

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

**Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor,  
Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor Expression  
in der humanen Frühschwangerschaft**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Anja Kneller (geb. Fischl)**  
aus Ludwigshafen am Rhein

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Holzinger  
Prof. Dr. Reinhold Knitza

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Bettina Toth

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2012

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
1.1 Definition und Epidemiologie des Aborts	6
1.2 Definition und Epidemiologie der Blasenmole	9
1.3 Aufbau und Funktion der Plazenta	11
1.4 Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor	14
1.5 Leptin-Rezeptor	17
1.6 Insulin-Rezeptor	20
1.7 Zielsetzung	21
2. Materialien und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.2 Aufbereitung der Paraffinschnitte	23
2.2 Immunhistochemie	25
2.2.1 Prinzip der Immunhistochemie	25
2.2.2 Antikörper	25
2.2.3 Avidin-Biotin-Methode	26
2.2.4 Schema der immunhistochemischen Färbung	27
2.2.5 Auswertung	27
2.3 Real Time Reverse Transcription-PCR	29
2.3.1 Prinzip der Real Time RT-PCR	29
2.3.2 RNA-Extraktion und Reverse Transkription	29
2.3.2 Real Time RT-PCR nach TaqMan®	30
2.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	31
2.4.1 Prinzip der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	31
2.4.2 Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	31
3. Ergebnisse	34
3.1. Immunhistochemie	34
3.1.1 Erythropoetin	34
3.1.2. Erythropoetin-Rezeptor	37
3.1.3 Leptin-Rezeptor	40
3.1.4 Insulin-Rezeptor	43
3.2 RT-PCR	48
3.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	50
4. Diskussion	53
5. Zusammenfassung	59
Anhang	61
Literatur	69
Danksagungen	77
Veröffentlichungen	78

# Abkürzungsverzeichnis

APC	Aktiviertes Protein C
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
C	Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CK7	Cytokeratin 7
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E <sub>2</sub>	Estradiol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
Epo	Erythropoetin
et al.	und andere (et alii)
EVT	Extravillöser Trophoblast
Fa.	Firma
FVL	Faktor V Leiden
g/dl	Gramm / Deziliter
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Ig	Immunglobulin
IRS	Immunoreaktiver Score nach Stegner
IUD	Intrauterine device, Spirale
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
mU/ml	Milliunits / Milliliter
Na	Natrium
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
p.c.	post conceptionem
p.m.	post menstruationem
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii
-R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RSA	Recurrent spontaneous abortion
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time Reverse Transkription PCR
SSW	Schwangerschaftswoche
Std	Stunde
StGB	Strafgesetzbuch
VT	Villöser Trophoblast
WHO	World health organization
β-hCG	Humanes Choriongonadotropin
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

# 1. Einleitung

## 1.1 Definition und Epidemiologie des Aborts

Zwischen 25-50% aller Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter erleiden im Laufe ihres Lebens eine oder mehrere Fehlgeburten (Rai and Regan 2006). Die Ursachen einer Fehlgeburt können sehr unterschiedlich sein.

Man unterteilt das Abortgeschehen in einen Frühabort (bis zur 12. SSW) und einen Spätabort (13.-24. SSW), wobei der Frühabort wesentlich häufiger auftritt. Ab der 24. SSW spricht man nicht mehr von einem Abort, sondern von einer Tot- bzw. Frühgeburt (Stauber and Weyerstahl 2005), (Haag, Hanhart et al. 2003).

Der häufigste Grund für einen Abort sind chromosomale Anomalien, welche vor allem mit steigendem mütterlichem Alter häufiger auftreten (Toth, Lok et al. 2007). Dies wird für die Medizin zunehmend wichtiger, da die Bevölkerung immer älter wird und auch später im Leben eine Familie gründet. In den USA zum Beispiel entschieden sich im Jahre 1976 nur 19,0 % der Frauen zwischen 35 und 39 Jahren für ein Kind. Diese Rate stieg 1998 auf 37,4 % an (Ventura, Taffel et al. 1988), (Guyer, Hoyert et al. 1999). Doch sowohl bei Ältergebärenden besteht auch bei Frauen unter 25 Jahren ein erhöhtes Abortrisiko, das niedrigste Risiko zeigt demnach die Altersgruppe von 25-30 Jahren (Gracia, Sammel et al. 2005).

Das direkte Aufeinanderfolgen von drei oder mehreren Aborten vor der 20. SSW wird nach der WHO als RSA (Recurrent spontaneous abortion) bezeichnet. Bekannte Risikofaktoren eines RSA sind zum Beispiel das mütterliche Alter und damit verbundene häufigere Chromosomenveränderungen. RSA hat ein erhöhtes Rezidivrisiko (Griebel, Halvorsen et al. 2005). Das Risiko eines weiteren Aborts steigt nach zwei Aborten auf ca. 24%, nach drei Aborten auf 30% und nach 4 vorangegangenen, aufeinanderfolgenden Aborten sogar auf 40% an (Regan, Braude et al. 1989). Statistisch betrachtet erleiden etwa 1-3% aller Frauen im gebärfähigen Alter einen RSA (Regan and Rai 2000). Bekannte Risikofaktoren sind beim RSA genetische Anomalien, uterine Fehlbildungen, endokrine Dysfunktionen, Autoimmunerkrankungen, erworbene und vererbare Thrombophilien und Umweltfaktoren (Toth, Nieuwland et al. 2008), (Stephenson, Awartani et al. 2002), (Li, Makris et al. 2002).

Eine erfolgreiche Implantation erfordert ein Gleichgewicht zwischen Koagulation, Fibrinolyse und Angiogenese (Buchholz and Thaler 2003). Uterine Fehlbildungen,

endokrine Dysfunktionen und Störungen im Gerinnungssystem können ebenso für einen RSA verantwortlich sein (Stephenson, Awartani et al. 2002), (Li, Makris et al. 2002). Allerdings bleibt in mehr als 50% der Fälle die Ursache ungeklärt (Chung and Yeko 1996).

Formen des Aborts sind der Abortus imminens, incipiens, incompletus, completus und der verhaltene Abort (missed abortion). Beim Abortus imminens (drohender Abort) ist der Zervikalkanal noch geschlossen und die Gravidität intakt, es kommt allerdings zu vaginalen Blutungen. Dagegen ist beim Abortus incipiens (beginnender Abort) der Zervikalkanal bereits geöffnet (Griebel, Halvorsen et al. 2005). Der Abortus incompletus beschreibt die Ausstossung von manchen, aber nicht allen Teilen des Schwangerschaftsgewebes vor der 20. SSW (Chen and Creinin 2007).

Bei einem kompletten Abort wird die Plazenta und das fetale Gewebe vollständig ausgestossen (Stauber and Weyerstahl 2005). Die sogenannte „missed abortion“ ist definiert als nicht lebensfähige Schwangerschaft, die unerkannt bereits abgestorben ist, aber noch nicht ausgestossen wurde. Der Begriff stammt noch aus der Zeit vor der Erfindung der Sonografie. Damals wurde eine missed abortion nur anhand der Diskrepanz des Alters der Schwangerschaft und der Uterusgröße diagnostiziert (Chen and Creinin 2007).

Die verschiedenen Unterformen des Aborts sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Definition Spontanabort

<b><u>Spontaner Abort: Definitionen und Einteilung</u></b>	
Kompletter Abort:	Alle Schwangerschaftsprodukte wurden ausgestossen ohne nötige chirurgische oder medikamentöse Intervention.
Inkompletter Abort:	Einige, aber nicht alle Schwangerschaftsprodukte wurden ausgestossen; verbliebene Produkte können Teile des Fetus, der Plazenta oder der Eihäute sein.
Abortus imminens (drohender Abort):	Eine Schwangerschaft mit Blutungskomplikation bei noch geschlossenem Zervikalkanal vor der 20. SSW.
Abortus incipiens (beginnender Abort):	Der Muttermund ist bereits geöffnet aber die Schwangerschaftsprodukte verbleiben noch in der Gebärmutter.
Missed abortion (verhaltender Abort):	Schwangerschaft mit fetalem Absterben (meist schon vor Wochen) aber keiner uterinen Aktivität, die zur Ausstossung führt.
RSA (Recurrent spontaneous abortion):	Drei oder mehrere aufeinanderfolgende Fehlgeburten vor Ende der 20. SSW.

Legende: Tabelle modifiziert nach Griebel, C. P., J. Halvorsen, et al. (2005). "Management of spontaneous abortion." Am Fam Physician **72**(7): 1243-50.

Abzugrenzen von einem Abort ist der gewollte Schwangerschaftsabbruch (Abruptio). In Deutschland wird der Schwangerschaftsabbruch durch das Abtreibungsrecht vom 01.10.1995 und das Schwangeren- und Familienhilfeänderungsgesetz vom 21.08.1995 geregelt. Gemäß § 218a StGB (Strafgesetzbuch) ist jeder Schwangerschaftsabbruch grundsätzlich strafbar, kann jedoch bei bestimmten Indikationen und einzuhaltenden Fristen durch einen Arzt rechtmäßig und straffrei vorgenommen werden (Haag, Hanhart et al. 2003).

Obwohl die Anzahl der Schwangerschaftsabbrüche in der westlichen Welt abnimmt, ist in den Entwicklungsländern ein Anstieg zu verzeichnen. Insgesamt schätzt man die weltweite Anzahl von entstehenden Schwangerschaften auf ca. 210 Millionen. Davon enden annähernd die Hälfte in einer Lebendgeburt. 42 Millionen enden in einem Schwangerschaftsabbruch (20 Millionen davon auf illegale Weise) und ca. 3 Millionen Neugeborene sind Totgeburten (Brown 2007).

Die häufigsten Risikofaktoren eines rezidivierenden Spontanaborts sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2:** Risikofaktoren für rezidivierende Spontanaborte

<b><u>Risikofaktoren für rezidivierende Spontanaborte</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• fortgeschrittenes mütterliches Alter und dadurch vermehrte Chromosomenveränderungen</li> <li>• Alkohol-, Zigaretten- und Drogenabusus</li> <li>• intrauterine Verhütungsmittel (Intrauterine Device = Spirale)</li> <li>• starker Kaffeegenuss</li> <li>• chronische mütterliche Erkrankungen wie z.B. Lupus erythematodes, Anti-Phospholipid-Syndrom</li> <li>• endokrinologische Störungen</li> <li>• Medikamente wie z.B. NSAR, Methotrexat, Misoprostol, Retinoide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• maternale Infektionen wie z.B. bakterielle Vaginose, Chlamydien, HIV, Toxoplasmose</li> <li>• erneute Schwangerschaft innerhalb von 6 Monaten nach Entbindung</li> <li>• multiple vorangegangene Schwangerschaftsabbrüche</li> <li>• vorangegangener Abort</li> <li>• Thrombophilien (APC-Resistenz, Mutationen im: Prothrombin-, FVL- und MTHFR-Gen, AT III-Mangel, Protein C- und S-Mangel)</li> <li>• uterine Fehlbildungen</li> </ul>

Legende: Tabelle modifiziert nach Griebel, C. P., J. Halvorsen, et al. (2005). "Management of spontaneous abortion." *Am Fam Physician* **72**(7): 1243-50. und Haag, P., N. Hanhart, et al. (2003). *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*. Breisach am Rhein, Medizinische Verlags- und Informationsdienste: pp. 115-120.

## 1.2 Definition und Epidemiologie der Blasenmole

Die Blasenmole ist eine gynäkologische Erkrankung, die schon in der Antike erwähnt wurde. In dem Werk "Luft, Wasser und Plätze" von Hippokrates (5. Jahrhundert vor Christus) heisst es "die Frauen erscheinen schwanger, ... dies ist aufgrund der Wassersucht der Gebärmutter". Man nahm an, dass die Frauen verunreinigtes Wasser getrunken hätten (Slim and Mehio 2007).

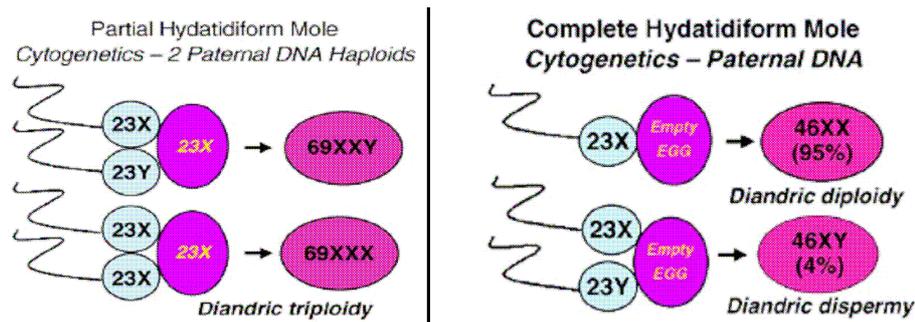
Heutzutage weiss man, dass der Trophoblast während der Schwangerschaft abnorm proliferieren kann. Man unterscheidet hierbei die Blasenmole, das Chorionepitheliom (invasive oder destruierende Blasenmole) und das Chorionkarzinom. Diese Erkrankungen werden als gestationsbedingte Trophoblasterkrankungen zusammengefasst (Stauber and Weyerstahl 2005).

Die Blasenmole ist eine seltene Schwangerschaftskomplikation mit einer Häufigkeit von 1:1000 Schwangerschaften in der westlichen Welt (Hancock and Tidy 2002). In Südostasien, Indien und China ist die Inzidenz circa 20-fach erhöht. Der wichtigste Risikofaktor ist, wie auch beim Spontanabort, das erhöhte Alter der Mutter. Frauen über 40 Jahre haben ein 5 bis 10-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer kompletten Blasenmole (Palmer 1994). Aber auch Frauen, die jünger als 20 Jahre sind, haben ein erhöhtes Risiko (Stauber and Weyerstahl 2005). Im Gegensatz dazu ist die Entstehung einer partiellen Blasenmole nicht mit dem Alter der Mutter assoziiert. Ein Spontanabort in der Anamnese erhöht allerdings das Risiko sowohl für eine partielle als auch eine komplette Blasenmole (Palmer 1994). Ebenso spielen ernährungsbedingte Faktoren eine Rolle in der Entwicklung der Blasenmole. So steigt das Risiko stufenweise an mit abnehmendem Anteil an tierischem Fett und Karotin, einer Vorstufe von Vitamin A in der Nahrung (Berkowitz, Cramer et al. 1985). Generell besteht bei der Blasenmole kein Rezidivrisiko. Es gibt aber doch Fälle mit einer Blasenmole in der Anamnese, die trotzdem ein erhöhtes Risiko von 1% aufwiesen, erneut zu erkranken (Garner, Goldstein et al. 2007).

Basierend auf der Morphologie und der Histopathologie unterscheidet man Blasenmolen als partiell und als komplett. Die Häufigkeit der partiellen Blasenmolen beträgt etwa 1 von 700 Schwangerschaften, die der kompletten Blasenmolen etwa 1 von 1500-2000 Schwangerschaften (Jeffers, O'Dwyer et al. 1993), (Berkowitz, Goldstein et al. 1985). Komplette Blasenmolen sind damit wesentlich seltener, sie haben meistens ein diploides Genom, partielle Blasenmolen sind meistens triploid

(Lawler, Pickthall et al. 1979). Diploide, also komplette Blasenmolen entstehen, wenn eine kernlose Oozyte, mit einem oder zwei Spermien befruchtet wird. Das Genom ist dann rein männlich (Kajii and Ohama 1977). Nur sehr selten besitzen komplette Blasenmolen die Gene beider Eltern (Fisher, Khatoon et al. 2000). Triploide, also partielle Blasenmolen, entstehen, wenn zwei Spermien eine Oozyte befruchten, daher beinhalten sie zwei Genome des Vaters und ein Genom der Mutter (Lawler, Fisher et al. 1982; Lawler, Povey et al. 1982).

**Abbildung 1:** Skizzierung der Entstehung von partiellen und kompletter Blasenmolen



Legende: modifiziert nach Smith, H. O., E. Kohorn, et al. (2005). "Choriocarcinoma and gestational trophoblastic disease." *Obstet Gynecol Clin North Am* 32(4): 661-84.

Die Blasenmole zeigt ein charakteristisches histologisches Bild. Morphologisch sind die Zotten bei der Blasenmole hydropisch vergrößert und teilweise in bis zu haselnußgroße Bläschen verwandelt. Der Embryo stirbt durch die mangelnde Gefäßversorgung fast immer ab. Der entartete Trophoblast bildet im Übermaß  $\beta$ -hCG (bis zu 1 Million IE/l), was man sich diagnostisch zu Nutze macht. Das  $\beta$ -hCG hat ebenso nach erfolgter Therapie eine wichtige Rolle, da es ähnlich wie ein Tumormarker in engen Verlaufskontrollen bestimmt wird. Für die Patientinnen besteht das Risiko, eine invasive Blasenmole oder ein Chorionkarzinom zu entwickeln, falls Reste des Gewebes der Blasenmole im Uterus verbleiben (Stauber and Weyerstahl 2005). Dieses Risiko besteht zwar auch nach jeder komplikationslos verlaufenden Schwangerschaft, ist aber vor allem bei kompletter Blasenmole erhöht (Seckl, Fisher et al. 2000). Die Fertilität von Patientinnen ist nach einer Blasenmole nicht beeinträchtigt (Garner, Goldstein et al. 2007).



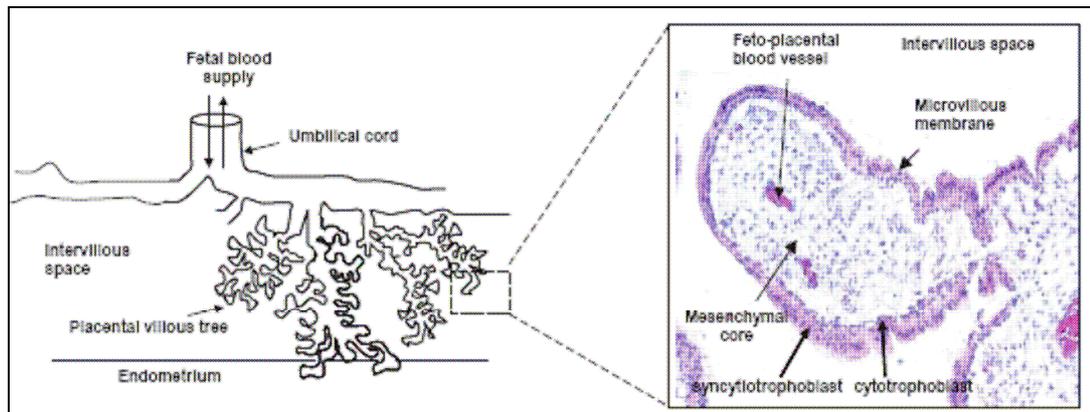
(Neo-)Angiogenese eine wichtige Rolle, insbesondere während des Menstruationszyklus, da ständig neue Gefäße gebildet werden, um die Verluste während der Menstruation zu kompensieren (Sasaki, Masuda et al. 2000).

Innerhalb des ersten Trimenon sind der maternale sowie der fetale Blutzufuss in die Plazenta eingeschränkt. Hustin und Jauniaux beschrieben anhand von Hysterektomie-Präparaten, dass der intervillöse Raum von der uterinen Zirkulation komplett durch okkludierende Trophoblastzellen abgetrennt ist (Hustin, Jauniaux et al. 1990). Dies führt zu einem Sauerstoffgradienten in den betroffenen Geweben. Die Embryogenese findet daher in relativ hypoxischen Verhältnissen statt, verglichen mit dem maternalen Gewebe (Rodesch, Simon et al. 1992). Im intervillösen Raum befindet sich bis zum Aufbrechen der Okklusion eine azelluläre Flüssigkeit, die wahrscheinlich aus Plasma und Sekret der endometrialen Drüsen besteht (Hustin and Schaaps 1987). Jauniaux et al. zeigten mittels vaginaler Dopplersonografie, dass vor der 10. SSW kein maternaler intraplazentarer Blutfluss im intervillösen Raum darzustellen ist (Jauniaux, Jurkovic et al. 1991). Bei gestörten Frühschwangerschaften vor Ende des ersten Trimenon scheint die Plazenta in der Dopplersonografie hingegen sogar hypervaskularisiert zu sein (Kurjak and Kupesic 1997).

Die in den tertiären Zotten vorhandenen Zytotrophoblasten proliferieren und entwickeln sich entweder weiter zu Synzytiotrophoblasten oder zu extravillösen Trophoblasten. Der Synzytiotrophoblast formt die äussere Schicht der Chorionzotten und ist für den Gas- und Nährstoffaustausch, aber auch für die Hormonproduktion der Plazenta zuständig (Forbes and Westwood 2008). Extravillöse Trophoblastzellen beginnen damit in die Dezidua der Gebärmutter einzuwandern, wo sie in die uterinen Spiralarteriolen eindringen (Lyll, Bulmer et al. 1999). Es bilden sich mit mütterlichem Blut gefüllte Lakunen (Jaffe, Jauniaux et al. 1997). In der gestörten Frühschwangerschaft ist genau diese Trophoblasteninvasion eingeschränkt, die Trophoblasten okkludieren daher die Spiralarterien nicht ausreichend und es kommt zu einer verfrühten maternalen Vaskularisierung der Plazenta (Hustin, Jauniaux et al. 1990).

Die Grenzfläche zwischen mütterlichem und kindlichem Blut, auch Plazentaschranke genannt, besteht in den Tertiärzotten nur noch aus dem villösen Trophoblast, dem Stroma und dem fetalen Endothelium (siehe Abbildung 3), (Kingdom, Huppertz et al. 2000). Die menschliche Plazenta ist vom hämochorialen Typ, das heisst, der fetale Trophoblast „schwimmt“ direkt im mütterlichen Blut (Jauniaux, Hempstock et al. 2003).

**Abbildung 3:** Aufbau und Struktur einer Zotte des ersten Trimenon



Legende: Aufbau und Struktur einer Zotte des ersten Trimenon (Forbes and Westwood 2008) "The IGF axis and placental function. a mini review." *Horm Res* 69(3): 129-37.

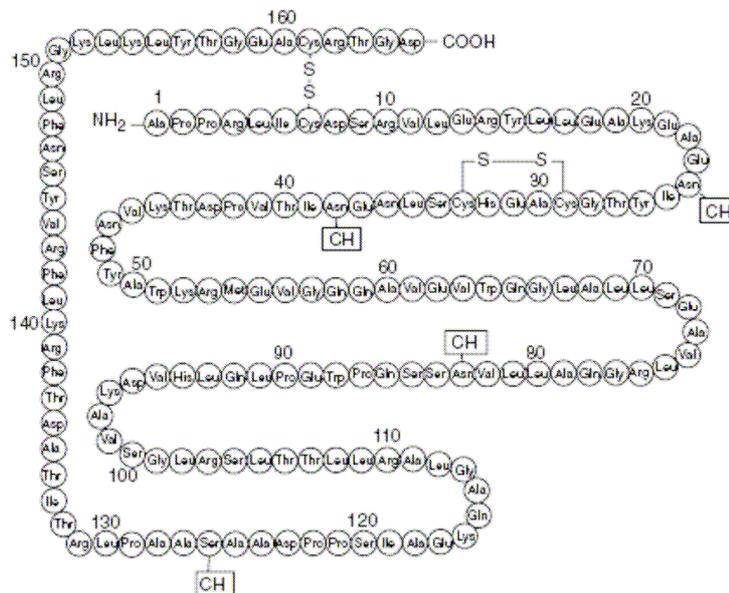
Der Synzytiotrophoblast ist ein mehrkerniges Zellkonglomerat, das selbst keine transkriptionale Aktivität besitzt. Er ist also während der gesamten Schwangerschaft von der Proliferation des darunterliegenden Zytotrophoblasten abhängig. Störungen dieser Regulierung finden sich z.B. bei Schwangerschaftskomplikationen wie der Präeklampsie und intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR). Die genauen Prozesse sind dabei noch nicht geklärt (Forbes and Westwood 2008). Jauniaux et al. konnten zeigen, dass in Zotten von Patientinnen mit einer Missed abortion die Schicht der Synzytiotrophoblasten oft sehr dünn ist und dass die Zytotrophoblasten abgeflacht sind (Jauniaux, Hempstock et al. 2003).

Der Synzytiotrophoblast ist weiterhin auch an der Produktion von Hormonen beteiligt, die lebensnotwendig für eine vitale Schwangerschaft sind. Dazu gehören z.B. das  $\beta$ -hCG (Chardonens, Cameo et al. 1999) und die Wachstumsfaktoren VEGF (vascular endothelial growth factor) und PlGF (placenta growth factor). Der Beginn der Produktion von  $\beta$ -hCG ist deckungsgleich mit der Bildung des Synzytiotrophoblasten (Kliman, Nestler et al. 1986).

## 1.4 Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor

Erythropoetin (Epo) ist ein Glykoprotein-Hormon mit einem Molekulargewicht von zirka 30 kDa. Es besteht aus 165 Aminosäuren und vier Kohlehydratgruppen. Wichtig für die molekulare Struktur sind die zwei Disulfidbrücken, die das Molekül Epo stabilisieren und es ihm ermöglichen, an den Epo-Rezeptor zu binden. Werden diese Brücken gespalten, verliert das Molekül seine biologische Aktivität (Tilbrook and Klinken 1999), (Lappin 2003).

**Abbildung 4:** Struktur von Erythropoetin



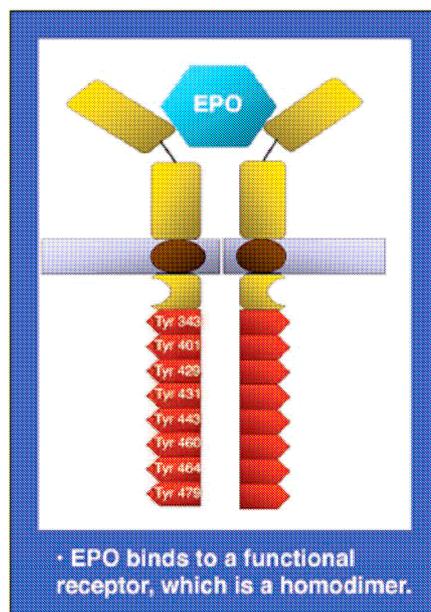
Legende: Struktur von Erythropoetin (Lappin 2003) "The cellular biology of erythropoietin receptors." Oncologist **8 Suppl 1**: 15-8.

Erythropoetin wird, induziert durch eine arterielle Hypoxie, in der adulten Niere produziert. Es fördert die Proliferation und Entdifferenzierung von erythroiden Vorläuferzellen (Kim, Bogic et al. 2001). Aufgaben von Erythropoetin sind die Kontrolle der Erythropoese im Knochenmark und der Schutz von zentralen Neuronen vor hypoxischen Schäden (Yasuda, Masuda et al. 1998), (Acs, Xu et al. 2004). Wird zu wenig Erythropoetin produziert, kann der Hämoglobin-Wert auf unter 8 g/dl fallen, was zu einer Anämie mit Symptomen wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit führt. Bei zu hohen Konzentrationen von Erythropoetin werden hingegen zu viele Erythrozyten produziert. Diese Erkrankung nennt sich Polycytämie und kann durch die erhöhte Viskosität des Blutes zu Gefäßverschlüssen führen (Lappin 2003).

Das Gehirn produziert eine eigene Unterform des Erythropoetins, welches ein wenig kleiner ist als das renale. Dies wirkt auf umliegende Zellen (parakrin), aber auch auf die produzierenden Zellen selbst (autokrin) (Lappin 2003).

Der Erythropoetin-Rezeptor gehört zur Superfamilie der Zytokinrezeptoren, die sich alle strukturell ähneln (Tilbrook and Klinken 1999). Er besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne. Die Signalweiterleitung nach Bindung von Erythropoetin an seinen Rezeptor erfolgt mittels Tyrosinphosphorylierung, welche eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt (Lappin 2003). Die Expression des Erythropoetin-Rezeptors wurde bereits in folgenden Geweben nachgewiesen: Epikard, Perikard und Endothelzellen (Anagnostou, Liu et al. 1994), Milz und Lunge (Fandrey and Bunn 1993), zentrales Nervensystem, Zervix, Endometrium und Ovar (Yasuda, Fujita et al. 2001) und in Trophoblastzellen von Plazenten des ersten Trimenon (Conrad, Benyo et al. 1996).

**Abbildung 5:** Struktur des Erythropoetin-Rezeptors



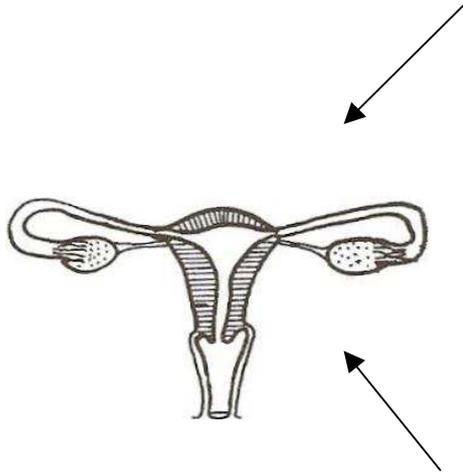
Legende: Struktur des Erythropoetin-Rezeptors (Lappin 2003) "The cellular biology of erythropoietin receptors." Oncologist **8 Suppl 1**: 15-8.

Die Quelle des zirkulierenden Erythropoetins sowie dessen nicht-erythropoetische Funktionen blieben für lange Zeit unbekannt. Zu ihnen zählt z.B. die Förderung der Entwicklung der Plazenta und des Feten während der (Früh-)Schwangerschaft.

Maternales Erythropoetin kann die Plazentaschranke nicht überwinden (Schneider and Malek 1995). Beim Feten ist nicht die Niere die primäre Quelle des zirkulierenden fetalen Erythropoetins, sondern die Leber (Fahnenstich and Dame 1996). Bei Feten mit bilateraler Nierenagenesie waren bei der Geburt normale

Erythropoetin-Werte im Plasma messbar (Widness, Schmidt et al. 1995). Es ist aber durchaus möglich, dass auch noch andere Erythropoetin-Quellen bestehen.

**Abbildung 6:** Wirkungen von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor auf den Genitaltrakt des Menschen und der Maus.



**Mensch:**

Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor Expression spielen eine signifikante Rolle in der Karzinogenese und Tumorprogression von Cervix- und Endometrium Karzinomen (Acs, Zhang et al. 2003), (Acs, Xu et al. 2004).

Im Endometrium steigt die Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor Expression während des Zyklus an und erreicht ein Maximum am Ende der sekretorischen Phase (Acs, Xu et al. 2004).

Erythropoetin spielt eine Rolle bei der Angiogenese im Rahmen der Umwandlung des funktionellen Endometriums während des weiblichen Zyklus. Dies geschieht nicht systemisch, sondern autokrin/parakrin. Steroide aus dem Ovar könnten dabei die Erythropoetin-Produktion stimulieren (Yokomizo, Matsuzaki et al. 2002), (Sasaki, Masuda et al. 2000).

Eine Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor Expression wurde auch in peritonealen Endometrioseherden gefunden. Es liegt nahe, dass Erythropoetin eine Rolle in der Pathophysiologie der Endometriose spielen könnte (Matsuzaki, Canis et al. 2003).

In Uterusmyomen wurde ebenso eine Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor Expression nachgewiesen, sodass man auch hier von einem Effekt in der Angiogenese von Myomen ausgehen kann (Pollio, Staibano et al. 2005).

**Maus:**

Die hypoxisch induzierte Produktion von Erythropoetin im Mausuterus ist auf die Anwesenheit von  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) angewiesen (Masuda, Kobayashi et al. 2000).

In den Maustuben ist eine hypoxisch induzierte Erythropoetin mRNA Expression nachweisbar, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von  $E_2$ . Sowohl die Ampulle als auch der Isthmus der Tube produzieren Erythropoetin. Eventuell spielt Erythropoetin auch eine Rolle bei der Befruchtung und der Spermienkapazitation (Masuda, Kobayashi et al. 2000).

Auch im Mausovar lässt sich eine Erythropoetin mRNA Expression nachweisen, die  $E_2$ -induzierte Stimulation wurde aber nur in den Tuben gefunden (Masuda, Kobayashi et al. 2000).

Legende: Wirkungen von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor auf den Genitaltrakt des Menschen und der Maus. Nach Haag, P., N. Hanhart, et al. (2003). Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis. Breisach am Rhein, Medizinische Verlags- und Informationsdienste: p 47.

## 1.5 Leptin-Rezeptor

Leptin, abgeleitet aus dem Griechischen λεπτος (leptos) für dünn (Sabogal and Munoz 2001), wurde ursprünglich als ein von Adipozyten abstammendes Protein identifiziert und ist zuständig für die Sättigungsregulierung und den Energiehaushalt im menschlichen Körper (Toth, Hornung et al. 2007). Im Jahre 1997 entdeckten Masuzaki et al., dass auch die Plazenta in der Lage ist, Leptin zu produzieren (Masuzaki, Ogawa et al. 1997). Zwei Jahre später fanden Bodner et al. eine Leptin-Rezeptor mRNA Expression in der Plazenta die während der Schwangerschaft ansteigt (Bodner, Ebenbichler et al. 1999).

Der Leptin-Rezeptor gehört zur Klasse I der Zytokinrezeptor-Superfamilie (Tartaglia 1997). Die genetische Sequenz stimmt zu mehr als 70% bei den bereits untersuchten Spezies (Maus, Mensch) überein (Ruiz-Cortes, Men et al. 2000). Leptin-Rezeptoren wurden bereits im Hypothalamus und in gonadotropen Zellen der Hypophyse bei Ratten und Mäusen (Jin, Zhang et al. 2000), in interstitiellen Zellen des menschlichen Ovars (Karlsson, Lindell et al. 1997) und im Endometrium nachgewiesen (Kitawaki, Koshiba et al. 2000). Zudem konnten Hoggard et al. zeigen, dass auch der plazentare Trophoblast Leptin und Leptin-Rezeptoren exprimiert. Dieses Leptin trägt zur schwangerschaftsassozierten Hyperleptinämie bei, die besonders im zweiten und dritten Trimenon nachweisbar ist. Die Leptinproduktion könnte dabei autokrin und parakrin die Proliferation und Differenzierung des Trophoblasten regulieren (Hoggard, Hunter et al. 1997). Die plazentare Leptinproduktion in den Zotten ist allerdings im ersten Trimenon höher als im dritten (Masuzaki, Ogawa et al. 1997).

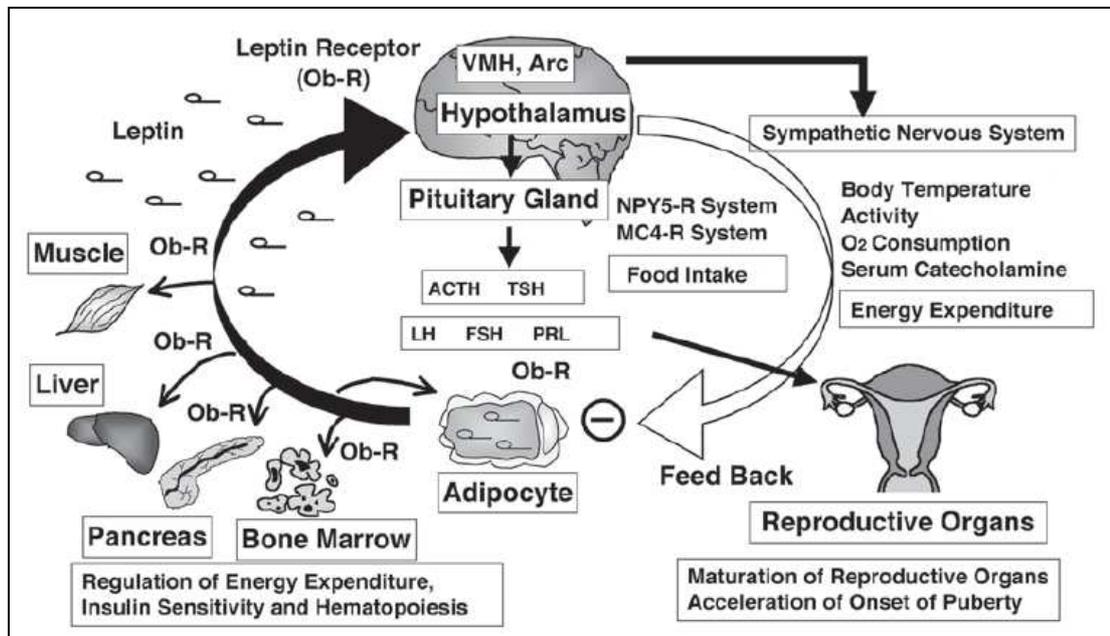
Sagawa et al. untersuchten 1997 die Expression von Leptin bei Blasenmolen. Sie fanden dabei eine erhöhte Expression von Leptin in Trophoblastzellen, weshalb sie Leptin eine pathophysiologische Rolle als lokaler Regulator bei Blasenmolen zusprachen (Sagawa, Mori et al. 1997).

Der Leptin-Rezeptor besitzt diverse Unterformen, z.B. Ob-Ra, Ob-Rb and Ob-Re. Ob-Re ist eine lösliche Form des transmembranen Rezeptors (Lewandowski, Horn et al. 1999). Die langen Unterformen sind für die Signaltransduktion zuständig. Die lange Form des Leptin-Rezeptors funktioniert ähnlich wie ein Zytokinrezeptor (Hassink, de Lancey et al. 1997) und wurde in Lunge, Niere, Leber und Skelettmuskulatur (Tartaglia, Dembski et al. 1995), sowie im Herzen, in Plazenta,

Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Ovar, Dünn- und Dickdarm nachgewiesen (Cioffi, Shafer et al. 1996).

Leptin wirkt sich auf zahlreiche Systeme des menschlichen Körpers aus, einige Beispiele sind in Abbildung 7 aufgeführt.

**Abbildung 7:** Physiologische Funktionen von Leptin



Legende: Physiologische Funktionen von Leptin. (Sagawa, Yura et al. 2002) "Possible role of placental leptin in pregnancy: a review." *Endocrine* **19**(1): 65-71.

Etwa 50% des zirkulierenden Leptins ist an Plasmaproteine gebunden. Dies ist der entscheidende Faktor für den steady-state der Plasma-Leptinwerte (Toth, Hornung et al. 2007). Die Plasma-Leptinwerte korrelieren dabei direkt mit den im Körper gemessenen Fettdepots (Hassink, de Lancey et al. 1997).

Weitere Studien haben nachgewiesen, dass Leptin auch bei der Angiogenese (Bouloumie, Drexler et al. 1998), bei Entzündungsprozessen, der Hämatopoese, der Immunmodulation (Fantuzzi and Faggioni 2000) und der Fortpflanzung (Mantzoros 2000) eine wichtige Rolle spielt. Es steigert dosisabhängig die Expression von immunoreaktiver MMP-2 (Matrixmetalloproteinase) und fFN (fetales Fibronectin) und verstärkt die Aktivität von MMP-9 in kultivierten Zytotrophoblastzellen (Sagawa, Yura et al. 2002), (Castellucci, De Matteis et al. 2000). Ausserdem beeinflusst es den Glukosemetabolismus, indem es die Insulinsensitivität erhöht (Sagawa, Yura et al. 2002).

Umgekehrt erhöht Insulin die Leptinproduktion (Wabitsch, Jensen et al. 1996). Dies könnte zum Abfall der Plasmaleptinwerte während des Fastens beitragen und

könnte deshalb die Hyperleptinämie erklären, die bei einer peripheren Insulinresistenz besteht (Mantzoros 1999).

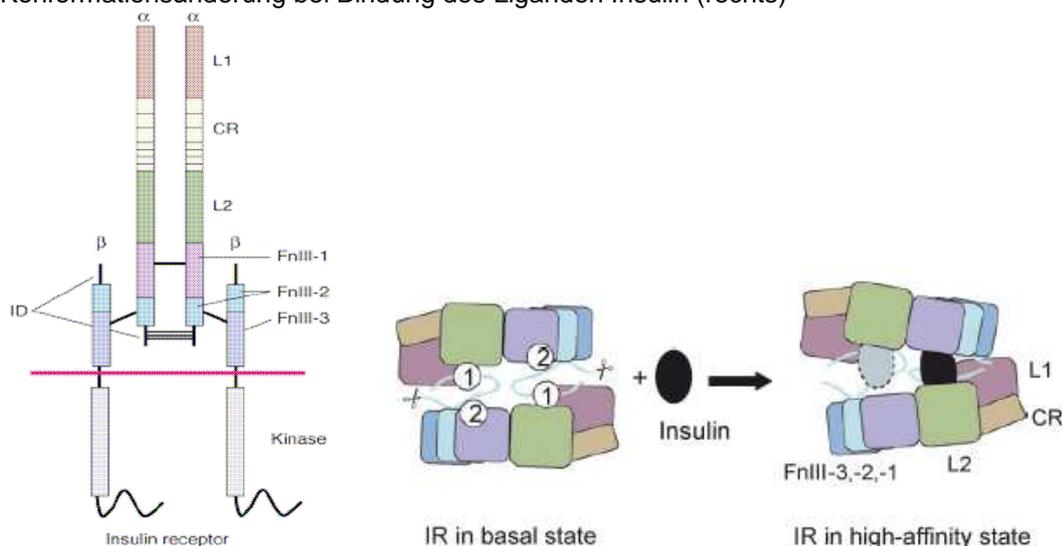
Es wird deutlich, dass Leptin und Insulin sich wechselseitig beeinflussen. Yamashita et al. konnten nachweisen, dass schwangere Mäuse mit einer bestehenden Mutation des Leptin-Rezeptors, einen schwangerschafts-assoziierten Diabetes mellitus entwickeln (Yamashita, Shao et al. 2001). Möglicherweise ist eine Dysregulation des Leptin- und Insulin-Metabolismus an der Pathogenese einer gestörten Schwangerschaft mit beteiligt. Die Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor Expression sind mögliche Parameter für eine endokrine Kontrolle auf plazentarer und fetaler Ebene.

## 1.6 Insulin-Rezeptor

Das Protein Insulin wird in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas produziert. Es besteht aus einer A-Kette mit 21 Aminosäuren und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren, die über 2 Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Insulin ist bekannt für seine Steigerung der anabolen Stoffwechselfvorgänge im Körper, wie z.B. die Glykogen-, Lipid- und Proteinbiosynthese (Renz-Polster and Braun 2000). Wird Insulin nicht mehr produziert (absoluter Insulinmangel) oder besteht eine Insulinresistenz im peripheren Gewebe (relativer Insulinmangel), spricht man vom Krankheitsbild des Diabetes mellitus (Herold 2004).

Der Insulinrezeptor ist ein Glykoprotein, das zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren gehört. Die Hauptaufgabe des Rezeptors liegt in der Regulierung metabolischer Prozesse. Dies unterscheidet ihn von anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren, die hauptsächlich für Zellwachstum und –differenzierung zuständig sind (Lee and Pilch 1994). Der Insulin-Rezeptor besitzt zwei extrazelluläre  $\alpha$ -Einheiten (135 kDa) und zwei  $\beta$ -Einheiten (95 kDa). Die  $\alpha$ -Einheit bindet den Liganden (Insulin) und die  $\beta$ -Einheit leitet das Signal in die Zelle weiter (Zick 1989), (Leconte, Auzan et al. 1992). Nachgewiesen wurde der Insulinrezeptor in zahlreichen Geweben, z.B. innerhalb der Plazenta im villösen Trophoblasten und im Endothel der fetalen Gefäße (Desoye, Hartmann et al. 1997).

**Abbildung 8:** Struktur des Insulin-Rezeptors mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten (links) und Konformationsänderung bei Bindung des Liganden Insulin (rechts)



Legende: Struktur des Insulin-Rezeptors mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten (links) und Konformationsänderung bei Bindung des Liganden Insulin aus (Ward, Lawrence et al. 2007) "The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation." *Trends Biochem Sci* **32**(3): 129-37. und (Ward, Lawrence et al. 2008) "Structural insights into ligand-induced activation of the insulin receptor." *Acta Physiol (Oxf)* **192**(1): 3-9.

Der Plasma-Insulinwert steigt im Verlauf der Schwangerschaft an (Desoye, Schweditsch et al. 1987) und die Glukosetoleranz im Gewebe ist reduziert (Kuhl 1975). Dies legt ein vermindertes Ansprechen des insulin-sensitiven Gewebes nahe (Yamashita, Shao et al. 2000). Der Mechanismus dieses verminderten Ansprechens liegt auf der Rezeptorebene, betrifft also das Binden des Liganden Insulin an dessen Rezeptor (Lazaro, Garcia et al. 2002).

Vor allem im Zusammenhang mit schwangerschaftsassoziertem Diabetes mellitus wurden die Wirkungen von Insulin und des Insulin-Rezeptors bereits in diversen Studien untersucht. Beim Krankheitsbild des Gestationsdiabetes ist die Bindung von Insulin an den Insulin-Rezeptor vermindert, die Affinität zum Rezeptor bleibt jedoch gleich (Duran-Garcia, Nieto et al. 1979). Desoye et al. fanden eine erhöhte Expression der Insulinrezeptoren in Synzytiotrophoblasten von Patientinnen mit Gestationsdiabetes, die diätetisch eingestellt waren (Desoye, Hofmann et al. 1992).

## **1.7 Zielsetzung**

Die hier beschriebenen Faktoren sind nach dem jetzigen Stand der Forschung wichtig in der Physiologie einer Schwangerschaft. Eine erfolgreiche Implantation erfordert ein Gleichgewicht zwischen Koagulation, Fibrinolyse und Angiogenese (Buchholz and Thaler 2003). Wie in der Einführung dargestellt scheinen Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor, Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor hierbei eine wichtige Rolle spielen. Daher konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung der Expression auf Protein und mRNA-Ebene von Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor, Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor in der normalen und gestörten Frühschwangerschaft, insbesondere bei (rezidivierenden) Aborten sowie Blasenmolen.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Material

Das verwendete Gewebe für die Immunhistochemie stammt aus archivierten Gewebeblöcken von Patientinnen, die sich in der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Campus Maistrasse, einer therapeutischen Kürettage unterzogen. Indikation für diese Kürettage war entweder eine Missed abortion, die Diagnose einer Blasenmole, ein medizinisch indizierter Abort oder ein gewünschter Schwangerschaftsabbruch nach §218 StGB. Das frische RNA-Gewebe stellte uns freundlicherweise die Praxis Friedrich Stapf in München zur Verfügung.

Die induzierten Aborte sowie die Abruptiones wurden zur Kontrollgruppe zusammengefasst, während die Abortgruppe und die Gruppe der Blasenmolen die Studiengruppen darstellten. Das Gewebe stammte jeweils aus den Schwangerschaftswochen 6-12.

Genehmigt wurde diese Dissertation durch die Ethikkommission (Projektnummer: 337-06)

Demographische und klinische Daten der Studienpatientinnen sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3:** Demographische und klinische Daten der Studienpatientinnen

	<b>Normale Schwangerschaft n=14</b>	<b>Abort n=14</b>	<b>Blasenmole n=14</b>
<b>Mütterliches Alter</b>	27.6 ± 7.4 (16-43)	30.9 ± 6.0 (22-41)	31.0 ± 5.1 (23-40)
<b>SSW</b>	8.6 ± 1.8 (6-12)	8.9 ± 1.8 (6-12)	8.9 ± 1.7 (6-12)
<b>Gravidität</b>	2.6 ± 1.5 (1-6)	2.8 ± 1.6 (1-7)	2.0 ± 1.1 (1-4)
<b>Parität</b>	0.9 ± 1.0 (0-3)	0.6 ± 1.4 (0-5)	0.4 ± 0.5 (0-1)

Insgesamt wurden 42 histologische Präparate pro Antikörper gefärbt, d.h. 168 Schnitte insgesamt sowie die jeweiligen Positivkontrollen. Die genaue Menge der Schnitte pro SSW ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Als Positivkontrolle wurde für Erythropoetin (Epo) Nierengewebe verwendet, für den Erythropoetin-Rezeptor (Epo-R) spätsekretorisches Endometrium. Terminplazenten dienten als Positivkontrollen für den Leptin- und Insulin-Rezeptor. Für Letzteren wurden zusätzlich Schnitte aus Pankreasgewebe mitgefärbt.

**Tabelle 4:** Menge der histologischen Schnitte

Schwangerschaftswoche	Menge der Schnitte		
	Kontrolle	Abort	Blasenmole
6. Woche	2	1	1
7. Woche	1	3	2
8. Woche	3	2	3
9. Woche	3	3	3
10. Woche	2	2	2
11. Woche	2	2	2
12. Woche	1	1	1
	n=14	n=14	n=14

## 2.1.2 Aufbereitung der Paraffinschnitte

Von den archivierten Paraffinblöcken wurden mit Hilfe des Schlittenmikrotoms jeweils 2-3 µm dicke Gewebeschnitte gewonnen und nach Glättung im Streckbad in 45°C warmen destillierten Wasser auf speziell für die Immunhistochemie beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Fa. Langenbrinck) aufgezogen. Um eine bessere Haftung zu gewährleisten, wurden die Schnitte zusätzlich zur Beschichtung über Nacht bei 56-58°C im Brutschrank getrocknet. Bis zur eigentlichen immunhistochemischen Versuchsreihe wurden die Schnitte nummeriert und in Objektträgermappen aufbewahrt.

**Abbildung 9:** Gebrauchslösungen

3%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für Paraffinschnitte: 150 ml Methanol + 4,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Natrium-Citratpuffer: 18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B + 900 ml Aqua dest.:

- Lösung A: 21,01g 0,1M Citronensäure + 1l Aqua dest.
- Lösung B: 29,41g 0,1M Na-Citrat + 1l Aqua dest.
- 

Vectastain Elite IgG-Kits:

- Blockierungsserum: 3 Tropfen Normalserum + 10ml steriles PBS
- Sekundärantikörper: 3 Tropfen Normalserum + 1 Tropfen Anti-mouse-IgG (bzw. Anti-rabbit, Anti-sheep) + 10ml Dako-Verdünnungsmedium
- ABC-Komplex: 4 Tropfen Reagenz A + 4 Tropfen Reagenz B + 10ml steriles PBS (30 min vor Gebrauch ruhen)

DAB (3,3 Diaminobenzidin): 3 Tropfen DAB Chromogen + 3ml Pufferkonzentrat

## 2.2 Immunhistochemie

### 2.2.1 Prinzip der Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Spezifität von Antikörpern, mit deren Hilfe man die Verteilung von Antigenen im histologischen Schnitt sichtbar machen kann.

Im histologischen Schnitt binden die Antikörper das für sie spezifische Antigen an dessen Ursprungsort. Um diese Bindung sichtbar zu machen, werden sekundäre, markierte Antikörper eingesetzt, die wiederum an den primären Antikörper gekoppelt sind. Markiert werden die sekundären Antikörper mit Farbstoffen oder Enzymen. Bindet nun also der gekoppelte primäre Antikörper an sein Antigen, kann man diese Bindung histochemisch sichtbar machen (Noll and Schaub-Kuhnen 2000).

### 2.2.2 Antikörper

Der Erythropoetin-Antikörper (Epo), der Erythropoetin-Rezeptor-Antikörper (Epo-R) sowie der Insulin-Rezeptor-Antikörper (CD 220) wurden von der Firma AbD Serotec, Oxford, Großbritannien bezogen. Der Leptin-Rezeptor-Antikörper ist ein Produkt der Firma R&D Systems, Minneapolis, USA. Eine Übersicht ist in Tabelle 5 zu finden.

**Tabelle 5 :** Verwendete Antikörper, deren Verdünnung und Hersteller

Antikörper	Isotyp	Klon	Verdünnung	Hersteller
Erythropoetin	Kaninchen IgG	Polyklonal	1 : 400	AbD Serotec, Oxford, UK
Erythropoetin-Rezeptor	Schaf IgG	Polyklonal	1 : 1000	AbD Serotec, Oxford, UK
Leptin-Rezeptor	Ziege IgG	Polyklonal	1 : 1000	R&D Systems, Minneapolis, USA
Insulin-Rezeptor	Kaninchen IgG	AHP 1216	1 : 20	AbD Serotec, Oxford, UK

## 2.2.3 Avidin-Biotin-Methode

Die immunhistochemische Darstellung erfolgte nach der Avidin-Biotin-Methode. Diese Technik beruht auf der Affinität von Avidin zu Biotin. Avidin ist ein Glykoprotein, das aus Hühnereiweiß gewonnen wird. Es besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin. Aufgrund unspezifischer Reaktionen wird nun auf gentechnologischen Wege ein reineres Produkt, das Streptavidin, gewonnen. Es wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert.

Für die Avidin-Biotin-Methode wird ein biotinylierter (mit Biotin markierter) Brückenantikörper verwendet. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, das leicht an den Brückenantikörper gekoppelt werden kann und so die Verbindung zum ABC-Komplex herstellt. An den biotinylierten Brückenantikörper kann nun der ABC-Komplex (siehe Abbildung 9) binden. An drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins wird je ein Molekül Biotin gebunden. An diesen Komplex wird ein Enzym gekoppelt, in diesem Fall Peroxidase.

Dadurch kommt es zu einer Farbreaktion, da das Enzym Peroxidase und dem jeweiligen Chromogen (DAB) ein Farbprodukt bildet. Katalysator bei dieser Reaktion ist  $H_2O_2$  (Noll and Schaub-Kuhnen 2000).

**Abbildung 10:** Der Avidin-Biotin-Komplex



Legende: Avidin-Biotin-Komplex (schematisch); modifiziert nach Noll, S. and S. Schaub-Kuhnen (2000). Praxis der Immunhistochemie. München, Jena, Urban & Fischer Verlag: pp. 17-18.

Nach Entparaffinierung der Schnitte, Freilegung der Bindungsstellen durch Hitzevorbehandlung oder Proteinase K und Hemmung der unspezifischen Hintergrundreaktion mit Normalserum von Kaninchen, Schaf oder Maus wurden die Schnitte in folgender Reihenfolge inkubiert:

1. Primärantikörper
2. Biotinylierter Sekundärantikörper
3. Vectastain ABC-Reagenz
4. Peroxidasesubstrat Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)

## 2.2.4 Schema der immunhistochemischen Färbung

1. Schnitte entparaffinieren für 15 Minuten in Xylol
2. Blockierung der endogenen Peroxidase durch 3%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT)
3. Schnitte hydratisieren
4. Für Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor:  
Demaskierung durch Hitzevorbehandlung mit Na-Citratpuffer pH 6,0 für 5 Minuten  
Für Leptin-Rezeptor:  
Demaskierung mit Proteinase K, Fa. Qiagen, Verdünnung 1:1000 in destilliertem H<sub>2</sub>O für 30 Minuten bei RT  
Für Insulin-Rezeptor:  
Demaskierung durch Hitzevorbehandlung mit EDTA-Puffer pH 9,0 für 5 min
5. Spülen in PBS-Puffer, pH 7,4
6. Für Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor:  
Inkubation mit verdünntem Blockierungsserum für 20 Minuten bei RT  
Für Leptin-Rezeptor:  
Inkubation mit Ultra V Block, Fa. Lab Vision, für 45 Minuten bei RT
7. Abkippen des Blockierungsserums, bzw. des Ultra V Blocks, nicht spülen  
Für Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor und Leptin-Rezeptor:  
Inkubation mit der Primärantikörperlösung für 60 Minuten bei RT  
Für Insulin-Rezeptor:  
Inkubation der Schnitte mit der Primärantikörperlösung für 16 Std bei 4°C
8. Spülen in PBS-Puffer
9. Inkubation mit verdünntem biotinylierten Zweitantikörper für 30 min bei RT
10. Spülen in PBS-Puffer
11. Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex für 30 Minuten bei RT
12. Spülen in PBS-Puffer
13. Substratfärbung mit DAB + Chromogen, Fa. Dako, für 2 Minuten bei RT
14. Spülen mit Aqua dest.
15. Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer für 2 min, anschließend in Leitungswasser bläuen für 5 min
16. Aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
17. Eindecken mit Eukitt

## 2.2.5 Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mit einem Leitz Fotomikroskop (Wetzlar, Deutschland) ausgewertet. Die jeweiligen Zellen wurden erst mit geringer Vergrößerung (10x) aufgesucht und danach mit stärkerer Vergrößerung (25x)

bewertet. Zur mikroskopischen Auswertung wurde der Immunoreaktive Score (IRS-Score) verwendet. (Remmele and Stegner 1987) Dieser semiquantitative Score berücksichtigt die beiden Parameter Färbeintensität (staining intensity = SI) und Prozentsatz der immunhistochemisch positiv angefärbter Zellen (PP) und setzt sie beide miteinander ins Verhältnis.

Färbeintensität (SI) der betrachteten Zellen:

- 0 = keine Farbreaktion
- 1 = schwache Färbeintensität
- 2 = mäßige Färbeintensität
- 3 = starke Färbeintensität

Prozentsatz positiv angefärbter Zellen:

- 0 = keine positiven Zellen
- 1 = < 10 % positive Zellen
- 2 = 10-50 % positive Zellen
- 3 = 51-80 % positive Zellen
- 4 = > 80 % positive Zellen

Für die Berechnung des IR-Scores wurde nun die Färbeintensität mit dem Prozentsatz der gefärbten Zellen multipliziert; der IR-Score konnte demnach Werte von 0 bis 12 annehmen.

Es ergaben sich folgende Expressionsgrade:

- 0 = keine Expression
- 1-3 = schwache Expression
- 4-8 = mäßige Expression
- 9-12 = starke Expression

Mit Hilfe eines Digitalkamera-Systems der Firma JVC (Japan) konnten Fotoaufnahmen der gefärbten Zellen erstellt und als jpeg-Datei auf dem PC gespeichert werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows® (Social Sciences Computer Software Version 15; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Der Mann-Whitney-U-Test wurde zum Vergleich der Werte der IRS-Scores angewandt. Verglichen wurden jeweils die Kontrollen mit den Aborten, sowie die Kontrollen mit den Blasenmolen. Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

## 2.3 Real Time Reverse Transcription-PCR

### 2.3.1 Prinzip der Real Time RT-PCR

Die Real Time RT-PCR, oder auch quantitative Echtzeit-RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Ketten-Reaktion beruht. Zusätzlich ist hierbei jedoch die gleichzeitige Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich. Diese Quantifizierung wird durch Fluoreszenz-Messungen vorgenommen, die bereits während des PCR-Zyklus erfasst werden. Die entstehende Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu (Holzapfel 2007).

### 2.3.2 RNA-Extraktion und Reverse Transkription

Es wurde plazentares Gewebe von 6 Aborten und ebenso 6 Abruptiones der 7. – 12. SSW für die Extraktion der mRNA aufbereitet.

Die Gewinnung der mRNA aus dem Gewebe verlief nach folgendem Protokoll:

- 1) 15 ml Flacon mit 1 ml Quiazol Lysis Reagenz füllen um die Zellen zu lysieren. Danach ca. 80 mg plazentares Gewebe hineingeben
- 2) Gewebe auf Eis mit Ultraschall zerkleinern und bei RT 5 min stehen lassen
- 3) 200 µl Chloroform hinzufügen, schütteln und danach 3 min bei RT stehen lassen
- 4) 15 min zentrifugieren

Es entstehen drei Phasen: obere/farblose= RNA, mittlere/weisse= Interphase, untere/rote= organische Phase

Die nun extrahierte mRNA wurde nach Standardprotokoll mit dem NucleoSpin® RNAII Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) weiterbehandelt. Um eine RT-PCR durchführen zu können, musste die vorhandene mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkription wurde mit dem „High capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland, durchgeführt. Nach dem Standardprotokoll am Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland, waren die Zyklen wie folgt: 10 min bei 25°C, 2 h bei 37°C, 5 s bei 85°C, danach bei 4°C auf hold.

### 2.3.2 Real Time RT-PCR nach TaqMan®

Die Real Time Reverse Transcription-PCR wurde in einer Mikrotiter-Platte mit insgesamt 96 wells durchgeführt. In jedes well wurde ein Volumen von 20 µl pipettiert. Dieses setzte sich zusammen aus je 1 µl TaqMan® Gene Expression Assay Mix 20fach konzentriert, 10 µl TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 2fach konzentriert (beide Firma Applied Biosystems, Weiterstadt), 1 µl Template für Epo und Epo-R und 2 µl Template für Leptin-R und Insulin-R. Auf insgesamt 20 µl Gesamtvolumen wurde mit H<sub>2</sub>O (DEPC behandeltes DI Wasser der Firma Sigma, Taufkirchen, Deutschland) aufpipettiert.

**Tabelle 6:** Pipettierschema für die Mikrotiter-Platte der RT-PCR

	Menge für 1 Reaktion (pro well)
TaqMan® Gene Expression Assay Mix	1 µl
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	10 µl
Template = Probe	je 1 µl für Epo und Epo-R je 2 µl für Leptin-R und Insulin-R
H <sub>2</sub> O	je 8 µl für Epo und Epo-R je 7 µl für Leptin-R und Insulin-R
Total	20 µl

Die Thermozyklen im Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR-Gerät verliefen wie folgt: 20 s bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen Amplifikation mit 3 s bei 95 °C und 30 s bei 60 °C.

Die Quantifizierung erfolgte mit der 2<sup>-ΔΔCt</sup>-Methode mit Glyceraldehydphosphat-dehydrogenase (GAPDH) als Housekeeping-Gen.

Die Berechnung wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Schritt: Normalisierung auf die endogene Kontrolle (GAPDH)

$$Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Housekeeping-Gen}) = \Delta Ct$$

2. Schritt: Normalisierung auf die Kalibratorprobe (Kontrollgruppe)

$$\Delta Ct (\text{Probe}) - \Delta Ct (\text{Kalibrator}) = \Delta \Delta Ct$$

3. Schritt: Formel zur relativen Quantifizierung

$$2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows® (Social Sciences Computer Software Version 15; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Der Mann-Whitney-U-Test wurde zum Vergleich der Werte angewandt. Verglichen wurden jeweils die Kontrollen mit den Aborten. Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

## **2.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung**

### **2.4.1 Prinzip der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung**

Zur weiteren Charakterisierung der plazentaren Zellen wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung an Gefrierschnitten von Ersttrimesterplazenten durchgeführt. Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung ist eine anschauliche Methode, um die simultane Expression zweier Proteine nachzuweisen. In unserem Fall fungierte Cytokeratin 7 als spezifischer Marker für extravillöse Trophoblasten und Prolaktin für deziduale Drüsenzellen.

### **2.4.2 Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung**

Zuerst wurden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Objektträger mit Alufolie zugedeckt und danach 10 min bei RT aufgetaut. Anschliessend wurden sie ca. 20 min getrocknet. Daraufhin folgte eine Fixierung mit Aceton für 5 min bei RT und ein abermaliges Trocknen der Präparate mit anschließender Spülung in PBS 3x 2 min.

Zur Absättigung elektrostatischer Ladungen von Proteinen, wodurch eine unspezifische Anfärbung verhindert werden sollte, wurden die Schnitte 15 min bei RT mit Ultra V Block inkubiert. Das Blockierungsserum wurde nur abgeklopft, nicht mit PBS gespült, um die Bindungsstellen nicht wieder freizulegen. Nun wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern inkubiert.

Der Erythropoetin-Antikörper wurde 1:400 und der Erythropoetin-Rezeptor-Antikörper 1:1000 verdünnt und für jeweils 60 min bei RT auf die Schnitte aufgetragen. Der Leptin-Antikörper wurde 1:2000 und der Insulin-Antikörper 1:20 verdünnt und über Nacht (ca. 16 h) im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut 3x 2 min mit PBS gespült. Nun wurden die Schnitte mit dem Antikörper für Cytokeratin 7 bzw. für Prolaktin inkubiert.

Für die Schnitte mit Erythropoetin-, Erythropoetin-Rezeptor- und Leptin-Rezeptor-Antikörper wurde CK7 1:100 verdünnt, für den Insulin-Rezeptor-Antikörper 1:30. Anschliessend wurden die Schnitte für 60 min bei RT inkubiert. Prolaktin wurde für den Insulin-Rezeptor und Leptin-Rezeptor 1:500 verdünnt und ebenfalls 60 min bei RT inkubiert. Danach wurde wieder 3x 2 min mit PBS gespült.

Ab jetzt wurde im Dunklen gearbeitet, da die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Antikörper markiert sind, bei Helligkeit ausbleichen. Die Sekundärantikörper waren jeweils mit den Farbstoffen Cy2 (grün) oder Cy3 (rot) markiert. Sie wurden gemischt und für Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor 40 min und für den Leptin- sowie Insulin-Rezeptor 30 min bei RT inkubiert.

Es wurde folgendes Inkubationsschema eingehalten:

- Erythropoetin:  
Ziege-Anti-Kaninchen Cy3 1:300  
CK7: Ziege-Anti-Maus Cy2 1:100
- Erythropoetin-Rezeptor:  
Esel-Anti-Schaf Cy3 1:200  
CK7: Ziege-Anti-Maus Cy2 1:100
- Leptin-Rezeptor:  
Ziege-Anti-Maus Cy2 1:100  
CK7: Ziege-Anti-Kaninchen 1:500 und Prolaktin: Ziege-Anti-Kaninchen Cy3 1:500
- Insulin-Rezeptor:  
Ziege-Anti-Kaninchen Cy2  
CK7: Ziege-Anti-Maus Cy3 1:500 und Prolaktin: Ziege-Anti-Maus Cy3 1:500

Anschliessend wurden die Schnitte nochmals mit PBS für 3x 2 min gespült und dann im Dunkeln getrocknet. Eingedeckt wurden die Schnitte mit Mounting Medium für Fluoreszenz mit dem Kernfarbstoff DAPI (4,6Diamino-2-Phenylindol) der Firma Vector, Burlingame, USA.

**Tabelle 7: verwendete Antikörper der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung**

<b>Antikörper</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Erythropoetin</b>	Kaninchen IgG	Polyklonal	1 : 400	AbD Serotec, Oxford, UK
<b>Erythropoetin-Rezeptor</b>	Schaf IgG	Polyklonal	1 : 1000	AbD Serotec, Oxford, UK
<b>Leptin-Rezeptor</b>	Ziege IgG	Polyklonal	1 : 2000	R&D Systems, Minneapolis, USA
<b>Insulin-Rezeptor</b>	Kaninchen IgG	AHP 1216	1 : 20	AbD Serotec, Oxford, UK
<b>CK7 für Epo, Epo-R, Insulin-R</b>	Maus IgG	OV-TL 12/30	1 : 30	Novocastra, Berlin, Deutschland
<b>CK7 für Leptin-R</b>	Kaninchen IgG	Polyklonal	1:100	Santa Cruz Biotechnology, USA
<b>Prolaktin für Leptin-R</b>	Kaninchen IgG	Polyklonal	1 : 500	Dako, Glostrup, Dänemark
<b>Prolaktin für Insulin-R</b>	Maus IgG	MCA 712	1:500	AbD Serotec, Oxford, UK
<b>Ziege-anti-Maus Cy3</b>	Ziege IgG für CK7, Prolaktin	Polyklonal	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
<b>Ziege-anti-Kaninchen Cy2</b>	Ziege IgG für Insulin-R	Polyklonal	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
<b>Ziege-anti-Maus Cy2</b>	Ziege IgG für CK7, Leptin-R	Polyklonal	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
<b>Ziege-anti-Kaninchen Cy3</b>	Ziege IgG für CK7, Epo, Prolaktin	Polyklonal	1:300	Dianova, Hamburg, Deutschland
<b>Esel-anti-Schaf Cy3</b>	Esel IgG für Epo-R	Polyklonal	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland

Ausgewertet wurden die Schnitte an einem Zeiss Axiophot Fotomikroskop (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland). Mittels eines Digitalkamerasystems (Axiocam, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) sowie der dazugehörigen Software (Axiovision, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) wurden Bilder angefertigt und als jpeg-Datei auf dem PC gespeichert.

# 3. Ergebnisse

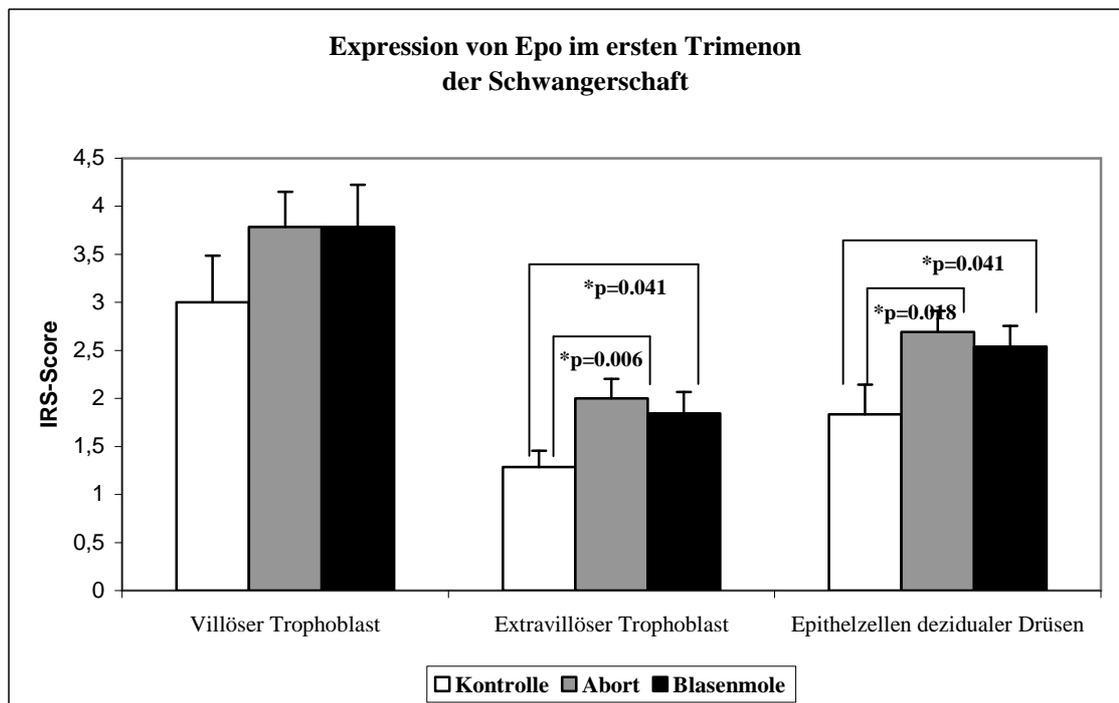
## 3.1. Immunhistochemie

### 3.1.1 Erythropoetin

Die Expression von Erythropoetin konnte im Zytoplasma von villösen Trophoblastzellen, von extravillösen Trophoblastzellen sowie in Epithelzellen dezidualer Drüsen nachgewiesen werden. Sichtbar war die Expression in der Kontrollgruppe, der Abortgruppe sowie in der Gruppe der Blasenmolen. Zusammengefasst wurden die Ergebnisse in Abbildung 11.

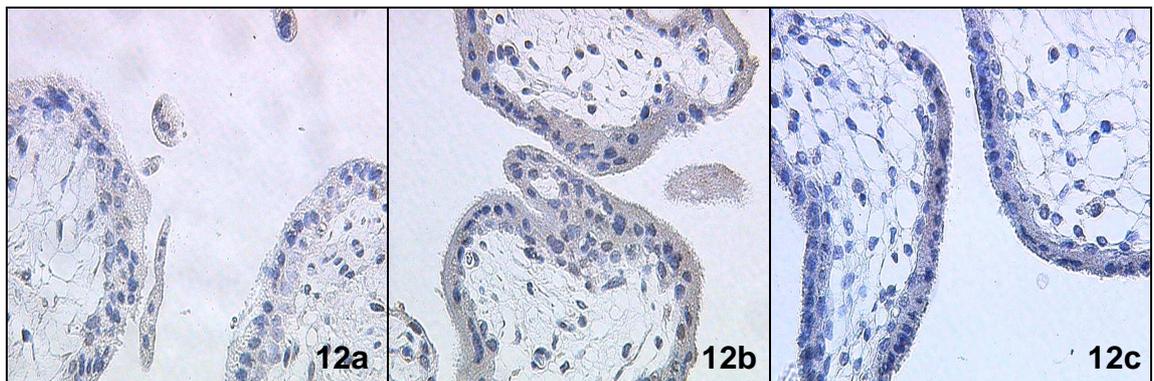
Die einzelnen IRS-Werte sind im Anhang unter Erythropoetin IRS zu finden.

**Abbildung 11:** Immunhistochemische Expression (IR-Scores) von Erythropoetin in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und bei Blasenmolen im ersten Trimenon



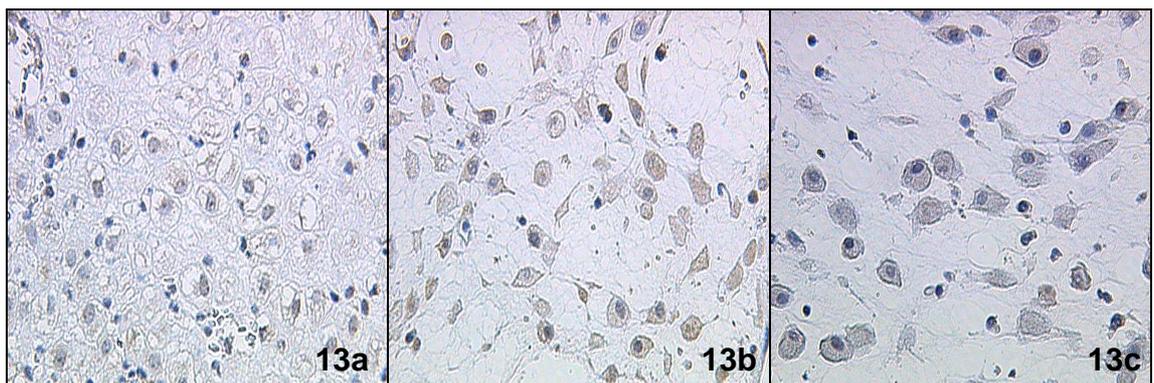
Legende: Immunhistochemische Expression (IR-Scores) von Erythropoetin in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und bei Blasenmolen im ersten Trimenon. Bewertete Zellen: Villöser Trophoblast, extravillöser Trophoblast, Epithelzellen dezidualer Drüsen. Villöser Trophoblast: keine signifikante Erhöhung; Extravillöser Trophoblast: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p=0.006$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p=0.041$ ; Epithelzellen dezidualer Drüsen: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p=0.018$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p=0.041$  ( $p < 0.05$  wurde als signifikant betrachtet). Dargestellt sind Mittelwerte plus Standardfehler.

Im villösen Trophoblasten bei Abortpatientinnen war die Expression von Erythropoetin im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkt. Auch bei der Blasenmole ließ sich eine Erhöhung der Expression im Vergleich mit der Kontrollgruppe nachweisen, beides erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau.



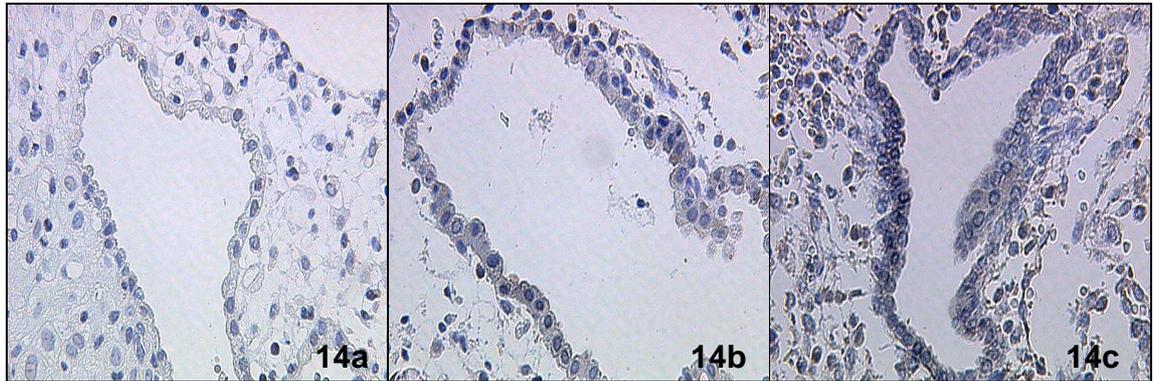
**Abbildung 12a-c:** Immunhistochemische Expression von Erythropoetin in Zellen des villösen Trophoblasts in der Kontrollgruppe (12a), der Abortgruppe (12b) und bei Blasenmolen (12c), 25x Objektiv.

Im extravillösen Trophoblasten wurde Erythropoetin sowohl im Abortgewebe ( $p=0.006$ ) als auch bei der Blasenmole ( $p=0.041$ ) signifikant verstärkt exprimiert, beides jeweils verglichen mit der Kontrollgruppe.



**Abbildung 13a-c:** Immunhistochemische Expression von Erythropoetin in Zellen des extravillösen Trophoblasts in der Kontrollgruppe (13a), in der Abortgruppe (13b) und bei Blasenmolen (13c), 25x Objektiv.

Betrachtete man die Epithelzellen der dezidualen Drüsen, ergab sich sowohl bei der Abortgruppe ( $p=0.018$ ), als auch bei den Blasenmolen ( $p=0.041$ ) eine signifikante Erhöhung der Expression von Erythropoetin im Vergleich mit der Kontrollgruppe.



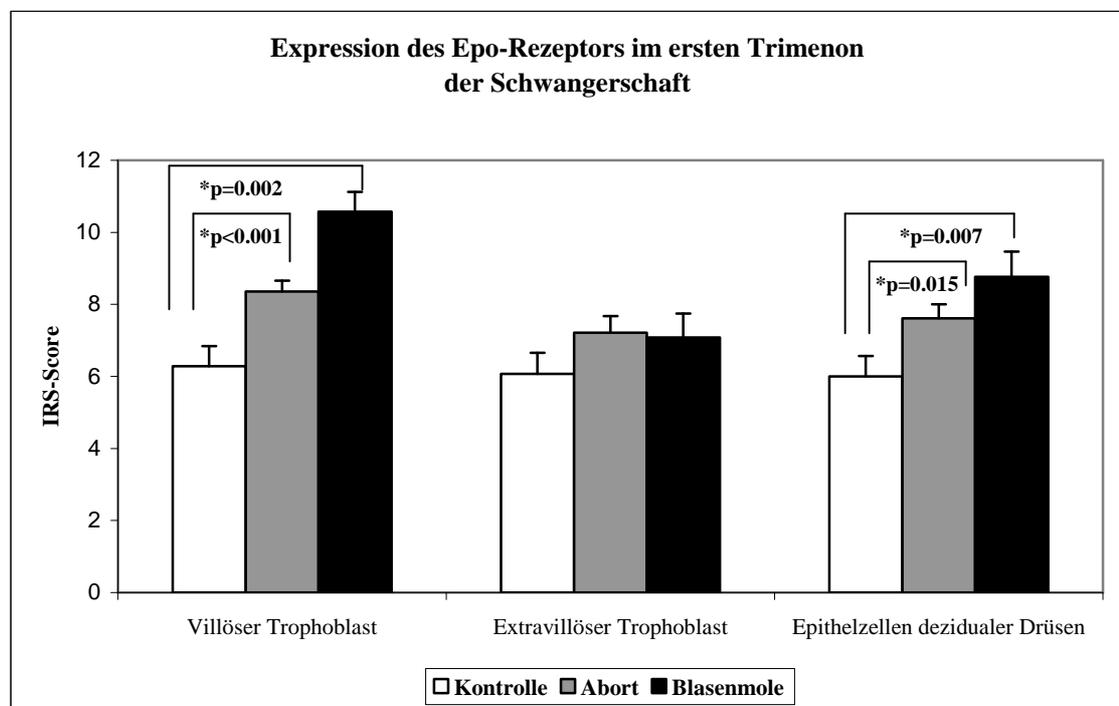
**Abbildung 14a-c:** Immunhistochemische Expression von Erythropoetin in Epithelzellen dezidualer Drüsen in der Kontrollgruppe (14a), in der Abortgruppe (14b) und bei Blasenmolen (14c), 25x Objektiv.

### 3.1.2. Erythropoetin-Rezeptor

Die Expression des Erythropoetin-Rezeptors konnte im apikalen Zytoplasma und in der Zellmembran belegt werden. Betrachtet wurden auch hier die Zellen des villösen Trophoblasts, des extravillösen Trophoblasts und die Epithelzellen dezidualer Drüsen jeweils in der Kontrollgruppe, bei den Aborten und bei den Blasenmolen. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 15 zusammengefasst.

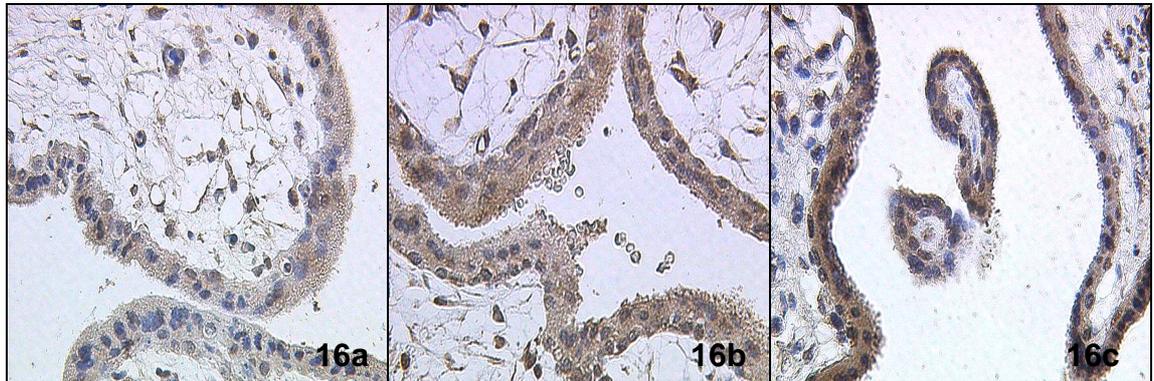
Die einzelnen IRS-Werte sind im Anhang unter Erythropoetin-Rezeptor IRS zu finden.

**Abbildung 15:** Immunhistochemische Expression (IR-Scores) des Erythropoetin-Rezeptors in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und bei Blasenmolen im ersten Trimenon



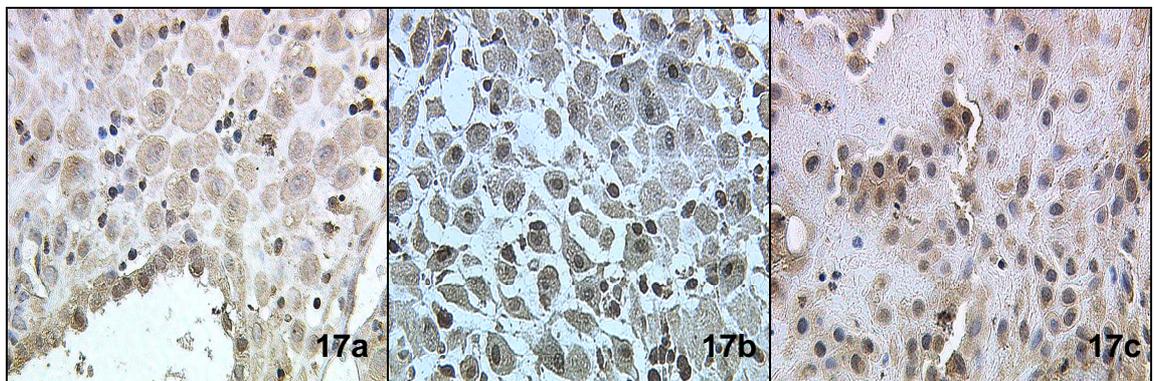
Legende: Immunhistochemische Expression (IR-Scores) des Erythropoetin-Rezeptors in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und bei Blasenmolen im ersten Trimenon. Bewertete Zellen: Villöser Trophoblast, extravillöser Trophoblast, Epithelzellen dezidualer Drüsen. Villöser Trophoblast: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p < 0.001$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p = 0.002$ ; Extravillöser Trophoblast: keine signifikante Erhöhung; Epithelzellen dezidualer Drüsen: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p = 0.015$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p = 0.007$  ( $p < 0.05$  wurde als signifikant betrachtet). Dargestellt sind Mittelwerte plus Standardfehler.

Vergleich man die Expression des Erythropoetin-Rezeptors in Zellen des villösen Trophoblasts der verschiedenen Gruppen, zeigte sich sowohl bei den Aborten ( $p=0.002$ ) als auch bei den Blasenmolen ( $p<0.001$ ) eine signifikante Erhöhung.



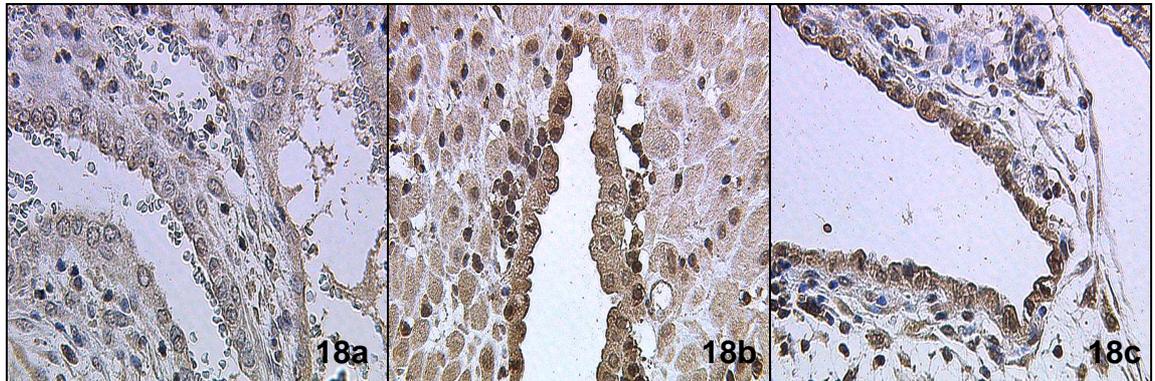
**Abbildung 16a-c:** Immunhistochemische Expression des Erythropoetin-Rezeptors in Zellen des villösen Trophoblasts der Kontrollgruppe (16a), in der Abortgruppe (16b) und bei Blasenmolen (16c), 25x Objektiv.

Im extravillösen Trophoblast zeigte sich für den Erythropoetin-Rezeptor ein ähnliches Bild wie für Erythropoetin im villösen Trophoblast. Es wurde zwar eine Zunahme der Expression gesehen, diese Zunahme blieb aber unter dem Signifikanzniveau ( $p<0.05$  wurde als signifikant betrachtet).



**Abbildung 17a-c:** Immunhistochemische Expression des Epo-Rezeptors in Zellen des extravillösen Trophoblasts in der Kontrollgruppe (17a), in der Abortgruppe (17b) und bei Blasenmolen (17c), 25x Objektiv.

Bei der Betrachtung der Epithelzellen dezidualer Drüsen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression des Erythropoetin-Rezeptors sowohl in der Abortgruppe ( $p=0.007$ ) als auch bei Blasenmolen ( $p=0.015$ ).



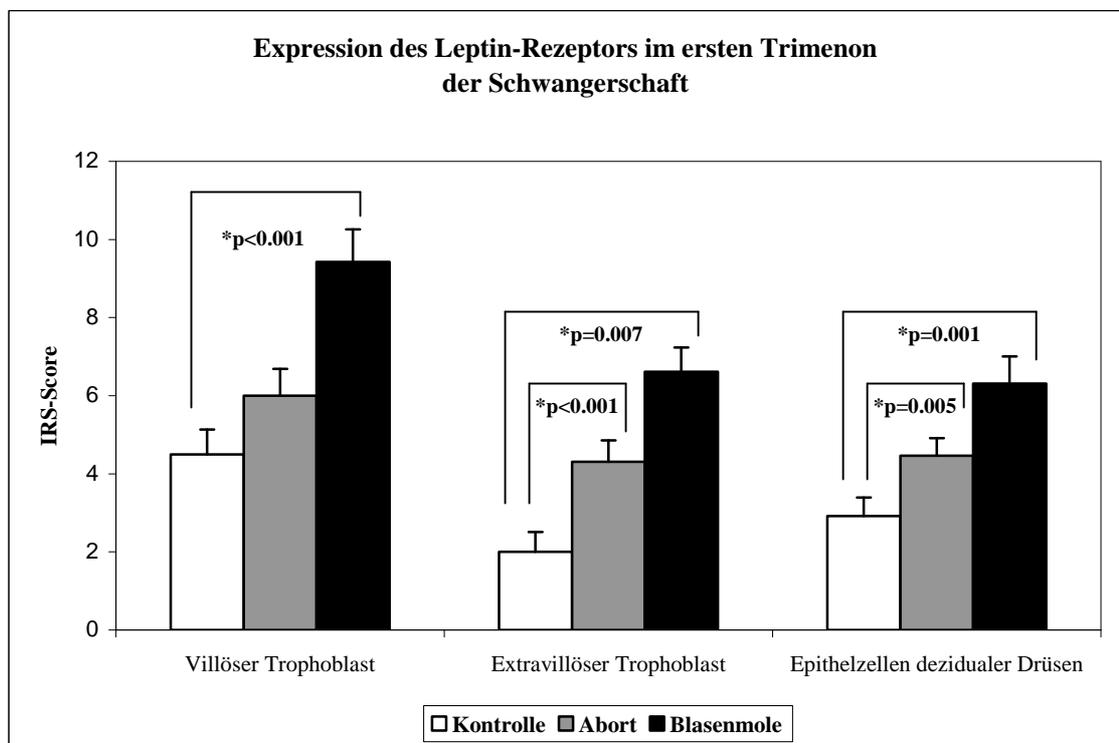
**Abbildung 18a-c:** Immunhistochemische Expression des Erythropoetin-Rezeptors in Epithelzellen dezidualer Drüsen in der Kontrollgruppe (18a), in der Abortgruppe (18b) und bei Blasenmolen (18c), 25x Objektiv.

### 3.1.3 Leptin-Rezeptor

Die Expression des Leptin-Rezeptors konnte sowohl im apikalen Zytoplasma der Zellen, als auch in der Zellmembran belegt werden. Ebenso wie bei der Expression von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor wurden die Zellen des villösen Trophoblasten, des extravillösen Trophoblasten und Epithelzellen dezidualer Drüsen betrachtet. Grafisch aufgezeigt sind die Ergebnisse in Abbildung 19.

Die einzelnen IRS-Werte sind im Anhang unter Leptin-Rezeptor IRS zu finden.

**Abbildung 19:** Immunhistochemische Expression (IR-Scores) des Leptin-Rezeptors in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und bei Blasenmolen im ersten Trimenon



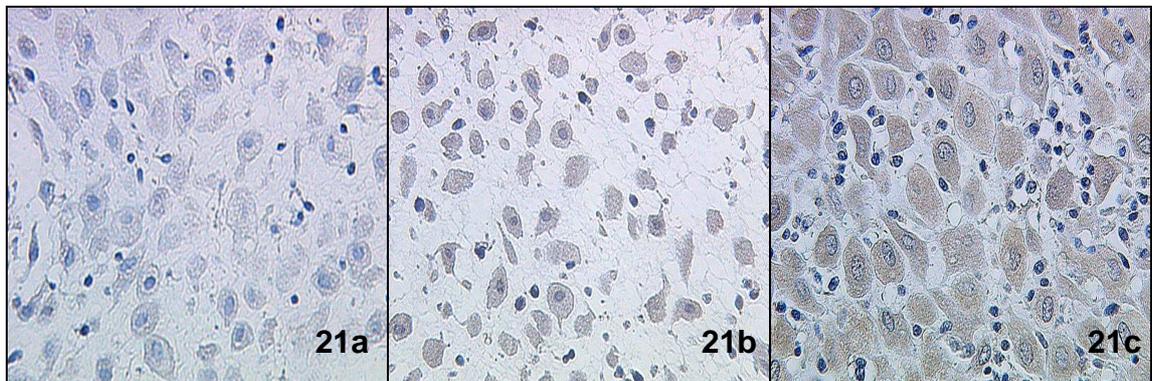
Legende: Immunhistochemische Expression (IR-Scores) des Leptin-Rezeptors in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und bei Blasenmolen im ersten Trimenon. Bewertete Zellen: Villöser Trophoblast, extravillöser Trophoblast, Epithelzellen dezidualer Drüsen. Villöser Trophoblast: signifikante Erhöhung nur bei der Gruppe, Kontrolle-Blasenmole:  $p < 0.001$ ; Extravillöser Trophoblast: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p < 0.001$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p = 0.007$ ; Epithelzellen dezidualer Drüsen: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p = 0.005$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p = 0.001$  ( $p < 0.05$  wurde als signifikant betrachtet). Dargestellt sind Mittelwerte plus Standardfehler.

Verglichen jeweils mit der Kontrollgruppe, war die Expression des Leptin-Rezeptors in Zellen des villösen Trophoblasts sowohl in der Abortgruppe als auch bei Blasenmolen erhöht. Signifikant erhöht war jedoch nur die Expression des Leptin-Rezeptors beim Vergleich Kontrolle-Blasenmole ( $p < 0.001$ ).



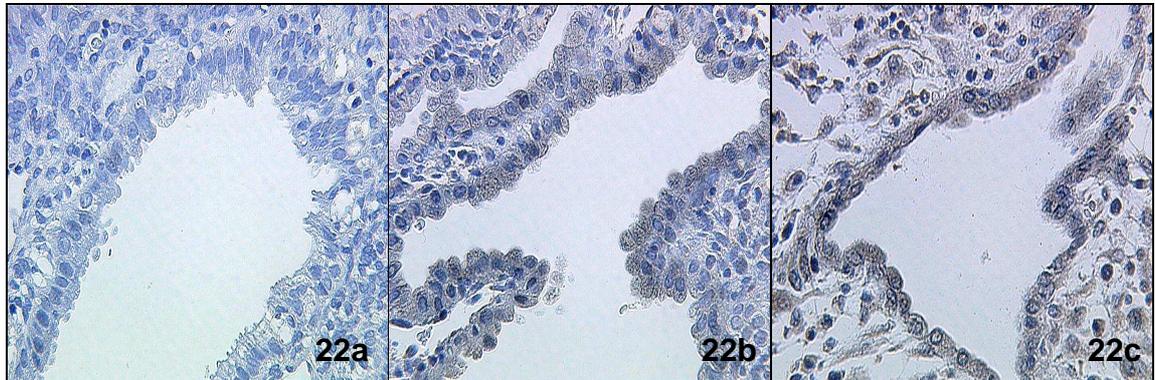
**Abbildung 20a-c:** Immunhistochemische Expression des Leptin-Rezeptors in Zellen des villösen Trophoblasts der Kontrollgruppe (20a), in der Abortgruppe (20b) und bei Blasenmolen (20c), 25x Objektiv.

Bezüglich der Expression des Leptin-Rezeptors in Zellen des extravillösen Trophoblasts ergab sich eine Signifikanz in beiden Gruppen. Es konnte eine vermehrte Expression sowohl bei den Aborten ( $p < 0.001$ ), als auch bei den Blasenmolen ( $p = 0.007$ ) nachgewiesen werden.



**Abbildung 21a-c:** Immunhistochemische Expression des Leptin-Rezeptors in Zellen des extravillösen Trophoblasts in der Kontrollgruppe (21a), in der Abortgruppe (21b) und bei Blasenmolen (21c), 25x Objektiv.

Die Epithelzellen dezidualer Drüsen zeigten eine signifikante Erhöhung der Expression des Leptin-Rezeptors. Dies war sowohl sichtbar in der Abortgruppe ( $p=0.005$ ) als auch bei Blasenmolen ( $p=0.001$ ), jeweils verglichen mit der Kontrollgruppe.



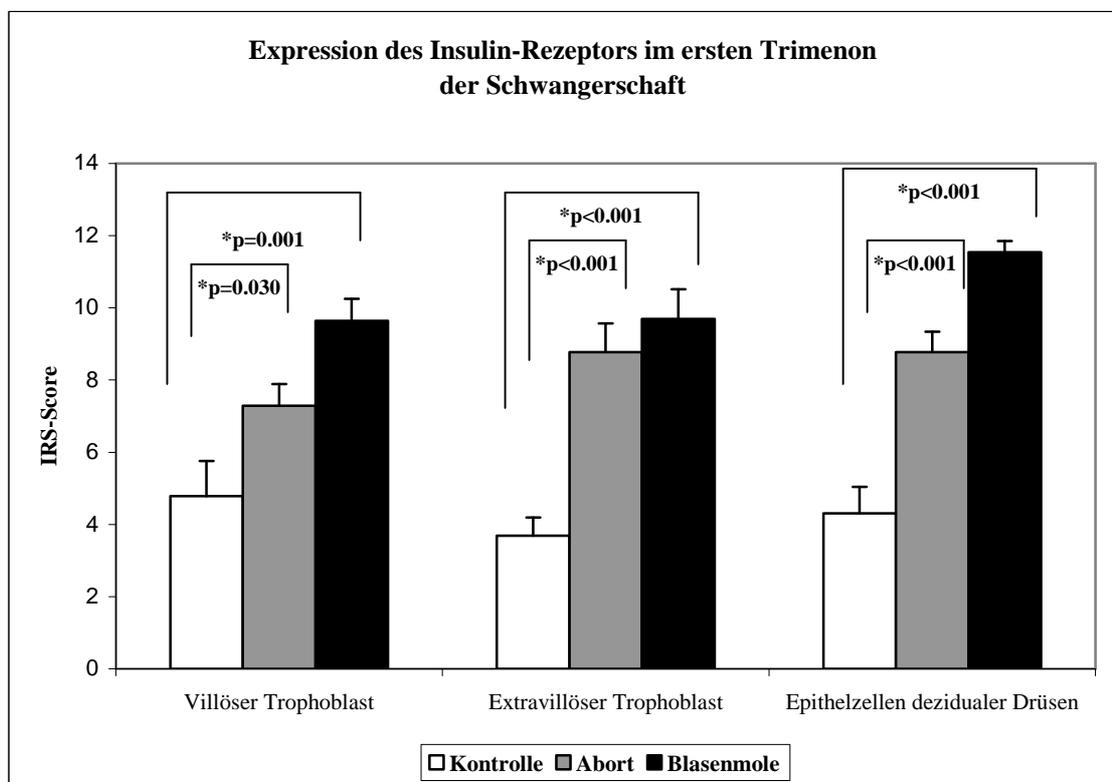
**Abbildung 22a-c:** Immunhistochemische Expression des Leptin-Rezeptors in Epithelzellen dezidualer Drüsen in der Kontrollgruppe (22a), in der Abortgruppe (22b) und bei Blasenmolen (22c), 25x Objektiv.

### 3.1.4 Insulin-Rezeptor

Der Insulin-Rezeptor wurde im apikalen Zytoplasma und in der Zellmembran der untersuchten Zellen exprimiert. Die Expression konnte in Zellen des villösen Trophoblasten, des extravillösen Trophoblasten und in Epithelzellen dezidualer Drüsen nachgewiesen werden. Zu sehen sind die Ergebnisse in Abbildung 23.

Die einzelnen IRS-Werte sind im Anhang unter Insulin-Rezeptor IRS zu finden.

**Abbildung 23:** Immunhistochemische Expression (IR-Scores) des Insulin-Rezeptors in der normalen Schwangerschaft, bei Abort und bei Blasenmole im ersten Trimenon

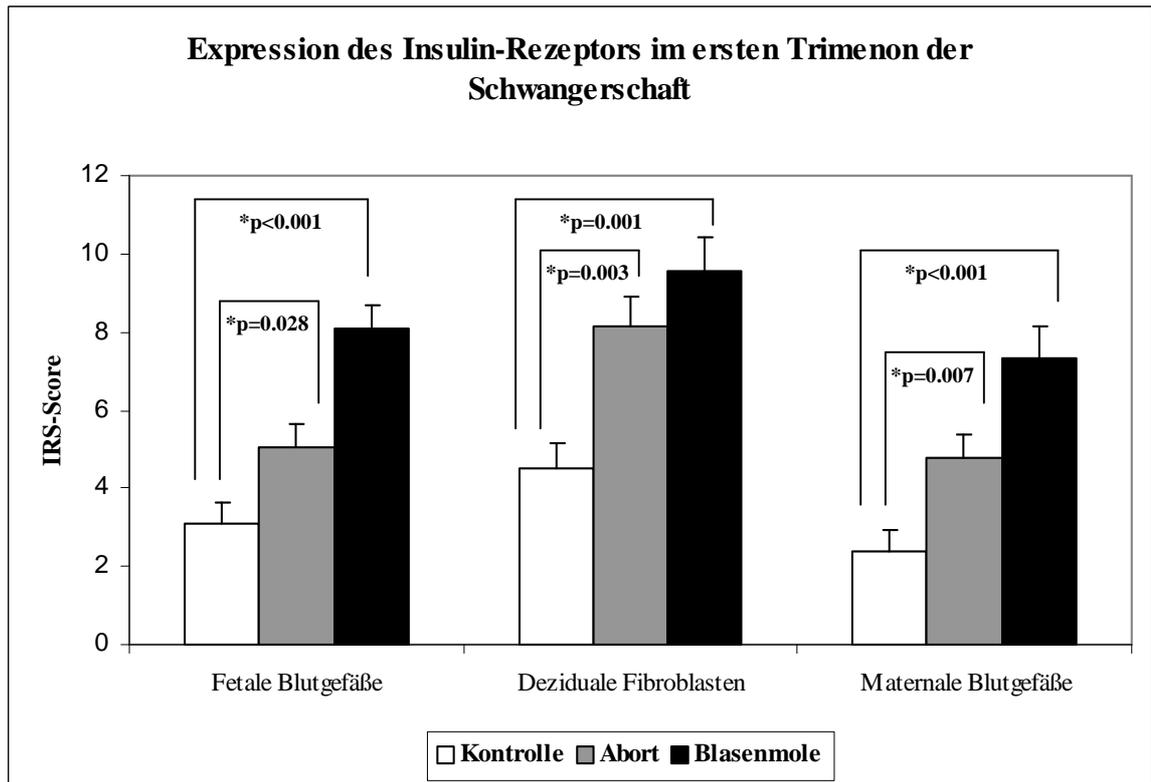


Legende: Immunhistochemische Expression (IR-Scores) des Insulin-Rezeptors in der normalen Schwangerschaft, bei Abort und bei Blasenmole im ersten Trimenon. Bewertete Zellen: Villöser Trophoblast, extravillöser Trophoblast, Epithelzellen dezidualer Drüsen. Villöser Trophoblast: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p=0.030$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p=0.001$ ; Extravillöser Trophoblast: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p<0.001$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p<0.001$ ; Epithelzellen dezidualer Drüsen: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p<0.001$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p<0.001$  ( $p<0.05$  wurde als signifikant betrachtet). Dargestellt sind Mittelwerte plus Standardfehler.

Zusätzlich zum villösen und extravillösen Trophoblasten und den Epithelzellen dezidualer Drüsen wurden beim Insulin-Rezeptor auch Endothelzellen fetaler Blutgefäße, deziduale Fibroblasten und Endothelzellen maternaler Blutgefäße mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 zusammengefasst.

Die einzelnen IRS-Werte sind im Anhang unter Insulin-Rezeptor IRS zu finden.

**Abbildung 24:** Immunhistochemische Expression (IR-Scores) des Insulin-Rezeptors in der normalen Schwangerschaft, bei Abort und bei Blasenmole im ersten Trimenon



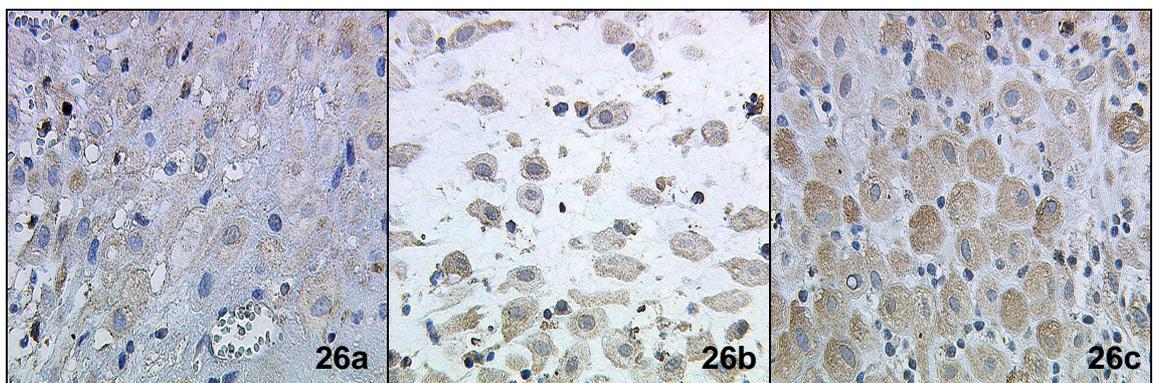
Legende: Immunhistochemische Expression (IR-Scores) des Insulin-Rezeptors in der normalen Schwangerschaft, bei Abort und bei Blasenmole im ersten Trimenon. Bewertete Zellen: Endothelzellen fetaler Blutgefäße, deziduale Fibroblasten und Endothelzellen maternaler Blutgefäße. Endothelzellen fetaler Blutgefäße: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p=0.028$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p<0.001$ ; Deziduale Fibroblasten: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p=0.003$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p<0.001$ ; Endothelzellen maternaler Blutgefäße: signifikante Erhöhung bei beiden Gruppen, Kontrolle-Abort:  $p=0.007$ , Kontrolle-Blasenmole:  $p<0.001$  ( $p<0.05$  wurde als signifikant betrachtet). Dargestellt sind Mittelwerte plus Standardfehler.

Betrachtete man die Zellen des villösen Trophoblasten ergab sich eine signifikante Erhöhung der Expression des Insulin-Rezeptors für den Vergleich Kontroll- mit Abortgruppe ( $p=0.03$ ), sowie für den Vergleich Kontrollgruppe mit der Gruppe der Blasenmolen ( $p=0.001$ ).



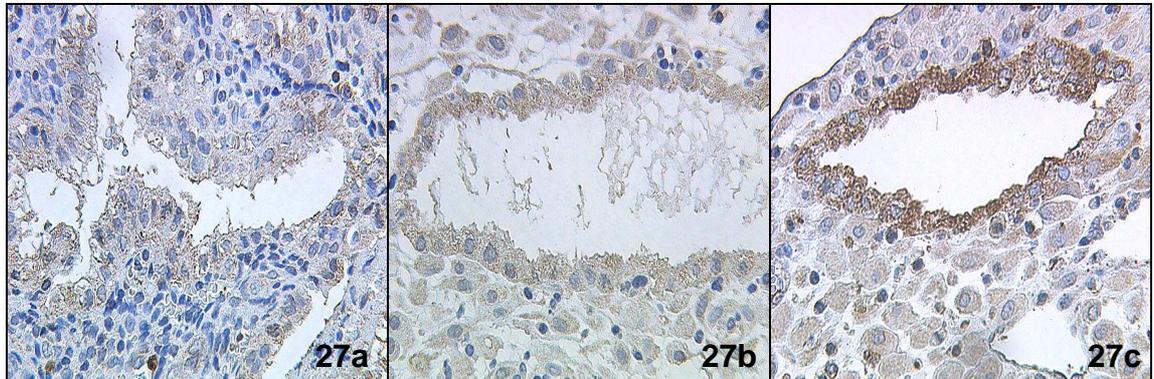
**Abbildung 25a-c:** Immunhistochemische Expression des Insulin-Rezeptors in Zellen des villösen Trophoblasts der Kontrollgruppe (25a), in der Abortgruppe (25b) und bei Blasenmolen (25c), 25x Objektiv.

Im extravillösen Trophoblast ergab sich ebenfalls für beide Gruppen eine signifikante Erhöhung der Expression des Insulin-Rezeptors. Hierbei konnte für beide Vergleiche ein p-Wert kleiner 0.001 erreicht werden.



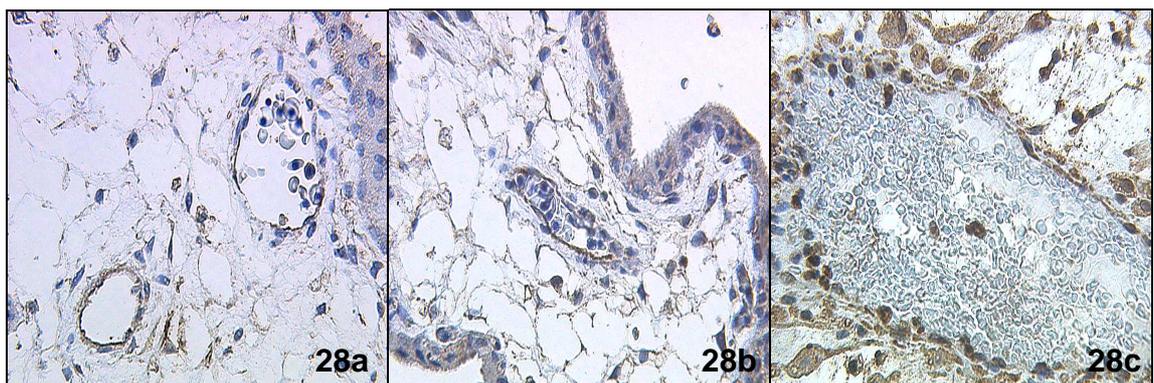
**Abbildung 26a-c:** Immunhistochemische Expression des Insulin-Rezeptors in Zellen des extravillösen Trophoblasts der Kontrollgruppe (26a), in der Abortgruppe (26b) und bei Blasenmolen (26c), 25x Objektiv.

In Epithelzellen dezidualer Drüsen konnte sowohl in der Abortgruppe ( $p < 0.001$ ) als auch in der Gruppe der Blasenmolen ( $p < 0.001$ ) eine signifikante Erhöhung der Expression nachgewiesen werden, jeweils verglichen mit der Kontrollgruppe.



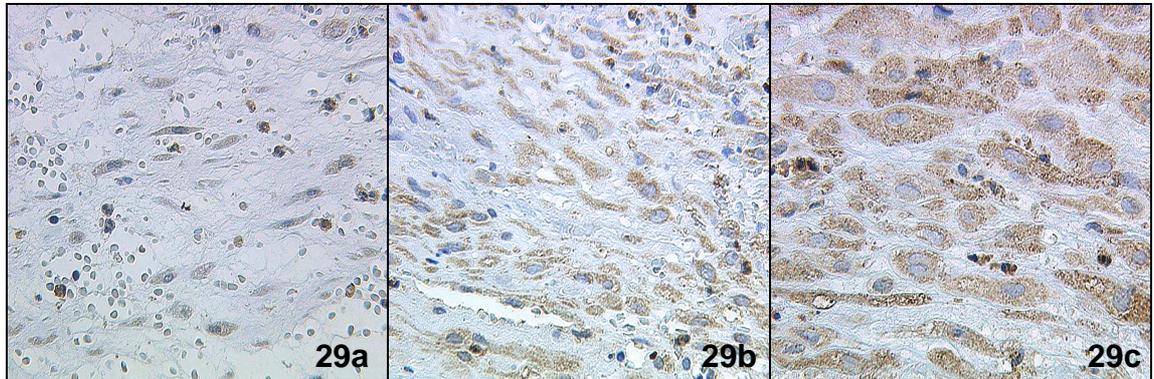
**Abbildung 27a-c:** Immunhistochemische Expression des Insulin-Rezeptors in Epithelzellen dezidualer Drüsen in der Kontrollgruppe (27a), in der Abortgruppe (27b) und bei Blasenmolen (27c), 25x Objektiv.

Die Expression des Insulin-Rezeptors wurde noch in 3 weiteren Zelltypen untersucht, darunter als erstes die Endothelzellen der fetalen Blutgefäße innerhalb der Zotten. Hierbei ergab sich in beiden Gruppen eine signifikant verstärkte Expression. Der Vergleich Kontrolle - Aborte ergab einen p-Wert von 0.028, der Vergleich Kontrolle – Blasenmole einen p-Wert kleiner 0.001.



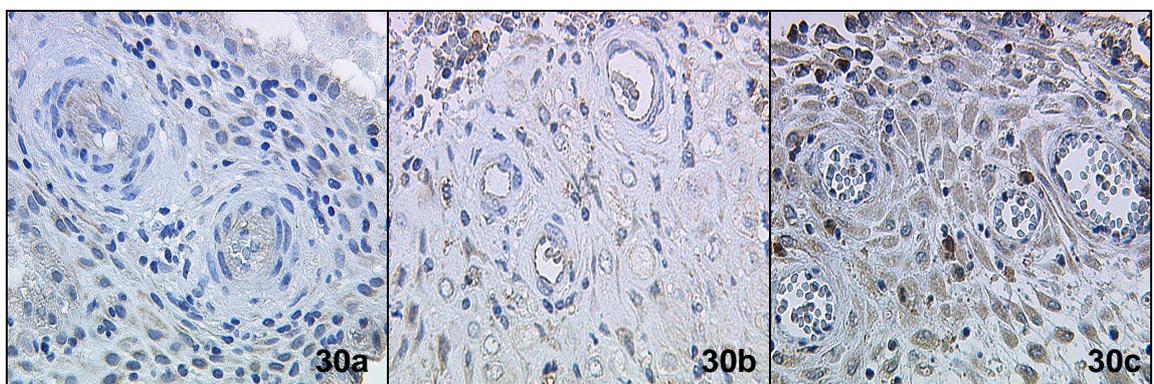
**Abbildung 28a-c:** Immunhistochemische Expression des Insulin-Rezeptors in Endothelzellen der fetalen Blutgefäße in der Kontrollgruppe (28a), in der Abortgruppe (28b) und bei Blasenmolen (28c), 25x Objektiv.

Zusätzlich wurden deziduale Fibroblasten betrachtet, bei denen sich ebenfalls eine vermehrte Expression in beiden Gruppen zeigte. Es ergab sich für die Aborte ein p-Wert von 0.003 und für die Blasenmolen ein p-Wert von 0.001 jeweils im Vergleich mit der Kontrollgruppe.



**Abbildung 29a-c:** Immunhistochemische Expression des Insulin-Rezeptors in Fibroblasten der Dezidua in der Kontrollgruppe (29a), in der Abortgruppe (29b) und bei Blasenmolen (29c), 25x Objektiv.

Die Untersuchung der Insulin-Rezeptor-Expression in Endothelzellen der maternalen Gefäße zeigte in beiden Fällen eine signifikante Steigerung der Expression, bei den Aborten mit einem p-Wert von 0.007 und bei den Blasenmolen mit einem p-Wert kleiner 0.001, verglichen jeweils mit der Kontrollgruppe.



**Abbildung 30a-c:** Immunhistochemische Expression des Insulin-Rezeptors in Endothelzellen der maternalen Gefäße in der Kontrollgruppe (30a), in der Abortgruppe (30b) und bei Blasenmolen (30c), 25x Objektiv.

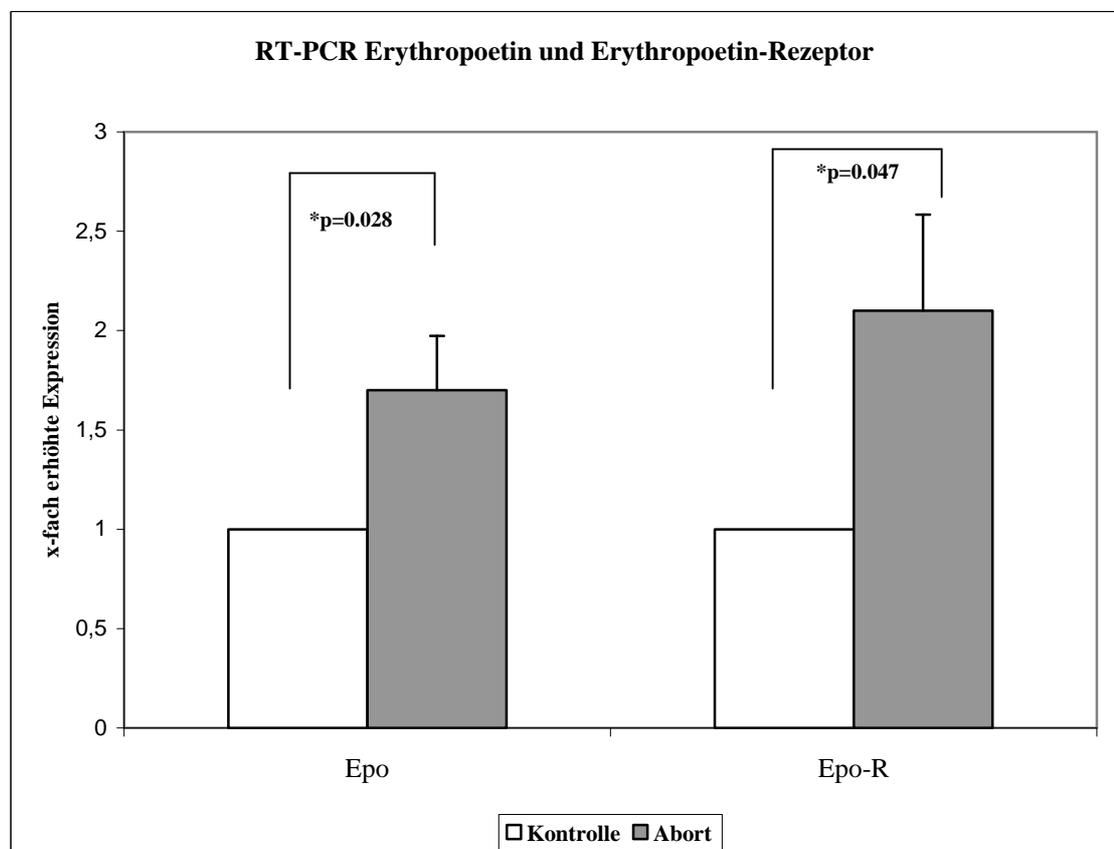
## 3.2 RT-PCR

Die bereits beschriebene nachgewiesene Expression von Erythropoetin und der Erythropoetin-, Leptin- und Insulin-Rezeptoren auf Proteinebene wurde mittels einer quantitativen RT-PCR auch auf mRNA Ebene im Kontroll- und Abortgewebe nachgewiesen. Die in der Immunhistochemie gefundenen Ergebnisse wurden hierdurch verifiziert. Es zeigte sich im Vergleich mit den Kontrollen ebenfalls eine vermehrte Expression von Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor, Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor im Abortgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Blasenmolen wurden hierbei allerdings aus Mangel an frischem Gewebe nicht untersucht.

Bei Erythropoetin war die Expression im Abortgewebe 1,7-fach signifikant erhöht ( $p=0.028$ ), beim Erythropoetin-Rezeptor war die Expression signifikant 2,1-fach erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0.047$ ) (siehe Abbildung 31).

Eine genaue Auflistung der Einzelwerte befindet sich im Anhang unter RT-PCR Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor.

**Abbildung 31:** Expression von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor in der RT-PCR

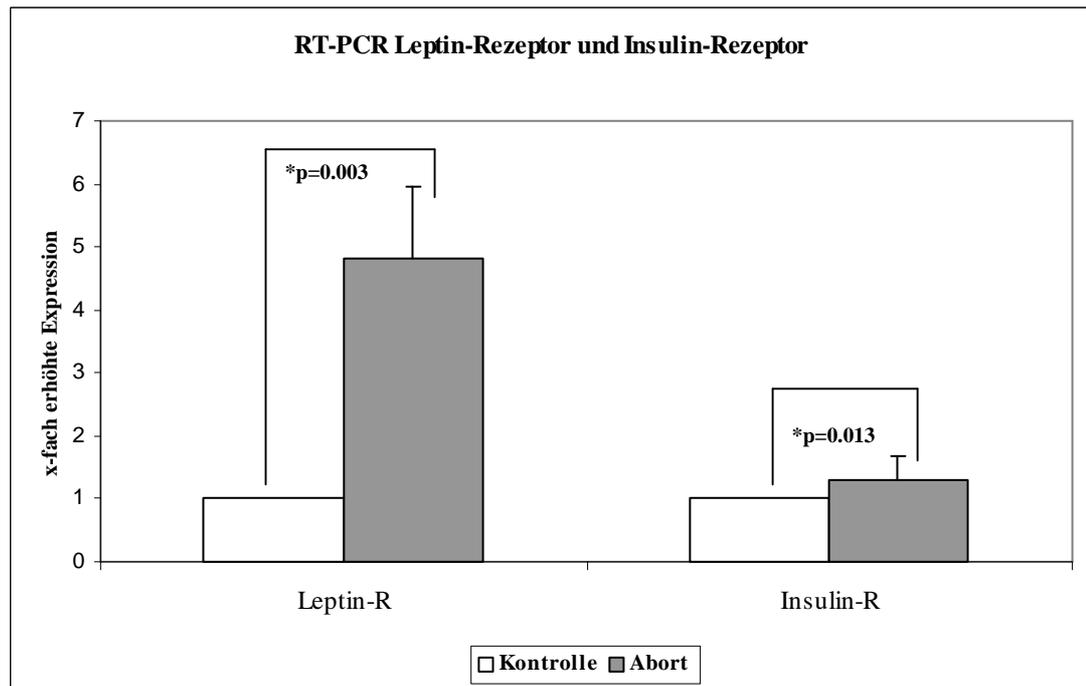


Legende: Expression von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor in der RT-PCR. Epo ist 1,7-fach erhöht ( $p=0.028$ ), Epo-R ist 2,1-fach erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0.047$ ). ( $p<0.05$  wurde als signifikant betrachtet). Dargestellt ist die x-fache Erhöhung der Expression nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode plus Standardabweichung.

Hinsichtlich des Leptin-Rezeptors ergab sich im Abortgewebe eine signifikant erhöhte Expression (4,8-fach;  $p=0.003$ ). Beim Insulin-Rezeptor war die Expression bei Abort 1,3-fach erhöht mit einer Signifikanz von  $p=0.013$  jeweils verglichen mit dem Kontrollgewebe (siehe Abbildung 32).

Eine genaue Auflistung der Einzelwerte befindet sich im Anhang unter RT-PCR Leptin- und Insulin-Rezeptor.

**Abbildung 32:** Expression von Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor in der RT-PCR



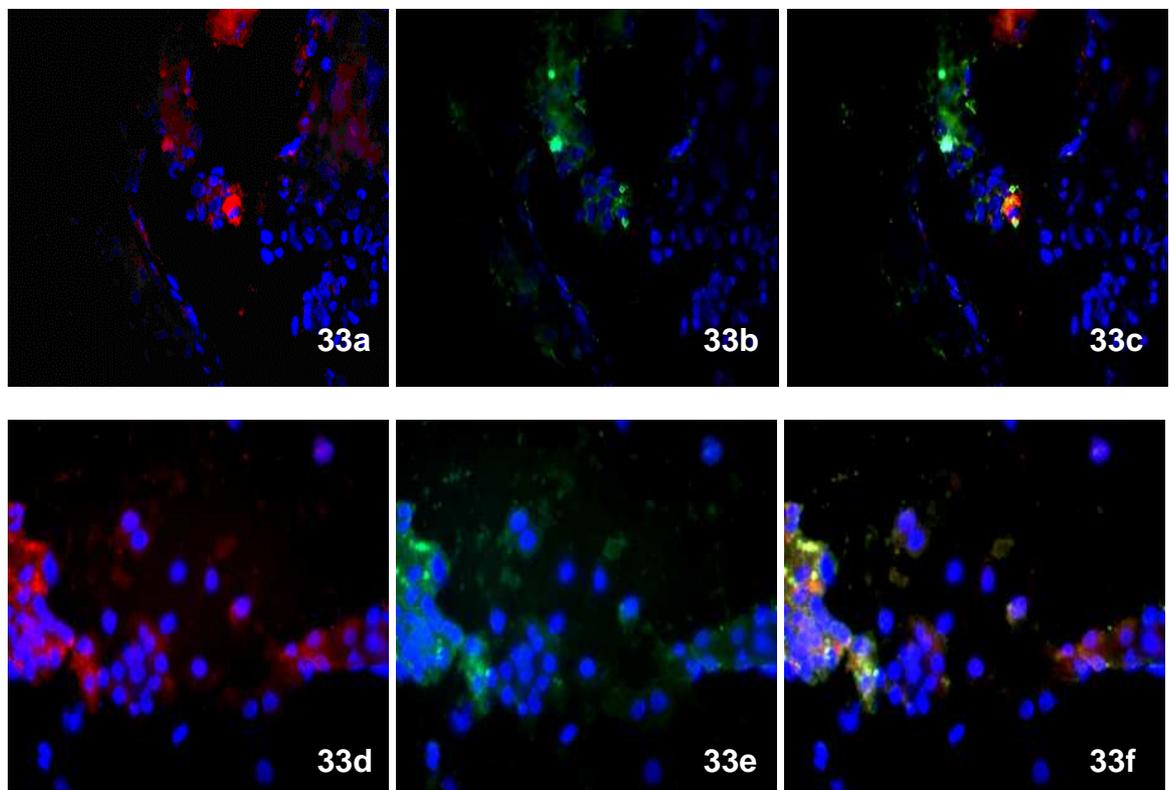
Legende: Expression von Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor in der RT-PCR. Leptin-Rezeptor ist 4,8fach erhöht ( $p=0.003$ ), Insulin-Rezeptor ist 1,3fach erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0.013$ ). ( $p<0.05$  wurde als signifikant betrachtet). Dargestellt ist die x-fache Erhöhung der Expression nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode plus Standardabweichung.

### 3.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Cytokeratin 7 (CK7) ist ein spezifischer Marker für Zellen des extravillösen Trophoblasten (Shiverick, King et al. 2001). Die Gefrierschnitte mit den entsprechenden Geweben wurden im Rahmen einer Doppelfärbung jeweils mit CK7 und den Antikörpern für Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor, Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor inkubiert. Da die angefärbten Zellen sowohl CK7 als auch jeden der Antikörper anfärbten, konnten sie somit als Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor, Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor exprimierende extravillöse Trophoblasten identifiziert werden.

Die Abbildungen 33 a-f zeigen die Cy3-markierten Erythropoetin- und Erythropoetin-Rezeptor-Antikörper rot, CK7 wurde Cy2 markiert und ist damit grün abgebildet. Bei der Triple filter excitation wurde alle Filter übereinander gelegt. Hierdurch ist die gleichzeitige Expression der Antikörper sichtbar. Gelb bedeutet, dass der rot und grün markierte Antikörper an genau derselben Stelle exprimiert wird. Zellkerne sind blau angefärbt.

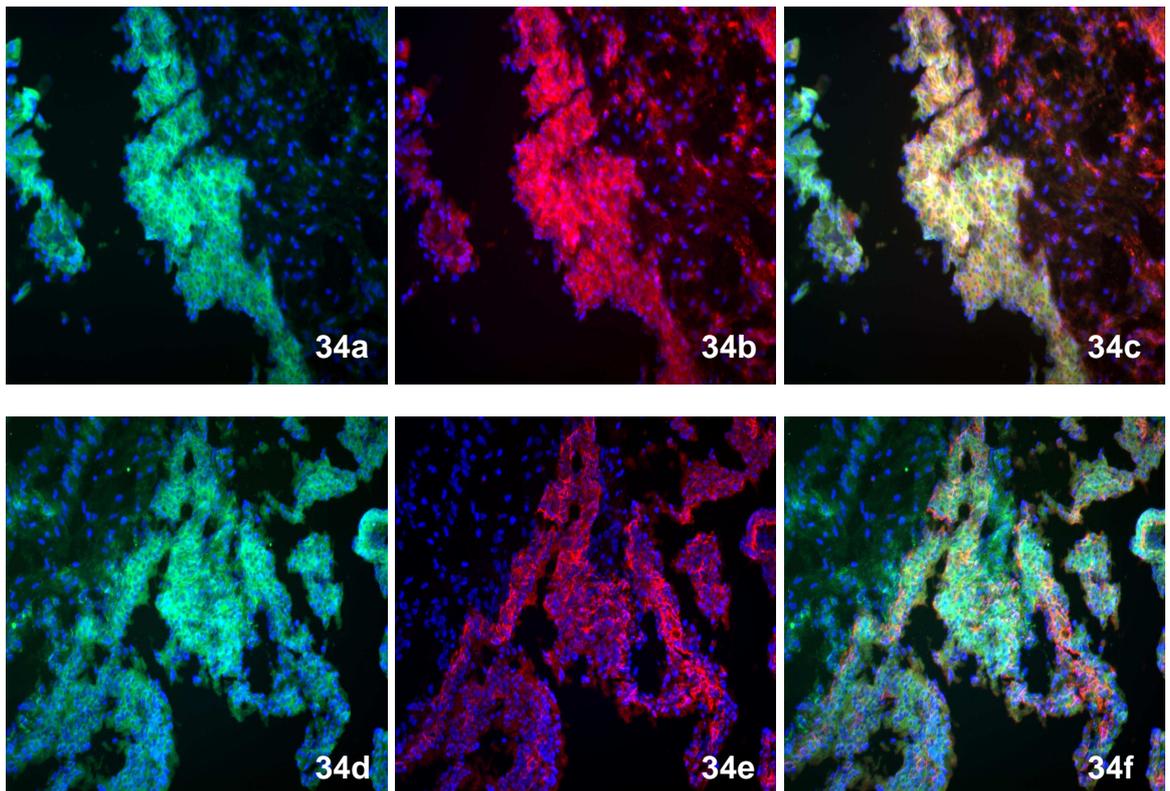
**Abbildung 33:** Immunfluoreszenz-Färbung von Erythropoetin und CK7 in extravillösen Trophoblasten



Legende: Immunfluoreszenz-Färbung von extravillösen Trophoblasten. Expression von Epo (33a), CK7 (33b), Triple filter excitation Epo und CK7 (33c); Expression des Epo-Rezeptors (33d), CK7 (33e), Triple filter excitation (33f), 40x Objektiv

Die Expression des Leptin- und Insulin-Rezeptors sowie von CK7 ist in den Abbildungen 34 a-f zu sehen. Man erkennt deutlich die gleichzeitige Expression in extravillösen Trophoblastzellen. Bei diesen Färbungen wurden der Leptin-Rezeptor und der Insulin-Rezeptor allerdings Cy2-markiert und CK7 Cy3, daher sind Leptin- und Insulin-Rezeptor grün und CK7 rot abgebildet.

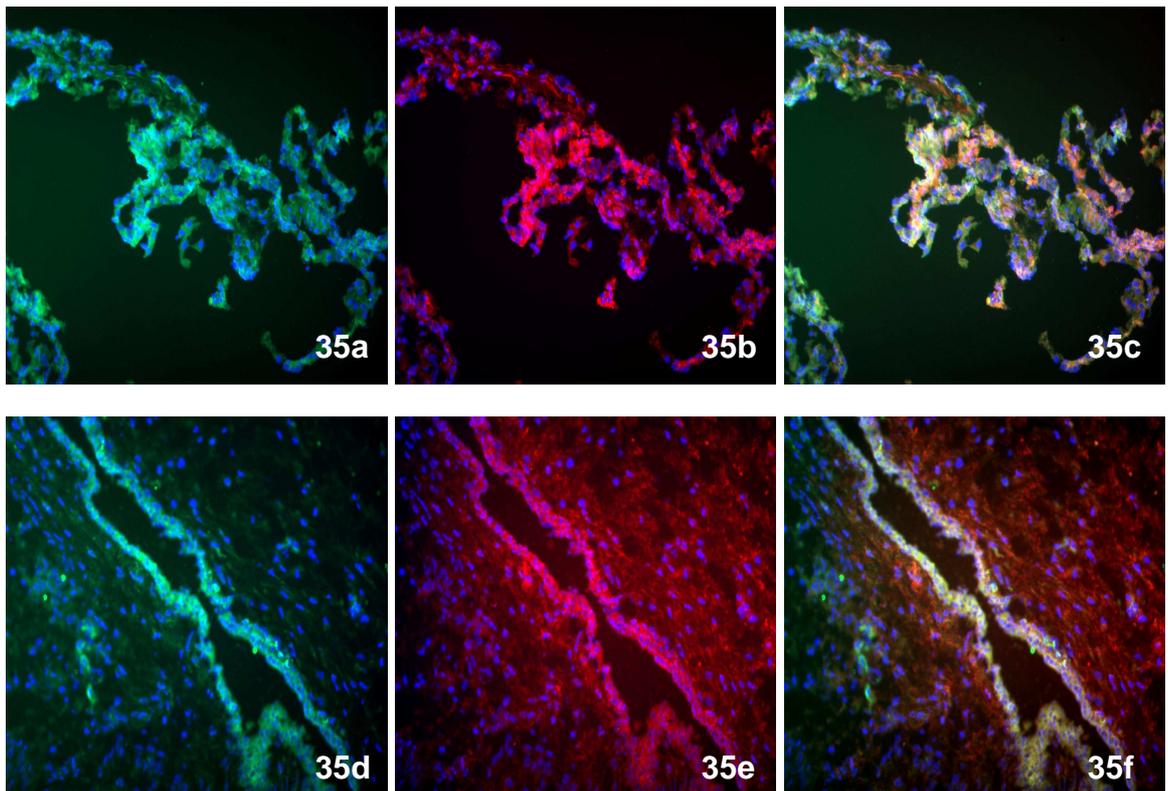
**Abbildung 34:** Immunfluoreszenz-Färbung von Leptin-Rezeptor und CK7 in extravillösen Trophoblasten



Legende: Immunfluoreszenz-Färbung von extravillösen Trophoblasten. Expression des Leptin-Rezeptors (34a), CK7 (34b), Triple filter excitation Leptin-R und CK7 (34c); Expression des Insulin-Rezeptors (34d), CK7 (34e), Triple filter excitation (34f), 20x Objektiv

Weiterhin wurde für den Leptin- und Insulin-Rezeptor auch die Expression in den dezidualen Drüsenzellen überprüft (Abbildungen 35 a-f). Hierbei wurde als spezifischer Marker für diese Zellen das Prolaktin verwendet. Leptin- und Insulin-Rezeptor wurden hierbei wieder Cy2-markiert und erscheinen deshalb grün, Prolaktin wurde Cy3-markiert und ist deshalb rot.

**Abbildung 35:** Immunfluoreszenz-Färbung von Leptin-Rezeptor und Prolaktin sowie Insulin-Rezeptor und Prolaktin in dezidualen Drüsenzellen



Legende: Immunfluoreszenz-Färbung von dezidualen Drüsenzellen. Expression des Leptin-Rezeptors (35a), Prolaktin (35b), Triple filter excitation Leptin-R und Prolaktin (35c); Expression des Insulin-Rezeptors (35d), Prolaktin (35e), Triple filter excitation (35f), 20x Objektiv

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der Expression von Erythropoetin und den Rezeptoren für Erythropoetin, Leptin und Insulin gibt, wenn man die normale mit der gestörten Frühschwangerschaft vergleicht. Die Expression des Erythropoetin-Rezeptors im villösen Trophoblasten bei den Aborten war im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht. Bei Blasenmolen war die Erythropoetin-Rezeptor-Expression im Synzytiotrophoblast ebenfalls erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Zellen des extravillösen Trophoblasts nur bei Erythropoetin eine signifikant erhöhte Expression, sowohl bei den Aborten als auch bei den Blasenmolen. Bei den glandulären Epithelzellen zeigte sich wiederum bei Erythropoetin und beim Erythropoetin-Rezeptor eine erhöhte Expression in der Abortgruppe sowie bei den Blasenmolen.

Durch eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit CK7 wurden die Erythropoetin-/Erythropoetin-Rezeptor exprimierenden Zellen als extravillöse Trophoblasten der fetomaternalen Interphase identifiziert. Die Unterschiede in der Expression von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor in der normalen Schwangerschaft und bei Aborten wurden auf mRNA Ebene bestätigt.

1996 entdeckten Conrad et al. die Trophoblastzellen von humanen Plazenten als einen neuen Produktionsort von Erythropoetin. Die Expression von Erythropoetin wurde im villösen sowie im extravillösen Trophoblasten der Plazenta durch immunhistochemische Untersuchungen nachgewiesen. Dabei kamen zwei monoklonale Antikörper zur Anwendung die verschiedene Antigene im villösen Trophoblasten und im extravillösen Trophoblasten nachwies. Weiterhin beschrieben die Autoren die Expression von Erythropoetin-mRNA in der Basalplatte und in den Zotten der Plazenta zu verschiedenen Zeitpunkten in der Schwangerschaft. Ausserdem untersuchten sie isolierte Zytotrophoblasten sowie MHC-Klasse I negative Chorionkarzinomzellen. Bei Stimulierung unter hypoxischen Bedingungen war die Expression von Erythropoetin in den Chorionkarzinomzellen erhöht. Während eines Abortprozesses tritt ebenfalls eine Hypoxie im Gewebe auf, die den oben genannten Mechanismen der in vitro Studien von Conrad et al. gleichen (Conrad, Benyo et al. 1996).

Teramo et al. und Girsan et al. fanden erhöhte Erythropoetin-Werte im Fruchtwasser bei schwangerschaftsassoziertem Bluthochdruck. Dies weist auf eine chronische

oder subchronische fetale Hypoxie hin. Weiterhin korrelieren die Erythropoetin-Werte aus dem Fruchtwasser mit Werten aus dem Nabelschnurplasma, die ebenfalls signifikant erhöht waren bei hypertonen Schwangerschaften im Vergleich zu normotonen Schwangerschaften (Teramo, Hiilesmaa et al. 2004). Girsen et al. untersuchten Erythropoetin-Konzentrationen im Serum bei Feten mit intrauteriner Wachstumsrestriktion und fanden erhöhte Werte proportional zur Schwere der fetalen kardiovaskulären Gefährdung (Girsen, Makikallio et al. 2007).

Im Jahre 1990 untersuchten Beguin et al. Erythropoetin-Werte während der Schwangerschaft und im Wochenbett. Da während der Schwangerschaft das Plasmavolumen erhöht ist, die Masse an roten Blutkörperchen aber nicht so stark, spricht man in diesem Falle von einer Schwangerschaftsanämie. Die Erythropoetin-Werte stiegen stetig von 18 +/- 6 mU/ml im ersten auf 26 +/- 14 mU/ml im zweiten und auf 35 +/- 18 mU/ml im dritten Trimenon ( $p < 0.001$ ). Die Autoren schlussfolgerten, dass die Erythropoetin-Ausschüttung bei einer relativen Schwangerschaftsanämie im ersten Trimenon beeinträchtigt war, sich in der Spätschwangerschaft erholte und sich im Wochenbett schnell normalisierte (Beguin, Lipscei et al. 1990).

Im Gegensatz dazu fanden Ireland et al. keine Unterschiede in maternalen Erythropoetin-Konzentrationen während der Schwangerschaft. Allerdings waren auch hier die maternalen Erythropoetin-Werte signifikant erhöht, verglichen mit nicht schwangeren Frauen. Ausserdem fanden sie erhöhte fetale Erythropoetin-Werte, die im Mittel von 4 mU/mL in der 16. SSW auf 13 mU/mL in der 40. SSW anstiegen (Ireland, Abbas et al. 1992).

Unterschiede in fetalen Erythropoetin-Werten wurden ebenfalls von Maier et al. beschrieben. Die fetale Erythropoetin-Produktion war durch eine induzierte Hypoxie mit einigen Stunden Verzögerung stimulierbar und führte zu einer gesteigerten Erythropoese. Dennoch folgerten die Autoren, dass eine eingehende Prüfung der Plazenta kombiniert mit Messwerten des umbilikalen venösen Erythropoetin-Spiegels und umbilikalen arteriellen pHs ausreichen, um Informationen über eine frühere fetale Hypoxie zu erlangen (Maier, Gunther et al. 1994).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die vorliegende Arbeit die erste systematische Studie, die sich mit einer veränderten Expression von Erythropoetin und des Erythropoetin-Rezeptors in der normalen und gestörten Frühschwangerschaft beschäftigt. Da die Expression in fast allen untersuchten Geweben signifikant erhöht war, könnte die

Hypoxie im Gewebe bei einem Abort ein Trigger für die Ausschüttung des Erythropoetins und des Erythropoetin-Rezeptors darstellen. Die erhöhte Expression könnte also die Antwort des Gewebes auf die vorhandene Hypoxie sein. Inwieweit die vermehrte Expression von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor bei der Blasenmole ein Zeichen der erhöhten Angiogenese und Neovaskularisation ist, bleibt noch ungeklärt.

Weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Expression des Leptin-Rezeptors, ebenfalls in plazentaren Zellen von Normalschwangerschaften, von Aborten und von Blasenmolen des ersten Trimenon. Eine signifikant höchste Expression konnte für den Leptin-Rezeptor in allen untersuchten Zellen bei Blasenmolen nachgewiesen werden. Die Leptin-Rezeptor-Expression im Abortgewebe, in den extravillösen Trophoblasten und in den dezidualen Drüsenzellen war signifikant erhöht im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Unsere Ergebnisse untermauern bereits veröffentlichte Ergebnisse von Choi et al. Auch sie fanden eine signifikant erhöhte Expression des Leptin-Rezeptors, als sie Chorionzotten von Patientinnen mittels PCR untersuchten. Sie verglichen dabei Plazenten von RSA-Patientinnen mit der Kontrollgruppe. Anamnestisch hatte die Kontrollgruppe weder einen Abort, noch eine ektopre Gravidität oder Totgeburt erlitten (Choi, Choi et al. 2003).

Im Jahre 1998 erforschten Henson et al. mit Hilfe einer Reverse Transcription-PCR die Expression von Leptin und des Leptin-Rezeptors in plazentaren Zotten aus Termin- und Frühplazenten der 7.-14. Schwangerschaftswoche. Die Leptin mRNA sank von der Früh- zur Spätschwangerschaft, was einen ontogenetischen Abfall der Leptin mRNA mit zunehmendem Schwangerschaftsalter nahelegt (Henson, Swan et al. 1998).

Weiterhin konnten Castellucci et al. eine starke Expression des Leptin-Rezeptors in distalen extravillösen Trophoblastzellen der Basalplatte nachweisen. Leptin selbst wurde hingegen homogen in allen zellulären Kompartments der Zellsäulen exprimiert. Sie wiesen ausserdem nach, dass Leptin dosisabhängig die Expression von immunoreaktiver Matrixmetalloproteinase (MMP-2) und fetalem Fibronectin (fFN) steigert und die Aktivität von MMP-9 in kultivierten Zytotrophoblastzellen verstärkt. Daher schlussfolgerten die Autoren, dass Leptin und der Leptin-Rezeptor durch Modulation der Expression der MMPs eine wichtige Rolle im invasiven

Prozess der extravillösen Trophoblastzellen spielen könnten (Castellucci, De Matteis et al. 2000).

Li et al. untersuchten die Expression von Leptin und des Leptin-Rezeptors in gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen mittels Immunhisto-chemie. Im Vergleich zur ungestörten Schwangerschaft fanden sie ebenfalls eine erhöhte Expression bei partieller und bei kompletter Blasenmole. Am höchsten war die Expression im Zytotrophoblasten, nicht im Synzytiotrophoblasten. Weiterhin wurde auch beim Chorionkarzinom eine deutlich erhöhte Leptinexpression beobachtet. Vermutlich nimmt Leptin über autokrine und parakrine Mechanismen Einfluss auf die Trophoblasteninvasion und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Trophoblasterkrankungen (Li, Yu et al. 2004). Unsere Arbeitsgruppe untermauerte Li's Ergebnisse bei der Blasenmole. Wir untersuchten Anfang 2008 die Expression von Leptin, PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) und PPAR Koaktivatoren (retinoic X receptor  $\alpha$  (RXR), amplified in breast cancer-3 gene (AIB3)) bei Aborten und Blasenmolen des ersten Trimenon (Toth, Bastug et al. 2008). In Trophoblastzellen bei der Blasenmole war die Leptin-Expression ebenso erhöht. Die Gruppe der Aborte zeigte eine verringerte Leptin-Expression im villösen Trophoblasten, aber eine erhöhte Expression von Leptin in dezidualen Drüsenzellen.

Laird et al. wiesen nach, dass die Plasma-Leptinkonzentration bei RSA-Patientinnen verglichen zur Normalschwangerschaft geringer ist,. Sie untersuchten ebenfalls Patientinnen im ersten Trimenon. Die von uns gefundene erhöhte Expression des Leptin-Rezeptors im plazentaren Gewebe von Abortpatientinnen könnte möglicherweise eine Antwort auf diese Hypoleptinämie in Form einer Hochregulierung auf Rezeptorebene sein, um ein besseres Ansprechen der Zellen auf das verringerte Leptinangebot zu gewährleisten (Laird, Quinton et al. 2001).

Wie beim Leptin-Rezeptor zeigte sich auch bei der Untersuchung des Insulin-Rezeptors die höchste Expression in allen untersuchten Zellen der Blasenmolen. Beim Insulin-Rezeptor ergab sich im Abortgewebe ebenfalls in allen untersuchten Zellen eine erhöhte Expression, auch wenn die p-Werte teilweise eine niedrigere Signifikanz erreichten als bei den Blasenmolen.

Die Verteilung und Expression des Insulin-Rezeptors ist durch einen räumlich-zeitlichen Wechsel zwischen dem ersten und dritten Trimenon charakterisiert (Desoye, Hartmann et al. 1997). Zu Beginn der Schwangerschaft werden die Insulin-Rezeptoren fast nur auf der mütterlichen Seite exprimiert. Genauer gesagt

findet sich der Insulin-Rezeptor in der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten, eine geringe Expression zeigte sich ebenfalls im Zytotrophoblasten. Hingegen ist in Terminplazenten der Insulin-Rezeptor besonders auf der fetalen Seite zu finden. Er kleidet dort die Endothelien der fetalen Blutgefäße aus (Desoye, Hartmann et al. 1994), (Jones, Hartmann et al. 1993). Diese Verschiebung der Expression mit steigendem Schwangerschaftsalter deutet an, dass zu Beginn der Schwangerschaft maternales Insulin die insulinabhängigen Prozesse kontrolliert. Zum Ende der Schwangerschaft hin übernimmt das fetale Insulin dann diese Aufgaben. Die Zotten sind am Beginn der Schwangerschaft Ort einer hohen Proliferation (Castellucci, Scheper et al. 1990) und genau dort wird der Insulin-Rezeptor im ersten Trimenon besonders stark exprimiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass Insulin eine wachstumsfördernde Wirkung auf den villösen Trophoblasten haben könnte (Straus 1984).

Der Nachweis der Leptin- und Insulin-Rezeptor-Expression legt nahe, dass diese beiden Rezeptoren eine potentielle Rolle bei autokrinen und parakrinen Interaktionen im Rahmen der Früh-Schwangerschaft spielen könnten. Die Mehrheit der Rezeptoren wird auf Strukturen exprimiert, die mit einem gesteigerten placentaren Wachstum in Verbindung gebracht werden (synzytiale Sprossen und mesenchymale Zotten des ersten Trimenon und fetales Endothelium am Ende der Schwangerschaft). Diese Tatsache könnte man unter anderem als wachstumsfördernde Funktion des Leptin- und Insulin-Rezeptors interpretieren.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, findet die Embryonalentwicklung in hypoxischen Verhältnissen statt (Rodesch, Simon et al. 1992). Der intervillöse Raum ist dabei komplett durch okkludierenden Trophoblastzellen von der uterinen Gefäßversorgung abgetrennt. In der gestörten Frühschwangerschaft ist die Einwanderung der Trophoblasten eingeschränkt, die Trophoblasten okkludieren daher die Spiralarterien nicht ausreichend und es kommt zu einer verfrühten maternalen Vaskularisierung der Plazenta (Hustin, Jauniaux et al. 1990). Es wird vermutet, dass diese verfrühte Öffnung der Gefäße dazu führt, dass der Embryo nicht ausreichend vor der plötzlichen Oxygenisierung geschützt ist und daher die Schwangerschaft in einem Abort enden könnte.

Möglicherweise spielen Leptin- und Insulin-Rezeptor eine Rolle in diesen pathophysiologischen Mechanismen.

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit einem immer noch sehr sensiblem Thema auseinander. Die im Vergleich zu anderen Studien eher geringe Fallzahl lässt sich

dadurch gut erklären und ist im Vergleich mit internationaler Literatur, die sich ebenfalls mit Aborten oder Blasenmolen befasst, durchaus Standard.

Bezüglich der Tatsache der teilweisen Behandlung der Patientinnen in der Kontrollgruppe mit Mifegyne konnten wir keine Inhomogenität in der Expression der untersuchten Parameter erkennen. Zu erwarten wäre dies eher bei Untersuchungen an Steroidhormonrezeptoren gewesen, da Mifegyne ein Progesteron-Rezeptor-Antagonist ist.

# 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation dient dazu, das Verständnis der Rolle von Erythropoetin und der Rezeptoren für Erythropoetin, Leptin und Insulin in der Entwicklung der Plazenta zu verbessern. Erythropoetin reguliert die Erythropoese im Knochenmark und damit die Anzahl der zirkulierenden peripheren Erythrozyten. Der Erythropoetin-Rezeptor wurde schon in verschiedenen Geweben nachgewiesen, darunter auch im Uterus. Leptin und Insulin werden von der Plazenta produziert und in den maternalen, sowieso in den fetalen Kreislauf sezerniert. Dort agieren sie als Signalgeber, die den Stoffwechsel des Feten steuern.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde Gewebe von Plazenten des ersten Trimenons untersucht (Schwangerschaftsabbrüchen (Kontrollen), Aborten sowie Blasenmolen). Die Ergebnisse der Immunhistochemie wurden auf mRNA-Ebene mittels Real time RT-PCR bestätigt. Die in der Immunhistochemie identifizierten Zellen wurden mittels Doppelimmunfluoreszenz als extravillöse Trophoblasten und im Falle des Leptin- und Insulin-Rezeptors als Epithelzellen der dezidualen Drüsen nachgewiesen.

Die Expression von Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor, Leptin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor wurde in villösen und extravillösen Trophoblasten und in Epithelzellen der dezidualen Drüsen ausgewertet. Für den Insulin-Rezeptor wurden zusätzlich fetale und maternale Endothelzellen der Gefäße sowie deziduale Fibroblasten betrachtet. Die Expression war sowohl im Abortgewebe als auch bei Blasenmole erhöht. Die Expression des Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptors und Leptin-Rezeptors war am höchsten in villösen Trophoblasten der Blasenmolen, beim Insulin-Rezeptor war dies der Fall in dezidualen Fibroblasten sowieso Endothelzellen der Drüsen.

Möglicherweise wirkt die Hypoxie im Abortgewebe als Trigger für die Erythropoetinexpression und führt zu einer reaktiv erhöhten Expression des Erythropoetin-Rezeptors. Weiterhin könnte die vermehrte Expression auch als Marker für die gesteigerte Angiogenese bei Blasenmole gewertet werden. Die Expression von Leptin- und Insulin-Rezeptor wurde in Strukturen nachgewiesen, die für das plazentare Wachstum verantwortlich sind. Daher könnten sie eine wachstumsfördernde Wirkung haben. Bei der Blasenmole ist die Invasion des

Trophoblasten gestört und bei Aborten wird der Trophoblast durch das maternale Immunsystem erkannt und deswegen möglicherweise dessen Invasion gestört. Die vermehrte Expression der Rezeptoren könnte hierbei eine Kompensation darstellen. Trotz der eher geringen Fallzahl der vorliegenden Arbeit, könnten die Ergebnisse dabei helfen, neue Diagnostikmöglichkeiten zu erschließen. Inwieweit dies möglich ist, oder ob eventuell sogar ein therapeutischer Nutzen erarbeitet werden kann, bleibt Gegenstand weiterführender Studien.

# Anhang

- Erythropoetin IR-Scores (S. 62)
- Erythropoetin-Rezeptor IR-Scores (S. 63)
- Leptin-Rezeptor IR-Scores (S. 64)
- Insulin-Rezeptor IR-Scores (S. 65)
- Ergebnisse Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor RT-PCR (S. 66)
- Ergebnisse Leptin- und Insulin-Rezeptor RT-PCR (S. 67 u. 68)

# Erythropoetin IRS

Schnitt	Indikation	SSW	Syncytiotrophoblast			Extravillöser Trophoblast			deziduale Drüsen		
			Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score
1	Schizophr.	10	1	3	3	1	1	1	1	1	1
2	M.A.	10	1	3	3	1	2	2	1	2	2
33	Blasenmole	10	1	4	4	1	1	1	1	1	1
3	Kriminolog.	12	2	4	8	1	1	1	1	1	1
4	M.A.	12	1	4	4	1	2	2	1	2	2
34	Blasenmole	12	1	2	2	1	1	1	1	2	2
5	Z.n. Abruption	9	1	2	2	1	1	1	1	2	2
6	M.A.	9	1	4	4	1	2	2	1	3	3
35	Blasenmole	9	1	4	4	1	1	1	1	2	2
7	Z.n. Abruption	6	1	4	4	1	1	1	1	1	1
8	M.A.	6	1	3	3	1	2	2	1	2	2
36	Mole?	6	1	4	4	1	1	1	1	3	3
9	Z.n. Abruption	11	1	2	2	1	1	1	1	1	1
10	M.A.	11	1	4	4	1	2	2	1	2	2
37	Blasenmole	11	1	2	2	1	1	1	1	2	2
11	Schizophr.	10	1	4	4	1	1	1	1	3	3
12	M.A.	10	1	3	3	1	1	1	1	2	2
38	Blasenmole	10	1	4	4	1	2	2	1	4	4
13	Kriminolog.	8	1	3	3	1	1	1	1	2	2
14	M.A.	8	1	4	4	1	2	2	1	3	3
39	Blasenmole	8	1	3	3	1	2	2	1	3	3
15	Z.n. Abruption	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	M.A.	7	1	3	3	1	2	2	1	2	2
40	Blasenmole	7	1	3	3	1	2	2	1	2	2
17	Z.n. Abruption	9	1	1	1	1	1	1	1	2	2
18	M.A.	9	1	4	4	1	3	3	1	4	4
41	Blasenmole	9	1	3	3	1	3	3	1	3	3
19	Z.n. Abruption	8	1	4	4	1	3	3	1	4	4
20	M.A.	8	1	4	4	1	2	2	1	4	4
42	Blasenmole	8	1	3	3	1	3	3	1	3	3
21	Z.n. Abruption	6	1	3	3	1	2	2	1	2	2
22	M.A.	7	1	3	3	1	2	2	1	4	4
43	Blasenmole	7	1	3	3	1	2	2	1	2	2
23	Z.n. Abruption	9	1	2	2	1	2	2	1	2	2
24	M.A.	9	1	3	3	1	1	1	1	3	3
44	Blasenmole	9	2	3	6	2	3	6	1	3	3
29	z.n. Abruption	8	1	2	2	1	1	1	1	1	1
30	M.A.	7	2	4	8	1	4	4	1	2	2
47	Blasenmole	8	1	4	4	1	3	3	1	3	3
31	Beckenthro.	11	1	3	3	1	1	1	1	4	4
32	M.A.	11	1	3	3	1	1	1	1	2	2
48	Blasenmole	11	2	4	8	1	2	2	1	3	3

## Erythropoetin-Rezeptor IRS

Schnitt	Indikation	SSW	Syncytiotrophoblast			Extravillöser Trophoblast			deziduale Drüsen		
			Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score
1	Schizophr.	10	2	4	8	2	4	8	2	4	8
2	M.A.	10	2	4	8	2	4	8	2	4	8
33	Blasenmole	10	3	4	12	2	4	8	2	4	8
3	Kriminolog.	12	2	4	8	2	4	8	2	4	8
4	M.A.	12	2	4	8	2	4	8	2	4	8
34	Blasenmole	12	2	4	8	2	4	8	2	4	8
5	Z.n. Abruption	9	2	3	6	2	4	8	1	4	4
6	M.A.	9	3	4	12	2	4	8	2	4	8
35	Blasenmole	9	2	4	8	1	4	4	1	4	4
7	Z.n. Abruption	6	2	4	8	2	3	6	2	3	6
8	M.A.	6	2	4	8	2	4	8	2	4	8
36	Blasenmole	6	3	4	12	2	4	8	2	4	8
9	Z.n. Abruption	11	2	3	6	2	4	8	2	3	6
10	M.A.	11	2	4	8	2	4	8	2	4	8
37	Blasenmole	11	3	4	12	2	4	8	2	3	6
11	Schizophr.	10	2	4	8	1	4	4	1	4	4
12	M.A.	10	2	4	8	1	3	3	1	3	3
38	Blasenmole	10	2	4	8	1	4	4	2	4	8
13	Kriminolog.	8	2	4	8	1	3	3	1	3	3
14	M.A.	8	2	4	8	2	4	8	2	4	8
39	Blasenmole	8	3	4	12	2	4	8	2	4	8
15	Z.n. Abruption	7	1	3	3	1	4	4	2	3	6
16	M.A.	7	2	4	8	2	4	8	2	4	8
40	Blasenmole	7	2	4	8	1	4	4	2	4	8
17	Z.n. Abruption	9	2	4	8	2	4	8	2	4	8
18	M.A.	9	2	4	8	2	4	8	2	4	8
41	Blasenmole	9	3	4	12	2	4	8	3	4	12
19	Z.n. Abruption	8	2	3	6	2	4	8	2	4	8
20	M.A.	8	2	4	8	2	4	8	2	4	8
42	Blasenmole	8	2	4	8	1	4	4	2	4	8
21	Z.n. Abruption	6	2	2	4	2	2	4	2	2	4
22	M.A.	7	2	4	8	2	4	8	2	4	8
43	Blasenmole	7	3	4	12	2	4	8	3	4	12
23	Z.n. Abruption	9	2	2	4	2	4	8	2	4	8
24	M.A.	9	2	4	8	2	4	8	2	4	8
44	Blasenmole	9	3	4	12	2	4	8	3	4	12
29	Z.n. Abruption	8	1	3	3	1	4	4	1	3	3
30	M.A.	7	3	3	9	2	3	6	2	4	8
47	Blasenmole	8	3	4	12	3	4	12	3	4	12
31	Beckenthro.	11	2	4	8	1	4	4	2	4	8
32	M.A.	11	2	4	8	1	4	4	2	4	8
48	Blasenmole	11	3	4	12	2	4	8	3	4	12

# Leptin-Rezeptor IRS

Schnitt	Indikation	SSW	Syncytiotrophoblast			Extravillöser Trophoblast			deziduale Drüsen		
			Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score
1	Schizophr.	10	1	4	4	1	2	2	1	3	3
2	M.A.	10	2	3	6	2	3	6	1	4	4
<b>33</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
3	Kriminolog.	12	2	4	8	1	2	2	1	3	3
4	M.A.	12	2	4	8	2	2	4	2	2	4
<b>34</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
5	Z.n.Abruptio	9	1	3	3	0	0	0	1	3	3
6	M.A.	9	1	4	4	1	3	3	1	4	4
<b>35</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
7	Z.n.Abruptio	6	2	4	8	1	1	1	1	3	3
8	M.A.	6	2	4	8	2	3	6	1	4	4
<b>36</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
9	Z.n.Abruptio	11	1	3	3	0	0	0	1	2	2
10	M.A.	11	1	4	4	1	4	4	1	4	4
<b>37</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
11	Schizophr.	10	2	4	8	1	3	3	1	2	2
12	M.A.	10	1	4	4	1	1	1	1	2	2
<b>38</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
13	Kriminolog.	8	1	4	4	1	1	1	1	2	2
14	M.A.	8	1	4	4	1	3	3	1	3	3
<b>39</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
15	Z.n.Abruptio	7	1	2	2	0	0	0	1	2	2
16	M.A.	7	1	4	4	1	2	2	1	3	3
<b>40</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
17	Z.n.Abruptio	9	1	2	2	1	1	1	1	2	2
18	M.A.	9	2	3	6	2	3	6	2	3	6
<b>41</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
19	Z.n.Abruptio	8	1	3	3	2	3	6	1	3	3
20	M.A.	8	2	4	8	2	3	6	2	3	6
<b>42</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
21	Z.n.Abruptio	6	1	2	2	1	1	1	1	2	2
22	M.A.	7	2	4	8	2	4	8	2	3	6
<b>43</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>12</b>
23	Z.n.Abruptio	9	2	3	6	1	4	4	1	4	4
24	M.A.	9	2	4	8	2	2	4	2	4	8
<b>44</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
29	z.n.Abruptio	8	1	4	4	1	2	2	1	2	2
30	M.A.	7	3	4	12	1	3	3	1	2	2
<b>47</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
31	Beckenthro.	11	2	3	6	2	2	4	2	4	8
32	M.A.	11	1	4	4	1	3	3	1	4	4
<b>48</b>	<b>Blasenmole</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>

# Insulin-Rezeptor IRS

Schnitt	Indikation	SSW	Syncytiotrophoblast			Extravillöser Trophoblast			deziduale Drüsen			fetale Blutgefäße			deciduale Fibroblasten			maternale Gefäße		
			Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score	Intensität	%	IRS-Score
1	Schizophr.	10	1	4	4	2	3	6	2	4	8	1	3	3	2	4	8	1	2	2
2	M.A.	10	2	4	8	3	4	12	3	3	9	2	2	4	3	4	12	2	4	8
33	Blasenmole	10	3	4	12	2	4	8	3	4	12	2	4	8	2	4	8	2	3	6
3	Kriminolog.	12	2	4	8	2	2	4	2	3	6	2	3	6	2	3	6	1	3	3
4	M.A.	12	1	4	4	3	4	12	3	4	12	1	2	2	3	4	12	1	3	3
34	Blasenmole	12	2	4	8	3	4	12	3	4	12	2	4	8	3	4	12	2	4	8
5	Z.n.Abruptio	9	1	4	4	1	2	2	0	0	0	1	3	3	2	3	6	0	0	0
6	M.A.	9	2	4	8	2	3	6	2	3	6	2	4	8	2	3	6	1	2	2
35	Blasenmole	9	2	4	8	2	3	6	3	4	12	2	4	8	2	3	6	1	2	2
7	Z.n.Abruptio	6	2	4	8	2	4	8	2	4	8	2	3	6	1	3	3	1	3	3
8	M.A.	6	2	4	8	3	4	12	3	4	12	1	3	3	2	4	8	2	3	6
36	Blasenmole	6	3	4	12	3	4	12	3	4	12	3	4	12	3	4	12	3	4	12
9	Z.n.Abruptio	11	1	2	2	1	2	2	1	3	3	1	2	2	1	1	1	1	1	1
10	M.A.	11	2	4	8	2	4	8	2	4	8	2	2	4	2	3	6	1	4	4
37	Blasenmole	11	2	4	8	3	4	12	3	3	9	2	4	8	3	4	12	3	3	9
11	Schizophr.	10	2	4	8	1	2	2	1	3	3	2	2	4	2	2	4	1	2	2
12	M.A.	10	2	4	8	2	4	8	2	4	8	2	3	6	3	3	9	2	3	6
38	Blasenmole	10	3	4	12	3	4	12	3	4	12	3	4	12	3	4	12	3	4	12
13	Kriminolog.	8	3	4	12	1	2	2	1	1	1	2	2	4	2	3	6	2	4	8
14	M.A.	8	2	4	8	2	4	8	2	4	8	2	4	8	2	3	6	2	3	6
39	Blasenmole	8	2	4	8	2	4	8	3	4	12	2	4	8	3	4	12	3	3	9
15	Z.n.Abruptio	7	0	0	0	2	2	4	1	2	2	0	0	0	2	2	4	0	0	0
16	M.A.	7	1	4	4	2	4	8	2	4	8	1	4	4	2	3	6	1	3	3
40	Blasenmole	7	2	3	6	1	3	3	3	4	12	1	3	3	1	2	2	1	3	3
17	Z.n.Abruptio	9	1	2	2	2	2	4	2	2	4	1	1	1	1	2	2	0	0	0
18	M.A.	9	2	4	8	2	3	6	3	3	9	2	3	6	3	3	9	2	3	6
41	Blasenmole	9	2	4	8	3	4	12	3	4	12	3	3	9	3	4	12	2	4	8
19	Z.n.Abruptio	8	0	0	0	1	4	4	2	3	6	0	0	0	1	4	4	1	3	3
20	M.A.	8	2	4	8	2	2	4	2	3	6	2	3	6	2	3	6	1	3	3
42	Blasenmole	8	3	3	9	3	4	12	3	4	12	2	3	6	2	4	8	2	3	6
21	Z.n.Abruptio	6	1	4	4	1	2	2	1	2	2	1	3	3	1	2	2	1	2	2
22	M.A.	7	2	4	8	3	4	12	3	4	12	2	2	4	3	4	12	3	3	9
43	Blasenmole	7	3	4	12	2	4	8	3	4	12	2	4	8	2	4	8	2	3	6
23	Z.n.Abruptio	9	2	2	4	2	2	4	2	2	4	1	3	3	2	3	6	2	3	6
24	M.A.	9	2	3	6	2	3	6	2	4	8	2	3	6	2	3	6	1	3	3
44	Blasenmole	9	3	4	12	3	4	12	3	4	12	2	4	8	3	4	12	2	4	8
29	z.n.Abruptio	8	1	3	3	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	4	8	2	3	6
30	M.A.	7	3	4	12	2	4	8	2	4	8	2	4	8	3	4	12	1	3	3
47	Blasenmole	8	2	4	8	3	3	9	3	3	9	2	4	8	2	4	8	2	3	6
31	Beckenthro.	11	2	4	8	2	2	4	2	4	8	2	3	6	1	1	1	1	3	3
32	M.A.	11	1	4	4	2	3	6	2	4	8	1	3	3	2	3	6	1	3	3
48	Blasenmole	11	3	4	12	3	4	12	3	4	12	2	4	8	3	4	12	2	4	8

## Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor RT-PCR

Probe	ct: GAPDH	ct: EPO	ct: EPO-R.		dCt: EPO	dCT: EPO-R
6	19,909	32,535	25,025	Interruptio	12,626	5,116
9	19,665	33,58	25,949	Interruptio	13,915	2,75
13	24,54	35,963	30,747	Interruptio	11,423	6,207
26	27,454	35,963	31,465	Interruptio	8,509	4,011
45	19,683	33,146	24,829	Interruptio	13,463	5,146
41	21,346	34,75	28,279	Abort	13,404	6,933
47	19,348	33,911	25,329	Abort	14,563	5,981
48	18,323	32,563	23,596	Abort	14,24	5,273
46	19,065	35,589	25,218	Abort	16,524	6,153
69	19,674	35,589	22,424	Abort	15,915	6,284

Statistik für Test(b)

	EPO	EPOR
Mann-Whitney-U	2	3
Wilcoxon-W	17	18
Z	-2,193378465	-1,984485278
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,028280123	0,047201768
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,031746032	0,055555556
a	Nicht für Bindungen korrigiert.	
b	Gruppenvariable: VAR00003	

## Leptin- und Insulin-Rezeptor RT-PCR

GAPDH		Ct-Werte	Avg. Ct	dCt Werte einzeln	Avg. dCt	ddCt einzeln	Avg. ddCt	x fache Erhöhung
Abort	A1	19,266						
	A2	19,315						
	A3	17,56						
	A4	17,409						
	A5	18,788						
	A6	19,249						
	A7	21,079						
	A8	22,737						
	A9	19,796						
	A10	20						
	A11	19,953						
	A12	19,786	<b>19,578</b>					
Kontrolle	B1	17,29						
	B2	17,217						
	B3	19,235						
	B4	19,584						
	B5	18,569						
	B6	18,798						
	B7	19,613						
	B8	20,198						
	B9	24,654						
	B10	24,531						
	B11	19,757						
	B12	20,073	<b>19,960</b>					
<b>Insulin-R</b>								
Abort	C1	20,327		1,061		-1,683		
	C2	20,797		1,482		-1,371		
	C3	19,833		2,273		-0,330		
	C4	20,322		2,913		0,642		
	C5	20,829		2,041		-1,627		
	C6	20,888		1,639		-2,034		
	C7	23,501		2,422		-0,608		
	C8	23,568		0,831		-1,753		
	C9	21,596		1,800		1,524		
	C10	22		2,000		1,356		
	C11	21,775		1,822		0,559		
	C12	21,916	<b>21,446</b>	2,130	<b>1,868</b>	0,993	<b>-0,361</b>	<b>1,284</b>
Kontrolle	D1	20,034		2,744				
	D2	20,07		2,853				
	D3	21,838		2,603				
	D4	21,855		2,271				
	D5	22,237		3,668				
	D6	22,471		3,673				
	D7	22,643		3,030				
	D8	22,782		2,584				
	D9	24,93		0,276				
	D10	25,175		0,644				
	D11	21,02		1,263				
	D12	21,21	<b>22,189</b>	1,137	<b>2,229</b>			
<b>Leptin-R</b>								
Abort	E1	25,958		6,692		-5,663		
	E2	26,4		7,085		-5,543		
	E3	26,17		8,610		-2,796		
	E4	26,545		9,136		-2,333		
	E5	25,617		6,829		-5,188		
	E6	25,544		6,295		-5,338		
	E7	31,786		10,707		-1,792		
	E8	31,837		9,100		-2,952		
	E9	31,543		11,747		1,024		
	E10	31,605		11,605		0,136		
	E11	31,665		11,712		1,516		
	E12	31,512	<b>28,849</b>	11,726	<b>9,270</b>	1,672	<b>-2,271</b>	<b>4,828</b>
Kontrolle	F1	29,645		12,355				
	F2	29,845		12,628				
	F3	30,641		11,406				
	F4	31,053		11,469				
	F5	30,586		12,017				
	F6	30,431		11,633				
	F7	32,112		12,499				
	F8	32,25		12,052				
	F9	35,377		10,723				
	F10	36		11,469				
	F11	29,953		10,196				
	F12	30,127	<b>31,502</b>	10,054	<b>11,542</b>			

**Statistik für Test(b)**

	InsulinR	LeptinR
Mann-Whitney-U	67,000	67,000
Wilcoxon-W	220,000	238,000
Z	-2,486	-3,006
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,013	,003
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,012(a)	,002(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: VAR00005

# Literatur

- Acs, G., X. Xu, et al. (2004). "Prognostic significance of erythropoietin expression in human endometrial carcinoma." Cancer **100**(11): 2376-2386.
- Acs, G., P. J. Zhang, et al. (2003). "Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression." Am J Pathol **162**(6): 1789-1806.
- Anagnostou, A., Z. Liu, et al. (1994). "Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3974-3978.
- Arck, P. C., M. Rose, et al. (2001). "Stress and immune mediators in miscarriage." Hum Reprod **16**(7): 1505-1511.
- Beguín, Y., G. Lipscei, et al. (1990). "Serum immunoreactive erythropoietin during pregnancy and in the early postpartum." Br J Haematol **76**(4): 545-549.
- Bellver, J., L. P. Rossal, et al. (2003). "Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation." Fertil Steril **79**(5): 1136-1140.
- Berkowitz, R. S., D. W. Cramer, et al. (1985). "Risk factors for complete molar pregnancy from a case-control study." Am J Obstet Gynecol **152**(8): 1016-1020.
- Berkowitz, R. S., D. P. Goldstein, et al. (1985). "Natural history of partial molar pregnancy." Obstet Gynecol **66**(5): 677-681.
- Bodner, J., C. F. Ebenbichler, et al. (1999). "Leptin receptor in human term placenta: in situ hybridization and immunohistochemical localization." Placenta **20**(8): 677-682.
- Bouloumie, A., H. C. Drexler, et al. (1998). "Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis." Circ Res **83**(10): 1059-1066.
- Brown, H. (2007). "Abortion round the world." Bmj **335**(7628): 1018-1019.
- Buchholz, T. and C. J. Thaler (2003). "Inherited thrombophilia: impact on human reproduction." Am J Reprod Immunol **50**(1): 20-32.
- Castellucci, M., R. De Matteis, et al. (2000). "Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion." Mol Hum Reprod **6**(10): 951-958.
- Castellucci, M., M. Scheper, et al. (1990). "The development of the human placental villous tree." Anat Embryol (Berl) **181**(2): 117-128.
- Chardonens, D., P. Cameo, et al. (1999). "Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion." Mol Hum Reprod **5**(11): 1077-1082.

- Chen, B. A. and M. D. Creinin (2007). "Contemporary management of early pregnancy failure." Clin Obstet Gynecol **50**(1): 67-88.
- Choi, H. K., B. C. Choi, et al. (2003). "Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients." Mol Reprod Dev **66**(1): 24-31.
- Chung, P. H. and T. R. Yeko (1996). "Recurrent miscarriage: causes and management." Hosp Pract (Minneap) **31**(5): 157-164.
- Cioffi, J. A., A. W. Shafer, et al. (1996). "Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction." Nat Med **2**(5): 585-589.
- Clark, D. A., J. W. Ding, et al. (1999). "The emerging role of immunoregulation of fibrinogen-related procoagulant Fgl2 in the success or spontaneous abortion of early pregnancy in mice and humans." Am J Reprod Immunol **42**(1): 37-43.
- Conrad, K. P., D. F. Benyo, et al. (1996). "Expression of erythropoietin by the human placenta." Faseb J **10**(7): 760-768.
- de la Rochebrochard, E. and P. Thonneau (2002). "Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study." Hum Reprod **17**(6): 1649-1656.
- Desoye, G., M. Hartmann, et al. (1994). "Insulin receptors in syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern." Histochemistry **101**(4): 277-285.
- Desoye, G., M. Hartmann, et al. (1997). "Location of insulin receptors in the placenta and its progenitor tissues." Microsc Res Tech **38**(1-2): 63-75.
- Desoye, G., H. H. Hofmann, et al. (1992). "Insulin binding to trophoblast plasma membranes and placental glycogen content in well-controlled gestational diabetic women treated with diet or insulin, in well-controlled overt diabetic patients and in healthy control subjects." Diabetologia **35**(1): 45-55.
- Desoye, G., M. O. Schweditsch, et al. (1987). "Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum." J Clin Endocrinol Metab **64**(4): 704-712.
- Duran-Garcia, S., J. G. Nieto, et al. (1979). "Effect of gestational diabetes on insulin receptors in human placenta." Diabetologia **16**(2): 87-91.
- Fahnenstich, H. and C. Dame (1996). "Erythropoietin concentrations and erythropoiesis in newborns suffering from renal agenesis and congenital kidney diseases." Eur J Pediatr **155**(3): 185-188.
- Fandrey, J. and H. F. Bunn (1993). "In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction." Blood **81**(3): 617-623.

- Fantuzzi, G. and R. Faggioni (2000). "Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis." J Leukoc Biol **68**(4): 437-446.
- Fisher, R. A., R. Khatoun, et al. (2000). "Repetitive complete hydatidiform mole can be biparental in origin and either male or female." Hum Reprod **15**(3): 594-598.
- Forbes, K. and M. Westwood (2008). "The IGF axis and placental function. a mini review." Horm Res **69**(3): 129-137.
- Garner, E. I., D. P. Goldstein, et al. (2007). "Gestational trophoblastic disease." Clin Obstet Gynecol **50**(1): 112-122.
- Girsen, A., K. Makikallio, et al. (2007). "The relationship between human fetal cardiovascular hemodynamics and serum erythropoietin levels in growth-restricted fetuses." Am J Obstet Gynecol **196**(5): 467 e461-466.
- Gracia, C. R., M. D. Sammel, et al. (2005). "Risk factors for spontaneous abortion in early symptomatic first-trimester pregnancies." Obstet Gynecol **106**(5 Pt 1): 993-999.
- Griebel, C. P., J. Halvorsen, et al. (2005). "Management of spontaneous abortion." Am Fam Physician **72**(7): 1243-1250.
- Guyer, B., D. L. Hoyert, et al. (1999). "Annual summary of vital statistics--1998." Pediatrics **104**(6): 1229-1246.
- Haag, P., N. Hanhart, et al. (2003). Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis. Breisach am Rhein, Medizinische Verlags- und Informationsdienste: pp. 115-120.
- Hancock, B. W. and J. A. Tidy (2002). "Current management of molar pregnancy." J Reprod Med **47**(5): 347-354.
- Hassink, S. G., E. de Lancey, et al. (1997). "Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development?" Pediatrics **100**(1): E1.
- Henson, M. C., K. F. Swan, et al. (1998). "Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term." Obstet Gynecol **92**(6): 1020-1028.
- Herold, G. (2004). Innere Medizin. Köln, Dr. med. Gerd Herold: pp. 595-620.
- Hoggard, N., L. Hunter, et al. (1997). "Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 11073-11078.
- Holzapfel, B. W., Lucia (2007). "Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)." Biologie in unserer Zeit **Band 37**(Nr. 2): S. 120-126.
- Hustin, J., E. Jauniaux, et al. (1990). "Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion." Placenta **11**(6): 477-486.

- Hustin, J. and J. P. Schaaps (1987). "Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy." Am J Obstet Gynecol **157**(1): 162-168.
- Ireland, R., A. Abbas, et al. (1992). "Fetal and maternal erythropoietin levels in normal pregnancy." Fetal Diagn Ther **7**(1): 21-25.
- Jaffe, R., E. Jauniaux, et al. (1997). "Maternal circulation in the first-trimester human placenta--myth or reality?" Am J Obstet Gynecol **176**(3): 695-705.
- Jauniaux, E., J. Hempstock, et al. (2003). "Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies." Am J Pathol **162**(1): 115-125.
- Jauniaux, E., D. Jurkovic, et al. (1991). "In vivo investigations of the anatomy and the physiology of early human placental circulations." Ultrasound Obstet Gynecol **1**(6): 435-445.
- Jeffers, M. D., P. O'Dwyer, et al. (1993). "Partial hydatidiform mole: a common but underdiagnosed condition. A 3-year retrospective clinicopathological and DNA flow cytometric analysis." Int J Gynecol Pathol **12**(4): 315-323.
- Jin, L., S. Zhang, et al. (2000). "Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells." Endocrinology **141**(1): 333-339.
- Jones, C. J., M. Hartmann, et al. (1993). "Ultrastructural localization of insulin receptors in human placenta." Am J Reprod Immunol **30**(2-3): 136-145.
- Kajii, T. and K. Ohama (1977). "Androgenetic origin of hydatidiform mole." Nature **268**(5621): 633-634.
- Karlsson, C., K. Lindell, et al. (1997). "Expression of functional leptin receptors in the human ovary." J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4144-4148.
- Kim, M. J., L. Bogic, et al. (2001). "Placental expression of erythropoietin mRNA, protein and receptor in sheep." Placenta **22**(5): 484-489.
- Kingdom, J., B. Huppertz, et al. (2000). "Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **92**(1): 35-43.
- Kitawaki, J., H. Koshihara, et al. (2000). "Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle." J Clin Endocrinol Metab **85**(5): 1946-1950.
- Kliman, H. J., J. E. Nestler, et al. (1986). "Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae." Endocrinology **118**(4): 1567-1582.
- Kuhl, C. (1975). "Glucose metabolism during and after pregnancy in normal and gestational diabetic women. 1. Influence of normal pregnancy on serum glucose

- and insulin concentration during basal fasting conditions and after a challenge with glucose." Acta Endocrinol (Copenh) **79**(4): 709-719.
- Kurjak, A. and S. Kupesic (1997). "Doppler assessment of the intervillous blood flow in normal and abnormal early pregnancy." Obstet Gynecol **89**(2): 252-256.
- Laird, S. M., N. D. Quinton, et al. (2001). "Leptin and leptin-binding activity in women with recurrent miscarriage: correlation with pregnancy outcome." Hum Reprod **16**(9): 2008-2013.
- Lappin, T. (2003). "The cellular biology of erythropoietin receptors." Oncologist **8 Suppl 1**: 15-18.
- Lawler, S. D., R. A. Fisher, et al. (1982). "Genetic studies on hydatidiform moles. I. The origin of partial moles." Cancer Genet Cytogenet **5**(4): 309-320.
- Lawler, S. D., V. J. Pickthall, et al. (1979). "Genetic studies of complete and partial hydatidiform moles." Lancet **2**(8142): 580.
- Lawler, S. D., S. Povey, et al. (1982). "Genetic studies on hydatidiform moles. II. The origin of complete moles." Ann Hum Genet **46**(Pt 3): 209-222.
- Lazaro, R. M., J. J. Garcia, et al. (2002). "Insulin receptor binding to erythrocytes during normal pregnancy: an update of the method." Anal Bioanal Chem **372**(1): 148-154.
- Leconte, I., C. Auzan, et al. (1992). "N-linked oligosaccharide chains of the insulin receptor beta subunit are essential for transmembrane signaling." J Biol Chem **267**(24): 17415-17423.
- Lee, J. and P. F. Pilch (1994). "The insulin receptor: structure, function, and signaling." Am J Physiol **266**(2 Pt 1): C319-334.
- Lewandowski, K., R. Horn, et al. (1999). "Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies." J Clin Endocrinol Metab **84**(1): 300-306.
- Li, R. H., M. M. Yu, et al. (2004). "Expression of leptin and leptin receptors in gestational trophoblastic diseases." Gynecol Oncol **95**(2): 299-306.
- Li, T. C., M. Makris, et al. (2002). "Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis." Hum Reprod Update **8**(5): 463-481.
- Lyall, F., J. N. Bulmer, et al. (1999). "Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide." Am J Pathol **154**(4): 1105-1114.
- Maier, R. F., A. Gunther, et al. (1994). "Umbilical venous erythropoietin and umbilical arterial pH in relation to morphologic placental abnormalities." Obstet Gynecol **84**(1): 81-87.
- Mantzoros, C. S. (1999). "The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence." Ann Intern Med **130**(8): 671-680.

- Mantzoros, C. S. (2000). "Role of leptin in reproduction." Ann N Y Acad Sci **900**: 174-183.
- Masuda, S., T. Kobayashi, et al. (2000). "The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(6): E1038-1044.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, et al. (1997). "Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans." Nat Med **3**(9): 1029-1033.
- Matsuzaki, S., M. Canis, et al. (2003). "Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in peritoneal endometriosis." Hum Reprod **18**(1): 152-156.
- Metwally, M., T. C. Li, et al. (2007). "The impact of obesity on female reproductive function." Obes Rev **8**(6): 515-523.
- Noll, S. and S. Schaub-Kuhnen (2000). *Praxis der Immunhistochemie*. München, Jena, Urban & Fischer Verlag: pp. 17-18.
- Palmer, J. R. (1994). "Advances in the epidemiology of gestational trophoblastic disease." J Reprod Med **39**(3): 155-162.
- Pollio, F., S. Staibano, et al. (2005). "Erythropoietin and erythropoietin receptor system in a large uterine myoma of a patient with myomatous erythrocytosis syndrome: possible relationship with the pathogenesis of unusual tumor size." Hum Pathol **36**(1): 120-127.
- Rai, R. and L. Regan (2006). "Recurrent miscarriage." Lancet **368**(9535): 601-611.
- Regan, L., P. R. Braude, et al. (1989). "Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion." Bmj **299**(6698): 541-545.
- Regan, L. and R. Rai (2000). "Epidemiology and the medical causes of miscarriage." Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **14**(5): 839-854.
- Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]." Pathologe **8**(3): 138-140.
- Renz-Polster, H. and J. Braun (2000). *Basislehrbuch Innere Medizin*. München, Jena, Urban & Fischer Verlag: pp. 772-777.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.
- Rodesch, F., P. Simon, et al. (1992). "Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy." Obstet Gynecol **80**(2): 283-285.
- Ruiz-Cortes, Z. T., T. Men, et al. (2000). "Porcine leptin receptor: molecular structure and expression in the ovary." Mol Reprod Dev **56**(4): 465-474.
- Sabogal, J. C. and L. Munoz (2001). "Leptin in obstetrics and gynecology: a review." Obstet Gynecol Surv **56**(4): 225-230.
- Sagawa, N., T. Mori, et al. (1997). "Leptin production by hydatidiform mole." Lancet **350**(9090): 1518-1519.

- Sagawa, N., S. Yura, et al. (2002). "Possible role of placental leptin in pregnancy: a review." Endocrine **19**(1): 65-71.
- Sagawa, N., S. Yura, et al. (2002). "Role of leptin in pregnancy--a review." Placenta **23 Suppl A**: S80-86.
- Sasaki, R., S. Masuda, et al. (2000). "Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis." Biosci Biotechnol Biochem **64**(9): 1775-1793.
- Schneider, H. and A. Malek (1995). "Lack of permeability of the human placenta for erythropoietin." J Perinat Med **23**(1-2): 71-76.
- Seckl, M. J., R. A. Fisher, et al. (2000). "Choriocarcinoma and partial hydatidiform moles." Lancet **356**(9223): 36-39.
- Shiverick, K. T., A. King, et al. (2001). "Cell culture models of human trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report." Placenta **22 Suppl A**: S104-106.
- Slim, R. and A. Mehio (2007). "The genetics of hydatidiform moles: new lights on an ancient disease." Clin Genet **71**(1): 25-34.
- Stauber, M. and T. Weyerstahl (2005). Duale Reihe. Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG: pp. 490-496.
- Stauber, M. and T. Weyerstahl (2005). Duale Reihe. Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG: pp. 480-486.
- Stephenson, M. D., K. A. Awartani, et al. (2002). "Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study." Hum Reprod **17**(2): 446-451.
- Straus, D. S. (1984). "Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo." Endocr Rev **5**(2): 356-369.
- Tartaglia, L. A. (1997). "The leptin receptor." J Biol Chem **272**(10): 6093-6096.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, et al. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." Cell **83**(7): 1263-1271.
- Teramo, K. A., V. K. Hillesmaa, et al. (2004). "Amniotic fluid and cord plasma erythropoietin levels in pregnancies complicated by preeclampsia, pregnancy-induced hypertension and chronic hypertension." J Perinat Med **32**(3): 240-247.
- Tilbrook, P. A. and S. P. Klinken (1999). "Erythropoietin and erythropoietin receptor." Growth Factors **17**(1): 25-35.
- Toth, B., M. Bastug, et al. (2008). "Leptin and peroxisome proliferator-activated receptors: impact on normal and disturbed first trimester human pregnancy." in print.
- Toth, B., D. Hornung, et al. (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptors: new players in the field of reproduction." Am J Reprod Immunol **58**(3): 289-310.
- Toth, B., C. A. Lok, et al. (2007). "Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy." Am J Reprod Immunol **58**(5): 389-402.

- Toth, B., R. Nieuwland, et al. (2008). "Systemic changes in haemostatic balance are not associated with increased levels of circulating microparticles in women with recurrent spontaneous abortion." Am J Reprod Immunol **59**(2): 159-166.
- Ventura, S. J., S. M. Taffel, et al. (1988). "Estimates of pregnancies and pregnancy rates for the United States, 1976-85." Am J Public Health **78**(5): 506-511.
- Wabitsch, M., P. B. Jensen, et al. (1996). "Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells." Diabetes **45**(10): 1435-1438.
- Ward, C., M. Lawrence, et al. (2008). "Structural insights into ligand-induced activation of the insulin receptor." Acta Physiol (Oxf) **192**(1): 3-9.
- Ward, C. W., M. C. Lawrence, et al. (2007). "The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation." Trends Biochem Sci **32**(3): 129-137.
- Welsch, U. (2002). Sobotta Atlas Histologie. München, Jena, Urban & Fischer Verlag: p. 193.
- Widness, J. A., R. L. Schmidt, et al. (1995). "Erythropoietin transplacental passage-- review of animal studies." J Perinat Med **23**(1-2): 61-70.
- Yamashita, H., J. Shao, et al. (2000). "Physiologic and molecular alterations in carbohydrate metabolism during pregnancy and gestational diabetes mellitus." Clin Obstet Gynecol **43**(1): 87-98.
- Yamashita, H., J. Shao, et al. (2001). "Leptin administration prevents spontaneous gestational diabetes in heterozygous Lepr(db/+) mice: effects on placental leptin and fetal growth." Endocrinology **142**(7): 2888-2897.
- Yasuda, Y., Y. Fujita, et al. (2001). "Expression of erythropoietin in human female reproductive organs." Ital J Anat Embryol **106**(2 Suppl 2): 215-222.
- Yasuda, Y., S. Masuda, et al. (1998). "Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis." J Biol Chem **273**(39): 25381-25387.
- Yokomizo, R., S. Matsuzaki, et al. (2002). "Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle." Mol Hum Reprod **8**(5): 441-446.
- Zick, Y. (1989). "The insulin receptor: structure and function." Crit Rev Biochem Mol Biol **24**(3): 217-269.

# Danksagungen

Ich danke Frau PD Dr. Bettina Toth für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung und durchgehende Beratung und Betreuung im Rahmen dieser Arbeit.

Herrn Prof Dr. Udo Jeschke danke ich für die sehr kompetente, freundliche Betreuung und jederzeit mögliche Beratung besonders bei der Auswertung der Immunhistochemie und Unterstützung bei statistischen Fragen.

Frau Christina Kuhn danke ich für die unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen, sowie Frau Susanne Kunze und Frau Sandra Schulze, die mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen.

Frau Irmi Wiest danke ich für das geduldige Korrekturlesen meiner Dissertation. Ebenso danke ich allen weiteren MitarbeiterInnen im Labor der Frauenklinik Maistrasse.

Ich bedanke mich weiterhin bei meinen Kommilitonen, Herrn Thomas Haufe, Frau Laura Santoso und Herrn Mehmet Bastug für die nette, kollegiale Zusammenarbeit sowie die Begleitung zum Kongress der DGGG in Hamburg.

Besonders freute mich die freundschaftliche und familiäre Atmosphäre im Labor der Frauenklinik Maistrasse.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, Frau Karin Fischl und Herrn Rudolf Fischl, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Dasselbe gilt in gleicher Hinsicht für meine Großeltern, für deren Hilfe ich sehr dankbar bin.

Ebenso danke ich meinem Ehemann, Michel Kneller, der mir bei Fragen bezüglich Microsoft Excel und Word immer gerne zur Seite stand. Meinem Vater danke ich ausserdem für das finale Korrekturlesen meiner Dissertation.

# Veröffentlichungen

- 04/2008      B. Toth, A. Fischl, C. Scholz, S. Kunze, K. Friese, U. Jeschke:  
Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in normal and  
disturbed pregnancy.  
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. May 2008
- 04/2009      B. Toth, A. Fischl, C. Scholz, C. Kuhn, K. Friese, M.Karamouti, A.  
Makrigiannakis, U. Jeschke:  
Insulin and leptin receptors as possible new candidates for endocrine  
control in normal and disturbed human pregnancy  
Mol Hum Reprod. April 2009