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA	Kaninchen	WB
ZytoChem Plus (HRP) One-step Polymer	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland	Maus & Kaninchen	IHC

Tabelle 7: Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie.

3.1.6 Primer

Für die Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene wurden Primer der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland verwendet (siehe Tabelle 9). Die Primersequenzen mit Quellenangabe wurden aus Publikationen übernommen. Falls keine Quelle angegeben ist, wurden mRNA-Sequenzen des zu untersuchenden Gens (inklusive Exon-Grenzen) mittels UCSC Genome Browser ermittelt. Dann wurden mittels Primer Express™ 3.0 Software die Primer entworfen¹⁴⁰. Weiterhin wurde das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) verwendet, um die Primersequenzen zu überprüfen.

Gen	Primer	Sequenz	Konz.
HSD11B1 ¹⁴¹	for	AGGAAAGCTCATGGGAGGACTAG	9 μ mol/l
	rev	ATGGTGAATATCATCATGAAAAAGATTC	3 μ mol/l
	taq	CATGCTCATTCTCAACCACATCACCAACA	2 μ mol/l
HSD11B2 ¹⁴²	for	CCGTATTGGAGTTGAACAGCC	6 μ mol/l
	rev	CAACTACTTCATTGTGGCCTGC	6 μ mol/l
	taq	CTAGAGTTCACCAAGGCCACACCACC	2 μ mol/l
ABCB1	for	CAGACAGGATGTGAGTTGGTTTG	3 μ mol/l
	rev	CCTGGAACCTATAGCCCTTTAA	6 μ mol/l
	taq	TTGACTACCAGGCTCGCCAATGATGCT	2 μ mol/l

NR3C1α	for	AGTGGAAGGACAGCACAATTACC	3 μ mol/l
	rev	TTTCGAGCTTCCAGGTTTCATTC	9 μ mol/l
	taq	TGCCCAGCATGCCGCTATCGA	2 μ mol/l
NR3C1 (gesamt)	for	GGGTGGAGATCATATAGACAATCAAG	6 μ mol/l
	rev	GGGTAGAGTCATTCTCTGCTCATTA	6 μ mol/l
	taq	AAACCTGCTGTGTTTTGCTCCTGATCTGA	2 μ mol/l

Tabelle 8: Primersequenzen für die zu untersuchenden Gene.

Als Referenz wurden die folgenden Gene mit den nachstehenden Sequenzen getestet:

Gen	Primer	Sequenz	Konz.
YWHAZ 143	for	TGGTGATGACAAGAAAGGGATTG	6 μ mol/l
	rev	TGGTTGCATTTCTTTTTTGCT	6 μ mol/l
	taq	CGATCAGTCACAACAAGCATACCAAGAAGC	2 μ mol/l
TBP	for	CGAATATAATCCCAAGCGGTTT	9 μ mol/l
	rev	GTGCACACCATTTTCCAGAA	6 μ mol/l
	taq	AGCCACGAACCACGGCACTGATTTT	2 μ mol/l
18s-rRNA 144	for	CGGCTACCACATCCAAGGAA	3 μ mol/l
	rev	GCTGGAATTACCGCGGCT	9 μ mol/l
	taq	TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC	2 μ mol/l
β-Aktin 145	for	GATGGCCACGGCTGCTT	6 μ mol/l
	rev	ACCCTCATTGCCAATGGT	6 μ mol/l
	taq	CTACGAGCTGCCTGACGGCCAGG	2 μ mol/l
SDHA	for	GACAGAGCCTCAAGTTTGAAAG	6 μ mol/l
	rev	TCGCAGAGACCTTCCATATAAGG	6 μ mol/l
	taq	TCGGACTGGCCACTCGCTATTGC	2 μ mol/l
GAPDH	for	CCCATGTTCTGTCATGGGTGT (20)	6 μ mol/l
	rev	TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA (23)	6 μ mol/l
	taq	CTGCACCACCAACTGCTTAGCACCC (25)	2 μ mol/l
HPRT 146	for	CCGGCTCCGTTATGGC	6 μ mol/l
	rev	GGTCATAACCTGGTTCATCATCA	6 μ mol/l
	taq	CGCAGCCCTGGCGTCGTGATTA	2 μ mol/l
β_2-MG 146	for	TGACTTTGTACAGCCCAAGATA	6 μ mol/l
	rev	CCAAATGCGGCATCTTC	6 μ mol/l
	taq	TGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCCA	2 μ mol/l

Tabelle 9: Primersequenzen für die zu messenden Referenzgene.

3.1.7 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, die im Nachfolgendem benannte, spezialisierte Software verwendet.

Name	Firma	Version
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®)	National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	zuletzt geöffnet am 23.09.2023

i-control™		Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz	Version 1.10
Image Lab™		Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA	Version 6.1.0
GraphPad QuickCalcs Outlier Detector		GraphPad Software, San Diego, USA: https://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/ ; alpha=0.05	zuletzt geöffnet am 30.01.2021
GraphPad Prism		GraphPad / Dotmatics, Boston, USA	Version 10.3.0
Primer Express™		Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA	Version 3.0.1
Ped(z) Kinderarzt Rechner		PD Dr. med. habil. Daniel Gräfe, Leipzig, Deutschland: https://www.pedz.de/de/neo.html	zuletzt geöffnet am 30.06.2024
qBase+		CellCarta, Quebec, Kanada	Version 3.4
UCSC Genome Browser ¹⁴⁰		Genomics Instituts, University of Santa Cruz, USA: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway	zuletzt geöffnet am 19.01.2024
7500 Software		Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA	Version 2.0.6

Tabelle 10: Verwendete Software.

3.2 Patientinnen-Kollektiv und Methoden der Probenasservierung

3.2.1 Patientinnen-Kollektiv

Für die vorliegende Forschungsarbeit wurden in Zusammenarbeit mit der Gynäkologie der Uniklinik Köln diejenigen Patientinnen aufgeklärt, die sich zwischen dem 01.03.2018 und dem 31.12.2020 maximal 7 Tage vor geplanter Sectio in der Hebammensprechstunde vorgestellt haben. Für diese Arbeit wurden alle Patientinnen eingeschlossen, die der Studienteilnahme nach einem Aufklärungsgespräch schriftlich zugestimmt haben und bei denen keiner der folgenden Ausschlussgründe vorlag: Mehrlingsschwangerschaft, Frühgeburtlichkeit bis SSW 35+0, Übertragung, Rauchen während der Schwangerschaft, Noxen-Abusus, schwere Vorerkrankungen wie bspw. onkologische Erkrankungen, behandlungspflichtige Hypertonie, Infektionskrankheiten wie HIV und Hepatitis, Medikation mit Cortisol-Derivaten oder Heparin sowie ein Amnioninfektionssyndrom. Aufgrund der geringen Anzahl wurden ebenfalls normalgewichtige Schwangere ausgeschlossen, die einen GDM hatten.

Eingeschlossen wurden Schwangerschaften mit einem Gestationsalter ab Schwangerschaftswoche 35+0 bis 42+0.

Die Ethikkommission der Universität zu Köln genehmigte die Studie unter der Leitung von Frau Dr. Sarah Appel erstmalig im Jahr 2014 unter dem Zeichen 14-244.

3.2.2 Datenerhebung der Patientinnen

Folgende Daten wurden nach Zustimmung der Patientinnen erhoben: Alter, Größe und Gewicht, mögliche Infektionen, Voroperationen und Vorerkrankungen sowie Medikamenteneinnahme, Raucherstatus, Ernährungsbesonderheiten, Bewegung, Geburtenanamnese, Gestationsalter, Geschlecht und Gewicht des Kindes. Alle Patientinnen-

Daten wurden nach Erfassung pseudonymisiert, sodass in der Auswertung kein Rückschluss auf einzelne Patientinnen möglich war.

Die Einteilung der Patientengruppen erfolgte anhand der Merkmale maternales Gewicht zu Beginn der Schwangerschaft und dem Vorliegen eines GDMs. Hierfür wurden für die Einteilung der Patientinnen nach dem ersten in der Schwangerschaft dokumentierten Gewicht anhand der BMI-Einteilung durch die WHO vorgegangen. Es ergaben sich zwei Gruppen, eine mit normalgewichtigen Schwangeren mit einem BMI von $18,5 \text{ kg/m}^2$ bis $24,99 \text{ kg/m}^2$ und eine mit übergewichtigen Schwangeren ab einem BMI $25,0 \text{ kg/m}^2$. Die übergewichtigen Schwangeren wurden außerdem in zwei Gruppen je nach Diabeteserkrankung eingeteilt, hier ergaben sich die Gruppen Übergewicht ohne GDM und Übergewicht mit GDM. Das biologische Geschlecht der Feten wurde als männlich oder weiblich erfasst.

Die erhobenen neonatalen Daten des Geburtsgewichts, der Geburtslänge und des Kopfumfanges wurden anhand des Gestationsalters mithilfe des Ped(z) Kinderarzt Rechners in die Geburtsperzentile nach Voigt eingeteilt.

Die jeweiligen Anzahlen (n) sind für die Analysen teilweise unterschiedlich und deshalb für die jeweilige Analyse im Ergebnis-Teil dieser Arbeit aufgeführt.

3.2.3 Maternale Blutproben

Es erfolgte die Entnahme von maternalen EDTA- und Serum-Blutproben im Rahmen der Routine-Blutentnahme durch die Hebamme bei der Geburtsplanung etwa 1 Woche vor der geplanten Sectio caesarea. Eine weitere Blutentnahme von einer Heparin-Plasma-Monovette erfolgte nüchtern vor Sectio im Rahmen der Anlage eines peripheren Venenverweilkatheters durch das Kreissaal-Team.

Sowohl Serum- als auch Plasma-Blut der Mutter wurden unmittelbar nach Entnahme innerhalb von höchstens 60 Minuten für zehn Minuten bei 1855 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -80 °C eingefroren. Für die Analysen im Zentrallabor wurden Plasma-Blut (nüchtern) für die Cortisol- und Glukose-Bestimmung verwendet, für die (HbA_{1c} -Bestimmung wurde das Serum-Blut (nicht-nüchtern) zum Zeitpunkt der Geburtsplanung der Schwangeren verwendet.

3.2.4 Fetale Blutproben

Es erfolgte eine Entnahme von venösem Nabelschnurblut aus der abgenabelten Plazenta, in jeweils eine EDTA-, Serum- und Lithium-Heparin-Plasma-Monovette. Sowohl Serum- als auch Plasma-Blut wurden nach Entnahme innerhalb von 60 Minuten für 10 Minuten bei 1855 g zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und bei -80 °C eingefroren.

Für die Analysen wurden jeweils Serum-Blut aus der Nabelschnur für die Bestimmung von Insulin und Cortisol sowie Plasma-Blut für den Lipidstatus und Glukose-Wert vom Zentrallabor der Uniklinik Köln analysiert.

3.2.5 Plazenta-Präparation

Die Präparation der Plazenten erfolgte innerhalb von 30 Minuten nach der Entbindung.

Zuerst wurden Maße und Gewicht der Plazenten bestimmt. Außerdem erfolgte eine Dokumentation der Nabelschnur-Insertion sowie eventueller Auffälligkeiten der Plazenta. Anschließend erfolgte die Präparation des Plazentagewebes für die Histologie und Molekularbiologie. Hierzu wurden jeweils drei Proben-Quadrate von 2 cm Kantenlänge in Abhängigkeit von der Entfernung zur Nabelschnur aus der Plazenta entnommen.

Die Regionen der Probenentnahme erfolgten nach dem Muster Nabelschnur-nah, mittig in gleichem Abstand zu Nabelschnur und Plazenta-Rand sowie Nabelschnur-fern am Plazenta-Rand (siehe Abbildung 4).

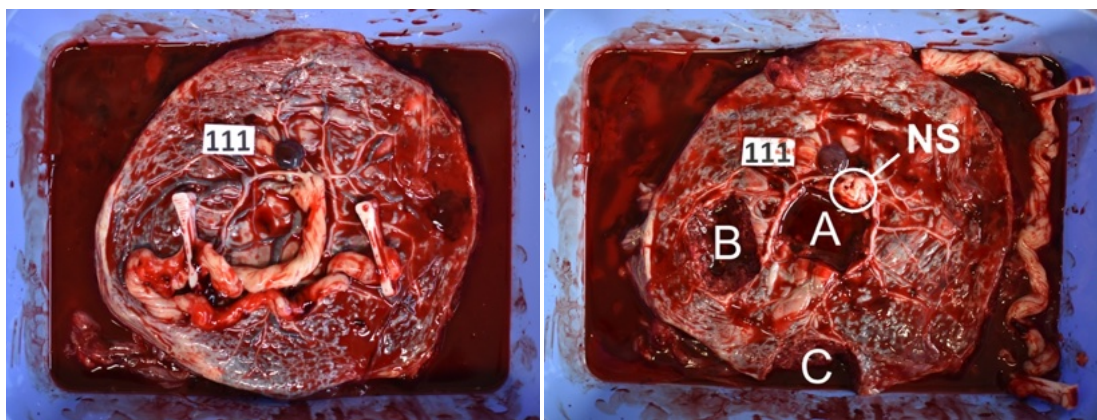


Abbildung 4: Die Stellen der Probenentnahme bei Plazenta-Präparation.

Links: Die Plazenta vor der Präparation in toto, man sieht die fetale Seite von oben. Die Nabelschnur sitzt hier mittig. Rechts: Die Plazenta nach der Probenentnahme, die Regionen sind entsprechend gekennzeichnet. Die Nabelschnur ist durchtrennt und als Stumpf auf der Plazenta und als Rest am Rand zu erkennen.

NS – Nabelschnur, A – Nabelschnur-nah, B – mittig, C – Nabelschnur-fern

Aus allen drei Probenquadraten erfolgte dann die weitere Präparation, wobei je die eine Hälfte der Probe als histologisches und die andere Hälfte als natives Präparat verwendet wurde.

Alle Proben aus den Regionen A, B und C wurden für die Asservierung nativer Proben in Anlehnung an die Schichtung maternal, villös und fetal gedrittelt und in isotoner NaCl-Lösung gewaschen (s. Abbildung 5). Anschließend wurden die Präparate zerkleinert und bei -80 °C eingefroren.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Isolationen der RNA sowie der Proteine wurden die Nativ-Präparate B – villös verwendet.

Die restliche Probe wurde erneut halbiert und je ein Teil für die Kryokonservierung in TissueTek bzw. für die Paraffineinbettung verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die nativen Proben und die Paraffin-eingebetteten Proben verwendet.

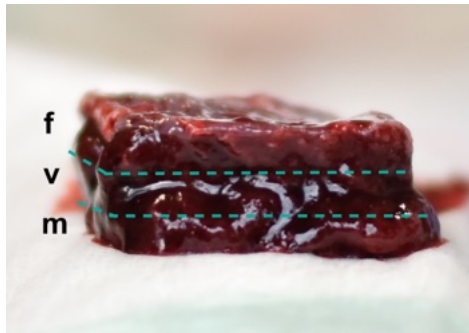


Abbildung 5: Unterteilung der Plazentaprobe für die Nativ-Präparation.

Markiert sind die Trennlinien der Plazenta in die (von oben nach unten) fetalen (f), villösen (v) und maternalen (m) Anteile.

Die Plazentaprobe wurde vor der Einbettung in Paraffin in isotoner NaCl-Lösung gewaschen und in Gewebekassetten gelegt. Die Fixierung erfolgte für 24 Stunden bei +4 °C in 4 % Paraformaldehydlösung zur Protein-Vernetzung und Fixierung. Anschließend wurden die Proben umgebettet und zur Dehydratation für mindestens 24 Stunden in 70 % Isopropanol belassen. Mittels Gewebeeinfiltrationsmaschine erfolgte das Einbetten der Plazenta-Proben nach dem Standardprotokoll der Core Facility des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) in Paraffin. Anschließend wurden die Proben in Paraffinblöcke gegossen und härteten bei -20 °C auf einer Kühlplatte aus. Die Lagerung bis zum Anfertigen der Paraffinschnitte erfolgte bei Raumtemperatur.

Für den Versuchsaufbau siehe auch Abbildung 6. Am Ende der Präparation wurden die Plazenten fachgerecht über den Kreissaal der Uniklinik Köln entsorgt.

3.3 Immunhistochemie

Zur Bestätigung, wo die zu untersuchenden Proteine und Rezeptoren in der menschlichen Plazenta dieser Kohorte exprimiert werden, wurde eine immunhistochemische Färbung als Nachweis angestrebt. Hier wurde sich für eine indirekte immunhistologische Färbung der Gewebeproben mittels DAB (3,3'-Diaminobenzidin) nach Graham und Karnovsky 1966 entschieden ¹⁴⁷.

Für das Anfertigen der 5 µm dicken Schnitte wurden die Probenblöcke in das Mikrotom eingespannt und geschnitten. Die Schnitte wurden bei 37 °C im Wasserbad gestreckt, auf SuperFrost® Plus Adhäsionsobjektträger gezogen und bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet. Die Aufbewahrung bis zur Färbung erfolgte bei Raumtemperatur in einem Präparatekasten.

Die Schnitte wurden dann für immunhistochemische Färbungen (siehe 3.3) verwendet.

Hierfür wurden die eingebetteten Proben mittels Neo-Clear™ dreimal jeweils für 15 Minuten entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (≥ 99,8 %; 96 %; 80 %; 70 % Ethanol) für jeweils eine Minute rehydriert und der Objektträger anschließend für eine

Minute in vollentsalztem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte ein Kochvorgang in Citratpuffer (Target Retrieval Solution pH 6) bei 95 °C für 25 Minuten zur Antigen-Demaskierung, bevor der Objektträger für 30 Minuten wieder abkühlte. Es erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang in PBS bei Raumtemperatur für 5 Minuten, danach wurde mittels PapPen eine lipophile Umrandung des Gewebes vorgenommen. Zur Entfernung möglicher Reaktionen auf gewebeeigene Peroxidasen (v.a. aus Erythrozyten) erfolgte ein Peroxidase Block mittels frisch angesetzter 3%iger H₂O₂-Lösung für 10 Minuten. Danach erfolgte eine einstündige Blockierung der Gewebeproben zur Verhinderung von Kreuzreaktionen mittels SEA Blocking Puffer in einer feuchten Kammer.

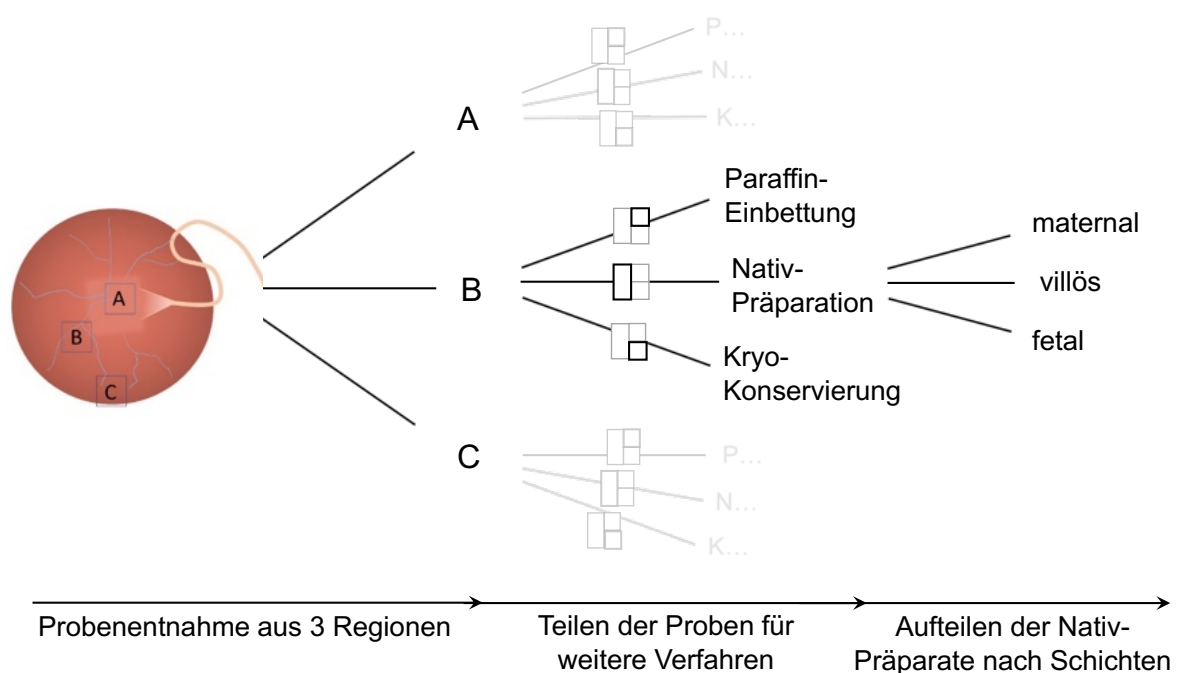


Abbildung 6: Versuchsaufbau der Plazenta-Präparation.

Als erstes werden die drei Proben-Quadrate A, B und C entnommen. Dann erfolgt jeweils das Durchschneiden der Quadrate für die verschiedenen Verfahren (hier: Blick von oben). Anschließend erfolgt die Trennung der Proben für das Nativ-Präparat nach dem histologischen Aufbau der Plazenta.

Der primäre Antikörper wurde mit dem Dako Antikörper Diluent verdünnt und auf die Gewebeprobe aufgetragen. Als primäre Antikörper wurden die unter Kapitel 3.1.5 Antikörper aufgeführten Anti-GR, Anti-GR- α , Anti-HSD11B1, Anti-11 β -HSD2 und Anti-P-Glykoprotein zum Nachweis der dazugehörigen Proteine eingesetzt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Für die Negativkontrolle erfolgte eine Inkubation mit dem Antikörper Diluent ohne Zugabe eines primären Antikörpers.

Am nächsten Tag erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschvorgang in PBS, bevor die 30-minütige Inkubation mit dem Zweitantikörper Zytochem Plus (HRP) One-Step Polymer Anti-rabbit/ Anti-mouse erfolgte und dann der Waschvorgang in PBS wiederholt wurde.

Die Schnitte wurden anschließend mit einer DAB-Lösung aus 30 µl DAB in 1 ml ImmPACT™ DAB Diluent behandelt und die Reaktion nach 30 Sekunden mit VE-Wasser gestoppt. So konnte die Antikörper-Antigen Reaktion nachgewiesen und visualisiert werden. DAB zeigt hierbei eine braune Färbung. Das Färben der basophilen Strukturen, insbesondere der Zellkerne, erfolgte mit filtriertem Hämatoxylin sauer nach Mayer für eine Minute und anschließendem Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 Minuten.

Die Objektträger wurden im Anschluss für jeweils eine Minute mit VE-Wasser abgespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %; 80 %; 96 %; ≥ 99,8 % Ethanol) vom wässrigen Milieu ins organische überführt. Die Objektträger wurden für zweimal 5 Minuten in Neoclear inkubiert und zum Abschluss mit Neomount und einem Deckglas eingedeckelt.

Anschließend erfolgten die Digitalisierung und Auswertung der Schnitte. Es wurde jeweils ein Schnitt der Kontrollgruppe sowie ein Schnitt der Gruppe Übergewicht mit Diabetes auf die nachzuweisenden Proteine (GR (gesamt), GR α , 11 β -HSD Typ 1 und 2 und p-GP) und eine Negativkontrolle analysiert. Hierzu wurden die Schnitte mittels Slide Scanner eingescannt. Bei Nachweis der Proteine in der Plazenta erfolgte eine weitere molekularbiologische Analyse mittels Western Blot und quantitativer Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (qRT-PCR). Eine quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen erfolgte nicht.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolation

Zur Extraktion der Gesamt-RNA aus Plazenten wurden Nativ-Präparate der Gruppe B villös verwendet. Die hier verwendete RNA-Isolation basiert auf der von Chomczynski und Sacchi 1987 entwickelten Single-Step-Methode ¹⁴⁸. Es wurde circa 50 mg Gewebe mit 0,5 ml TriReagent® und einer sterilen Metallkugel für 60 Sekunden bei 30 Hertz in einer MM400 Schwingmühle homogenisiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten, erfolgte die Hinzugabe von 100 µl Chloroform und dies wurde für 15 Sekunden vermischt. Nach erneuter Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten wurde das Gemisch 15 Minuten bei 4 °C mit 13680 g zentrifugiert. Es entstand eine dreiphasige Trennung, wobei nur die RNA-haltige, obere, wässrige Phase vorsichtig abpipettiert und weiterverwendet wurde. Es erfolgte eine Ausfällung mit Isopropanol zur RNA-Ausfällung. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis bei +4 °C für 20 Minuten und die Proben wurden dann für 15 Minuten bei 21380 g zentrifugiert, sodass ein RNA-Pellet entstand. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet in 75%igem Ethanol gewaschen und danach erneut bei 21380 g zur Entfernung möglicher Kontaminationen zentrifugiert. Dieser Waschvorgang erfolgte insgesamt zweimal. Danach wurde das Pellet für 45 Minuten luftgetrocknet und in 150 µl RNase-freiem DEPC-Wasser gelöst. Die Lagerung bis zur Weiterverwendung erfolgte bei -80 °C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen.

3.4.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde eine Messung mit dem Nano Quant Infinite® M200 Pro und der zugehörigen Software i-control™ durchgeführt.

Die Messung zur Konzentrationsbestimmung (Quantität) der RNA erfolgte nach ihrem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Bei einer optischen Dichte (OD₂₆₀) von 1 entspricht dies 40 µg RNA /ml H₂O. Zusätzlich erfolgte zur Detektion von Proteinen und Phenolen auch die Absorptionsmessung im Bereich von 280 nm (OD₂₈₀). Bei einem Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,8 bis 2,0 wurde von einer reinen Probe ausgegangen (Qualitätsbestimmung) ¹⁴⁹. Zur Kalibrierung fand zuerst eine Messung von RNase-freiem DEPC-Wasser statt. Anschließend wurden jeweils 2 µl der Probe auf einer NanoQuant Platte™ gemessen. Bei einem OD₂₆₀-Wert über 1,0 wurde die Probe mit DEPC-H₂O verdünnt, um eine OD₂₆₀ von 0,1 bis 1,0 zu erreichen.

Nach großen Schwankungen der C_T-Werte in der qRT-PCR und der entsprechenden Fehlersuche (s.3.4.7) wurde der OD₂₆₀/OD₂₈₀ jeder RNA-Probe insgesamt 14-fach über die gesamte Platte gemessen und der Mittelwert der Messergebnisse gebildet. So konnten die Schwankungen deutlich reduziert werden. Für alle Proben wurde ein OD₂₆₀/280 zwischen 1,8 und 2,0 bestätigt.

Die Proben wurden nach der Messung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.3 cDNA-Synthese

Um die Genanalyse mittels quantitativer Real-time PCR zu ermöglichen, wurde die isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (nach Okayama und Berg 1982) ¹⁵⁰. Aufgrund ihrer Doppelsträngigkeit ist cDNA deutlich stabiler und lässt sich deshalb besser vervielfältigen als RNA.

Zuerst erfolgte der DNase-Verdau mit 1 µl 10-fach DNase I Puffer und 1 µl RNase-freier DNase I, die zu jeweils 1 µg der isolierten RNA hinzugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden, um eventuelle DNA-Reste aus der Probe zu verdauen. Anschließend wurde die DNase durch Hinzufügen von 1 µl 25 mmol/l EDTA-Lösung und Erhitzen der Probe im Heizblock auf 65 °C für 15 Minuten inaktiviert. Als nächstes folgte die Hinzugabe von Mastermix A, wobei die enthaltenen Primer an die RNA binden. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend für eine Minute auf Eis gestellt.

Durch die anschließende Zugabe des Mastermix B und der darin enthaltenen MMLV-Reverse Transkriptase wird erst ein zur RNA komplementärer DNA-Strang und dann ein zweiter DNA-Strang transkribiert. Hierzu erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C, bevor die Reaktion auf Eis gestellt und damit gestoppt wurde. Die so synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Für die Zusammensetzung der Mastermixe A und B siehe Tabelle 11.

Mastermix A:	Konzentration	Mastermix B:	Konzentration
Randomprimer	0,06 µg/µl	MMLV-buffer 5x	0,5 µg/µl
Oligo- (dT)Primer	0,04 µg/µl	dNTP-Mix	1 mmol/µl
DEPC-H₂O		RNase-Inhibitor	2 U/µl
		MMLV	20 U/µl
		DEPC-H ₂ O	

Tabelle 11: Zusammensetzung der Mastermixe A und B in der cDNA-Synthese.

Beide Mastermixe werden zum Schreiben der cDNA eingesetzt.

3.4.4 qRT-PCR-TaqMan®

Die Amplifikation und Quantifizierung der cDNA auf Basis der RNA erfolgten mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Heid et al. ¹⁵¹. Die Reaktion läuft in Echtzeit ab und wird deshalb auch quantitative real-time PCR (qRT-PCR) genannt. Es wurden Oligonukleotid-Primer eingesetzt, die zu dem Startpunkt (forward) oder dem Endpunkt (reverse) des zu amplifizierenden Genabschnittes homolog sind. Im ersten Schritt erfolgt eine Hitze-Denaturierung, mit der die cDNA in Einzelstränge gespalten wird, sodass im nächsten Schritt die Primer an ihre komplementären cDNA-Abschnitte binden können (Primer Annealing). Im Folgenden erfolgt durch eine Polymerase die Synthese des komplementären DNA-Abschnittes von 5' nach 3' die Elongation. Durch die zyklische Wiederholung dieser Reaktionsschritte wird eine exponentielle Vervielfältigung des Abschnittes erreicht.

Die zu untersuchenden Gene werden anschließend in Relation zu Referenzgenen ausgewertet. Diese Housekeeping-Gene zeichnen sich durch eine stabile Expression im zu untersuchenden Gewebe aus.

Für die zugrunde liegenden Experimente dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verfahren der qRT-PCR verwendet.

TaqMan® qRT-PCR		
Ansatz/Well	Endkonzentration	Bedingungen
Platinum™ Quantitative PCRSuperMix-UDG mit ROX	0,5 µg/µl	1 Zyklus: 50 °C für 2 min 1 Zyklus: 95 °C für 10 min
Primer taq (2µmol/l)	40 nmol/l	45 Zyklen: 95 °C für 15 s
Primer for (3 bis 9 µmol/l)	60-180 nmol/l	45 Zyklen: 60 °C für 1 min
Primer rev (3 bis 9 µmol/l)	60-180 nmol/l	
cDNA	0,1 µg/µl	
Mit HPLC-H ₂ O aufgefüllt		

Tabelle 12: qRT-PCR-Taqman® Ansatz und Bedingungen.

Ansatz und Bedingungen für die qRT-PCR im TaqMan® Verfahren. Die Endkonzentrationen der Primer sind angegeben, sofern konstant; für alle Konzentrationen s. Kapitel 3.1.6.

Das erste Verfahren ist die TaqMan® Methode. Hierzu wird eine Hydrolysesonde verwendet, die TaqMan® Probe, die zu einem Teil des amplifizierten Genabschnittes homolog ist und am

5'-Ende mit einer fluoreszierenden FAMTM-Farbstoffmarkierung, dem Reporter, gebunden ist. Am 3'-Ende der TaqMan® Probe befindet sich ein Quencher, der die Fluoreszenz des FAM-Farbstoffs unterdrückt, solange sie sich in räumlicher Nähe zueinander befinden. Im Verlauf der Elongation wird die Sonde mittels der endogenen Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase am 5'-Ende geschnitten und so der fluoreszierende Farbstoff des Reporters freigesetzt. So kann der amplifizierte Genabschnitt quantifiziert werden und wird anhand des C_T-Wertes abgelesen, der beschreibt, in welchem Reaktionszyklus erstmalig ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz aufgetreten ist.

Für die qRT-PCR-TaqMan® wurden die cDNA-Proben auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Als erstes wurde ein Gemisch angesetzt, welches jeweils die Primer und in einem Supermix die DNA-Polymerasen enthielt (siehe Tabelle 12). Für die TaqMan® Messungen wurden jeweils 22,5 µl des Mastermixansatzes in die Wells pipettiert, und anschließend jeweils 2,5 µl von der cDNA-Probe hinzugefügt. Um ein Verdampfen der Probe im Gerät zu verhindern, wurde die Platte zugeschweißt. Dann wurde die Platte für 3 Minuten bei 338 g zentrifugiert.

Die qRT-PCR selbst erfolgte im 7500 Real Time PCR System Thermocycler mit der zugehörigen 7500 Software. Für den detaillierten qRT-PCR-Ansatz und die qRT-PCR-Bedingungen siehe Tabelle 12, für die verwendeten Primer siehe Tabelle 8.

Die Auswertung erfolgte in Excel mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode¹⁵². Der erste Schritt entspricht ΔC_T , hier wird die Differenz der C_T-Werte der untersuchten Gene mit den Housekeeping-Genen gebildet. Hierfür wurden die Gene HSD11B1, HSD11B2, NR3C1, NR3C1α und ABCB1 untersucht, als Referenz wurden die Housekeeping-Gene 18S-RNA, TBP und YWHAZ verwendet.

Im nächsten Schritt wurden dann die unterschiedlichen Kontrollgruppen gegeneinander ausgewertet, dieser Schritt komplettiert die $\Delta\Delta C_T$ -Auswertung der qRT-PCR.

3.4.5 qRT-PCR-SYBR®-Green

Das zweite verwendete Verfahren ist angelehnt an die SYBR® Green-Methode. Hierbei wird der Reaktion ein Farbstoff (SYBR-Green) hinzugefügt, der mit Bindung an doppelsträngige DNA fluoresziert. Mit Ablauf der PCR kommt es zu einem Anstieg der DNA-Moleküle durch die Amplifikation der Genabschnitte, sodass immer mehr doppelsträngige DNA vorliegt und infolgedessen der SYBR-Farbstoff mehr Bindungsstellen zur Verfügung hat. Die Fluoreszenz steigt proportional mit der doppelsträngigen DNA an.

Der SYBR Green Farbstoff bindet dabei, anders als die speziell für jeden Primer designte TaqMan® Sonde, universell an die vorhandene doppelsträngige DNA. Der Nachteil dieser Methode ist, dass der SYBR-Farbstoff dementsprechend unspezifischer ist und nur mit gut designten Primern funktioniert. Die Spezifität der Primer kann anhand einer Temperaturkurve kontrolliert werden. Hierbei ist entscheidend, dass in der Temperaturkurve nur ein Ausschlag als Maßstab für ein spezifisches Amplikon vorliegt. Das SYBR-Green-Verfahren wurde

entsprechend zwar zur Kontrolle der Primersequenzen mittels Temperaturkurve eingesetzt, allerdings wurde aufgrund der höheren Genauigkeit das TaqMan®-Verfahren für die quantitativen Analysen angewandt.

Für die qRT-PCR-SYBR®-Green wurden die cDNA-Proben auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Als erstes wurde ein Gemisch angesetzt, welches jeweils die Primer und in einem Mastermix die DNA-Polymerasen enthält (siehe Tabelle 13).

SYBR® Green qRT-PCR				qRT-PCR-Bedingungen
Ansatz/Well		Endkonzentration		
GoTaq qRT-PCR Master Mix		0,5 µg/µl		1 Zyklus: 95 °C für 2 Min
Primer for (10 µmol/l)		0,5 µmol/l		40 Zyklen: 95 °C für 15 s
Primer rev (10 µmol/l)		0,5 µmol/l		40 Zyklen: 60 °C für 60 s
cDNA		0,5 µmol/l		1 Zyklus: 95 °C für 15 s
Mit HPLC-H ₂ O aufgefüllt				

Tabelle 13: qRT-PCR-Ansatz und Bedingungen im SYBR®-Green Verfahren

Ansatz und Bedingungen für die qRT-PCR im SYBR®-Green Verfahren. Die Endkonzentrationen der Primer sind angegeben.

Bei den SYBR-Green-Versuchen wurden 19 µl des Gemisches und 1 µl der cDNA in die Wells pipettiert. Als Negativ-Kontrolle wurde HPLC-H₂O verwendet. Um ein Verdampfen der Probe im Gerät zu verhindern, wurde die Platte zugeschweißt. Dann wurde die Platte für 3 Minuten bei 338 g zentrifugiert.

Die qRT-PCR selbst erfolgte im 7500 Real Time PCR System Thermocycler mit der zugehörigen Software 7500 Software v2.0.6. Für den detaillierten qRT-PCR-Ansatz und die qRT-PCR-Bedingungen siehe Tabelle 13, für die verwendeten Primer siehe Tabelle 8.

3.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nach Ablauf der TaqMan® qRT-PCR erfolgte eine Kontrolle des Reaktionsproduktes mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dieses Verfahren beschreibt eine Weiterentwicklung der Elektrophorese nach Tiselius durch Smithies 1955 in Stärkegelen^{153,154}. Es beruht darauf, dass die DNA-Fragmente einer Probe nach ihrer Größe aufgetrennt werden, indem ein elektrisches Feld generiert wird, innerhalb dessen die negativ-geladenen Nukleinsäuren zum Pluspol wandern. Große Moleküle wandern dabei langsamer durch das Gel als kleinere Moleküle.

Hierzu wurde ein DNA-Farbstoff (Midori Green) während der Elektrophorese gebunden und unter einer UV-Lampe visualisiert. Anhand des verwendeten Markers erfolgte die Auswertung über die Anzahl und ungefähre Basenpaarlänge (bp-Länge) der Banden. Anhand der

Ergebnisse in der Gelelektrophorese wurde die Spezifität der Primer überprüft, da diese nur einen spezifischen Genabschnitt amplifizieren sollten und sich so in jeder Probe nur DNA-Fragmente derselben bp-Länge befinden sollten.

Es wurden 2,5%ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurden jeweils 3,75 g Agarose in 150 ml 1x TAE durch Kochen in der Mikrowelle gelöst und anschließend unter Rühren und Zugabe von 25 µl Midori Green für 3-5 Minuten abgekühlt. Das Gemisch wurde dann in den Gelgießstand gegossen, welcher Kämme als Platzhalter für die Probenslots enthielt, und für 30 Minuten polymerisiert. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE bedeckt. Jeweils in den ersten Slot wurden 10 µl eines 100 bp Marker pipettiert, für die anderen Slots wurden jeweils 22 µl cDNA aus den qRT-PCR-Platten und 4,4 µl 6-fach Probenpuffer gemischt und diese befüllt. Dann wurde für 40 Minuten eine Spannung von 100 Volt angelegt. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht mit dem BioRad-System und der dazugehörigen BioDocAnalyze Software visualisiert.

Für jeden Primer wurden mindestens zwei Proben randomisiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Bei Vorliegen von mehr als einer Bande wurde das Primerset neu designt und der neue Primer ebenfalls auf seine Spezifität überprüft.

3.4.7 qRT-PCR-Fehleranalyse

Da die Referenzgene (Housekeeping-Gene) als Kontrolle gelten und in der Regel in jeder Probe mit einem ähnlichen C_T -Wert exprimiert werden sollten, wurden verschiedene Housekeeping-Gene miteinander verglichen. Aufgrund einer weiten Streuung der Housekeeping-Gene erfolgte eine Fehleranalyse, um den Prozess von der RNA-Isolation bis zur qRT-PCR zu überprüfen in mehreren, nachfolgenden Schritten.

3.4.7.1 Fehleranalyse: RNA-Quantifizierung und cDNA-Synthese

Jede RNA-Probe wurde zur RNA-Quantifizierung gut mit einer Pipette durchmischt und dann 14-fach auf die NanoQuant Platte™ aufgetragen, um so mögliche Schwankungen durch die Platte und das Photometer auszuschließen. Für die anschließende cDNA-Synthese wurden die Mittelwerte der so gemessenen OD260-Werte gebildet und verwendet (siehe Kapitel 3.4.2).

Außerdem wurde eine geeignete Konzentration der cDNA in der qRT-PCR mittels Konzentrationsreihe (1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:100, 1: 1000, 1:10000 und 1:10000) bestimmt.

3.4.7.2 Fehleranalyse: Primer Design und Referenzgene

Primer, die nicht bereits im Laborbestand waren, wurden anhand bereits publizierter Gensequenzen bestellt oder selbst designt (siehe hierfür auch Kapitel 3.1.6). Die designten Primer wurden mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) überprüft und die Ähnlichkeit verschiedener Gene abgeglichen.

Es erfolgte eine Überprüfung der Forward- und Reverse-Primer mittels SYBR® Green qRT-PCR (s. 3.4.5), wobei hier vor allem die Auswertung der Schmelzkurven ausschlaggebend war. Nur Primer mit spezifischem Ausschlag für das jeweilige Genfragment in der Temperaturkurve wurden zur Durchführung der endgültigen TaqMan® qRT-PCR herangezogen.

Alle verwendeten Primer wurden außerdem im Anschluss an die TaqMan® qRT-PCR anhand der Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.4.6) auf die Spezifität ihrer Banden hin überprüft. Hierbei wurde sich das elektrophoretische Prinzip zunutze gemacht, dass Moleküle anhand ihrer Größe in unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Agarosegel wandern. Da jedoch ein spezifischer Genabschnitt in der qRT-PCR nachgewiesen werden sollte, konnte ein spezifischer Primer nicht mehr als eine Bande in der Gelelektrophorese zeigen. Genügten die Primer nicht den entsprechenden Anforderungen, wurden neue Primer designt und wiederum überprüft.

Die richtige Konzentration von Forward- und Reverse-Primer wurde für alle noch nicht etablierten Primer in einer Taqman® qRT-PCR ermittelt, indem sowohl Forward- als auch Reverse-Primer in den Endkonzentrationen 3 µM, 6 µM und 9 µM zu der cDNA hinzugegeben wurden und die Kombination, die die wenigsten Temperaturzyklen für eine exponentielle Amplifikation (geringster C_T-Wert) zeigte, wurde dann entsprechend weiterverwendet.

Es erfolgte die Auswahl geeigneter Housekeeping-Gene anhand der Analyse durch die Software qBase+. Diese ermittelt anhand des geNorm Algorithmus die Stabilität der Genexpression M, in dem es verschiedene Housekeeping-Gene vergleicht. In einem zweiten Schritt analysiert geNorm anhand der paarweisen Varianz V, ob ein oder mehrere Housekeeping-Gene in der Analyse hinzugezogen werden sollen. Der vom Programm vorgeschlagene Cut-Off-Wert ist 0,15.

3.5 Proteinanalytische Methoden

3.5.1 Protein-Isolation

Die Proteine wurden über eine SDS-Gelelektrophorese und einen anschließenden Western Blot analysiert. Hierzu wurden zuerst die Proteine aus dem Plazentagewebe isoliert.

Für die Protein-Isolation wurde jeweils eine kleine Probe (ca. 200 mg) entnommen, hierbei wurde das villöse Plazentagewebe mittig zwischen Nabelschnur und Plazentarand verwendet (B-villös). Jede Probe wurde mit 500 µl modifiziertem RIPA-Puffer versetzt und danach mit einem Mörser zerkleinert. Es folgte mit dem Ultraschall-Homogenisator Sonopuls® eine Sonifizierung für circa 60 Sekunden (als Einstellungen erfolgte 50 % Energie und 3x 10 % Zyklus) und anschließend eine einstündige Inkubation auf Eis. Dann wurde die Probe bei +4 °C für 5 Minuten bei 18407 g in der Zentrifuge 5424 R zentrifugiert. Der Überstand, der nun die

Proteine enthielt, wurde abpipettiert, in ein neues Gefäß überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe von Bicinchoninsäure mittels Pierce® BCA Protein Kit gemessen, um in der folgenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese vergleichbare Proteinmengen auftragen zu können. Die Proteinlysate wurden mit RIPA-Puffer im Verhältnis 1:20 verdünnt. Es wurde eine Verdünnungsreihe aus BSA (2mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml) sowie RIPA-Puffer als Leerwert verwendet. Jeweils 10 µl der Probe oder des Standards wurden in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Es erfolgte die Mischung der Reagenzien des Protein Kits im Verhältnis 50:1 (Reagenz A : Reagenz B). Anschließend wurde von diesem Diluent jeweils 200 µl auf die 96-Well-Platte gegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C und dann wurde die optischen Dichte bei 562 nm im Nano Quant Infinite® M200 Pro gemessen.

Die Proteinkonzentration wurde anhand der BSA-Standardreihe ermittelt. Hierzu wurden erst die Mittelwerte der Doppelbestimmungen gebildet, der Mittelwert des Leerwertes abgezogen und die Proben später wieder mit 20 (Verdünnungsfaktor) multipliziert. Anhand der Verdünnungsreihe wurde dann die Konzentration berechnet.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse der Proteine wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli durchgeführt ¹⁵⁵. Die Proben durchliefen zuerst ein Sammelgel, um die Proteine auf eine Laufront zu fokussieren und wurden anschließend im Trenngel aufgetrennt. Durch die Bindung von SDS an die Proteine wurden diese negativ geladen und mit Hilfe einer Hitze-Denaturierung und β-Mercaptoethanol vollständig entfaltet. Die Proteine wandern so mittels Elektrophorese durch ein Polyacrylamid-Gel und trennen sich entsprechend ihrem Molekulargewicht auf.

Für die Herstellung des Polyacrylamid Gels wurde das SDS-PAGE-Gelsystem sowie Spacer von Peglab verwendet. Aufgrund der begrenzten Anzahl der Probentaschen n = 36 wurden aus dem Patientinnen-Kollektiv innerhalb der Analyse-Gruppen Stichproben mit Microsoft® Excel randomisiert.

Es wurden jeweils 20 bis 30 µg Protein auf 8 µl VE-Wasser aufgefüllt und mit 2 µl 5-fach Probenpuffer gemischt. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei 70 °C denaturiert und anschließend mit Hilfe von Kapillarpipettenspitzen in die Probentaschen des Sammelgels pipettiert. Bei dem Antikörper p-GP entfiel dieser Koch-Schritt gemäß den Herstellerangaben von Abcam. Als Größenstandard dienten der PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1-fach Laemmli-Puffer aufgefüllt. Es wurde eine Spannung von 80 V im Sammelgel angelegt und die Spannung wurde auf 120 V erhöht, sobald die

Probenlauffront das Trenngel erreichte. Kurz bevor die Lauffront das Ende des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet.

Für die Konzentrationen des Sammelgels und der Trenngele siehe Tabelle 14.

Bezeichnung	Sammelgel
Acrylamid	5,1 %
Sammelgelpuffer pH 6,8	65 mmol/l
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,1 %
ad H ₂ O	

Bezeichnung	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %
Acrylamid	8 %	10 %	12 %
Trenngelpuffer pH 8,8	375 mmol/l	375 mmol/l	375 mmol/l
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
APS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,06 %	0,04 %	0,04 %
ad H ₂ O			

Tabelle 14: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel in der SDS-PAGE.

Das Sammelgel wurde für jeden Western Blot verwendet, die Konzentrationen der Trenngele war abhängig von der Größe der nachzuweisenden Proteine. So wurden das 8 %-ige und das 12 %-ige Trenngel bei dem Nachweis von ABCB1 verwendet, das 10 %-ige Trenngel bei den anderen Proteinen.

3.5.4 Western Blot

Für die weitere Analyse der aufgetrennten Proteine wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierfür wurden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Whatman® Nitrocellulose-Membran übertragen. Die elektrophoretische Auftrennung bleibt hierbei erhalten. Im Anschluss können mithilfe von spezifischen Antikörpern einzelne Proteine sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Als erstes wurde die Nitrocellulose-Membran sowie die Filterpapiere auf eine passende Größe geschnitten, anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran aktiviert, in dem sie für eine Minute in VE-Wasser gelegt wurde.

Die Blotkammer wurde mit dem Towbin Puffer angefeuchtet und auf 2 Filterpapiere wurden die Nitrocellulose-Membran und dann das proteinhaltige Trenngel gefolgt von 2 weiteren Filterpapieren gestapelt. Es wurde für 2 Stunden eine Stromstärke von 1,3 mA/cm² (bzw. 1,4 mA/cm² für p-GP aufgrund seiner Größe > 100 kDa) angelegt, sodass die Übertragung der negativ geladenen Proteine aus dem Trenngel auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte. Es erfolgte eine Färbung des Gesamtproteins zur Überprüfung der Protein-Übertragung mittels

0,2 % Ponceau S-Lösung, bevor die Membran anhand des Proteingrößen-Markers für die jeweilige Analyse zurechtgeschnitten wurde. Hierfür wurde die Membran für 2 Minuten mit Ponceau-Lösung inkubiert und die Membran anschließend 3-malig in VE-Wasser gewaschen und im Imager ChemiDoc XRS+ System visualisiert. Im Anschluss wurde die Membran für 1 Stunde mit einer Blockierlösung aus TBST sowie 5 % Milchpulver und 2 % BSA blockiert, um eine unspezifische Bindung von Proteinen zu verhindern. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, mit dem jeweils ein spezifisches Protein nachgewiesen werden sollte, für 30 Minuten bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei +4 °C auf einem Schüttler. Nach 3-maligem Waschen in TBST wurde am nächsten Tag die Membran im Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut 3-malig mit TBST gewaschen. Genaue Angaben zu den verwendeten Antikörpern sind in Tabelle 7 beschrieben.

Für die Entwicklung der Membranstreifen wurden die ECL-Reagenzien nach Anleitung 1:1 gemischt und auf den jeweiligen Membranstreifen für 60 Sekunden einwirken gelassen. Die Visualisierung erfolgte mit dem Imager ChemiDoc XRS+. Die Auswertung des Western Blots erfolgte anhand der Software Image Lab™ (Version 6.1.0), indem eine densitometrische Ausmessung der einzelnen Banden erfolgte. Die weitere Analyse erfolgte dann mittels Microsoft® Excel, in dem die Intensität der untersuchten Proteinbanden mit der Bande des Referenzproteins differenziert und nach untersuchten Gruppen ausgewertet wurde.

Nach Austestung einiger Haushaltsproteine (HPRT, GAPDH, α -Tubulin und β -Aktin) wurde β -Aktin als geeignetes Referenzprotein verwendet.

3.5.5 Stripping

Nach der Visualisierung wurde die Membran bei Bedarf mit einem weiteren Antikörper inkubiert.

Nach 3-maligem Waschen der Membran mit TBST für jeweils 10 Minuten, wurde hierfür der Stripping-Puffer mit β -Mercaptoethanol angesetzt und die Membran für 25 Minuten im Wasserbad bei 56 °C inkubiert. Nach erneutem 3-maligen Waschschrift mit TBST erfolgte vom 2-stündigen Blockieren der Membran bis zur Visualisierung im Imager ChemiDoc XRS+ und der Auswertung anhand der Software Image Lab™ (Version 6.1.0) dasselbe Vorgehen wie unter 3.5.4 beschrieben.

3.6 Statistische Auswertung

Die klinischen Daten der Studienkohorte wurden anhand der Software IBM® SPSS Statistics statistisch ausgewertet. Eine statistische Beratung wurde durch das Institut für medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln durchgeführt.

Metrische Daten wurden zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Testung auf Varianzgleichheit nach Levene. Bei

normalverteilten, varianzgleichen Daten erfolgte eine ANOVA zur Testung der 3 Gruppen nach BMI und GDM. Die Gruppen wurden dann aufgrund der teils ungleichen Stichprobengröße mit einem Hochberg-Test näher untersucht. Die Ergebnisse werden mit Mittelwert und einer Standardabweichung angegeben.

Bei nicht-normalverteilten oder nicht-varianzgleichen Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test und anschließend ein Hochberg-Test verwendet. In diesem Fall sind der Median und der Interquartilsabstand angegeben.

Qualitative Daten werden prozentual in der untersuchten Gruppe angegeben und nach Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Die Erstellung der Grafiken zu klinischen Daten erfolgte ebenfalls mit der Software IBM® SPSS Statistics.

Die statistische Auswertung der praktischen Versuche der qRT-PCR erfolgte mittels Microsoft® Excel und der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, der Kruskal-Wallis-Test wie auch, falls erforderlich, der Hochberg-Test erfolgte anhand der Software IBM® SPSS Statistics. Die graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism.

Die Auswertung der praktischen Versuche im Western Blot erfolgte mittels Microsoft® Excel, die graphische Darstellung und Signifikanztestung wie auch die graphische Darstellung der Parameter maternales und fetales Cortisol erfolgte mit GraphPad Prism.

Es wurde mithilfe des GraphPad QuickCalcs Outlier Detectors ein Grubbs-Test auf statistische Ausreißer durchgeführt und gegebenenfalls maximal ein signifikanter Ausreißer von der Auswertung exkludiert.

In SPSS erfolgte ein Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung. Es erfolgte ein ANOVA bei normalverteilten Daten bzw. ein Kruskal-Wallis-Test bei nicht-normalverteilten Daten. Zur weiteren Signifikanztestung in GraphPad wurde ein Hochberg-Test herangezogen.

Als Signifikanzniveau α wurde in allen Analysen $\alpha \leq 0,05$ verwendet, ab einem Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0,01$ wurde das Ergebnis als hochsignifikant gewertet und die Ergebnisse in Tabellen und Grafiken entsprechend mit einem ($\alpha \leq 0,05$) oder zwei Sternen ($\alpha \leq 0,01$) gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

In der dieser Dissertationsschrift zugrunde liegenden Studienpopulation wurden insgesamt 147 Frauen und ihre Einlinge eingeschlossen.

Es wurde nach der Höhe des BMI und dem Vorliegen eines GDM in entsprechende Gruppen unterteilt. Gruppe I beschreibt die normalgewichtigeren Schwangeren ohne GDM (NG -), Gruppe II Übergewicht ohne Vorliegen eines GDM (ÜG -) und Gruppe III die übergewichtigen Schwangeren mit GDM (ÜG + GDM).

4.1 Beschreibung der Studienkohorte

Die Beschreibung der Studienkohorte wurde zur besseren Übersicht in maternale, plazentare und neonatale Daten unterteilt.

4.1.1 Studienpopulation – Maternale Daten

Das mittlere Alter aller 147 Patientinnen lag bei 34 Jahren und unterschied sich in keiner der Untersuchungsgruppen signifikant. Die mittlere Gestationsdauer in der gesamten Studienkohorte lag bei 39,1 Schwangerschaftswochen und es ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied nach den ausgewerteten Gruppen I, II und III.

Ein signifikanter Unterschied bestand in der Gravidität und Parität (Gravidität $p = 0,21$; Parität $p = 0,14$). Eine höhere Gravidität bestand bei den übergewichtigen Gruppen II und III gegenüber der normalgewichtigen Gruppe I. Eine erhöhte Parität zeigte sich zwischen den Gruppen I (NG -) und II (ÜG -).

Der mittlere BMI vor der Schwangerschaft in der gesamten Studienkohorte lag bei $26,7 \text{ kg/m}^2$ und unterschied sich signifikant zwischen den untersuchten Gruppen. In Gruppe I lag der mittlere BMI bei $21,7 \text{ kg/m}^2$, in Gruppe II bei $28,6 \text{ kg/m}^2$ und in Gruppe III bei $32,0 \text{ kg/m}^2$ ($p < 0,001$).

Die empfohlene Gewichtszunahme der WHO im Laufe der Schwangerschaft unterscheidet sich gemäß dem BMI zu Beginn der Schwangerschaft. Während normalgewichtigen Schwangeren eine Gewichtszunahme von 11,5-16 kg empfohlen wird, gilt für übergewichtige Frauen 7-11,5 kg und für adipöse Frauen 5-9 kg empfohlene Gewichtszunahme^{4,9}. Die Gewichtszunahme in dieser Kohorte lag im Median bei 12,2 kg. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der normalgewichtigen Gruppe I mit 13,2 kg mittlerer Gewichtszunahme sowie der übergewichtigen Gruppe II mit 11,6 kg zu der übergewichtigen, diabetischen Gruppe III mit einer Gewichtszunahme von 10,9 kg.

Das Auftreten eines GDM unterschied sich signifikant nach dem BMI zwischen den Gruppen I und III bzw. II und III ($p < 0,001$), dieser Unterschied war aufgrund der Gruppendifinition zu erwarten.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Alltagsbewegung. Im Sportverhalten während der Schwangerschaft zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,008$), so zeigte

sich in der Kategorie „kein Sport“ ein geringerer Anteil in Gruppe I zu Gruppe III. Insgesamt zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Dauer der beruflichen Beschäftigung ($p = 0,004$), so arbeiteten Schwangere der normalgewichtigen Gruppe I insgesamt länger als die anderen Gruppen II und III.

			alle (n = 147)	NG- Gruppe I (n = 56)	ÜG- Gruppe II (n = 49)	ÜG+GDM Gruppe III (n = 42)	p
Alter [Jahre]	Median ± IQR		34 ± 7	34 ± 5,5	35 ± 7	32,5 ± 7	n.s.
BMI vor SS [kg/m ²]	Median ± IQR		26,7 ± 9,5	21,7 ± 2,9	28,6 ± 5,7	32 ± 9	*** / # ^
Δ Gewicht [kg]	Median ± IQR		12,2 ± 7	13,2 ± 5,7	11,6 ± 6,6	10,9 ± 7,1	n.s.
SSW als Kommazahl	Median ± IQR		39,1 ± 0,7	39,2 ± 0,7	39,1 ± 0,7	39,3 ± 0,7	n.s.
Gravida	Median ± IQR		2 ± 1	2 ± 2	3 ± 2	2 ± 1	* / #
Para inkl. aktuelle SS	Median ± IQR		2 ± 2	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 2	* /
GDM	GDM	Anzahl abs. (rel.)	42 (29 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	42 (100 %)	*** # ^
	- Diät	Anzahl abs. (rel.)	13 (9 %)			13 (31 %)	
	- Insulin	Anzahl abs. (rel.)	29 (20 %)			29 (69 %)	
	kein GDM	Anzahl abs. (rel.)	105 (71 %)	56 (100 %)	49 (100 %)	0 (0 %)	
Mat. Glukose [mg/dl]	MW ± SD		71,7 ± 12,8	70,4 ± 12	67,7 ± 11,2	77,5 ± 13,6	**
	Anzahl		97	34	33	30	# ^
Mat. HbA1c [%]	Median ± IQR		5,4 ± 0,5	5,2 ± 0,5	5,4 ± 0,5	5,6 ± 0,6	**
	Anzahl		120	45	42	33	# ^

Tabelle 15: Übersicht über die maternalen Stammdaten.

Dargestellt sind die wichtigsten maternalen Stammdaten nach den untersuchten Gruppen. Gruppe I beschreibt hierbei eine Normalgewichtige Schwangere ohne GDM (NG-), Gruppe II beschreibt die Übergewichtigen Schwangeren ohne GDM (ÜG-), in Gruppe III werden die übergewichtigen Schwangeren mit GDM abgebildet (ÜG+GDM). Für eine ausführliche Beschreibung der Studienkohorte siehe Kapitel 4.1.1.

In der rechten Spalte wird die Signifikanz aus der ANOVA mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) bzw. dem Kruskal-Wallis-Test mit Median und Interquartilsabstand (IQR) angegeben, bei nominalen und ordinalen Daten erfolgte ein Chi-Quadrat-Test, hierbei gilt $p > 0,05$ nicht signifikant (n.s.), * entspricht $0,01 < p \leq 0,05$, ** entspricht $0,001 < p \leq 0,01$, *** entspricht $p \leq 0,01$. Als Post-hoc-Test der metrischen Daten wurde ein Hochberg-Test durchgeführt, eine Signifikanz wird anhand dieser Zeichen angegeben: / Gruppe I zu II; # Gruppe I zu III; ^ Gruppe II zu III

Der letzte im Mutterpass notierte Blutdruck in der Schwangerschaft wurde ebenfalls ausgewertet. Weder der diastolische noch der systolische Blutdruck zeigte sich nach den untersuchten Gruppen signifikant.

Weiterhin wurden die Glukose-Werte aus dem Nüchtern-Plasma peripartal vor Sectio bestimmt. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,03$), dieser bestand nach Vorliegen eines GDM zwischen den Übergewichtsgruppen II und III, bei einem mittlerem

Nüchternwert von 67,7 mg/dl ohne GDM (Gruppe II) im Vergleich zu einem Nüchternwert von 77,5 mg/dl mit GDM (Gruppe III).

Die HbA1c-Werte wurden beim Aufklärungstermin circa eine Woche vor geplanter Sectio durch das Zentrallabor der Uniklinik Köln bestimmt. Hier zeigte sich ein steigender HbA1c mit Übergewicht und Vorliegen eines GDM, ein signifikanter Unterschied bestand zwischen den Gruppen I bzw. II im Vergleich zu Gruppe III ($p = 0,002$). Für eine tabellarische Übersicht der Parameter siehe Tabelle 15.

4.1.2 Studienpopulation – Plazentare Informationen

Das mittlere Gewicht der untersuchten Plazenten betrug 674 g. Es unterschied sich in keiner der untersuchten Gruppen signifikant. Eine tabellarische Übersicht ist unter Tabelle 16 zu finden.

	alle (n = 147)	NG- Gruppe I (n = 56)	ÜG- Gruppe II (n = 49)	ÜG+GDM Gruppe III (n = 42)	p
Plazentagewicht [g] Median ± IQR	674 ± 189	664 ± 145	674 ± 256	709 ± 207	n.s.

Tabelle 16: Übersicht über die plazentaren Stammdaten.

Dargestellt sind die wichtigsten plazentaren Stammdaten nach den untersuchten Gruppen. Gruppe I beschreibt hierbei eine Normalgewichtige Schwangere ohne GDM (NG -), Gruppe II beschreibt die Übergewichtigen Schwangeren ohne GDM (ÜG -), in Gruppe III werden die übergewichtigen Schwangeren mit GDM abgebildet (ÜG + GDM). Für eine ausführliche Beschreibung der Studienkohorte siehe Kapitel 4.1.2. In der rechten Spalte wird die Signifikanz des Kruskal-Wallis-Tests angegeben, hierbei gilt $p > 0,05$ nicht signifikant (n.s.).

4.1.3 Studienpopulation – Fetale Daten

Im Folgenden soll eine Übersicht über die fetalen Stammdaten gegeben werden, eine tabellarische Übersicht ist in Tabelle 17 dargestellt.

In der zugrunde liegenden Studienkohorte wurden alle 74 männlichen und 72 weiblichen Kinder lebend geboren. Bei einem lebend geborenen Kind konnte das Geschlecht anhand der erhobenen Daten nicht eindeutig nachvollzogen werden (unterschiedliche Angaben in Mutterpass und Geburtsbericht). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der untersuchten Gruppen bezüglich des fetalen Geschlechts.

Die unmittelbar postpartal untersuchten Neugeborenen zeigten keine signifikanten Unterschiede im nach 5 und 10 Minuten erhobenen APGAR-Score. Der 10' APGAR lag bei allen Neugeborenen bei mindestens 7 von 10 Punkten. Der Nabelschnur-pH lag im Median bei 7,32 und unterschied sich nicht zwischen den untersuchten Gruppen I bis III. Es gab in zwei Fällen eine leichte Azidose des Nabelschnur-pHs mit einem Minimum von 7,16 bzw. 7,18, zu diesen kam es in den Gruppen I und III, andere Entgleisungen des Nabelschnur-pHs gab es nicht.

Eine weitere postpartale Beobachtung erfolgte im Rahmen der Studie nicht, da die Neugeborenen nicht über den Kreissaal hinaus erfasst wurden. Sofern im Geburtsprotokoll

erfasst, ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der postpartalen Adaption, weder respiratorisch noch beim Vorliegen von Hypoglykämien nach den untersuchten Gruppen.

Die Neugeborenen unterschieden sich maßgeblich in den biometrischen Daten Kopfumfang, Geburtsgewicht und Geburtslänge und deren Einschätzung nach Perzentilen nach Höhe des maternalen BMI und Vorliegen eines GDM.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen zahlreicher Studien, dass mit steigendem BMI bzw. Vorliegen eines GDM vor allem die fetalen Parameter Geburtsgewicht, Kopfumfang und damit einhergehend auch die Wahrscheinlichkeit für eine Schulterdystokie und weiteren Geburtskomplikationen steigt ^{12,156}.

Das mittlere Geburtsgewicht lag bei 3498 g. Im Vergleich zur normalgewichtigen Gruppe I mit 3371 g und der übergewichtigen, nicht diabetischen Gruppe II mit 3409 g zeigte sich ein deutlich erhöhtes Geburtsgewicht in der übergewichtigen, diabetischen Gruppe III mit 3771 g ($p < 0,001$).

Die Einordnung der Perzentile, die neben dem absoluten Geburtsgewicht auch die Gestationsdauer und das Geschlecht berücksichtigt, ergab im Median über die gesamte Studienpopulation ein Geburtsgewicht auf der 55. Perzentile. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen I, mit einem Geburtsgewicht auf der 42. Perzentile, und II, mit einem Geburtsgewicht auf der 52. Perzentile, zur diabetischen, übergewichtigen Gruppe III auf der 75. Perzentile ($p < 0,001$).

Die Betrachtung eines Geburtsgewichts über 4500 g wird in der Leitlinie GDM unter anderem zur Wahl des Geburtsmodus empfohlen ¹³. Es ist bekannt, dass ein erhöhtes Risiko für ein erhöhtes Geburtsgewicht und Makrosomie unter GDM vor allem in schlechter therapeutischer Einstellung besteht ^{157,158}. In dieser Kohorte zeigte sich insgesamt bei 17 Kindern ein Geburtsgewicht über 4 kg, das entspricht 12 %. Es zeigte sich häufiger eine Makrosomie bei Vorliegen eines GDM ($p = 0,012$), so unterschieden sich die Gruppen I mit 5 % und III mit 24 % signifikant.

Als Alternative der Einschätzung eines zu hohen Geburtsgewichts anhand einer absoluten Zahl wie bei der Makrosomie gibt es auch noch die Perzentilen-gerechte Einschätzung eines LGA. Hier gilt ein Geburtsgewicht über der 90. Perzentile als LGA und über der 97. Perzentile als vLGA (very Large for Gestational Age). Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen I bzw. II gegenüber der übergewichtigen, diabetischen Gruppe III, in der sich häufiger ein (v)LGA zeigte ($p = 0,002$). Die mittlere Geburtslänge der Studienpopulation insgesamt betrug 52 cm und befand sich auf der 57. Perzentile. Mit dem maternalen Gewicht und Vorliegen eines GDM stieg die mittlere Körperlänge von 51 cm

(Gruppe I) auf 53 cm (Gruppe III) an, dieser Effekt zeigte sich zwischen den Gruppen I bzw. II im Vergleich zu Gruppe III statistisch signifikant ($p < 0,001$).

			alle (n = 147)	NG - Gruppe I (n = 56)	ÜG - Gruppe II (n = 49)	ÜG+GDM Gruppe III (n = 42)	p
Geschlecht	♂	Anzahl abs. (rel.)	74 (51 %)	26 (47 %)	25 (51 %)	23 (55 %)	n.s.
	♀	Anzahl abs. (rel.)	72 (49 %)	29 (53 %)	24 (49 %)	19 (45 %)	
Nabelschnur-pH		Md ± IQR	7,32 ± 0,05	7,34 ± 0,07	7,33 ± 0,06	7,32 ± 0,05	n.s.
		Anzahl	145	54	49	42	
Geburtsgewicht [g]		MW ± SD	3498 ± 486	3371 ± 432	3409 ± 504	3771 ± 431	*** # ^
	PEDS	Md ± IQR	54,5 ± 50	42 ± 54	52 ± 47	75,5 ± 44	*** # ^
	SGA	Anzahl abs. (rel.)	10 (6 %)	5 (9 %)	5 (10 %)	0 (0 %)	** # ^
	- davon vSGA	Anzahl abs. (rel.)	5 (3 %)	3 (5 %)	3 (6 %)	0 (0 %)	
	AGA	Anzahl abs. (rel.)	118 (80 %)	47 (84 %)	40 (82 %)	31 (74 %)	* /
	LGA	Anzahl abs. (rel.)	19 (13 %)	4 (7 %)	4 (8 %)	11 (26 %)	
	- davon vLGA	Anzahl abs. (rel.)	10 (7 %)	2 (4 %)	2 (4 %)	6 (14 %)	*** # ^
	nein	Anzahl abs. (rel.)	130 (88 %)	53 (95 %)	45 (92 %)	32 (76 %)	
Makrosomie	ja	Anzahl abs. (rel.)	17 (12 %)	3 (5 %)	4 (8 %)	10 (24 %)	*** # ^
Geburtslänge [cm]		Md ± IQR	52 ± 4	51 ± 3	52 ± 3	53 ± 3	
	PEDS	Md ± IQR	57 ± 54	50 ± 53	46 ± 47	75,5 ± 31	*** # ^
Kopfumfang [cm]		Md ± IQR	35,5 ± 1,5	35,5 ± 1,5	35,5 ± 2	36,5 ± 2	* # ^
fet. Glukose [mg/dl]		MW ± SD	61,7 ± 12,7	60,9 ± 13,3	60 ± 10,2	64,6 ± 13,8	n.s.
		Anzahl	117	46	36	35	
fet. Insulin [mU/l]		Md ± IQR	10,4 ± 7,2	9,1 ± 6,8	9,5 ± 6,7	14,4 ± 7,4	*** # ^
		Anzahl	134	52	44	38	

Tabelle 17: Übersicht über die fetalen Stammdaten.

Dargestellt sind die wichtigsten fetalen Stammdaten nach den untersuchten Gruppen. Gruppe I beschreibt hierbei eine normalgewichtige Schwangere ohne GDM (NG-), Gruppe II beschreibt die übergewichtigen Schwangeren ohne GDM (ÜG-), in Gruppe III werden die übergewichtigen Schwangeren mit GDM abgebildet (ÜG+GDM). Für eine ausführliche Beschreibung der Studienkohorte siehe Kapitel 4.1.3. In der rechten Spalte wird die Signifikanz aus der ANOVA mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) bzw. dem Kruskal-Wallis-Test mit Median und Interquartilsabstand (IQR) angegeben, bei nominalen und ordinalen Daten erfolgte ein Chi-Quadrat-Test. Hierbei gilt $p > 0,05$ nicht signifikant (n.s.), * entspricht $0,01 < p \leq 0,05$, ** entspricht $0,001 < p \leq 0,01$, *** entspricht $p \leq 0,01$. Als Post-hoc-Test der metrischen Daten wurde ein Hochberg-Test durchgeführt, eine Signifikanz wird anhand dieser Zeichen angegeben: / Gruppe I zu II; # Gruppe I zu III; ^ Gruppe II zu III

SGA Small for Gestational age, vSGA very Small for Gestational age, AGA Appropriate for Gestational Age, LGA Large for Gestational Age, vLGA very Large for Gestational Age

Es zeigte sich ein Anstieg der Geburtslängenperzentile vor allem bei Vorliegen eines GDM von 50 (Gruppe I) bzw. 46 (Gruppe II) auf 72 in der diabetischen, übergewichtigen Gruppe III ($p < 0,001$). Der Kopfumfang zeigte sich mit 36,5 cm ebenfalls erhöht bei Zugehörigkeit zur übergewichtigen, diabetischen Gruppe III gegenüber der normalgewichtigen Gruppe I und der übergewichtigen Gruppe II mit jeweils 35,5 cm ($p = 0,011$).

Die fetale Glukose zeigte sich unmittelbar postpartal im Nabelschnurblut bei Vorliegen von Übergewicht und eines GDM höher, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Das fetale Insulin zeigte sich signifikant höher bei Vorliegen eines GDM (Gruppe I bzw. II im Vergleich zu Gruppe III $p < 0,001$).

4.2 Cortisol

4.2.1 Maternale Cortisolspiegel

95 maternale Plasma-Proben wurden auf die Höhe des Gesamt-Cortisols durch das Zentrallabor der Uniklinik Köln untersucht. Als Referenzwert gilt hier bei einem nicht schwangeren Erwachsenen bei morgendlicher Blutentnahme ein Bereich von 62 bis 194 $\mu\text{g/l}$. In der Schwangerschaft sind die maternalen Cortisolspiegel physiologisch erhöht ^{31,34,35}. Bereits publizierte Daten bestätigen einen bis zu dreifachen Anstieg des maternalen Serum-Cortisols im Laufe der Schwangerschaft ³¹.

Maternale Cortisolspiegel nach BMI und GDM

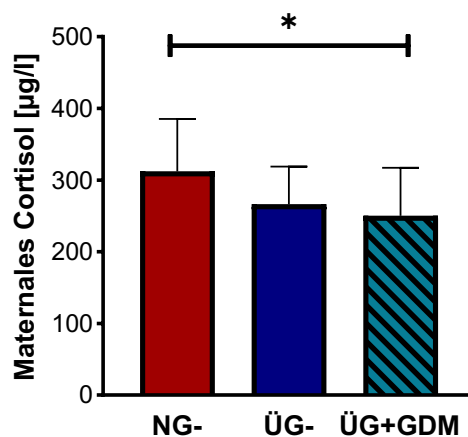


Abbildung 7: Maternale Cortisolspiegel nach BMI und GDM.

Das maternale Cortisol in $\mu\text{g/l}$ wurde am Morgen vor Sectio caesarea ermittelt. Es zeigt sich eine Verringerung des Cortisolspiegels im Vergleich der Gruppen Normalgewicht ohne GDM (Gruppe I, NG-) und Übergewicht mit GDM (Gruppe III, ÜG+GDM) ($p = 0,037$; Post-hoc $p = 0,047$).

Die Gruppengröße n beträgt bei NG- $n = 34$; ÜG- $n = 31$; ÜG+GDM $n = 30$. Die Darstellung erfolgt als Median mit IQR (Fehlerbalken), die Signifikanztestung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- bzw. einem Hochberg-Test; * $p < 0,05$.

In der untersuchten Kohorte lag der Cortisolspiegel am Morgen vor der Sectio caesarea im Median bei 281,0 $\mu\text{g/l}$. Somit ergibt sich in dieser Arbeit ein (Referenz-) Bereich für das maternale Cortisol (mit 95% aller Werte) zwischen 149 - 478 $\mu\text{g/l}$. Es zeigte sich ein niedrigerer

Cortisolspiegel bei den übergewichtigen, diabetischen Schwangeren der Gruppe III mit 250 µg/l im Vergleich zu NG-Gruppe I mit 312 µg/l. ($p = 0,037$; Post-hoc $p = 0,047$ Gruppe I zu III; s. Abbildung 7).

Die maternalen Cortisolspiegel zeigten sich in Abhängigkeit des maternalen BMI signifikant reduziert im Sinne einer negativen Korrelation ($r = -0,329$, $p = 0,001$; s. Abbildung 8).

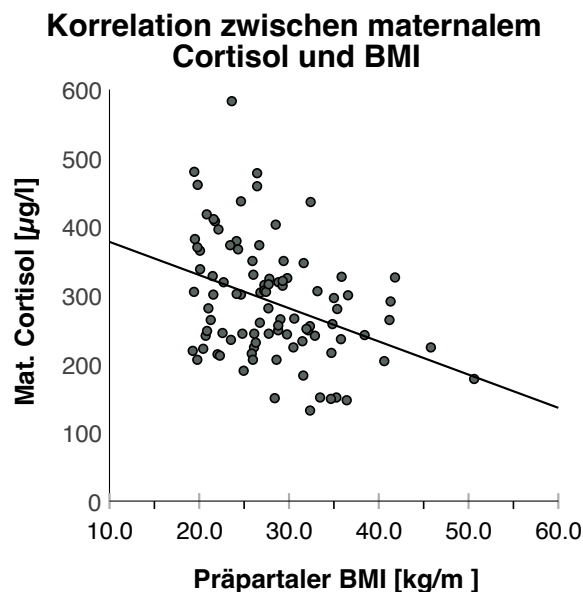


Abbildung 8: Maternale Cortisolspiegel nach BMI.

Es zeigt sich eine negative Korrelation ($r = -0,329$, $p = 0,001$) zwischen maternalem Cortisolspiegel in µg/l und dem maternalen, präpartalen BMI in kg/m². Es werden $n = 95$ Probanden dargestellt, wobei jede Probe einen Punkt im Diagramm darstellt. Die Korrelation und Signifikanztestung erfolgte mittels Korrelationskoeffizient nach Spearman.

4.2.2 Fetale Cortisolspiegel

Der fetale Cortisolspiegel wurde mittels Blutentnahme aus der Nabelschnur nach Abnabelung des Fetus bestimmt. Für die Bestimmung des Cortisolspiegels aus Nabelschnurblut lag kein eigener Referenzbereich des Zentrallabors zum Vergleich vor. Der pädiatrische Grenzwert für das morgendliche Cortisol bei Kindern und Jugendlichen liegt wie beim Erwachsenen zwischen 62 - 194 µg/l (bzw. 6,2 - 19,4 µg/dl). Inwieweit sich dieser auf den Cortisolspiegel im Nabelschnurblut anwenden lässt, ist unklar.

Der Cortisolspiegel des Neugeborenen im Nabelschnurblut lag in dieser Kohorte bei insgesamt 130 Proben bei 36,0 µg/l im Median (IQR ± 19,0 µg/l). Damit ergibt sich in dieser Arbeit ein Referenzwert für das neonatale Cortisol (95% aller Werte) zwischen 20 - 90 µg/l.

Der Vergleich der Gruppen nach BMI sowohl mit GDM als auch ohne diesen ergab keine signifikanten Unterschiede (s. Abbildung 9). Anders als der maternale Cortisolspiegel schien der fetale Cortisolspiegel postnatal weder durch den maternalen BMI noch durch das Vorliegen eines GDM beeinflusst, sondern erscheint von diesen Faktoren postnatal weitgehend unbeeinflusst.

Eine mögliche Korrelation zwischen den maternalen und fetalen Cortisolspiegeln wird im nächsten Abschnitt beleuchtet.

Fetales Cortisol nach BMI und GDM

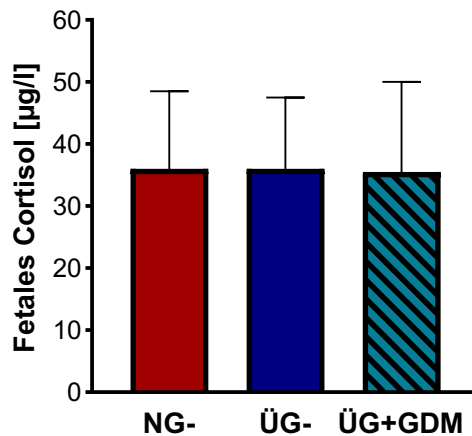


Abbildung 9: Fetale Cortisolspiegel nach maternalem BMI und GDM.

Das fetale Cortisol in µg/l wurde aus dem Nabelschnurblut ermittelt, die Darstellung erfolgt als Median mit IQR (Fehlerbalken); zur Signifikanztestung erfolgte ein Kruskal-Wallis-Test.

NG- Normalgewicht (n = 50), ÜG- Übergewicht (n = 43), ÜG+GDM Übergewicht mit GDM (n = 37).

4.2.3 Fetale und maternale Cortisolspiegel und die fetale und plazentare Gewichtsentwicklung

Es ist bekannt, dass das maternale Cortisol zumindest teilweise auf den Fetus übergeht und die Zielsetzung dieser Arbeit beinhaltet eine nähere Untersuchung eben dieses Übergangs und dem Einfluss einer vermuteten Plazenta-Schranke.

Insgesamt lässt sich im Nabelschnurblut noch 10 bis 15 % des maternalen Cortisols nachweisen^{53,54,55}. Weiterhin ist eine deutliche Erhöhung des Verhältnisses von Cortisol zu Cortisol im Neugeborenen beschrieben, was für eine Inaktivierung des maternalen Cortisols in der Plazenta spricht^{54,55}.

Aus den Pärchen des maternalen und fetalen Cortisolspiegels wurde der prozentuale Anteil berechnet. In dieser Arbeit betrug das maternale Cortisol im Median das 7,5-fache des fetalen Cortisols bzw. die Höhe des fetalen Cortisols betrug im Median 13,3 % des maternalen Cortisolspiegels. Es ergab sich eine mittelgradige und hochsignifikante Korrelation ($r = 0,28$, $p = 0,010$) der Cortisolspiegel untereinander (siehe Abbildung 10).

In anderen Studien wurde bereits der Einfluss des maternalen Cortisols auf das plazentare Gewicht untersucht, wobei sich hierbei im Tierversuch unter Hochdosis-Glucocorticoid-Therapie eine deutliche Reduktion des plazentaren Gewichts zeigte^{159,160}. In der untersuchten, humanen Kohorte zeigte sich keine signifikante Korrelation des maternalen Cortisolspiegels mit dem Plazentagewicht (ohne Abbildung). Auch der fetale Cortisolspiegel korrelierte nicht mit dem Plazentagewicht (ohne Abbildung).

Das Geburtsgewicht zeigte sich weder vom perinatalen, maternalen Cortisolspiegel noch vom Cortisolspiegel des Nabelschnurbluts beeinflusst (ohne Abbildung).

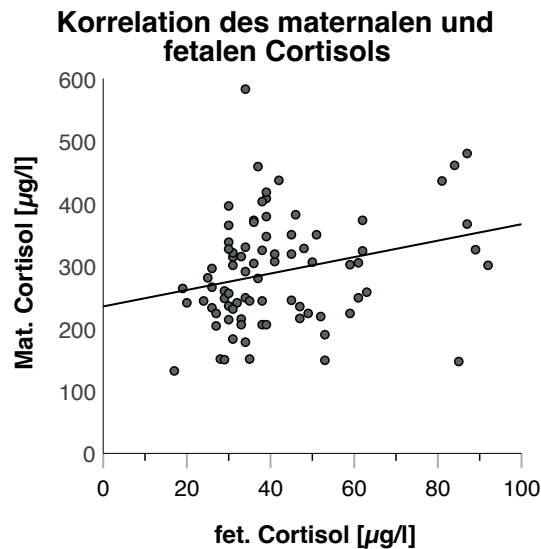


Abbildung 10: Korrelation maternalen und fetaler Cortisolspiegel.

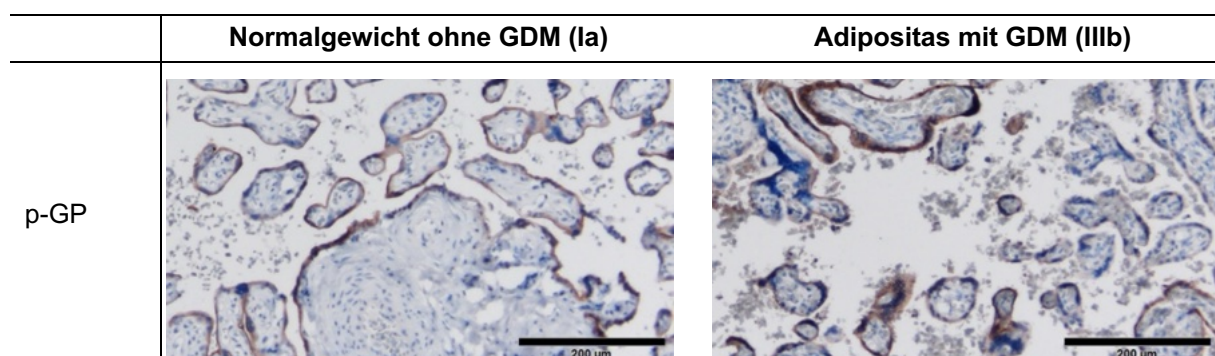
Es zeigt sich eine positive Korrelation ($r = 0.28$; $p = 0,010$) zwischen den Paaren aus maternalem und fetalem Cortisolspiegel. Je ein grauer Punkt stellt eines dieser 90 Paare ($n = 81$) dar. Die Korrelation und Signifikanztestung erfolgte mittels Korrelationskoeffizient nach Spearman.

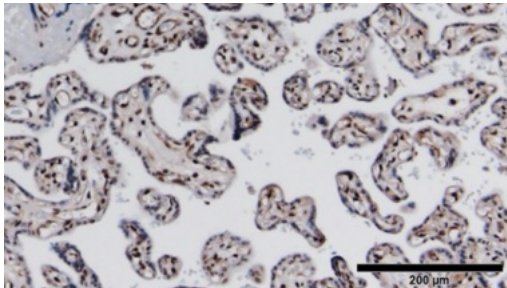
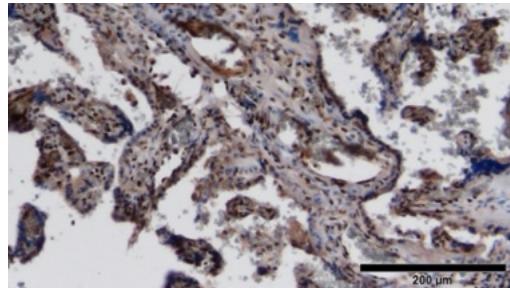
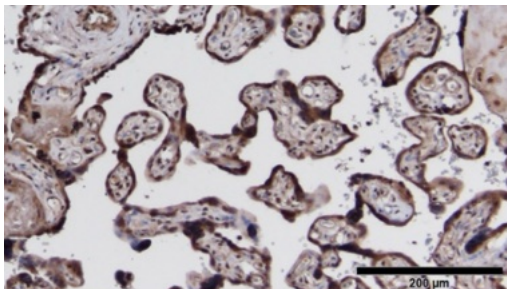
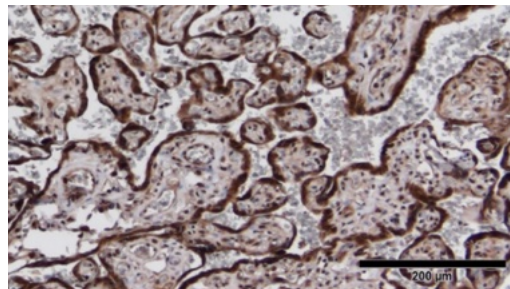
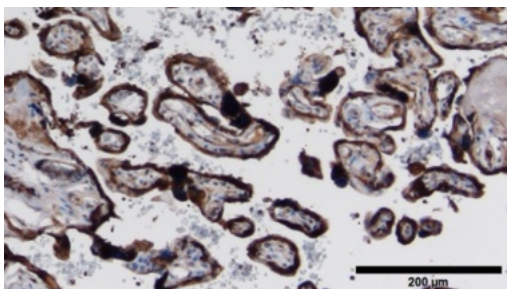
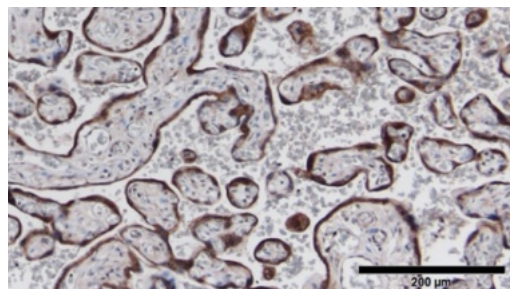
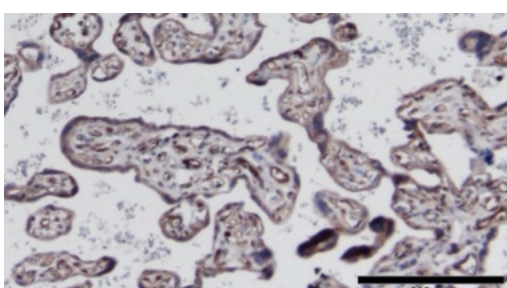
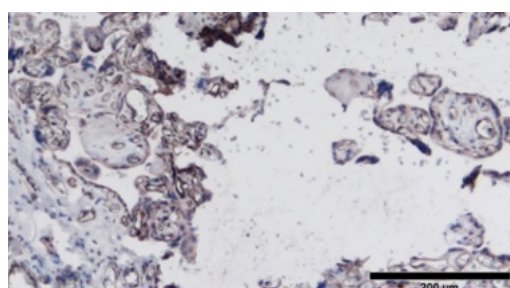
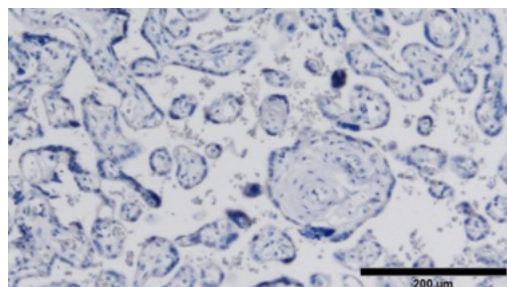
4.3 Immunhistochemie- Vorversuch

Zum Nachweis der untersuchten Proteine aus der GR-Familie, den 11 β -HSD1 und 2 und auch dem p-GP in der humanen Plazenta dieser Studienkohorte wurde ein Vorversuch unternommen. Hierzu wurde aus dem B (mittig)-villösen Bereich der Plazenta von normalgewichtigen Schwangeren ohne GDM (Gruppe I) sowie von übergewichtigen Schwangeren mit GDM (Gruppe III) ein immunhistochemischer, qualitativer Nachweis der zu untersuchenden Proteine angestrebt. Eine quantitative Auswertung erfolgte im Rahmen des Vorversuchs nicht.

Es zeigte sich eine deutliche (Braun-)Färbung insbesondere bei den GR und der beiden 11 β -HSD1 und 2. Die Färbung zeigte sich hauptsächlich im Bereich des Synzytiotrophoblasten, die GR zeigten zusätzlich ein ubiquitäres Vorkommen im Bereich der Chorionzotten. Eine etwas schwächere Färbung zeigte sich beim p-GP im Bereich des Synzytiotrophoblasten. Für die graphischen Darstellungen siehe auch Abbildung 11.

Für alle Proteine wurde entsprechend mit den quantitativen Analysen mittels qRT-PCR und Western Blot fortgefahren.



	Normalgewicht ohne GDM (Ia)	Adipositas mit GDM (IIIb)	
GR (gesamt)			
GRα			
11β- HSD2			
11β- HSD1			
KO		<p>Abbildung 11: Immunhistochemischer Vorversuch in Plazentagewebe</p> <p>Paraffinschnitte der villösen Plazenta, mittig. AK-Färbung (DAB) plus Hämatoxylin.</p> <p>Visuell zeigt sich eine deutliche (Braun-) Färbung der untersuchten Proteine sowohl im villösen Plazentagewebe der normalgewichtigen Schwangeren (Gruppe I) als auch der adipösen GDM Schwangeren (Gruppe III) im Vergleich zur Negativkontrolle (KO). Eine vergleichsweise schwache Färbung zeigt sich beim p-Glykoprotein. Größenbalken 200 µm.</p>	

4.4 qRT-PCR-Fehleranalyse

Zu Beginn der qRT-PCR-Analysen zeigte sich eine deutliche Schwankungsbreite aller untersuchten Referenzgene 18S-rRNA, β -Aktin, TBP, YWHAZ, SDHA, GAPDH, β_2 -MG und HPRT verglichen. Als Maß für eine natürliche, Proben-bedingte C_T -Streuung galt ein maximaler Unterschied von 3 C_T -Werten zwischen den Proben. Alle Referenzgene zeigten eine deutlich erhöhte Streuung der C_T -Werte über die gemessenen Proben, so zeigte sich zwischen den gemessenen Proben bei den untersuchten Referenzgenen eine Streuung von $\Delta C_{T\beta\text{-Aktin}} = 7,4$ und $\Delta C_{T\text{GAPDH}} = 14,8$. Wir entschieden, dass die Methode für diese Kohorte erst etabliert werden musste.

Im Nachfolgenden erfolgte eine Kontrolle der molekularbiologischen Analyse von der RNA-Isolation aus der Plazenta bis zur qRT-PCR.

Um eine falsche Messung der RNA-Konzentration vor Synthese der cDNA auszuschließen, wurde jede RNA-Probe vor der Quantifizierung gut durchmischt und dann aus einer 14-fachen Messung die Mittelwerte der so gemessenen OD260-Werte gebildet und für die cDNA-Synthese verwendet. Außerdem wurde eine geeignete Konzentration der cDNA in der qRT-PCR mittels Konzentrationsreihe bestimmt. Hierbei erwies sich eine Verdünnung von 1:5 am geeignetsten, da hier der Threshold bei der Amplifikation für alle Primer unter einem C_T -Wert von 40 lag und die Schwankungen der C_T -Werte unterschiedlicher Proben derselben Konzentration im Housekeeping-Gen die geringste Streubreite aufwiesen.

Die richtige Konzentration von Forward- und Reverse-Primer wurde für alle noch nicht etablierten Primer in einer Taqman® qRT-PCR ermittelt, indem sowohl Forward- als auch Reverse-Primer in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht wurden. Die Kombination aus Forward- und Reverse-Primer, die die wenigsten Temperaturzyklen für eine exponentielle Amplifikation (geringster C_T -Wert) zeigte, wurde dann weiterverwendet.

Es erfolgte eine Auswertung der Schmelzkurven mittels SYBR® Green qRT-PCR (s. 3.4.5), sodass ausschließlich Primer mit spezifischem Ausschlag für das jeweilige Genfragment zur Durchführung der endgültigen TaqMan® qRT-PCR herangezogen wurden.

Alle verwendeten Primer wurden außerdem im Anschluss an die TaqMan® qRT-PCR anhand der Agarose-Gelelektrophorese (s.3.4.6) auf die Spezifität ihrer Banden hin überprüft.

Wir etablierten die qRT-PCR für die Referenzgene 18S-RNA, TBP und YWHAZ und entschieden uns für eine Auswertung mit TBP und YWHAZ im Mittelwert aufgrund der Analyse der Referenzgene in qBase+.

4.5 Die plazentaren GR

4.5.1 NR3C1-mRNA-Expression in der Plazenta

Um den Einfluss des Cortisols am Wirkort der Plazenta direkt zu ermitteln, wurden die GR untersucht, welche vom Gen NR3C1 kodiert werden. Über die GR ist bekannt, dass sie

ubiquitär und auch in der Plazenta exprimiert werden. Es wurden bereits einige spezielle Isoformen der GR, insbesondere der GR α A (94 kDa), GR β (91 kDa), GR α C (81 kDa), GRP (74 kDa), GRA (65 kDa) sowie der GR α D1-3 (50–55 kDa), in der Plazenta nachgewiesen^{99,100}.

Über die Funktion der GR in der Plazenta ist bisher kaum etwas herausgefunden worden.

In dieser Arbeit wurde zuerst die mRNA-Expression der GR allgemein untersucht. Es wurde Gewebe aus dem mittigen Abschnitt der Plazenta im villösen Bereich gewählt, zur genauen Methodik siehe Kapitel 3.4 und die entsprechenden Unterkapitel.

Im Vergleich der maternalen Gruppen Normalgewicht, Übergewicht sowie Übergewicht mit GDM konnte kein Unterschied in der NR3C1-mRNA-Expression gezeigt werden (s. Abbildung 12).

NR3C1-mRNA-Expression nach BMI und GDM

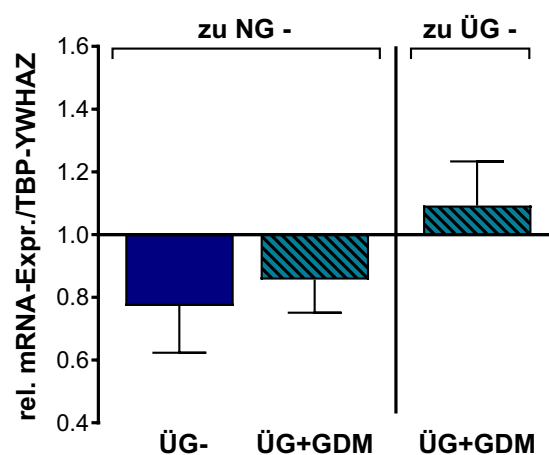


Abbildung 12: Die NR3C1-mRNA-Expression zwischen Normalgewicht, Übergewicht und übergewichtiger Schwangerschaft mit GDM in plazentarem Gewebe.

Als Kontrollgruppe dient die normalgewichtige Schwangerschaft ohne GDM mit n = 20 untersuchten Plazenten. Die Anzahl der untersuchten Plazenten in Gruppe übergewichtige Schwangerschaft ohne GDM (ÜG-, Gruppe II) ist n = 12, die Anzahl der untersuchten Plazenten in Gruppe III Übergewicht mit GDM (ÜG+GDM) ist n = 11.

Die relative mRNA-Expression des NR3C1-Gens wurde mittels qRT-PCR und $\Delta\Delta CT$ -Methode, normiert auf TBP und YWHAZ gemäß qBase+-Empfehlung, bestimmt.

4.5.2 Die GR auf Protein-Ebene in der Plazenta

Um den Einfluss des maternalen BMI und eines GDM auf die humane Plazenta und die GR-Proteinlevel näher zu untersuchen, wurden die Proteine aus dem mittigen, villösen Anteil der Plazenta isoliert und mittels Western Blot näher analysiert.

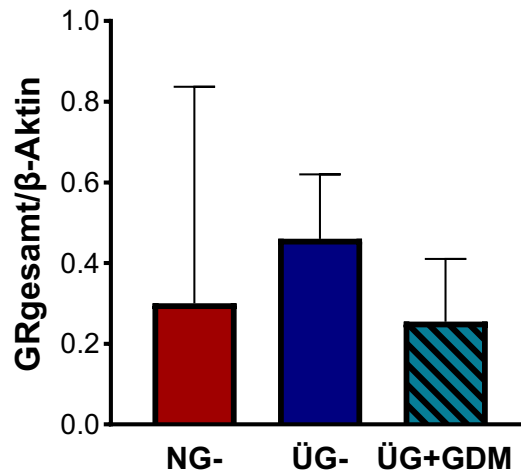
Unter allen bekannten Isoformen wurde sich im Rahmen dieser Studie auf die Darstellung der folgenden Isoformen des GR konzentriert: die klassische Variante des GR α A mit einer Größe von 94 kDa sowie die etwas kleineren Isoformen des GR β und des GR α B, die beide bei ungefähr 91 kDa identifiziert wurden^{93,98}. Um diese voneinander zu differenzieren, wurde sowohl das Proteinlevel des GR allgemein (s. Abbildung 13) betrachtet, der neben den oben genannten Isoformen des GR α auch die β -Isoform darstellen soll. Zusätzlich zu der Analyse

des allgemeinen GR erfolgte zum Nachweis der GR α -Isoformen ein weiterer Western Blot mit einem spezifischen GR α -Antikörper (s. Abbildung 14).

Im Western Blot mit dem allgemeinen GR-Antikörper zeigte sich ein höheres Proteinlevel der 94 kDa-GR α -Isoform (GR α A) und eine schwächer ausgeprägte, kleinere Proteinbande, die sowohl die zuvor bereits in der Plazenta nachgewiesenen Varianten der GR β als auch die 91 kDa- oder die 83 kDa-GR α -Isoform (GR α C) abbilden könnte (s. Abbildung 13).

A

Plazentares GR (gesamt)-Proteinlevel nach BMI und GDM



B

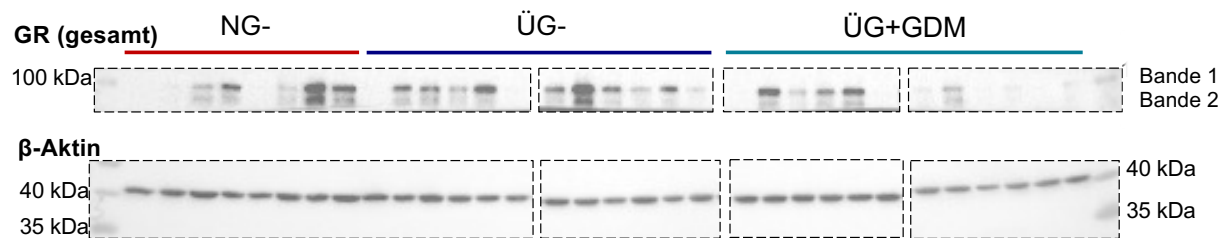


Abbildung 13: Relative Proteinmenge des GR nach BMI und GDM.

Das Proteinlevel des GR (gesamt) im Western Blot nach den Gruppen I NG-, II ÜG- und III ÜG+GDM.

A) Graph der densitometrischen Auswertung. Für die Auswertung wurden beide GR-Banden (s. B) Western Blot) ausgewertet und addiert. Als Referenzprotein diente β -Aktin (untere Banden). Die graphische Darstellung erfolgt anhand des Medians und des IQR (Fehlerbalken) aufgrund der Nicht-Normalverteilung. Es gilt für NG- n = 8, ÜG- n = 11 und ÜG+GDM n = 12; die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test.

B) Western Blot. Oben: GR (gesamt); unten: β -Aktin als Referenzprotein. Darstellung angepasst in der Sortierung nach ausgewerteten Gruppen (durch umgrenzende Kästen dargestellt).

Es zeigte sich bei der gemeinsamen Auswertung beider Isoformen des GR (gesamt) der normgewichtigen Gruppe I bei Übergewicht ohne GDM (Gruppe II) eine scheinbare Hochregulation des GR-Proteinlevels. Diese zeigte sich bei Vorliegen eines GDM (Gruppe II zu III) reduziert. Allerdings ergab sich keine Signifikanz im Kruskal-Wallis Test ($p = 0,127$).

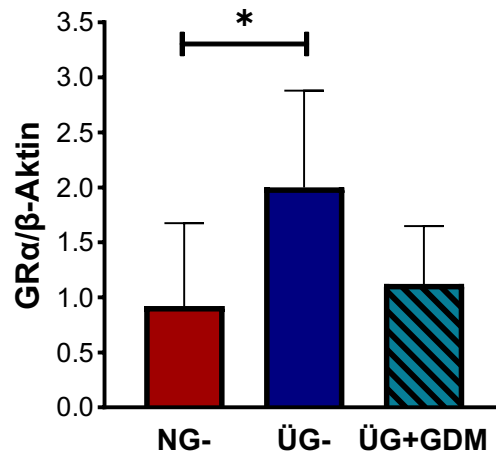
Ein zweiter Western Blot mit einem spezifischen GR α -Antikörper diente zur Analyse der GR α Isoformen (s. Abbildung 14).

Hier zeigte sich ähnlich wie im Western Blot des GR (gesamt) eine Erhöhung des GR α -Proteinlevels (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,030$) zwischen Normalgewicht und der

übergewichtigen Gruppe ohne GDM (Gruppe I zu Gruppe II; Hochberg-Test $p = 0,011$). Dieser Erhöhung in der übergewichtigen Gruppe wirkte jedoch der GDM wieder entgegen, dieser Effekt zeigte sich nach Hochberg-Test jedoch lediglich als Tendenz (Gruppe II zu Gruppe III; $p = 0,068$; s. auch Abbildung 14).

A

Plazentares GR α -Proteinlevel nach BMI und GDM



B

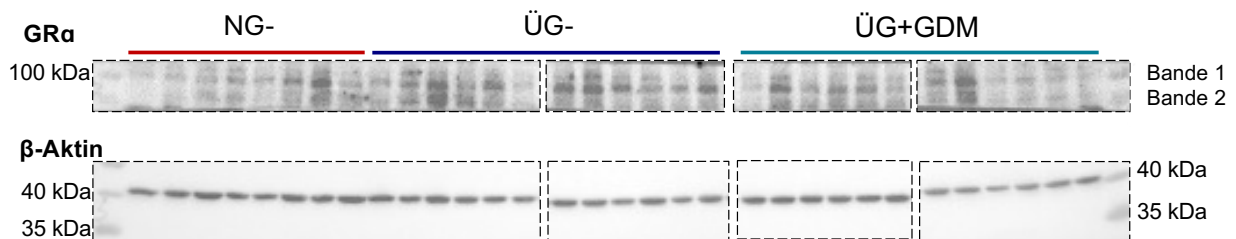


Abbildung 14: Relative Proteinmenge des GR α nach BMI und GDM.

Das Proteinlevel des GR α im Western Blot nach den Gruppen I NG-, II ÜG- und III ÜG+GDM.

A) Graph der densitometrischen Auswertung. Für die Auswertung wurden beide GR-Banden (s. B) Western Blot) ausgewertet und addiert. Als Referenzprotein diente β -Aktin (untere Banden). Die graphische Darstellung erfolgt anhand des Medians und des IQR (Fehlerbalken) aufgrund der Nicht-Normalverteilung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Es gilt für NG- $n = 8$, ÜG- $n = 12$ und ÜG+GDM $n = 12$; * $p > 0,05$.

B) Western Blot. Oben: GR α ; unten: β -Aktin als Referenzprotein. Darstellung angepasst in der Sortierung nach ausgewerteten Gruppen (durch umgrenzende Kästen dargestellt).

4.5.3 Maternales Cortisol und die plazentaren GR

Um einen Zusammenhang der Cortisolspiegel und des GR-Proteinlevels im villösen Anteil der Plazenta zu untersuchen, wurde nach einer Korrelation zwischen den maternalen und fetalen Cortisolspiegeln und dem plazentaren GR-Proteinlevel gesucht (s. Abbildung 15). Hier zeigte sich eine starke Korrelation zwischen den maternalen peripartalen Cortisolspiegeln und dem GR (gesamt) ($r = 0,54$; $p = 0,021$, $n = 18$; s. Abbildung 13 Banden 1 und 2) und hier speziell der 94 kDa Isoform des GR (gesamt) ($r = 0,57$; $p = 0,014$; $n = 18$; s. Abbildung 13 Bande 1). Zwischen den Cortisolspiegeln aus dem Nabelschnurblut und des plazentaren GR-Proteinlevels zeigte sich hingegen kein signifikanter Zusammenhang (ohne Abbildung).

Korrelation zwischen maternalem Cortisol und plazentarem GR-Proteinlevel

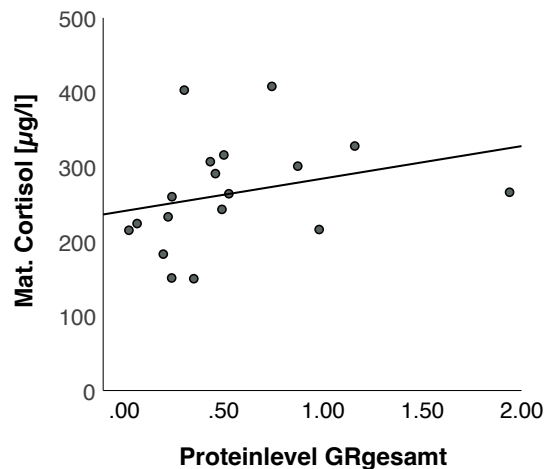


Abbildung 15: Korrelation zwischen dem maternalen Cortisolspiegel und dem plazentaren GR (gesamt)-Proteinlevel.

Es zeigt sich ein positiver Zusammenhang ($r = 0,54$; $p = 0,021$) zwischen dem maternalen Cortisolspiegel in $\mu\text{g/l}$ und dem plazentaren GR-Proteinlevel von $n = 18$ Proben (aus WB-Quantifizierung s. Abbildung 13). Die Korrelation und Signifikanztestung erfolgte mittels Korrelationskoeffizient nach Spearman.

4.6 11 β -HSD, eine Komponente der GC-Plazentaschranke

Die 11 β -HSD Typ 1 und 2 werden in der Plazenta exprimiert und spielen eine wesentliche Rolle in der GC-Plazentaschranke, weshalb sie im folgenden Abschnitt in der Studienkohorte untersucht wurden^{65,70-72}.

4.6.1 Plazentare HSD11B1 mRNA-Genexpression

Die mRNA-Expression des HSD11B1-Gens in der qRT-PCR wurde ebenfalls in dem villösen Anteil der Plazenta betrachtet, um die Veränderungen in Bezug zur GC-Plazenta-Schranke

HSD11B1-Genexpression nach BMI und GDM

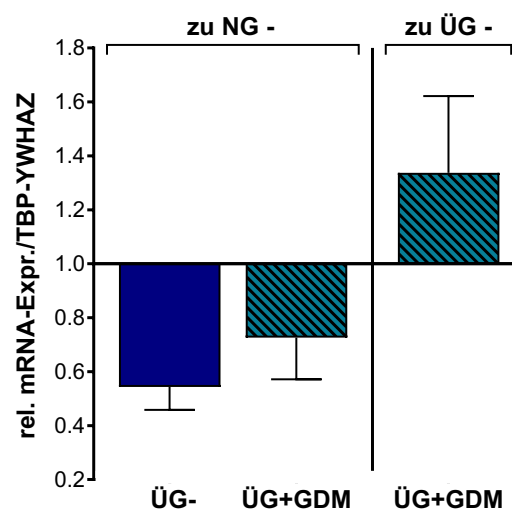


Abbildung 16: HSD11B1-Genexpression nach BMI und GDM

Als Kontrollgruppe NG- dient die normalgewichtige Schwangerschaft ohne GDM mit $n = 20$ untersuchten Plazenten. Die Anzahl der untersuchten Plazenten in Gruppe übergewichtige Schwangerschaft ohne GDM (ÜG-, Gruppe II) ist $n = 12$, die Anzahl der untersuchten Plazenten in Gruppe III Übergewicht mit GDM (ÜG+GDM) ist $n = 11$.

Die relative mRNA-Expression des HSD11B1-Gens wurde mittels qRT-PCR und $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, normiert auf TBP und YWHAZ gemäß qBase+-Empfehlung, bestimmt. Es gilt $* p < 0,05$.

genauer zu untersuchen. In anderen Studien konnte eine Aktivität der 11 β -HSD vor allem in der Dezidua nachgewiesen werden, während sich im villösen Teil der Plazenta kaum Aktivität zeigte^{66,68}.

Es zeigt sich in dem untersuchten Gewebe kein signifikanter Unterschied, weder bei Übergewicht noch bei Vorliegen eines GDM (I zu II $p = 0,153$; I zu III $p = 0,425$; II zu III $p = 0,301$), siehe Abbildung 16.

Eine Darstellung des plazentaren 11 β -HSD1-Proteinlevel gelang im WB nicht, da uns kein spezifischer Antikörper vorlag. Da sich in der Literatur und vorhergehenden Studien das hauptsächliche plazentare Vorkommen der 11 β -HSD1 ohnehin vor allem in der Dezidua zeigte, wurde auf weitere Versuche verzichtet.

4.6.2 HSD11B2-mRNA-Expression in der Plazenta

In der zugrunde liegenden Patientenkohorte konnte ein signifikanter Einfluss auf die HSD11B2-Genexpression in dem villösen Anteil der Plazenta im Gruppenvergleich nachgewiesen werden (Kruskal-Wallistest $p = 0,043$). So zeigte sich eine deutlich höhere HSD11B2-Genexpression bei Vorliegen eines GDM in der übergewichtigen Gruppe III (ÜG+GDM, $n = 10$) im Vergleich zur übergewichtigen Schwangerschaft ohne GDM (Gruppe II, ÜG-, $n = 13$; Gruppe II zu III $p = 0,037$) (siehe Abbildung 17).

HSD11B2-mRNA-Expression nach BMI und GDM

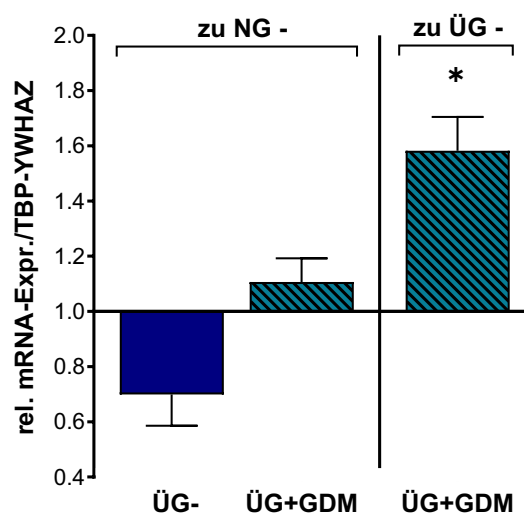


Abbildung 17: HSD11B2-mRNA-Expression nach BMI und GDM

Die HSD11B2-Genexpression im Vergleich der Gruppen II ÜG- und III ÜG+GDM. Als Kontrollgruppe NG- dient die normalgewichtige Schwangerschaft ohne GDM mit $n = 18$ untersuchten Plazenten. Die Anzahl der untersuchten Plazenten in Gruppe übergewichtige Schwangerschaft ohne GDM (ÜG-, Gruppe II) ist $n = 13$, die Anzahl der untersuchten Plazenten in Gruppe III Übergewicht mit GDM (ÜG+GDM) ist $n = 10$.

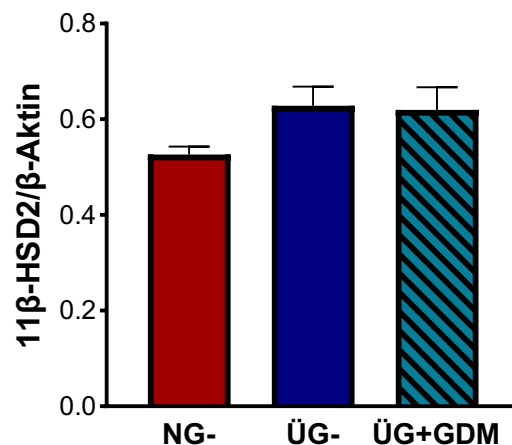
Die relative mRNA-Expression des HSD11B2-Gens wurde mittels qRT-PCR und $\Delta\Delta CT$ -Methode, normiert auf TBP und YWHAZ gemäß qBase+-Empfehlung, bestimmt. Es gilt * $p < 0,05$.

4.6.1 11 β -HSD2-Proteinlevel in der Plazenta

Zusätzlich zur Veränderung der 11 β -HSD auf mRNA-Expressionsebene wurde auch das plazentare Proteinlevel der 11 β -HSD2 mittels Western Blot untersucht. Hier zeigte sich im ANOVA kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p = 0,218$), siehe Abbildung 18.

A

11 β -HSD2-Proteinlevel nach BMI und GDM



B

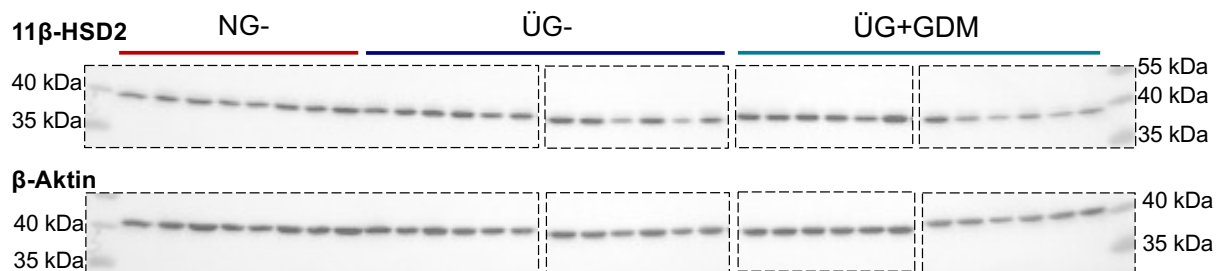


Abbildung 18: plazentare 11 β -HSD2-Proteinlevel nach BMI und GDM.

Das plazentare Proteinlevel der 11 β -HSD2 im Western Blot nach den Gruppen I NG-, II ÜG- und III ÜG+GDM. Als Referenzprotein diente β -Aktin (untere Banden). Es gilt für NG- $n = 8$, ÜG- $n = 12$ und ÜG+GDM $n = 12$.

A) Graph der densitometrischen Auswertung: Die graphische Darstellung erfolgt anhand des Mittelwerts und des SEM (Fehlerbalken) aufgrund der Normalverteilung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA.

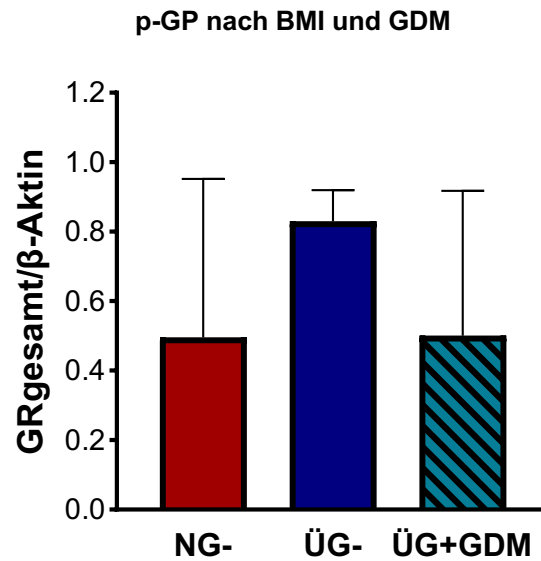
B) Western Blot. Oben: 11 β -HSD2; unten: β -Aktin als Referenzprotein. Darstellung angepasst in der Sortierung nach ausgewerteten Gruppen (durch umgrenzende Kästen dargestellt).

4.7 p-GP

Eine qRT-PCR des p-GP kodierenden ABCB1-Gens verlief leider ergebnislos. Trotz mehrmaligen Versuchen und unterschiedlichen Primern ließ sich kein oder nur ein sehr hoher C_T -Wert in den meisten Proben dieser Studienkohorte messen.

Da immunhistochemisch jedoch ein Nachweis des p-GP gelang (siehe Kap. 4.3, Abbildung 11), erfolgte die Auswertung des Proteinlevels mittels Western Blot. Hier zeigte sich eine über alle Gruppen eher schwankendes Proteinlevel des p-GP. Eine signifikante Veränderung des p-GP innerhalb der Gruppen ließ sich nicht nachweisen ($p = 0,735$), siehe Abbildung 19.

A



B

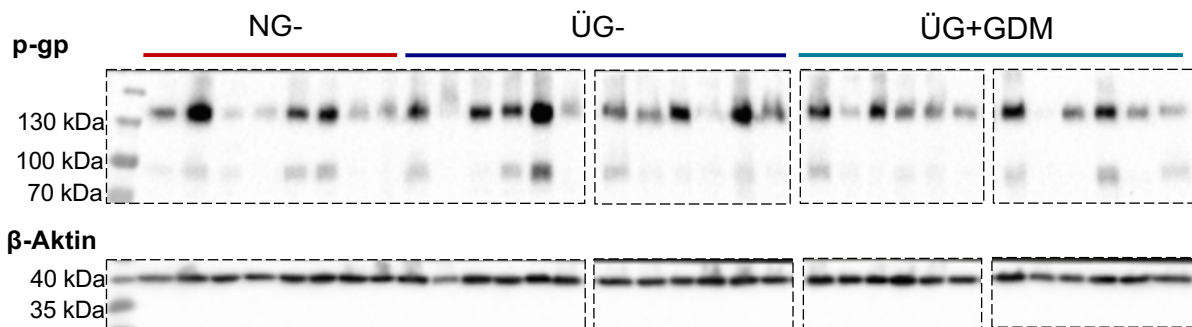


Abbildung 19: p-GP-Proteinlevel nach BMI und GDM in der Plazenta

Das Proteinlevel des p-GP im Western Blot nach den Gruppen I NG-, II ÜG- und III ÜG+GDM. Es gilt für NG- n = 8, ÜG- n = 12 und ÜG+GDM n = 12.

A) Graph der densitometrischen Auswertung: Für die Auswertung wurden beide pGP-Banden (s. B) Western Blot) ausgewertet und addiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Als Referenzprotein diente β-Aktin (untere Banden). Die graphische Darstellung erfolgt anhand des Medians und des IQR (Fehlerbalken) aufgrund der Nicht-Normalverteilung.

B) Western Blot. Oben p-GP; unten: β-Aktin als Referenzprotein. Darstellung angepasst in der Sortierung nach ausgewerteten Gruppen (durch umgrenzende Kästen dargestellt).

4.7.1 p-GP und der fetale Kopfumfang

Es zeigte sich eine signifikante, negative Korrelation zwischen dem kindlichen Kopfumfang und der plazentaren Proteinlevel des p-GP im Western Blot ($r = -0,398$; $p = 0,024$; $n = 32$), diese ist in Abbildung 20 dargestellt.

Korrelation des neonatalen Kopfumfanges und des plazentaren p-GP-Proteinlevels

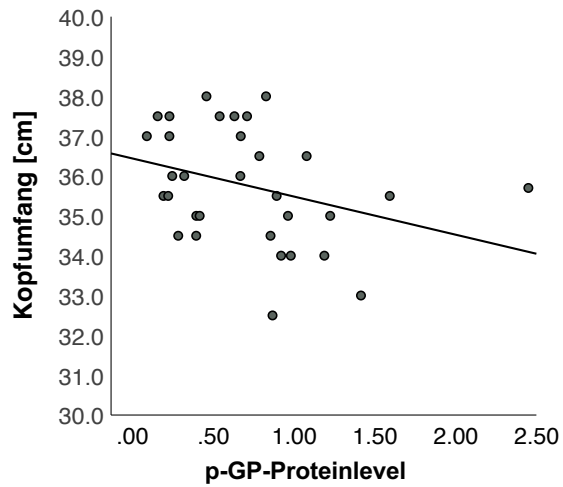


Abbildung 20: Korrelation des p-GP mit dem neonatalen Kopfumfang

Es zeigt sich ein positiver Zusammenhang ($r = 0,54$; $p = 0,021$) zwischen dem p-GP-Proteinlevel (aus WB-Quantifizierung, s. Abbildung 19) in der peripartalen Plazenta und dem neonatalen Kopfumfang in cm. Je ein Punkt im Diagramm bildet eine der $n = 32$ Proben ab. Die Korrelation und Signifikanztestung erfolgte mittels Korrelationskoeffizient nach Spearman.

5. Diskussion

5.1 Interpretation der Ergebnisse aus der Studienkohorte

In der Studie zeigte sich ein mittleres Alter von 34 Jahren und einer mittleren Gestationsdauer von 39,1 Schwangerschaftswochen. Dies entspricht einem etwas höheren maternalem Alter als in der Durchschnittsbevölkerung in Deutschland, hier zeigte sich 2022 ein maternales Alter im Schnitt von 31,7 Jahren ¹⁶¹. Ein erhöhtes maternales Alter gilt insbesondere als Risikofaktor für einen GDM, allerdings zeigte sich auch bei den Schwangeren ohne GDM ein höheres maternales Alter ¹⁴. Dies könnte auch durch die Struktur einer Universitätsklinik oder möglicherweise durch den Geburtsmodus bedingt sein. Die mittlere Gestationsdauer liegt vor dem ET, diese Abweichung liegt vermutlich an der besseren Planbarkeit aufgrund des Geburtsmodus.

Es bestand eine erhöhte Gravidität und Parität bei Adipositas im Vergleich zur normalgewichtigen Frau, sodass Multiparität und Multigravität mit erhöhtem Risiko für Adipositas einhergehen. Der Schluss liegt nahe, dass hier eine Kausalität besteht und vorbestehende Schwangerschaften ein Risikofaktor für eine zumindest zeitweise bleibende Gewichtszunahme auch nach der Schwangerschaft bedeuten.

Bei Betrachtung der übergewichtigen Schwangeren mit GDM (ÜG+GDM, Gruppe III) fällt auf, dass diese mit 32,0 kg/m² einen signifikant höheren BMI als die übergewichtigen Schwangeren ohne GDM (ÜG-, Gruppe II) mit einem mittleren BMI von 28,6 kg/m² hatten. So kann möglicherweise ein Effekt in der Gruppe III (ÜG+GDM) nicht nur durch den GDM, sondern auch durch den höheren BMI bedingt sein. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde bei der Auswahl der Proteinproben im Western Blot auf eine gleichmäßige Verteilung des BMI in beiden übergewichtigen Gruppen geachtet.

In bereits publizierten Studien zeigten sich uneinheitliche Ergebnisse bezüglich des Plazentagewichts. In einer US-amerikanischen Studie von Ouyang et al. mit einer Patientenkohorte der 1970er Jahre zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl nach maternalem Gewicht als auch bei Vorliegen eines GDM (jedoch nach Kriterien eines 100 g oGTT) ²⁰. Tanaka et al. und auch Martino et al. konnten hingegen kein erhöhtes Plazentagewicht in Schwangerschaft mit GDM, dafür aber bei Vorliegen einer maternalen Adipositas nachweisen ^{162,163}. Das Verhältnis zwischen fetalem Geburtsgewicht und Plazentagewicht als Maß für die plazentare Effektivität zeigte sich vor allem in diabetischer Schwangerschaft (bei Tanaka et al.) erniedrigt ^{162,164}.

In dieser untersuchten Studienpopulation zeigte sich eine leichte Erhöhung des mittleren Plazentagewichts nach Übergewicht und zusätzlich bei Vorliegen eines GDM ohne statistische Signifikanz.

Alle Neonaten zeigten postpartal einen sehr guten 10' APGAR sowie einen guten Nabelschnur-pH, der sich weder nach Vorliegen eines GDM noch nach dem maternalen präpartalen BMI unterschied. Hier ist allerdings der Geburtsmodus Sectio caesarea als ein entscheidender Faktor zu bedenken, so wird insbesondere bei LGA-Feten diabetischer Mütter explizit zur Sectio caesarea geraten, um Geburtskomplikationen wie Schulterdystokie, Asphyxie und Hypoxie zu vermeiden ¹³.

Es bestand in dieser Studienkohorte ein signifikanter Unterschied in den meisten fetometrischen Maßen bei Geburt. Vor allem Kopfumfang und Geburtsgewicht und deren Einordnung nach Perzentilen unterschieden sich je nach Vorliegen von Übergewicht sowie eines GDM. Dies deckt sich mit den Ergebnissen zahlreicher Studien, dass mit steigendem maternalem BMI bzw. Vorliegen eines GDM vor allem die fetalen Parameter Geburtsgewicht, Kopfumfang und damit einhergehend auch die Wahrscheinlichkeit für eine Schulterdystokie und weiteren Geburtskomplikationen steigt ^{12,16,156}.

Das fetale Schätzwert im Ultraschall beeinflusst die Wahl des Geburtsmodus. Ab dem Vorliegen eines Geburtsgewichts von 4500 g bzw. eines LGA-Fetus empfiehlt die aktuelle GDM-Leitlinie keinen vaginalen Geburtsmodus bei diabetischer Schwangerschaft mehr, in der Leitlinie zur Sectio caesarea besteht bei einem übermäßigen fetalen Gewicht aktuell nur individualisiert die Indikation zur Sectio caesarea, dies gilt auch für die adipöse Schwangerschaft aufgrund des erhöhten perioperativen Risikos ^{4,13,165}.

Ein erhöhtes Geburtsgewicht zeigte sich in übergewichtiger diabetischer Schwangerschaft (ÜG+GDM, Gruppe III) sowohl gegenüber dem Normalgewicht (NG-, Gruppe I) als auch gegenüber dem Übergewicht (ÜG-, Gruppe II) erhöht. Auch ein vLGA trat signifikant häufiger in übergewichtiger diabetischer Schwangerschaft auf. Der Kopfumfang zeigte sich in übergewichtiger diabetischer Schwangerschaft signifikant erhöht. Klinisch besteht hierin auch langfristig ein erhöhtes Risiko für Mutter und Kind, so ist bei einer LGA-Geburt nicht nur das unmittelbare Risiko für Geburtskomplikationen erhöht, sondern damit einhergehend auch das Risiko für Komplikationen in folgenden Schwangerschaften (bspw. das Risiko für eine Re-Sectio bei erhöhter Sectio-Wahrscheinlichkeit). Für das Kind steigt das metabolische Risiko sowie das Risiko für eine Adipositas im Kindes- und Jugendalter ^{18,20}.

Die fetale Glukose zeigte sich unmittelbar postpartal nicht signifikant verändert. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da die maternale Glukose über die Plazenta großteils in das Nabelschnurblut übergeht, während ein Rückgang der kindlichen Glukose und die gefürchtete neonatale Hypoglykämie nach diabetischer Schwangerschaft erst wenige Stunden postpartal zu erwarten ist ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Es könnte allerdings aufgrund der Abnahme im Lithium-Heparin-Probenentnahmegefäß bereits zu einer Metabolisierung der Blutglukose in dieser Studienkohorte gekommen sein.

Das fetale Insulin zeigte sich signifikant erhöht bei gleichzeitigem Vorliegen eines Übergewichts sowie GDM, was für eine fetale Gegenregulation für einen über die Dauer der Schwangerschaft eher zu hoch liegenden fetalen Blutzucker spricht.

5.2 Die peripartalen Cortisolspiegel der Schwangeren und ihres Fetus unter GDM und Übergewicht

Bekannt ist eine physiologische Erhöhung der maternalen Cortisolspiegel bis zu einem dreifachen Anstieg im Schwangerschaftsverlauf ^{31,34,35}.

Es zeigte sich ein maternaler, peripartaler Cortisolspiegel in der untersuchten Kohorte von 149 bis 478 µg/l (95 % Referenzbereich). Als Referenzwert der klinischen Chemie der Uniklinik Köln gilt bei einem nicht schwangeren Erwachsenen bei morgendlicher Blutentnahme ein Referenzbereich zwischen 62 bis 194 µg/l. Damit unterscheidet sich diese Kohorte deutlich von dem angegebenen Referenzbereich beim Nicht-Schwangeren Erwachsenen.

Bekannt ist bei adipösen Schwangeren ein signifikant geringerer Anstieg der maternalen Cortisolspiegel und der allgemeinen HPA-Aktivität im Verlauf der Schwangerschaft im Vergleich zur normalgewichtigen Schwangerschaft ⁵¹.

Die maternalen Cortisolspiegel zeigten sich in dieser Studienkohorte mit Zunahme des maternalen BMI signifikant reduziert (s. Abbildung 8), während sich ein solcher Zusammenhang im Nabelschnurblut nicht nachweisen ließ. Diese Beobachtung deckt sich mit bereits publizierten Daten ¹³⁴.

In dieser Studienpopulation zeigte sich bei gleichzeitigem Vorliegen eines GDMs und Übergewicht (Gruppe III, ÜG+GDM) eine nicht signifikante Verringerung der maternalen Cortisolspiegel im Vergleich zur normalgewichtigen Gruppe I (NG-), die sich vermutlich auf den höheren mittleren BMI der Schwangeren mit GDM zurückführen lässt.

Die Cortisolspiegel aus Nabelschnurblut zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied weder bei Vorliegen von Übergewicht noch einer Kombination aus Übergewicht und diabetischer Schwangerschaft. Zu diesem Ergebnis kommt auch die PREOBE-Studie ¹³⁹.

Insgesamt fehlt hier jedoch eine gute Studienlage in der Literatur. Eine kleine chinesische Studie, die 22 nicht-diabetische mit 23 GDM-Schwangeren verglich, deren GDM rein diätetisch eingestellt wurde, konnte einen erhöhten maternalen Cortisolspiegel in diabetischer Schwangerschaft zeigen. Die weiterhin untersuchten Parameter des fetalen Geburtsgewichts und des venösen Nabelschnur-Cortisols zeigten keinen signifikanten Unterschied in diabetischer Schwangerschaft ¹³⁷. Einschränkend ist bei dieser Studie von Ma et al. zu erwähnen, dass die Schwangeren zu Beginn der Schwangerschaft einen ähnlichen mittleren BMI hatten, die Gewichtszunahme in der GDM-Gruppe jedoch signifikant höher war. Die Höhe der fetalen Cortisolspiegel korrelierten negativ mit dem Geburtsgewicht ¹³⁷. Grigorakis et al. konnten zum Zeitpunkt eines 100 g oGTT hingegen keinen Unterschied im morgendlichen

nüchternen Cortisolspiegel zwischen 15 GDM- und 26 nicht-diabetischen Schwangeren feststellen, hier zeigte sich zudem einschränkend ein übergewichtiger mittlerer BMI der GDM-Schwangeren vs. einem normalgewichtigen BMI der Schwangeren ohne GDM, wenngleich sich der BMI nicht signifikant unterschied. Zudem ist der 100 g oGTT zur Diagnose eines GDMs nur bedingt mit dem 75 g oGTT-Test anhand der IADPSG-Kriterien vergleichbar ¹³⁸.

Cohen et al. bestimmten in einer sehr großen Studienkohorte mit 900 Patientinnen den Unterschied im Nabelschnur-Cortisol von 48 GDM-Plazenten, hier lag ein 50 g bzw. 100 g oGTT zur Bestätigung der GDM-Diagnose zugrunde. Eine weitere Follow-Up-Studienkohorte aus dieser Publikation untersuchte bei 29 GDM-Schwangeren mit 75 g oGTT-Diagnose das Cortisol der 5-jährigen Kinder im Haar. In beiden Studienkohorten ließ sich kein Unterschied der Kinder aus diabetischer vs. nicht-diabetischer Schwangerschaft nachweisen. Cohen et al. schließen hieraus, dass eine GDM-Schwangerschaft die kindliche HPA-Achse nicht beeinflusst ¹⁶⁹.

In allen oben genannten Studien bestand ein statistisch nicht signifikanter, jedoch möglicherweise klinisch relevanter Unterschied im BMI der Schwangeren mit und ohne GDM, so zeigten alle Studien einen höheren BMI in der diabetischen Schwangerschaft. Bei einigen Studien besteht zudem nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen den GDM-Diagnosen wie in Deutschland üblich aus 50 g bzw. 75 g oGTT wie in dieser Studienkohorte mit dem teilweise in der Literatur verwendeten 100 g oGTT. Weiterhin zeigten alle Studienkohorten eine nur geringe Fallzahl, sodass eine statistische Effektstärke möglicherweise aufgrund einer zu geringen Fallzahl vermutlich nicht erreicht wurde.

In der hier untersuchten Kohorte zeigte sich eine positive Korrelation zwischen den maternalen und fetalen Cortisolspiegeln, entsprechend kann von einer erhöhten fetalen Cortisol-Exposition ausgegangen werden in Abhängigkeit der Höhe des maternalen Cortisolspiegels. Das Verhältnis zwischen den maternalen und fetalen Cortisolspiegeln lag bei 13,5 %, das maternale Cortisol lag also um den Faktor 7,5 höher, sodass von einem unvollständigen Übertritt des maternalen Cortisols auf das Neugeborene ausgegangen werden kann.

In anderen Studien zeigte sich dieses Verhältnis im Bereich von 1:6 bis 1:10, hier zeigten sich vor allem deutliche Erhöhungen des fetalen Verhältnisses von Cortison zu Cortisol, was für eine plazentare Inaktivierung des maternalen Cortisols spricht ^{53,54,55,85}.

Weder die maternalen noch die Nabelschnur-Cortisolspiegel zeigten peripartal eine Korrelation mit dem Geburtsgewicht und es zeigte sich keine Korrelation des Plazentagewichts mit den maternalen Cortisolspiegeln. Andere Beobachtungen aus Tierversuchs-Studien zeigten hingegen einen negativen Zusammenhang zwischen dem Plazentagewicht und dem Cortisol (bzw. Corticosteron) des Muttertiers ^{159,160}.

Bekannt ist weiterhin der Einfluss der GC auf die Entwicklung eines FGR, so zeigte sich in zahlreichen Studien eine übermäßige, teilweise iatrogene Cortisol-Exposition häufiger mit einem SGA bzw. FGR assoziiert ^{76,86,89}. Andere Studien fanden im zweiten bzw. frühen dritten Trimenon einen positiven Zusammenhang der maternalen Cortisolspiegel mit den fetobiometrischen Maßen, vor allem des Kopfumfanges und des Abdominal-Umfanges, die auch in Deutschland maßgeblich zur Therapieeinstellung der diabetischen Schwangerschaft angewandt werden ^{13,170,171}.

5.3 Die GC-Plazenta-Schranke unter maternalem Übergewicht und GDM

Ziel dieser Arbeit ist es, Änderungen in der Funktion der GC-Plazenta-Schranke in übergewichtiger sowie diabetischer Schwangerschaft zu detektieren. Dafür sollen die Schrankenproteine 11 β -HSD1 und 11 β -HSD2 näher untersucht werden, die für die Aktivierung bzw. Inaktivierung der GC hauptsächlich verantwortlich sind, sowie das Transportprotein p-GP, welches Cortisol aktiv auf die maternale Seite der GC-Plazenta-Schranke rücktransportiert ^{61,63,66,68,72}.

5.3.1 11 β -HSD2

In der Plazenta und den fetalen Geweben wirkt vor allem die 11 β -HSD2 inhibitorisch auf die GC, sodass vor allem der maternofetale Cortisol-Übertritt zugunsten des inaktiven Cortisons eingeschränkt wird ^{66,72,84,85}.

Eine höhere 11 β -HSD2-Aktivität bietet einen höheren Schutz des Fetus vor den maternalen Cortisolspiegeln, weiterhin moduliert 11 β -HSD2 die Wirkung der GC an den GR durch die niedrigere Substrat-Konzentration ^{65,66,72,79}. Eine höhere plazentare 11 β -HSD2-Aktivität und -mRNA-Expression ist nach der aktuellen Studienlage unter anderem assoziiert mit einem höheren Geburtsgewicht ^{66,76,172}.

In der zugrunde liegenden Patientenkohorte konnte kein Einfluss des maternalen Übergewichts auf die plazentare HSD11B2-Genexpression nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stützen die Erkenntnisse aus bereits durchgeführten Studien, die ebenfalls auf mRNA-Ebene keine Unterschiede in der HSD11B2-Expression je nach dem präpartalen BMI finden konnten ^{135,173}. Im Gegensatz hierzu erwähnt Johns unpublizierte Daten, die einen positiven Zusammenhang zwischen maternalem BMI und HSD11B2-mRNA-Expression herstellen sollen ¹⁰². Während der maternale BMI keinen nachweislichen Einfluss auf die HSD11B2-Genexpression zeigte, bestand in dieser Studienpopulation ein signifikanter Unterschied bei Vorliegen von GDM bei Übergewicht (ÜG+GDM, Gruppe III) im Vergleich zur übergewichtigen Schwangerschaft ohne GDM (ÜG-, Gruppe II; siehe Abbildung 17). So zeigte sich eine deutlich höhere HSD11B2-Genexpression in der übergewichtigen, diabetischen Schwangerschaft (Gruppe III) im Vergleich zur übergewichtigen Schwangerschaft ohne GDM

(Gruppe II). Im Vergleich zur normalgewichtigen Gruppe ohne GDM (Gruppe I) bestand kein signifikanter Unterschied.

Ma et al. fanden in einer kleinen chinesischen Studie ebenfalls eine erhöhte HSD11B2-mRNA-Expression bei GDM, die sich allerdings auf Proteinebene nicht abbilden ließ. Einschränkend wurde hier allerdings nicht nach dem BMI differenziert, beide Gruppen zeigten sich zu Beginn der Schwangerschaft im Mittel mit einem normalgewichtigen BMI, während die Gewichtszunahme in der diabetischen Schwangerschaft signifikant höher war ¹³⁷.

Zusätzlich zur Veränderung der 11 β -HSD2 auf Genexpressions-Ebene wurde auch das Proteinlevel der 11 β -HSD2 mittels Western Blot in dieser Studie untersucht. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, weder nach dem maternalen BMI noch bei Vorliegen eines GDM.

In Tierversuchsstudien zeigte sich bei gemästeten Schafen jedoch ein höheres plazentares 11 β -HSD2-Proteinlevel, wie auch erhöhte fetale und maternale Cortisolspiegel ¹⁷⁴.

Auch Mina et al. fanden einen ähnlichen Effekt auf mRNA-Ebene, den sie als U-förmige Korrelation der HSD11B2-mRNA-Expression und Cortisolspiegel, also eine Erniedrigung der 11 β -HSD2 in hohen und niedrigen Cortisolspiegeln, beschreiben ¹³⁵. Die höhere HSD11B2-mRNA-Expression, die hier bei Vorliegen von GDM in übergewichtiger Schwangerschaft gefunden wurden, spricht für einen besonderen Glucocorticoid-Schutz des Fetus, der sich auch in den Nabelschnur-Cortisolspiegeln zeigt. Dieser Effekt ließ sich allerdings auf Protein-Ebene nicht abbilden. Inwiefern unter GDM im Laufe der Schwangerschaft eine erhöhte fetale GC-Exposition besteht, die möglicherweise durch die höhere 11 β -HSD2-Menge abgemildert wird, ist mit unserem Versuchsaufbau nicht zu erfassen und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

5.3.2 11 β -HSD1

Die hauptsächliche Aktivität der 11 β -HSD1 liegt laut einigen Studien hauptsächlich in der maternalen Dezidua, wie auch in fetalen bzw. neonatalen Geweben außerhalb der Plazenta ^{66,68,174}. In dieser Arbeit wurde der villöse Anteil der Plazenta untersucht, hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied, weder nach dem präpartalen BMI noch nach dem Vorliegen eines GDM in übergewichtiger Schwangerschaft. Aufgrund der nur gering zu erwartenden Proteinmenge in der villösen Plazenta gegenüber dem Ort des hauptsächlichen Vorkommens in der Dezidua wurden nach frustanem Western Blot keine weiteren Experimente durchgeführt.

In einer einzelnen anderen Studie zeigte sich bei Vorliegen eines GDM die HSD11B1-mRNA-Expression und das 11 β -HSD1-Proteinlevel im villösen Anteil der Plazenta reduziert. In dieser Studie bestand allerdings auch ein signifikanter Unterschied mit höheren maternalen Cortisolspiegeln und einer signifikant höheren Gewichtszunahme in der GDM-Gruppe ¹³⁷.

Für die weitere Forschung stellt sich vor allem auch 11 β -HSD1 in neonatalen Geweben interessant dar, so konnte in Tierversuchsstudien ein erhöhtes Proteinlevel der 11 β -HSD1 in der neonatalen Leber gefunden werden ¹⁷⁴. Ein solcher Effekt könnte die Schutzfunktion vor dem aktiven GC-Übertritt wieder aufheben ¹⁷⁴.

5.3.3 p-GP

Das p-GP ist bereits in der Frühschwangerschaft im Synzytiotrophoblasten nachweisbar und übernimmt hier einen aktiven Transport des Cortisols von der fetalen Seite zurück in das maternale Kompartiment ^{118,120,124}.

Leider verlief die Bestimmung der ABCB1-mRNA-Expression in dieser Kohorte ergebnislos, dies kann an einer zu geringen Expression des ABCB1-Gens im untersuchten Gewebe oder an anderen methodisch bedingten Schwierigkeiten gelegen haben. Es ist weiterhin bekannt, dass zum Schwangerschaftsende eine reduzierte p-GP Aktivität in der Plazenta besteht ^{120,123}. Es zeigte sich ein etwas höheres plazentares p-GP-Proteinlevel in der übergewichtigen, nicht-diabetischen Schwangerschaft (Gruppe II) im Vergleich zur normalgewichtigen (Gruppe I), wie auch zur übergewichtigen, diabetischen (Gruppe III) Schwangerschaft. Dieser Unterschied zeigte sich jedoch statistisch nicht signifikant. In anderen Studien zeigte sich bei Vorliegen eines erhöhten maternalen Gewichts eine reduzierte ABCB1-mRNA-Expression sowie ein reduziertes p-GP-Proteinlevel in der Plazenta ^{135,136}.

Eine andere Studie konnte bei Vorliegen eines insulinpflichtigen GDMs zwar eine höhere ABCB1-mRNA-Expression zeigen, jedoch keine Veränderung auf Proteinebene abbilden. In dieser Studie bestand ein signifikanter höherer BMI in der GDM-Untersuchungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ohne GDM ¹⁷⁵.

Es zeigte sich in dieser Kohorte eine negative Korrelation des plazentaren p-GP-Proteinlevel und des neonatalen Kopfumfanges (s. Abbildung 20), welche laut der Literaturrecherche zu dieser Arbeit bisher noch nicht berichtet wurde. Der Zusammenhang mit dem Cortisol-Stoffwechsel bzw. den Untersuchungsgruppen erscheint jedoch nicht naheliegend, da alle anderen untersuchten Parameter keinen signifikanten Unterschied zeigten. Da das p-GP ein Transporter mit vielfältigen Substraten ist, sollte dieser Zusammenhang Gegenstand weiterer Untersuchungen auch in Bezug auf andere p-GP-Substrate sein.

5.4 Die GR unter GDM und Übergewicht

Ziel dieser Arbeit ist unter anderem die Beleuchtung der plazentaren NR3C1-mRNA-Expression und GR-Proteinlevel bei Vorliegen von maternalem Übergewicht und GDM. Insbesondere die Datenlage zur diabetischen Schwangerschaft und den GR ist bisher sehr gering.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit keine signifikante Veränderung der NR3C1-mRNA-Expression nachgewiesen werden, weder in übergewichtiger Schwangerschaft ohne GDM

noch mit GDM. Die NR3C1-mRNA-Expression und auch das GR-Proteinlevel ist in Übergewicht und GDM weitgehend unerforscht.

Eine einzelne Studie untersuchte die plazentare GR-Methylierung und kam zu dem Schluss, dass aufgrund der höheren Methylierung des NR3C1-Gens in der nicht-diabetischen Schwangerschaft (5,6 % in nicht-diabetischer Schwangerschaft vs. 3,3 % in diabetischer Schwangerschaft) eine Repression der NR3C1-mRNA-Expression vorliegt. Die diabetische Schwangerschaft zeigte hierbei einen signifikant höheren präpartalen BMI ¹⁷⁶.

Eine einzelne Tierversuchsstudie zeigte ein höheres GR-Proteinlevel der diabetischen Ratten gegen Ende der Schwangerschaft, allerdings bestand dieser Unterschied an Tag 17 und 19, an Tag 21 bestand kein höheres GR-Proteinlevel mehr ¹⁷⁷. Inwiefern sich dieses Ergebnis auf den Menschen anwenden lässt, ist bisher unklar.

Aufgrund zahlreicher Forschungsergebnisse erscheint es, dass nur der GR α aktiv an die GRE bindet und die klassische Cortisol-Wirkung vollständig entfaltet, während die GR β -Isoform eher inhibitorische Wirkung hat ^{96,106,112}. Obwohl über die Funktion der GR in der Plazenta wenig bekannt ist, scheint in anderen Geweben die etwas weniger bekannte GR α B-Isoform (91 kDa) die GR-Funktion stärker zu entfalten ⁹⁸. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung der GR α -Proteinlevel bei Übergewicht (Gruppe II) im Vergleich zum Normalgewicht (Gruppe I) gezeigt werden, die in der Tendenz bei gleichzeitigem Vorliegen von Übergewicht und GDM (Gruppe III) wieder rückläufig ist. Für den GR (gesamt) zeigte sich ein ähnliches Bild, hierbei zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede, was möglicherweise auch an der Miterfassung der inhibitorischen GR β liegen könnte.

5.5 Stärken und Limitationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 56 normalgewichtige (Gruppe I), 49 nicht-diabetische, übergewichtige (Gruppe II) und 42 diabetische, übergewichtige Schwangere, ihre Plazenten und ihre Einlinge untersucht. Auch im Rahmen der qRT-PCR und der Western Blots konnte eine große, hauptsächlich nur durch die Versuchsbedingungen selbst eingeschränkte, Probenzahl analysiert werden. Die genaue Betrachtung und Einteilung der beiden übergewichtigen Versuchsgruppen anhand des GDM ermöglicht einen direkten Vergleich zum Vorliegen eines GDM, da in den meisten GDM-Studien das Übergewicht als eigener Einflussfaktor nicht separiert wurde. Leider ist aufgrund der geringen Anzahl in der Studienkohorte eine Analyse auch der normalgewichtigen, diabetischen Schwangerschaften nicht möglich gewesen. Die große Studiengröße und damit einhergehende höhere Effektstärke wurde insofern eingeschränkt, dass nicht alle Patientinnen-Plazenta-Neugeborenen Paare im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet werden konnten, da weitere Ausschlussgründe wie beispielsweise das Rauchen oder eine erhöhte iatrogene GC-Exposition (z.B. über eine Lungenreifeinduktion) beachtet werden mussten. Außerdem konnte nicht zu allen Patientinnen-Plazenta-Neugeborenen Paaren alle Blutwerte analysiert werden, da teilweise

Blutproben nicht oder nicht ausreichend vorhanden waren. Die Studienpopulation spiegelt mit ihrem bewusst hohen Vorkommen von Übergewicht und GDM nicht die Allgemeinbevölkerung wider, sondern soll im Gegenteil eine eher angegliche Untersuchungsruppengröße für die höhere statistische Evidenz abbilden.

Im Rahmen der qRT-PCR ergaben sich einige Probleme im Sinne von starken Schwankungen der Referenzgene, die eine Fehleranalyse nötig machten. Im Rahmen der unternommenen Schritte (insbesondere der vorgenommenen Probenverdünnung) könnte es zu einer Abschwächung von Effekten auf mRNA-Ebene gekommen sein. Auf der anderen Seite ist durch die mehrfache Messung und der genauen Analyse der Referenzgene mittels qBase+ eine Verfälschung der Versuchsergebnisse aufgrund von Schwankungen der Referenzgene in übergewichtiger oder bei gleichzeitig auch diabetischer Schwangerschaft minimiert worden. Weiterhin konnte die GC-Plazentaschranke nicht abschließend, wie in der Fragestellung der Arbeit formuliert, analysiert werden, da es uns nicht gelang die ABCB1-Genexpression darzustellen, genauso wenig wie die 11 β -HSD1-Proteinmenge.

Es wurden weiterhin nur der villöse Anteil der Plazenta auf die beteiligten Gene und ihre Proteine untersucht, nicht jedoch die maternale Dezidua oder die fetale Seite. Auch der Zeitpunkt der Analysen (Reifgeborene Kinder, geplante Sectio) ist im Rahmen der humanen Studienpopulation aus ethischen Gründen nicht beeinflussbar. In einigen Tierversuchsstudien, wurde insbesondere für den GR und das p-GP eine niedrigere Genexpression und Proteinmenge am Ende der Schwangerschaft festgestellt ^{120,123,176}. Eine Abbildung über den Verlauf der Schwangerschaft war aus ethischen Gründen ebenfalls nicht möglich.

5.6 Fazit und Ausblick

Die Plazentaschranke für GC scheint den Fetus sehr gut zu schützen. Während die maternalen Cortisolspiegel in dieser Studienkohorte signifikant negativ mit dem BMI korrelierten, zeigte sich kein nachweisbarer Unterschied in den fetalen Cortisolspiegeln. Diese Beobachtung deckt sich mit zahlreichen Studien ^{16,134,169}. Die fetalen Cortisolspiegel ohne Unterschied nach GDM- oder übergewichtiger Schwangerschaft wie auch die Haar-Cortisol-Analysen von Cohen et al. im Kindes- und Jugendalter aus diabetischer Schwangerschaft bestätigen die Vermutung, dass die kindliche HPA-Achse nicht durch die Geburt aus übergewichtiger oder diabetischer Schwangerschaft beeinflusst wird ¹⁶⁹. Allerdings bedeutet dies nicht, dass die erniedrigten maternalen Cortisolspiegel in adipöser und übergewichtiger Schwangerschaft keine Auswirkungen auf das metabolische Risiko der Kinder haben können.

In diabetischer Schwangerschaft zeigte sich eine signifikante Erhöhung der 11 β -HSD2 auf mRNA-Ebene, hier ließ sich zwischen den Gruppen Übergewicht ohne GDM und Übergewicht mit GDM eine signifikante Erhöhung der HSD11B2-mRNA-Expression nachweisen. Auf Proteinebene zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung. Eine weitere Studie kommt

zu einem ähnlichen Ergebnis mit einer erhöhten HSD11B2-mRNA-Expression in diabetischer Schwangerschaft, auf Proteinebene ließ sich hier jedoch keine Veränderung mehr abbilden¹³⁷. Für die Cortison-aktivierende 11 β -HSD1 konnten keine Veränderung auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, weder nach Vorliegen eines GDM in übergewichtiger Schwangerschaft noch nach dem maternalen BMI. Diese Aussage wird eingeschränkt durch einen frustranen Western Blot, in dem die 11 β -HSD1 nicht spezifisch im villösen Anteil der Plazenta dargestellt werden konnte. In anderen Studien zeigte sich vor allem eine Expression in der Dezidua sowie in den fetalen Geweben jenseits der Plazenta^{66,68,174}. Ein möglicher Effekt in der maternalen Dezidua ist also nicht genauer untersucht worden. Die Fragestellung der Aufhebung einer GC-Schutzfunktion in der Plazenta über eine erhöhte Cortison-Expression des Fetus, welches wiederum auf fetaler Seite mittels 11 β -HSD1 zu Cortisol aktiviert werden könnte, sollte Ziel zukünftiger Untersuchungen sein¹⁷⁴.

Insgesamt konnte ein höherer maternaler Cortisolspiegel mit steigendem maternalen BMI nachgewiesen werden sowie ein höherer maternaler Cortisolspiegel bei gemeinsamem Vorliegen von GDM und Übergewicht (im Vergleich zum Normalgewicht ohne GDM). Ein höherer Cortisolspiegel korreliert auch mit dem plazentaren GR-Proteinlevel, welches sich vor allem bei übergewichtiger Schwangerschaft ohne GDM erhöht zeigte (im Vergleich zum Normalgewicht). Die Funktion der plazentaren GR ist weitgehend unverstanden und sollte im Rahmen weiterer Experimente noch näher analysiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K, Ellinger I. Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 1027.
2. Gynecologists ACoOa. ACOG Committee Opinion number 315, September 2005. Obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2005; **106**(3): 671-5.
3. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Technical Report Series* 2000; **894**: i-xii, 1-253.
4. Deutsche Adipositas-Gesellschaft e.V.: Wabitsch M. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“. 2014. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/050-001I_S3_Adipositas_Pr%C3%A4vention_Therapie_2014-11-abgelaufen.pdf (zuletzt abgerufen am 29.10. 2021).
5. Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, et al. Maternal Obesity and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2007; **30**(8): 2070-6.
6. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril* 2008; **90**(3): 714-26.
7. Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *Jama* 2009; **301**(6): 636-50.
8. IQTIG. Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen: Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2022
Perinatalmedizin: Geburtshilfe. Berlin, 2023.
9. Institute of M, National Research Council Committee to Reexamine IOMPWG. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: Rasmussen KM, Yaktine AL, eds. Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines. Washington (DC): National Academies Press (US)
Copyright © 2009, National Academy of Sciences.; 2009: S. 254.
10. Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010; **33**(3): 676-82.
11. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009; **32** **Suppl 1**(Suppl 1): S62-7.
12. Metzger BETHSCRG. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: Associations With Neonatal Anthropometrics. *Diabetes* 2009; **58**(2): 453-9.
13. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe: Seelbach-Göbel B, Deutsche Diabetes Gesellschaft: Müller-Wieland D. S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM),

Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 2018. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/057-008I_S3_Gestationsdiabetes-mellitus-GDM-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2019-06.pdf (zuletzt abgerufen am 29.10.2021).

14. Teede HJ, Harrison CL, Teh WT, Paul E, Allan CA. Gestational diabetes: Development of an early risk prediction tool to facilitate opportunities for prevention. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2011; **51**(6): 499-504.
15. Torloni MR, Betrán AP, Horta BL, et al. Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Obesity Reviews* 2009; **10**(2): 194-203.
16. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008; **358**(19): 1991-2002.
17. Nehring I, Chmitorz A, Reulen H, von Kries R, Ensenaer R. Gestational diabetes predicts the risk of childhood overweight and abdominal circumference independent of maternal obesity. *Diabet Med* 2013; **30**(12): 1449-56.
18. Schaefer-Graf UM, Pawliczak J, Passow D, et al. Birth weight and parental BMI predict overweight in children from mothers with gestational diabetes. *Diabetes Care* 2005; **28**(7): 1745-50.
19. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, et al. High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care* 2008; **31**(2): 340-6.
20. Ouyang F, Parker MG, Luo ZC, et al. Maternal BMI, gestational diabetes, and weight gain in relation to childhood obesity: The mediation effect of placental weight. *Obesity (Silver Spring)* 2016; **24**(4): 938-46.
21. Shah BR, Retnakaran R, Booth GL. Increased Risk of Cardiovascular Disease in Young Women Following Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2008; **31**(8): 1668-9.
22. Retnakaran R, Shah BR. Mild glucose intolerance in pregnancy and risk of cardiovascular disease: a population-based cohort study. *Canadian Medical Association Journal* 2009; **181**(6-7): 371-6.
23. Sadler TD, U; Brand-Saberi, B. Taschenlehrbuch Embryologie. Stuttgart: Thieme; 2014.
24. Sadler TW, Langman J, Drews U. Medizinische Embryologie - Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 11., aktualisierte und erw. Aufl. ed. Stuttgart: Thieme; 2008.
25. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
26. Amelung D, Hübener HJ, Roka L, Meyerheim G. CONVERSION OF CORTISONE TO COMPOUND F. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1953; **13**(9): 1125-6.
27. Osinski PA. Steroid 11 β -ol Dehydrogenase in Human Placenta. *Nature* 1960; **187**(4739):

777-.

28. Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ. Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta* 2005; **359**(1-2): 189-94.
29. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of Disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2007; **3**(6): 479-88.
30. Sandman CA, Glynn L, Schetter CD, et al. Elevated maternal cortisol early in pregnancy predicts third trimester levels of placental corticotropin releasing hormone (CRH): priming the placental clock. *Peptides* 2006; **27**(6): 1457-63.
31. Jung C, Ho JT, Torpy DJ, et al. A longitudinal study of plasma and urinary cortisol in pregnancy and postpartum. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**(5): 1533-40.
32. Entringer S, Buss C, Andersen J, Chicz-DeMet A, Wadhwa PD. Ecological momentary assessment of maternal cortisol profiles over a multiple-day period predicts the length of human gestation. *Psychosom Med* 2011; **73**(6): 469-74.
33. Cousins L, Rigg L, Hollingsworth D, et al. Qualitative and quantitative assessment of the circadian rhythm of cortisol in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1983; **145**(4): 411-6.
34. Demey-Ponsart E, Foidart JM, Sulon J, Sodoysz JC. Serum CBG, free and total cortisol and circadian patterns of adrenal function in normal pregnancy. *J Steroid Biochem* 1982; **16**(2): 165-9.
35. Lindholm J, Schultz-Moller N. Plasma and urinary cortisol in pregnancy and during estrogen-gestagen treatment. *Scand J Clin Lab Invest* 1973; **31**(1): 119-22.
36. Scott EM, McGarrigle HH, Lachelin GC. The increase in plasma and saliva cortisol levels in pregnancy is not due to the increase in corticosteroid-binding globulin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **71**(3): 639-44.
37. Rosenthal HE, Slaunwhite WR, Jr., Sandberg AA. Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma. XI. Effects of estrogens or pregnancy in guinea pigs. *Endocrinology* 1969; **85**(5): 825-30.
38. Coolens JL, Van Baelen H, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987; **26**(2): 197-202.
39. Slaunwhite WR, Lockie GN, Back N, Sandberg AA. Inactivity in vivo of transcortin-bound cortisol. *Science* 1962; **135**(3508): 1062-3.
40. Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 1983; **20** (Pt 6): 329-35.
41. Umeda T, Hiramatsu R, Iwaoka T, Shimada T, Miura F, Sato T. Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin Chim Acta* 1981; **110**(2-3): 245-53.
42. Robinson BG, Emanuel RL, Frim DM, Majzoub JA. Glucocorticoid stimulates expression

- of corticotropin-releasing hormone gene in human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**(14): 5244-8.
43. Rees LH, Burke CW, Chard T, Evans SW, Letchworth AT. Possible placental origin of ACTH in normal human pregnancy. *Nature* 1975; **254**(5501): 620-2.
44. Sasaki A, Tempst P, Liotta AS, et al. Isolation and characterization of a corticotropin-releasing hormone-like peptide from human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; **67**(4): 768-73.
45. Petraglia F, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W. Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. *Nature* 1987; **328**(6132): 717-9.
46. Nolten WE, Rueckert PA. Elevated free cortisol index in pregnancy: possible regulatory mechanisms. *Am J Obstet Gynecol* 1981; **139**(4): 492-8.
47. Brown MA, Thou ST, Whitworth JA. Stimulation of aldosterone by ACTH in normal and hypertensive pregnancy. *Am J Hypertens* 1995; **8**(3): 260-7.
48. Willenberg HS, Bornstein SR, Hiroi N, et al. Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type I antagonist on human adrenal function. *Mol Psychiatry* 2000; **5**(2): 137-41.
49. McLean M, Bisits A, Davies J, Woods R, Lowry P, Smith R. A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med* 1995; **1**(5): 460-3.
50. Grammatopoulos DK, Hillhouse EW. Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet* 1999; **354**(9189): 1546-9.
51. Stirrat LI, O'Reilly JR, Barr SM, et al. Decreased maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in very severely obese pregnancy: Associations with birthweight and gestation at delivery. *Psychoneuroendocrinology* 2016; **63**: 135-43.
52. Doe RP, Fernandez R, Seal US. Measurement of Corticosteroid-Binding Globulin in Man. *J Clin Endocrinol Metab* 1964; **24**: 1029-39.
53. Gitau R, Cameron A, Fisk NM, Glover V. Fetal exposure to maternal cortisol. *Lancet* 1998; **352**(9129): 707-8.
54. Hillman DA, Giroud CJ. PLASMA CORTISONE AND CORTISOL LEVELS AT BIRTH AND DURING THE NEONATAL PERIOD. *J Clin Endocrinol Metab* 1965; **25**: 243-8.
55. Dormer RA, France JT. Cortisol and cortisone levels in umbilical cord plasma and maternal plasma of normal pregnancies. *Steroids* 1973; **21**(4): 497-510.
56. Johnson RF, Rennie N, Murphy V, Zakar T, Clifton V, Smith R. Expression of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid transcripts in the human placenta at term. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**(12): 4887-93.
57. López Bernal A, Anderson AB, Turnbull AC. The lack of influence of labor on human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; **54**(6): 1251-4.

58. Murphy BE. Human fetal serum cortisol levels related to gestational age: evidence of a midgestational fall and a steep late gestational rise, independent of sex or mode of delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1982; **144**(3): 276-82.
59. Migeon CJ, Prystowsky H, Grumbach MM, Byron MC. Placental passage of 17-hydroxycorticosteroids: comparison of the levels in maternal and fetal plasma and effect of ACTH and hydrocortisone administration. *J Clin Invest* 1956; **35**(5): 488-93.
60. Ślabuszewska-Józwiak A, Włodarczyk M, Kilian K, et al. Does the Caesarean Section Impact on 11 β HSD2 and Fetal Cortisol? *Int J Environ Res Public Health* 2020; **17**(15).
61. Brown RW, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. Human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* 1993; **132**(6): 2614-21.
62. Whorwood CB, Franklyn JA, Sheppard MC, Stewart PM. Tissue localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; **41**(1): 21-8.
63. Lakshmi V, Monder C. Evidence for independent 11-oxidase and 11-reductase activities of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: enzyme latency, phase transitions, and lipid requirements. *Endocrinology* 1985; **116**(2): 552-60.
64. Mercer WR, Krozowski ZS. Localization of an 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase activity to the distal nephron. Evidence for the existence of two species of dehydrogenase in the rat kidney. *Endocrinology* 1992; **130**(1): 540-3.
65. Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS. Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **105**(2): R11-7.
66. Murphy BE. Ontogeny of cortisol-cortisone interconversion in human tissues: a role for cortisone in human fetal development. *J Steroid Biochem* 1981; **14**(9): 811-7.
67. Lakshmi V, Nath N, Muneyyirci-Delale O. Characterization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: evidence for the existence of two species of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; **45**(5): 391-7.
68. Stewart PM, Rogerson FM, Mason JI. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal adrenal steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**(3): 885-90.
69. Stewart PM, Murry BA, Mason JI. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **78**(6): 1529-32.
70. Lopez Bernal A, Craft IL. Corticosteroid metabolism in vitro by human placenta, fetal membranes and decidua in early and late gestation. *Placenta* 1981; **2**(4): 279-85.
71. Murphy VE, Clifton VL. Alterations in human placental 11beta-hydroxysteroid

- dehydrogenase type 1 and 2 with gestational age and labour. *Placenta* 2003; **24**(7): 739-44.
72. Blasco MJ, Lopez Bernal A, Turnbull AC. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity of the human placenta during pregnancy. *Horm Metab Res* 1986; **18**(9): 638-41.
73. Giannopoulos G, Jackson K, Tulchinsky D. Glucocorticoid metabolism in human placenta, decidua, myometrium and fetal membranes. *J Steroid Biochem* 1982; **17**(4): 371-4.
74. Sarkar S, Tsai SW, Nguyen TT, Plevyak M, Padbury JF, Rubin LP. Inhibition of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by catecholamines via alpha-adrenergic signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; **281**(6): R1966-74.
75. Hardy DB, Pereria LE, Yang K. Prostaglandins and leukotriene B4 are potent inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Biol Reprod* 1999; **61**(1): 40-5.
76. Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 1993; **341**(8841): 339-41.
77. Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, et al. Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res* 2001; **16**(6): 1037-44.
78. Johnstone JF, Bocking AD, Unluedik E, Challis JR. The effects of chorioamnionitis and betamethasone on 11beta hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor in preterm human placenta. *J Soc Gynecol Investig* 2005; **12**(4): 238-45.
79. Edwards CR, Stewart PM, Burt D, et al. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 1988; **2**(8618): 986-9.
80. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 1988; **242**(4878): 583-5.
81. Stewart PM, Murry BA, Mason JI. Human kidney 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned type I isoform. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **79**(2): 480-4.
82. Ulick S, Levine LS, Gunczler P, et al. A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; **49**(5): 757-64.
83. Shackleton CH, Rodriguez J, Arteaga E, Lopez JM, Winter JS. Congenital 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency associated with juvenile hypertension: corticosteroid metabolite profiles of four patients and their families. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1985; **22**(6): 701-12.
84. Montenegro YHA, de Queiroga Nascimento D, de Assis TO, Santos-Lopes SSD. The epigenetics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in fetal development. *Ann Hum Genet* 2019; **83**(4): 195-213.

85. Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; **46**(2): 161-6.
86. Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet* 1993; **341**(8841): 355-7.
87. Shams M, Kilby MD, Somerset DA, et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Hum Reprod* 1998; **13**(4): 799-804.
88. Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CR, Seckl JR. Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension* 1996; **27**(6): 1200-4.
89. Reinisch JM, Simon NG, Karow WG, Gandelman R. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science* 1978; **202**(4366): 436-8.
90. McTernan CL, Draper N, Nicholson H, et al. Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**(10): 4979-83.
91. Barker DJ. The fetal origins of adult hypertension. *J Hypertens Suppl* 1992; **10**(7): S39-44.
92. Schrey S, Stepan H. Pränatale epigenetische Prägung: Stand des Wissens. *Deutsches Ärzteblatt International* 2016; **113**(45): A-2040.
93. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985; **318**(6047): 635-41.
94. Francke U, Foellmer BE. The glucocorticoid receptor gene is in 5q31-q32 [corrected]. *Genomics* 1989; **4**(4): 610-2.
95. Encío IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1991; **266**(11): 7182-8.
96. Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 1995; **95**(6): 2435-41.
97. Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 2005; **18**(3): 331-42.
98. Yudt MR, Cidlowski JA. Molecular Identification and Characterization of A and B Forms of the Glucocorticoid Receptor. *Molecular Endocrinology* 2001; **15**(7): 1093-103.
99. Saif Z, Hodyl NA, Stark MJ, et al. Expression of eight glucocorticoid receptor isoforms in the human preterm placenta vary with fetal sex and birthweight. *Placenta* 2015; **36**(7): 723-30.

100. Saif Z, Hodyl NA, Hobbs E, et al. The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta* 2014; **35**(4): 260-8.
101. Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 2004; **151 Suppl 3**: U49-62.
102. Johns EC, Denison FC, Reynolds RM. The impact of maternal obesity in pregnancy on placental glucocorticoid and macronutrient transport and metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; **1866**(2): 165374.
103. Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, et al. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* 1988; **55**(2): 361-9.
104. Wrange O, Eriksson P, Perlmann T. The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *J Biol Chem* 1989; **264**(9): 5253-9.
105. Hollenberg SM, Evans RM. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1988; **55**(5): 899-906.
106. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem* 1996; **271**(16): 9550-9.
107. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991; **352**(6335): 497-505.
108. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 1990; **62**(6): 1189-204.
109. Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, et al. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 1990; **62**(6): 1205-15.
110. Schüle R, Rangarajan P, Kliewer S, et al. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 1990; **62**(6): 1217-26.
111. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS, Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995; **15**(2): 943-53.
112. Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 1999; **274**(39): 27857-66.
113. Joshi AA, Vaidya SS, St-Pierre MV, et al. Placental ABC Transporters: Biological Impact and Pharmaceutical Significance. *Pharm Res* 2016; **33**(12): 2847-78.

114. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; **455**(1): 152-62.
115. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**(9): 3004-8.
116. Gros P, Ben Neriah YB, Croop JM, Housman DE. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986; **323**(6090): 728-31.
117. Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, et al. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 1986; **324**(6096): 485-9.
118. van Kalken CK, Broxterman HJ, Pinedo HM, et al. Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Br J Cancer* 1993; **67**(2): 284-9.
119. 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* 2003; **285**(3): C584-91.
120. MacFarland A, Abramovich DR, Ewen SW, Pearson CK. Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta. *Histochem J* 1994; **26**(5): 417-23.
121. Mylona P, Glazier JD, Greenwood SL, Sides MK, Sibley CP. Expression of the cystic fibrosis (CF) and multidrug resistance (MDR1) genes during development and differentiation in the human placenta. *Mol Hum Reprod* 1996; **2**(9): 693-8.
122. Nakamura Y, Ikeda S, Furukawa T, et al. Function of P-glycoprotein expressed in placenta and mole. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **235**(3): 849-53.
123. 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* 2006; **27**(6-7): 602-9.
124. Kalabis GM, Kostaki A, Andrews MH, Petropoulos S, Gibb W, Matthews SG. Multidrug resistance phosphoglycoprotein (ABCB1) in the mouse placenta: fetal protection. *Biol Reprod* 2005; **73**(4): 591-7.
125. Meijer OC, de Lange EC, Breimer DD, de Boer AG, Workel JO, de Kloet ER. Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology* 1998; **139**(4): 1789-93.
126. Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 1995; **96**(4): 1698-705.
127. Karssen AM, Meijer OC, van der Sandt IC, et al. Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain.

Endocrinology 2001; **142**(6): 2686-94.

128. Mark PJ, Waddell BJ. P-glycoprotein restricts access of cortisol and dexamethasone to the glucocorticoid receptor in placental BeWo cells. *Endocrinology* 2006; **147**(11): 5147-52.
129. Stirrat LI, Sengers BG, Norman JE, et al. Transfer and Metabolism of Cortisol by the Isolated Perfused Human Placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; **103**(2): 640-8.
130. Manceau S, Giraud C, Declèves X, et al. ABC drug transporter and nuclear receptor expression in human cytotrophoblasts: influence of spontaneous syncytialization and induction by glucocorticoids. *Placenta* 2012; **33**(11): 927-32.
131. Mårin P, Darin N, Amemiya T, Andersson B, Jern S, Björntorp P. Cortisol secretion in relation to body fat distribution in obese premenopausal women. *Metabolism* 1992; **41**(8): 882-6.
132. Praveen EP, Sahoo JP, Kulshreshtha B, et al. Morning cortisol is lower in obese individuals with normal glucose tolerance. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2011; **4**: 347-52.
133. Weaver JU, Kopelman PG, McLoughlin L, Forsling ML, Grossman A. Hyperactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in obesity: a study of ACTH, AVP, beta-lipotrophin and cortisol responses to insulin-induced hypoglycaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993; **39**(3): 345-50.
134. Stirrat LI, Just G, Homer NZM, Andrew R, Norman JE, Reynolds RM. Glucocorticoids are lower at delivery in maternal, but not cord blood of obese pregnancies. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 10263.
135. Mina TH, Räikkönen K, Riley SC, Norman JE, Reynolds RM. Maternal distress associates with placental genes regulating fetal glucocorticoid exposure and IGF2: Role of obesity and sex. *Psychoneuroendocrinology* 2015; **59**: 112-22.
136. Wang C, Li H, Luo C, et al. The effect of maternal obesity on the expression and functionality of placental P-glycoprotein: Implications in the individualized transplacental digoxin treatment for fetal heart failure. *Placenta* 2015; **36**(10): 1138-47.
137. Ma R, Liu J, Wu L, et al. Differential expression of placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in pregnant women with diet-treated gestational diabetes mellitus. *Steroids* 2012; **77**(7): 798-805.
138. Grigorakis SI, Alevizaki M, Beis C, Anastasiou E, Alevizaki CC, Souvatzoglou A. Hormonal parameters in gestational diabetes mellitus during the third trimester: high glucagon levels. *Gynecol Obstet Invest* 2000; **49**(2): 106-9.
139. Berglund SK, García-Valdés L, Torres-Espinola FJ, et al. Maternal, fetal and perinatal alterations associated with obesity, overweight and gestational diabetes: an observational cohort study (PREOBE). *BMC Public Health* 2016; **16**: 207.
140. Raney BJ, Barber GP, Benet-Pagès A, et al. The UCSC Genome Browser database: 2024 update. *Nucleic Acids Res* 2024; **52**(D1): D1082-d8.

141. Rabbitt EH, Ayuk J, Boelaert K, et al. Abnormal expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pituitary adenomas: a prereceptor determinant of pituitary cell proliferation. *Oncogene* 2003; **22**(11): 1663-7.
142. Schoof E, Girstl M, Frobenius W, et al. Decreased Gene Expression of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 and 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase in Human Placenta of Patients with Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; **86**(3): 1313-7.
143. Nüsken E, Herrmann Y, Wohlfarth M, et al. Strong hypoxia reduces leptin synthesis in purified primary human trophoblasts. *Placenta* 2015; **36**(4): 427-32.
144. Paravicini TM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Increased NADPH Oxidase Activity, gp91phox Expression, and Endothelium-Dependent Vasorelaxation During Neointima Formation in Rabbits. *Circulation Research* 2002; **91**(1): 54-61.
145. Zhang Y, Wang YL, Liu YW, et al. Change of peripheral blood mononuclear cells IFN- γ , IL-10, and TGF- β 1 mRNA expression levels with active human cytomegalovirus infection in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 2009; **41**(5): 1767-9.
146. Appel S, Ankerne J, Appel J, Oberthuer A, Mallmann P, Dotsch J. CNN3 regulates trophoblast invasion and is upregulated by hypoxia in BeWo cells. *PLoS One* 2014; **9**(7): e103216.
147. Graham RC, Jr., Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 1966; **14**(4): 291-302.
148. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; **162**(1): 156-9.
149. Ambrecht M. Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. *Application Note, Eppendorf AG, Hamburg* 2013; **279**.
150. Okayama H, Berg P. High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Molecular and Cellular Biology* 1982; **2**(2): 161-70.
151. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996; **6**(10): 986-94.
152. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001; **25**(4): 402-8.
153. Tiselius A. The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins. Uppsala, universitet: Almqvist & Wiksell Uppsala; 1930.
154. Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J* 1955; **61**(4): 629-41.
155. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**(5259): 680-5.

156. Martin KE, Grivell RM, Yelland LN, Dodd JM. The influence of maternal BMI and gestational diabetes on pregnancy outcome. *Diabetes Res Clin Pract* 2015; **108**(3): 508-13.
157. Ehrenberg HM, Mercer BM, Catalano PM. The influence of obesity and diabetes on the prevalence of macrosomia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004; **191**(3): 964-8.
158. Sermer M, Naylor CD, Farine D, et al. The Toronto Tri-Hospital Gestational Diabetes Project. A preliminary review. *Diabetes Care* 1998; **21 Suppl 2**: B33-42.
159. Jensen EC, Gallaher BW, Breier BH, Harding JE. The effect of a chronic maternal cortisol infusion on the late-gestation fetal sheep. *J Endocrinol* 2002; **174**(1): 27-36.
160. Gunberg DL. Some effects of exogenous hydrocortisone on pregnancy in the rat. *Anat Rec* 1957; **129**(2): 133-53.
161. Statistik Bf. Durchschnittliches Alter¹ der Eltern bei der Geburt des Kindes 2022 (biologische Geburtenfolge nach der Altersjahrmethode), 2022.
162. Tanaka K, Yamada K, Matsushima M, et al. Increased maternal insulin resistance promotes placental growth and decreases placental efficiency in pregnancies with obesity and gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol Res* 2018; **44**(1): 74-80.
163. Martino J, Sebert S, Segura MT, et al. Maternal Body Weight and Gestational Diabetes Differentially Influence Placental and Pregnancy Outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; **101**(1): 59-68.
164. Choo S, de Vrijer B, Regnault TRH, Brown HK, Stitt L, Richardson BS. The impact of maternal diabetes on birth to placental weight ratio and umbilical cord oxygen values with implications for fetal-placental development. *Placenta* 2023; **136**: 18-24.
165. Louwen F, Wagner U, Abou-Dakn M, et al. Caesarean Section. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S3-Level, AWMF Registry No.015/084, June 2020). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2021; **81**(8): 896-921.
166. Huggett AS, Warren FL, Warren NV. The origin of the blood fructose of the foetal sheep. *J Physiol* 1951; **113**(2-3): 258-75.
167. Chen CH, Adam PA, Laskowski DE, McCann ML, Schwartz R. The plasma free fatty acid composition and blood glucose of normal and diabetic pregnant women and of their newborns. *Pediatrics* 1965; **36**(6): 843-55.
168. Srinivasan G, Pildes RS, Cattamanchi G, Voora S, Lilien LD. Plasma glucose values in normal neonates: a new look. *J Pediatr* 1986; **109**(1): 114-7.
169. Cohen N, Faleschini S, Rifas-Shiman SL, et al. Associations of maternal glucose markers in pregnancy with cord blood glucocorticoids and child hair cortisol levels. *J Dev Orig Health Dis* 2023; **14**(1): 88-95.
170. Tien Nguyen S, Bui Minh T, Trung Dinh H, et al. Relationship Between Maternal Serum Cortisol and Maternal Insulin Resistance and Fetal Ultrasound Characteristics in Gestational

Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2023; **16**: 365-72.

171. Entringer S, Buss C, Rasmussen JM, et al. Maternal Cortisol During Pregnancy and Infant Adiposity: A Prospective Investigation. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; **102**(4): 1366-74.

172. Mikelson C, Kovach MJ, Troisi J, et al. Placental 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression: Correlations with birth weight and placental metal concentrations. *Placenta* 2015; **36**(11): 1212-7.

173. Volqvartz T, Andersen HHB, Pedersen LH, Larsen A. Obesity in pregnancy-Long-term effects on offspring hypothalamic-pituitary-adrenal axis and associations with placental cortisol metabolism: A systematic review. *Eur J Neurosci* 2023; **58**(11): 4393-422.

174. Ghnenis AB, Odhiambo JF, Smith AM, Pankey CL, Nathanielsz PW, Ford SP. A heretical view: rather than a solely placental protective function, placental 11 β hydroxysteroid dehydrogenase 2 also provides substrate for fetal peripheral cortisol synthesis in obese pregnant ewes. *J Dev Orig Health Dis* 2021; **12**(1): 94-100.

175. 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.

176. El Hajj N, Pliushch G, Schneider E, et al. Metabolic programming of MEST DNA methylation by intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 2013; **62**(4): 1320-8.

177. Korgun ET, Acar N, Sati L, et al. Expression of glucocorticoid receptor and glucose transporter-1 during placental development in the diabetic rat. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; **49**(2): 325-34.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung und Inhibierung von Cortisol durch die 11 β -HSD nach Chatuphonprasert et al, 2018.	20
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glucocorticoid-Plazenta Schranke nach Seckl, 2004 und Johns et al., 2020.....	22
Abbildung 3: Cortisol von maternaler HPA-Achse über die Plazenta bis zum fetalen Blut von Chatuphonprasert et al., 2018.....	23
Abbildung 4: Die Stellen der Probenentnahme bei Plazenta-Präparation.	38
Abbildung 5: Unterteilung der Plazentaprobe für die Nativ-Präparation.	39
Abbildung 6: Versuchsaufbau der Plazenta-Präparation.	40
Abbildung 7: Maternale Cortisolspiegel nach BMI und GDM.....	57
Abbildung 8: Maternale Cortisolspiegel nach BMI.	58
Abbildung 9: Fetale Cortisolspiegel nach maternalem BMI und GDM.....	59
Abbildung 10: Korrelation maternalen und fetaler Cortisolspiegel.....	60
Abbildung 11: Immunhistochemischer Vorversuch in Plazentagewebe	61
Abbildung 12: Die NR3C1-mRNA-Expression zwischen Normalgewicht, Übergewicht und übergewichtiger Schwangerschaft mit GDM in plazentarem Gewebe.....	63
Abbildung 13: Relative Proteinmenge des GR nach BMI und GDM.....	64
Abbildung 14: Relative Proteinmenge des GR α nach BMI und GDM.....	65
Abbildung 15: Korrelation zwischen dem maternalen Cortisolspiegel und dem plazentaren GR (gesamt)-Proteinlevel.....	66
Abbildung 16: HSD11B1-Genexpression nach BMI und GDM	66
Abbildung 17: HSD11B2-mRNA-Expression nach BMI und GDM.....	67
Abbildung 18: plazentare 11 β -HSD2-Proteinlevel nach BMI und GDM.....	68
Abbildung 19: p-GP-Proteinlevel nach BMI und GDM in der Plazenta	69
Abbildung 20: Korrelation des p-GP mit dem neonatalen Kopfumfang	70

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Gewichtsgruppen anhand des Body-Mass-Index.	14
Tabelle 2: Diagnostische Kriterien eines GDM in Deutschland.	15
Tabelle 3: Geräteliste.....	29
Tabelle 4: Verbrauchs- und Gebrauchsgegenstände.	30
Tabelle 5: Chemikalien.	32

Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	33
Tabelle 7: Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie.....	34
Tabelle 8: Primersequenzen für die zu untersuchenden Gene.....	35
Tabelle 9: Primersequenzen für die zu messenden Referenzgene.....	35
Tabelle 10: Verwendete Software.....	36
Tabelle 11: Zusammensetzung der Mastermixe A und B in der cDNA-Synthese.	43
Tabelle 12: qRT-PCR-Taqman® Ansatz und Bedingungen.	43
Tabelle 13: qRT-PCR-Ansatz und Bedingungen im SYBR®-Green Verfahren	45
Tabelle 14: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel in der SDS-PAGE.	49
Tabelle 15: Übersicht über die maternalen Stammdaten.....	53
Tabelle 16: Übersicht über die plazentaren Stammdaten.....	54
Tabelle 17: Übersicht über die fetalen Stammdaten.....	56