

Intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) mit ARED-Flow in der Dopplersonographie der Arteria umbilicalis:

Molekulargenetische Analyse der Gene *IGF-I* und *IGF-IR*

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Athina Kapagerof

aus

Amarousio (Griechenland)

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Klaus Zerres

Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Werner Rath

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juni 2006

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Inhalt

1	Einleitung	7
2	Allgemeine Grundlagen	9
2.1	Anatomische und physiologische Grundlagen.....	9
2.1.1	Plazenta	9
2.1.2	Uteroplazentarer Kreislauf	10
2.1.3	Fetoplazentarer Kreislauf	10
2.2	Intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR)	11
2.2.1	Definition und Einteilung.....	11
2.2.2	Ätiologie.....	12
2.2.3	Pathologische Anatomie und Pathogenese.....	13
2.2.3.1	Uteroplazentare Versorgungsstörung.....	14
2.2.3.2	Reifungsstörungen der Plazentazotten.....	15
2.2.4	Diagnostik	17
2.2.4.1	Diagnostisches Vorgehen und Überwachung	17
2.2.4.2	Klinische Bedeutung der Dopplersonographie	18
2.2.5	Therapieansätze.....	20
2.2.6	Prognose	21
2.3	Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft (HES).....	22
2.3.1	Definition und Einteilung.....	22
2.3.2	Ätiologie.....	23
2.3.3	Pathologische Anatomie und Pathogenese.....	25
2.4	Wachstumsfördernde Faktoren und Regulation der Plazentaentwicklung	26

2.4.1	<i>Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)</i>	26
2.4.1.1	Molekulargenetik und Struktur von <i>IGF-I</i>	26
2.4.1.2	Expression und Funktion von <i>IGF-I</i>	27
2.4.2	<i>Insulin-like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR)</i>	29
2.4.2.1	Molekulargenetik und Struktur von <i>IGF-IR</i>	29
2.4.2.2	Expression und Funktion von <i>IGF-IR</i>	30
2.4.3	Regulation der Expression von <i>IGF-I</i> und <i>IGF-IR</i>	32
3	Material und Methoden.....	34
3.1	Probandenkollektiv	34
3.2	Materialien	35
3.2.1	Chemikalien	35
3.2.2	Puffer.....	35
3.2.3	Kits	36
3.2.4	Enzyme.....	36
3.2.5	Oligonukleotid-Primer	37
3.2.6	Geräte und sonstige Arbeitsutensilien.....	37
3.3	Molekulargenetische Methoden.....	38
3.3.1	DNA-Isolation.....	38
3.3.1.1	DNA-Isolation aus Frischblut.....	38
3.3.1.2	DNA-Isolation aus Paraffinblöcken.....	38
3.3.1.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	38
3.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	41
3.3.4	Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (SSCP)	42

3.3.5	Direkter Mutationsnachweis	43
3.3.5.1	DNA-Sequenzierung.....	43
3.3.5.2	Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP).....	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Mutationsanalyse der Gene <i>IGF-I</i> und <i>IGF-IR</i>	47
4.1.1	Ergebnisse der Analyse des <i>IGF-I</i> -Gens.....	47
4.1.2	Ergebnisse der Analyse des <i>IGF-IR</i> -Gens	48
4.1.2.1	5'-untranslatierte Region des <i>IGF-IR</i> -Gens.....	50
4.1.2.2	Kodierende Region des <i>IGF-IR</i> -Gens.....	52
4.1.2.3	3'-untranslatierte Region des <i>IGF-IR</i> -Gens.....	54
5	Diskussion.....	61
5.1	Angewandte molekulargenetische Methoden	61
5.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	61
5.1.2	Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (SSCP)	62
5.1.3	DNA-Sequenzierung	63
5.1.4	Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP).....	63
5.2	Rolle von <i>IGF-I</i> und <i>IGF-IR</i> bei der Entstehung von IUGR mit ARED-Flow	64
5.2.1	Mögliche funktionelle Folgen von Mutationen der Gene <i>IGF-I</i> und <i>IGF-IR</i>	64
5.2.2	Ergebnisse der Mutationsanalyse der Gene <i>IGF-I</i> und <i>IGF-IR</i>	65
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	67
6	Zusammenfassung.....	68
7	Literatur.....	70

8	Anhang.....	87
8.1	Übersicht des Probandenkollektives.....	87
8.1.1	Patientenkollektiv.....	87
8.1.2	Kontrollkollektiv.....	88
8.2	Primer-Sequenzen für das <i>IGF-I</i> -Gen und das <i>IGF-IR</i> -Gen.....	89
8.3	Übersicht der Ergebnisse aus der Mutationsanalyse in dem <i>IGF-IR</i> -Gen.....	91
8.3.1	Patientenkollektiv.....	91
8.3.2	Kontrollkollektiv.....	92
9	Abkürzungsverzeichnis.....	93
10	Danksagung.....	96
11	Lebenslauf.....	97

1 Einleitung

Eine intrauterine Wachstumsretardierung („Intrauterine Growth Retardation/ Restriction“, [IUGR]) liegt vor, wenn ein Neugeborenes mit seinem Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile der Norm für das Gestationsalter liegt und - in Abgrenzung zu dem Terminus „zu klein für das Gestationsalter“ („Small for Gestational Age“, [SGA]) - zusätzlich eine pathologische Wachstumsrestriktion auf genetischer oder umweltbedingter Basis vorliegt (59; 143; 156).

Die IUGR ist in vielen Fällen mit einer Präeklampsie vergesellschaftet (26; 43). Bei der Präeklampsie handelt es sich um eine syndromale Erkrankung aus dem Formenkreis der hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft (HES), die mit einer Häufigkeit von 5-7% aller Schwangerschaften zu den wichtigsten Krankheitsbildern der Geburtshilfe gehören (41; 119). IUGR und Präeklampsie führen zur Frühgeburtlichkeit und sind mit einer besonders hohen Perinatalsterblichkeit sowie Morbidität – einschliesslich Beeinträchtigung der Langzeitentwicklung – verbunden (115; 156; 141).

Diese beiden Schwangerschaftspathologien (IUGR und Präeklampsie) werden auf Störungen der Plazentation zurückgeführt, welche die fetoplazentaren und / oder uteroplazentaren Gefässgebiete betreffen können und zu einer Mangelversorgung des Feten führen. Die daraus resultierende fetale Hypoxie wird nach Kingdom und Kaufmann (1997) in eine präplazentare, eine uteroplazentare und eine postplazentare Hypoxie unterteilt (79).

Die funktionellen Auswirkungen der morphologischen Veränderungen in der Plazenta können mit der Dopplersonographie erfasst werden (143). Dabei wird zur Beurteilung der fetoplazentaren Hämodynamik die A.umbilicalis und zur Evaluierung der uteroplazentaren Durchblutung vornehmlich die A.uterina herangezogen. Bei früh auftretenden und schweren Formen der IUGR zeigt sich ein hochpathologisches Dopplerströmungsprofil der A.umbilicalis mit Verlust bis hin zur Strömungsumkehr des enddiastolischen Flusses („Absent or Reversed EndDiastolic-Flow“, [ARED]) als Ausdruck eines stark erhöhten Widerstandes im Umbilikalkreislauf. Durch einen eingeschränkten Sauerstoffabtransport über das fetoplazentare Gefäßsystem der Zotten kommt es zu einer lokalen intraplazentaren Hyperoxie bei gleichzeitiger dramatischer Unterversorgung des Feten (postplazentare Hypoxie). Histologisch ist eine Zottenpathologie vorhanden, die durch eine ungenügende

Entwicklung der Endzotten mit mangelnder Vaskularisierung charakterisiert ist (Dominanz der sogenannten „non-branching“-Angiogenese) (79; 80). Bei der IUGR mit ARED-Flow ist die Perinatalsterblichkeit mit mehr als 40% besonders hoch. Weniger stark ausgeprägte Formen der IUGR, die sich erst im späteren Schwangerschaftsverlauf manifestieren, zeigen einen normalen Dopplerbefund der Umbilikalarterie bei meist gleichzeitig bestehender uteroplazentarer Gefäßpathologie mit pathologischem Dopplersonogramm der A.uterina. Der eingeschränkte Zustrom von maternalem Blut in den intervillösen Raum führt zu einer intraplazentaren Hypoxie (uteroplazentare Hypoxie). Morphologisch findet man Zeichen einer gesteigerten Zytotrophoblastproliferation und einer Hyperkapillarisation im Bereich der Endzotten (Dominanz der sogenannten „branching“-Angiogenese) (79; 80).

Eine besondere Rolle bei den Wachstumsvorgängen im Verlauf der plazentaren Zottenreifung spielt der *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)*, der seine Wirkung über die Interaktion mit seinem spezifischen Rezeptor *IGF-IR* entfaltet. Die Korrelation des fetalen Geburtsgewichtes sowohl mit der *IGF-I*-Konzentration im Nabelschnurblut und im mütterlichen Blut als auch mit der *IGF-I*- und *IGF-IR*-Expression in der Plazenta ist durch zahlreiche Studien belegt (3; 34; 44; 58; 68; 81; 85; 94; 136; 139). Die wachstumsfördernde Wirkung von *IGF-I* auf die Entwicklung der Plazentazotten betrifft einerseits die Proliferation des villösen Zytotrophoblasten und andererseits die Vorgänge der Angiogenese (27; 66; 75; 102; 160). Dabei wird die *IGF-I*-Wirkung durch die Bindung von *IGF-I* an den spezifischen *IGF-I-Rezeptor* sowie an spezifische *IGF-Bindungsproteine* moduliert, so dass alle diese Parameter zusammen ein funktionelles System bilden. Die verminderte Aktivität des *IGF-I*-Systems scheint für die eingeschränkte Zytotrophoblastproliferation und Angiogenese bei der IUGR mit ARED-Flow verantwortlich zu sein.

Ziel der vorliegenden Studie war es, Mutationen der Gene *IGF-I* und *IGF-IR* in einem Patientenkollektiv mit IUGR und ARED-Flow in der Dopplersonographie der A.umbilicalis zu identifizieren, die für die Fehlentwicklung der Plazentazotten verantwortlich sein können. Die Ergebnisse dieser Studie könnten das Wissen um die molekulargenetischen Grundlagen der Erkrankung erweitern und so einen Fortschritt ermöglichen im Hinblick auf ein tieferes Verständnis ätiopathogenetischer Vorgänge der IUGR mit ARED-Flow sowie sich daraus möglicherweise ergebender Konsequenzen für die genetische Beratung und Therapie betroffener Familien.

2 Allgemeine Grundlagen

2.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

2.1.1 Plazenta

Die reife menschliche Plazenta entwickelt sich während des 3. bis 6. Schwangerschaftsmonats. Sie dient dem embryo- bzw. feto-maternalen Gas- und Stoffaustausch sowie der Produktion von Steroidhormonen (Östrogene, Progesteron) und Proteohormonen (HCG, HCS) in Arbeitsteilung mit dem maternalen und dem fetalen Organismus als sogenannte maternofetoplazentare Einheit (s. Abb. 2-1a).

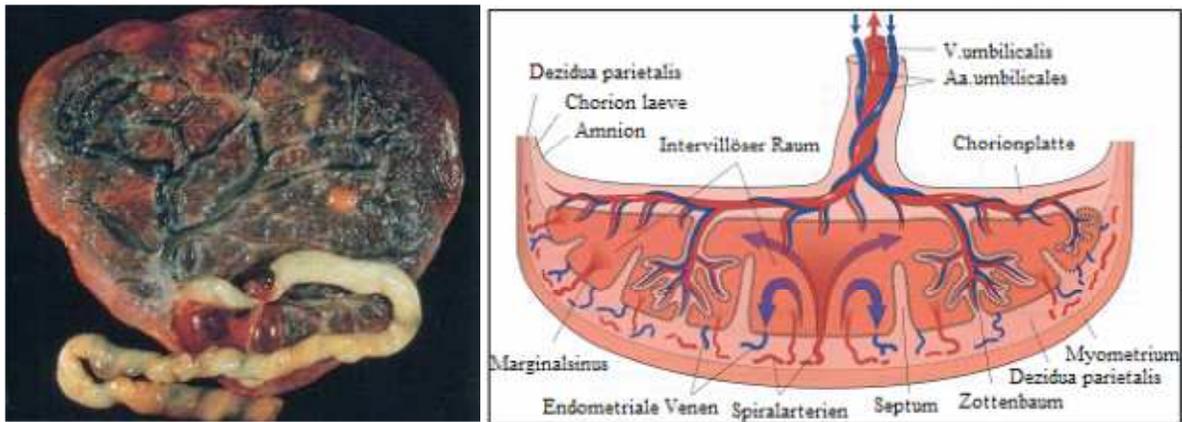


Abb. 2-1 a, b: Reife menschliche Plazenta mit Nabelschnur (a). Schematische Darstellung des Aufbaus der Plazenta (b) (Aus: Crum 1999)

Von zentraler Bedeutung für die Funktion der Plazenta als Versorgungsorgan des Feten ist eine normale Entwicklung der uteroplazentaren und der fetoplazentaren Gefäßgebiete, über die eine ausreichende Zufuhr maternalen und fetalen Blutes in die Austauschregion der Plazenta sichergestellt wird (s. Abb. 2-1b).

2.1.2 Uteroplazentarer Kreislauf

Das uteroplazentare Gefäßsystem wird durch ein Anastomosensystem aus den Aa.uterinae und Aa.ovaricae versorgt. Von diesen Gefässen gehen die im Myometrium gelegenen Arcuatagefässe als Gefässgeflecht ab. Hiervon zweigen wiederum etwa 100 Radialarterien ab, die sich in myometran gelegene Basalarterien und schliesslich in endometran und dezidual gelegene Spiralarterien aufteilen (92) (s. Abb. 2-1b).

Im Rahmen der physiologischen Plazentation vollziehen sich entscheidende morphologische und hämodynamische Veränderungen, aus denen die Umwandlung maternaler Spiralarterien in uteroplazentare Gefässe resultiert. Der extravillöse Trophoblast dringt invasiv in die Dezidua und das innere Drittel des Myometriums vor (interstitielle Invasion) mit besonderer Anreicherung in der Umgebung der Spiralarterien. Der interstitielle Trophoblast bewirkt gemeinsam mit den sich im Inneren der Spiralarterien ausbreitenden endovaskulären Trophoblastanteilen eine Zersetzung und Umwandlung der Gefässwände mit Auflösung der muskuloelastischen Anteile, die durch Fibrinoid ersetzt werden. Dieser physiologische Umwandlungsprozess führt zu einer Gefässdilatation im Endbereich der Spiralarterien, die der maternalen Vasomotorenkontrolle entzogen werden (23; 131) (s. Abb. 2-2). Insgesamt resultiert aus diesen morphologischen Gefässveränderungen eine 10fach höhere uteroplazentare Durchblutung. Gegen Ende der Schwangerschaft wird der Uterus etwa mit 500-800 ml/min durchblutet.

2.1.3 Fetoplazentarer Kreislauf

Die Nabelschnur stellt die Verbindung zwischen Plazenta und Frucht dar und enthält zwei Umbilikalarterien, die das sauerstoffarme Blut vom Feten zur Plazenta führen, und eine Umbilikalvene, die das oxygenierte Blut von der Plazenta zum Feten führt (s. Abb. 2-1b).

Funktionell wird die Plazenta in fetomaternalen Strömungseinheiten, die sogenannten Plazentone, aufgegliedert. Für die Versorgung der einzelnen plazentaren Funktionseinheiten sind die Spiralarterien verantwortlich. Vom Zentrum des Plazentons fließt das maternale Blut in den sogenannten intervillösen Raum und umspült hier die Oberfläche der jeweiligen Zottenbäume (92) (s. Abb. 2-1b). Im Laufe der Zottenreifung bzw. Plazentareifung kommt es zu einer Zunahme der Zottenzahl und zu einer Abnahme des Zottendurchmessers bei

gleichzeitiger Zunahme der Zottenvaskularisation, die eine zentrale Bedeutung für die fetale Versorgung hat (143). Die Entwicklung des vielfach verzweigten kapillaren Netzwerkes in den Zotten der reifen Plazenta führt zu einer erheblichen Widerstandsabnahme im fetoplazentaren Kreislauf. Durch die beschriebenen Vorgänge kommt es zu einer deutlichen Vergrößerung der plazentaren Austauschfläche. Daneben führen weitere morphologischen Veränderungen zu einer Verminderung der Diffusionsstrecke (73).

2.2 Intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR)

2.2.1 Definition und Einteilung

Als intrauterine Wachstumsretardierung („Intrauterine Growth Retardation/ Restriction“, [IUGR]) wird die Unterschreitung des genetisch determinierten Wachstumspotentials aufgrund endogener wie exogener Einflussfaktoren definiert. Die IUGR geht mit einer deutlich erhöhten perinatalen Morbidität und Mortalität einher und macht mehr als 20% der intrauterinen Fruchttode aus (156).

Die IUGR-Feten stellen knapp die Hälfte aller SGA-Feten („Small for Gestational Age“, [SGA]) dar, wobei ausgehend von Gewichtsperzentilen für das ultrasonographisch ermittelte fetale Schätzwert ein Unterschreiten der 10. Perzentile mehrheitlich als Grenzwert für einen untergewichtigen sogenannten SGA-Feten angesehen wird (59; 107). Demzufolge sind definitionsgemäss 10% aller Feten, bezogen auf das Gestationsalter untergewichtig. Dabei ist zu beachten, dass die Feststellung eines SGA-Feten nicht gleichbedeutend mit einem pathologischen Wachstum ist, sondern Ausdruck verschiedener konstitutioneller Faktoren wie Geschlecht des Kindes, ethnische Herkunft, Gewicht und Körpergrösse der Mutter sowie Gewichtszunahme während der Schwangerschaft sein kann (55; 152).

Bei der intrauterinen Wachstumsretardierung werden aufgrund des unterschiedlichen sonographischen Wachstumsmusters zwei Grundformen unterschieden (28): (a) die symmetrische proportionierte oder hypoplastische; und (b) die asymmetrische disproportionierte oder hypotrophe Wachstumsretardierung. Welche Form der Retardierung beim Kind in Erscheinung tritt, hängt zum grössten Teil vom Zeitpunkt der Einwirkung der unterschiedlichen Ursachen ab (131).

- (a) Die symmetrische Wachstumsretardierung kommt mit einer Häufigkeit von 20-30% vor und entwickelt sich im ersten bzw. zweiten Schwangerschaftstrimenon. Die Körperlänge, das Körpergewicht und der Kopfumfang sind gleichermassen betroffen, d.h. die Zellteilung und das Zellwachstum sind unabhängig von der Substratzufuhr bzw. dem Substratbedarf gestört. Sowohl das Geburtsgewicht als auch die Geburtslänge liegen unterhalb des definierten Grenzwertes (154; 156).
- (b) Die asymmetrische Wachstumsretardierung macht ca. 70-80% der Retardierungen aus und entwickelt sich im letzten Schwangerschaftstrimenon, wenn ein erhöhter Sauerstoff- und Substratbedarf des Feten vorliegt und/ oder aufgrund einer eingeschränkten Plazentafunktion dieser Bedarf nicht ausreichend gewährleistet werden kann. Bei dieser Form liegt das Geburtsgewicht unterhalb des definierten Grenzwertes und die Geburtslänge im Normbereich, d.h. die Körperlänge und der Kopfumfang sind von der Retardierung im Vergleich zum Körpergewicht minimal betroffen (154; 156).

2.2.2 Ätiologie

Die Ursachen für eine IUGR sind vielfältig und können angesichts der zentralen Bedeutung einer ausreichenden Versorgung des Feten mit den für das Wachstum erforderlichen Substanzen grundsätzlich in zwei Formen unterteilt werden (131): (a) Formen mit ungestörter Versorgung bei primär fetaler Pathologie; und (b) Formen mit Beeinträchtigung der Versorgung bei präplazentarer, maternaler oder plazentarer Pathologie. Die folgende Tabelle (Tab. 2-1) gibt eine Übersicht bezüglich der wichtigsten Ursachen.

Primär fetale Ursachen

Endogen

- Fehlbildungen
- Chromosomenanomalien:
u.a. Trisomie 13, 18, 21
- Stoffwechselerkrankungen

Exogen

- Intrauterine Infektionen:
u.a. *Toxoplasmose*, *Röteln*,
Zytomegalie, *Herpes*
(=TORCH)
- Strahlenexposition

Uteroplazentare Insuffizienz

<i>Präplazentar</i>	<i>Maternal</i>	<i>Plazentar</i>
-O ₂ -Mangel (Höhenexposition)	-Anämie	-Plazenta praevia
-Hyperthermie	-Hypertonie/ Präeklampsie	-Chromosomen-Mosaik
-Mangelernährung	-Chronische Nierenleiden	-Gestörte Plazentation (mit oder ohne Uterus- pathologie)
-Toxische Einflüsse, Nikotin, Alkohol, Drogen, Medikamente	-Diabetes mellitus	-Multiple Infarkte
	-System. Lupus erythematodes	-Mehrlings- schwangerschaft
	-Zyanotische Herzvitien	

Tab. 2-1: Ätiologie der intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR).

Bei der symmetrischen Wachstumsretardierung kommen als Ursache vor allem Störungen endogener Natur wie fetale Fehlbildungen und Chromosomenaberrationen infrage. Auch exogene Faktoren wie Virusinfektionen (z.B. Röteln, Zytomegalie) und toxische Substanzen wie Alkohol, Nikotin, Drogen oder ionisierende Strahlen können sich schädigend auf das fetale Wachstum auswirken. Die asymmetrische Form der Wachstumsretardierung wird als Folge einer uteroplazentaren Mangelversorgung, z.B. bei maternaler Hypertonie, Präeklampsie oder Diabetes mellitus, angesehen. In ca. 40% der Fälle bleibt die Ätiologie unklar; man spricht dann von idiopathischer IUGR, die meist asymmetrisch ist (21; 107; 155).

Darüber hinaus deuten viele Studien auf eine familiäre Häufung der IUGR hin; z.B. konnten Ghezzi et al. (2003) in ihrem Patientenkollektiv mit IUGR ungeklärter Ätiologie bei einigen Familien eine vertikale und bei anderen eine horizontale Häufung der intrauterinen Wachstumsretardierung nachweisen (56).

2.2.3 Pathologische Anatomie und Pathogenese

Eine IUGR entsteht im Rahmen einer chronisch nutritiven Plazentainsuffizienz, die einerseits auf einer Minderdurchblutung im Bereich der fetomaternalen Einheit, andererseits auf einer Pathologie der Plazentazotten basiert (131).

2.2.3.1 Uteroplazentare Versorgungsstörung

Analog der Ätiopathogenese der Präeklampsie wird als Hauptursache der eingeschränkten uteroplazentaren Blutzufuhr eine gestörte Trophoblastinvasion mit fehlender Erweiterung der Spiralarterien diskutiert (s. Abb. 2-2).

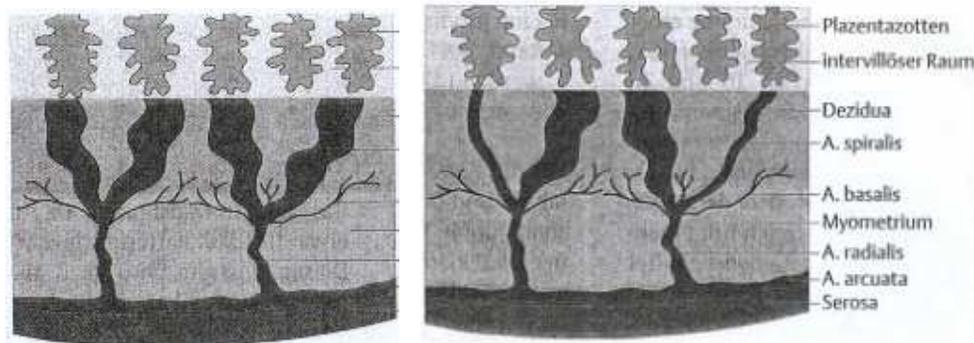


Abb. 2-2: Schematische Darstellung des uteroplazentaren Gefäßsystems mit physiologischer (links) bzw. fehlender (rechts) Dilatation der Spiralarterien (Aus: Merz 2002)

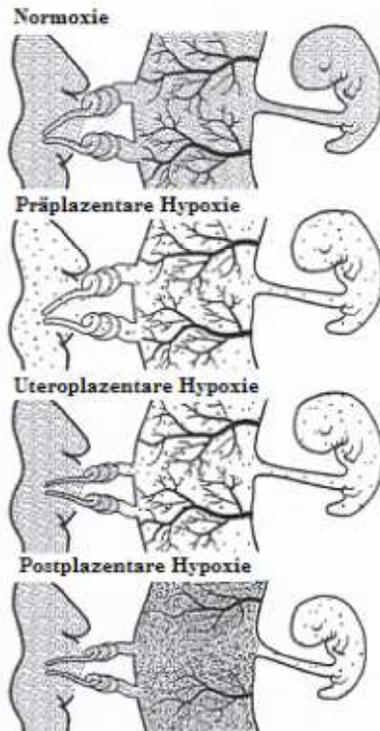
Brosens et al. (1977) konnten anhand von Plazentabettbiopsien bei Schwangerschaften mit fetaler Wachstumsretardierung bei normalem Blutdruck zeigen, dass in den meisten Fällen eine partielle oder eine komplette Störung der Trophoblastinvasion vorliegt (22).

Dabei ist der Schweregrad der IUGR proportional zu dem der Plazentationsstörung. In den Spiralarterien findet man gehäuft typische pathohistologische Merkmale: eine endotheliale Dysfunktion, eine Intimaverdickung sowie atheromatoseähnliche Schädigungen bis hin zu vollständigen Gefäßobliterationen. Dadurch kommt es zu multiplen Plazentainfarkten und einer Reduktion des plazentaren Parenchyms und der Zottenbaumoberfläche. Histomorphologische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Spiralarteriendurchmesser bei einer IUGR nur etwa 40% derjenigen bei gesunden Schwangeren betragen. Die Spiralarterienlumina können aber auch komplett durch Fibrin im Sinne einer akuten Atherosose verlegt sein.

Die IUGR wird daher als sekundäre Folge einer Schädigung der uteroplazentaren Gefäße angesehen.

2.2.3.2 Reifungsstörungen der Plazentazotten

Auch Störungen im Verlauf der Zottenreifung bzw. Plazentareifung können Grundlage für eine fetale Versorgungsstörung sein.



Kingdom und Kaufmann (1997) haben drei verschiedene Kategorien der fetalen Hypoxie beschrieben: (a) präplazentare Hypoxie; (b) uteroplazentare Hypoxie; und (c) postplazentare Hypoxie (79) (s. Abb. 2-3). Diese drei Hypoxiezustände sind häufig mit bestimmten Schwangerschaftspathologien assoziiert. So hängt eine präplazentare Hypoxie gehäuft mit Schwangerschaften in grosser Höhe, maternalen Anämie und zyanotischen Herzfehlern zusammen. Eine uteroplazentare Hypoxie ist mit IUGR bei normalem Dopplerbefund der Umbilikalarterie und Spätgestose assoziiert, während eine postplazentare Hypoxie mit IUGR bei ARED-Flow in der A.umbilicalis und Frühgestose korreliert.

Abb. 2-3: Fetale Hypoxie. Der Grad der Schattierung entspricht dem Grad der Oxygenierung (Aus: Kingdom und Kaufmann 1997)

Ausgehend von der Vaskularisierung des Zottensystems, kann man im Wesentlichen zwei Typen von IUGR auf der Basis einer plazentaren Versorgungsstörung unterscheiden (16; 131):

- (a) Eine sich im frühen Schwangerschaftsverlauf manifestierende schwere symmetrische Form der IUGR mit frühem Verlust des enddiastolischen Flusses bis hin zur Strömungsumkehr (ARE-Flow) in der Doppleruntersuchung der A.umbilicalis als Ausdruck eines stark erhöhten Widerstandes im Umbilikalkreislauf. Das entsprechende histomorphologische Korrelat wird durch pathologische Veränderungen im Bereich des Zottenzytotrophoblasten (eingeschränkte Proliferation) sowie an den Zottenkapillaren („non-branching“-Angiogenese) bestimmt (67; 69; 79; 91) (s. Abb. 2-4).

- (b) Eine sich später in der Schwangerschaft manifestierende mildere meist asymmetrische Form der IUGR mit normalem Dopplerbefund der Umbilikalarterie bei normalen oder sogar erniedrigten Widerstandswerten im Umbilikalkreislauf. Histologisch findet man eine typische Zottenpathologie mit den Zeichen einer gesteigerten Zytotrophoblastproliferation und „branching“-Angiogenese an den Zottenkapillaren (24; 52; 79) (s. Abb. 2-4).

Bei der ersten Form (a), die mit einer hohen perinatalen Mortalität sowie mit einer beträchtlichen Morbidität bei den Überlebenden verbunden ist, könnte man von einer primären Plazentapathologie mit Fehlentwicklung der Zotten bisher ungeklärter Ätiologie sprechen. Bei der zweiten Form (b) lassen sich die plazentaren Veränderungen mit einer Anpassung und Funktionssteigerung als Kompensation der chronischen Mangelversorgung erklären.

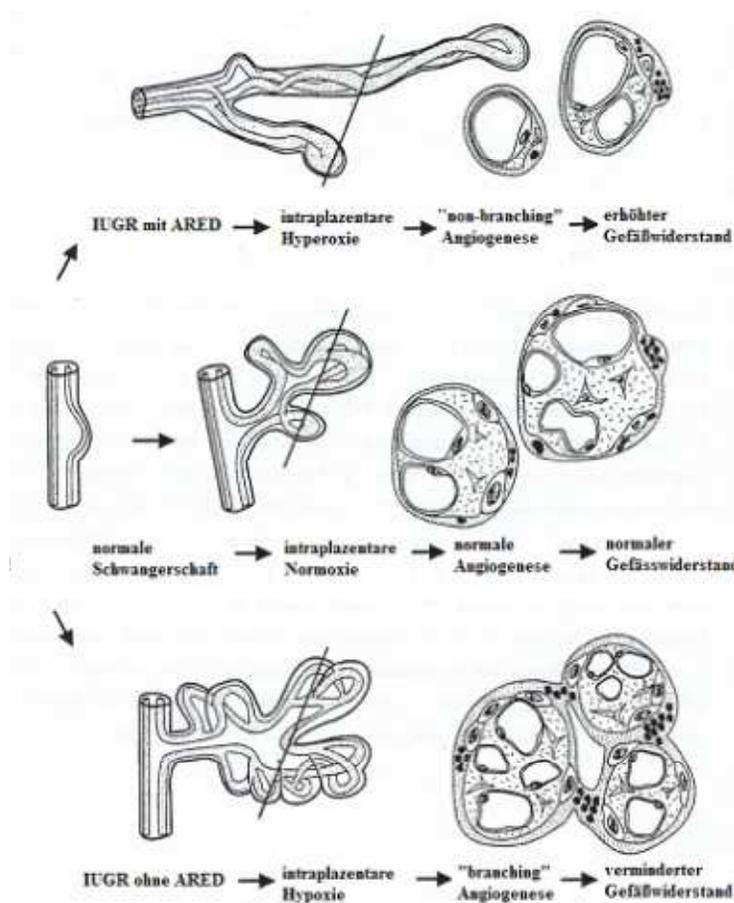


Abb. 2-4: Unterschiedliche Angiogenese der Zottenkapillaren in Abhängigkeit von der intra-plazentaren Sauerstoffkonzentration. Normale Angiogenese (Mitte). Angiogenese mit ungenügender Verzweigung der Intermediärzotten-Kapillaren und mangelhafte Kapillarisation der Endzotten (Oben). Angiogenese mit vermehrter Verzweigung der Kapillaren in den Intermediärzotten und Hyperkapillarisation der Endzotten (Unten) (Aus: Kingdom und Kaufmann 1997; modifiziert)

Eine chronische Versorgungsstörung des Feten führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Bedarf und Zufuhr von Sauerstoff und Substrat (Nahrungsstoffen, Vitaminen, Mineralien und Spurenelementen). Dabei kommt es nach tierexperimentellen Befunden sowie klinischen Beobachtungen zu einer typischen Sequenz verschiedener fetoplazentarer Adaptationsmechanismen. Eine frühe Adaptation des Feten an die intrauterine Mangelversorgung ist die Anpassung des Zellstoffwechsels mit Verlangsamung der Wachstumsrate, die auf einem komplexen Regelmechanismus basiert, wobei das Zellwachstum von Wachstumsfaktoren wie insbesondere *IGF-I* und Insulin reguliert wird (131).

2.2.4 Diagnostik

2.2.4.1 Diagnostisches Vorgehen und Überwachung

Am Anfang der Diagnostik steht die Feststellung des SGA-Feten. Grundvoraussetzung für diese Diagnose ist die exakte Bestimmung bzw. sonographische Bestätigung des Gestationsalters. Die klinische Untersuchung (Palpation, Messung des Symphysen-Fundus-Abstandes) bietet entgegen ihrer weltweiten Verbreitung nach den Ergebnissen prospektiver, klinisch kontrollierter Studien nur unzureichende Hilfestellung bei der Erkennung des SGA-Feten (88; 132; 133). Die pränatale Diagnostik des SGA-Feten gelingt am zuverlässigsten mit der fetalen Gewichtschätzung basierend auf ultrasonographisch gewonnenen biometrischen Messdaten, wobei die kombinierte Messung von Kopf- und Abdomenumfängen zu den besten Ergebnissen führt, zusammen mit der Bestimmung der Fruchtwassermenge (mithilfe des sogenannten „Amniotic Fluid Index“, [AFI]).

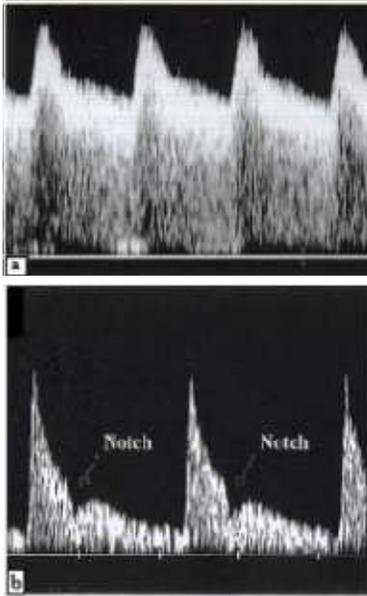
Eine fetale Wachstumskurve, die unterhalb der Norm verläuft, reflektiert nicht zwingend eine fetale Gefährdung im Sinne einer intrauterinen Wachstumsretardierung. Die IUGR wird allgemein als Unterschreitung des genetischen Wachstumspotentials definiert; da letzteres jedoch nicht fassbar ist, kann die Diagnose einer IUGR nicht aufgrund des Gewichtes gestellt werden. Durch die Verwendung des sogenannten „Ponderal-Index“ = Geburtsgewicht (g)/Geburtslänge (cm)³ x 100, der unabhängig von Rasse und Geschlecht ist, kann die Verdachtsdiagnose einer IUGR gestellt werden (129).

Bei klinisch und sonographisch erhobenem Verdacht auf SGA sollte zunächst eine Ursachenabklärung (Ausschluss gefässrelevanter maternaler Erkrankungen, gezielte sonographische Fehlbildungsdiagnostik, ggf. Karyotypisierung und fetale Infektabklärung) vorgenommen werden. Anschliessend sollte eine weiterführende Diagnostik und Überwachung des eigentlich hypoxiegefährdeten IUGR-Kollektives erfolgen, um den idealen Entbindungszeitpunkt bestimmen zu können (131). Zum Einsatz kommen einerseits die Ultraschallbiometrie und die Doppler-/ Farbdopplersonographie, andererseits das Kardiotokogramm (CTG) mit seinen Testvarianten („Non-Stress-Test“, [NST] und „Contraction-Stress-Test“, [CST]) und das biophysikalische Profil (BPP), wobei letztere (CTG und BPP) vornehmlich der Diagnose akut eintretender Hypoxien dienen (32). Prospektive Studien belegen eindeutig die Überlegenheit der Dopplersonographie gegenüber allen anderen Verfahren in der antepartalen Erkennung der chronischen fetalen Hypoxie im Sinne von längerfristiger und meist progredienter Verschlechterung der Plazentafunktion (7; 82; 138).

2.2.4.2 Klinische Bedeutung der Dopplersonographie

Die Dopplersonographie stellt in der Geburtshilfe und Pränatalmedizin eine wichtige additive Methode zur Beurteilung und Überwachung von Risikoschwangerschaften wie z.B. der intrauterinen Wachstumsretardierung und der Präeklampsie dar (92). Einen nicht unerheblichen Teil der unterschiedlichen Mechanismen dieser Schwangerschaftspathologien machen Veränderungen der Hämodynamik, sowohl utero- wie auch fetoplazentar, aus. Mit Hilfe der Dopplersonographie lassen sich hämodynamische von nicht-hämodynamischen Problemen unterscheiden und die Lokalisation der Störung bestimmen. Dies kann speziell klinisch für die Prognosestellung und die Therapieplanung von Nutzen sein (143). Über die Veränderungen im Widerstandsverhalten der Gefässe des utero- und fetoplazentaren Kreislaufes wurde in den Kap. 2.1 und 2.2.3 bereits ausführlich berichtet. Die Erhöhung von Gefässwiderständen sowie die in der zweiten Schwangerschaftshälfte bei stärkerer Versorgungseinschränkung zu beobachtende Blutumverteilung in fetalen Organen sind mit Hilfe der nicht-invasiven Dopplersonographie diagnostizierbar.

A.uterina



Die A.uterina ist ein Mass für die uteroplazentaren Strömungsverhältnisse (9; 25; 130; 142; 149). Basierend auf den bereits in Kap. 2.2.3 beschriebenen morphologischen Veränderungen einer abnormen Plazentation ist eine pathologische uteroplazentare Gefäßversorgung typischerweise durch eine Persistenz der postsystolischen Inzisierung (Notch) und hohe Widerstandsindizes (RI) gekennzeichnet (17; 51; 150) (s. Abb. 2-5).

Abb. 2-5 a, b: Unauffälliges (a) und pathologisches (b) Dopplersonogramm der A.uterina mit Notch als Zeichen eines hohen vaskulären Widerstandes

Darüber hinaus gilt die Assoziation, je ausgeprägter der Schweregrad des klinischen Krankheitsbildes, desto höher der RI und vice versa (130). Dabei ist die durchschnittliche Sensitivität in einem Risikokollektiv mit Begleitpathologie wie Gestationshypertonie oder Präeklampsie signifikant besser (132) und erreicht dann Werte um etwa 80% (143).

A.umbilicalis

Die A.umbilicalis ist ein Mass für die fetoplazentaren Strömungsverhältnisse (9; 57; 130; 142; 149; 148). Eine pathologische Plazentaentwicklung, wie sie bereits in Kap. 2.2.3 detailliert diskutiert wurde, zeigt auch Auswirkungen auf das Dopplersonogramm der Umbilikalarterien im Sinne erhöhter Widerstandsindizes mit enddiastolischem Flussverlust bis hin zur Flussumkehr, dem sogenannten ARED-Fluss („Absent or Reversed End-Diastolic“-Flow, [ARED-Flow]) (143) (s. Abb. 2-6).

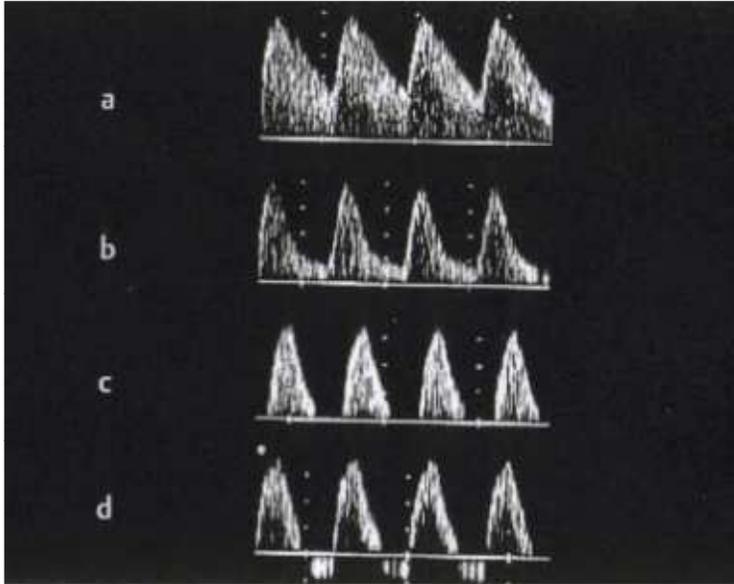


Abb. 2-6 a-d: Darstellung von unauffälligen und pathologischen Dopplerprofilen der A.umbilicalis gemäss der optischen Blutflussklassifikation. Normales Dopplerspektrum (a). Abnahme der enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit (b). Verlust der enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeit (synonym: Absent-Flow) (c). Enddiastolischer Rückwärtsfluss (synonym: Reversed-Flow) (d)

Verschiedene Studien konnten eine signifikante Assoziation von ARED-Flow an der Umbilikalarterie mit IUGR und/ oder Gestationshypertonie und Präeklampsie zeigen (72; 95). Die perinatale Mortalität dieses Dopplerströmungsprofils ist deutlich erhöht und weist insbesondere bei Vorliegen eines Reversed-Flow eine Rate von 30-50% auf (72). Ausserdem besteht eine schwerwiegende Morbidität in der Neonatalperiode sowie ein deutlich erhöhtes Risiko für eine spätere neuromotorische Entwicklungsstörung (92).

2.2.5 Therapieansätze

Eine spezifische Therapie der IUGR gibt es bisher nicht. Die einzigen klinisch sinnvollen „Therapieansätze“ stellen die Ausschaltung von Noxen wie z.B. Rauchen, vor allem aber die perfusionssteigernde Wirkung der Bettruhe dar, die gelegentlich zu einer Normalisierung der bei der IUGR beobachteten Disproportion der Blutverteilung zwischen rechtem und linkem Ventrikel führt (39).

Da erfolgsversprechende therapeutische Interventionen nicht in Aussicht sind, basiert die grösste Hoffnung für die IUGR-Feten auf der Überwachung mit dem Ziel der Entbindung zum optimalen Zeitpunkt. Dabei stellt das Abwägen des Risikos bleibender Organschäden gegenüber den Problemen der Unreife der fetalen Organe bei Frühgeburtlichkeit eine besondere Herausforderung dar. Bei ARED-Flow im Doppler der A.umbilicalis ist wegen der deutlich erhöhten Mortalität die Schwangerschaftsbeendigung generell zu diskutieren (131).

Diese schwierigen klinischen Entscheidungen sind sicher nur auf individueller Basis und unter direktem Miteinbeziehen der betroffenen Eltern nach entsprechender Aufklärung zu treffen.

2.2.6 Prognose

Die IUGR-Feten haben eine deutlich erhöhte Morbidität und Mortalität. Dabei hängt die Prognose von dem Zeitpunkt des Beginns der Wachstumsretardierung sowie dem Schweregrad des klinischen Krankheitsbildes ab, der unter anderem mit dem Dopplerprofil der Umbilikalarterie korreliert (s. auch Kap. 2.2.3 und 2.2.4).

Kurzzeitriskien

Die Tatsache, dass unter Frühgeburten ein höherer Anteil an IUGR-Feten zu finden ist als unter Reifgeborenen weist darauf hin, dass durch die plazentare Insuffizienz Frühgeburtslichkeit induziert wird. Darüber hinaus ist, neben einer 3- bis 5fach höheren perinatalen Mortalität, das relative Risiko dieser Feten bezüglich perinataler Komplikationen (z.B. Asphyxie, Hypoglykämie, Hypothermie, Hypokalzämie, Atemnotsyndrom, Polyglobulie, Infektionen, bronchopulmonale Dysplasie, Hirnblutungen, periventrikuläre Leukomalazie, nekrotisierende Enterokolitis) um ein Vielfaches erhöht (60; 140; 156).

Langzeitriskien

IUGR-Kinder zeigen zudem vermehrt Störungen in ihrer neurologischen und intellektuellen Langzeitentwicklung (28; 110; 141). Bei einer beträchtlichen Anzahl der Betroffenen findet kein Aufholwachstum statt und die Kinder bleiben auch als Erwachsene zu klein. Von besonderer Aktualität sind die immer deutlicher werdenden Zusammenhänge zwischen einer Pathologie des intrauterinen Wachstums und im Erwachsenenalter manifest werdender Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems wie Hypertonie und des Stoffwechselsystems wie Hyperlipidämie und Diabetes mellitus Typ II (14; 86). Dadurch erhält die IUGR eine weitere gesundheitspolitische Dimension.

2.3 Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft (HES)

2.3.1 Definition und Einteilung

Unter dem Begriff „Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft“ (HES) werden alle Schwangerschaftsstörungen zusammengefasst, die durch das gemeinsame Symptom der Hypertonie charakterisiert sind. Die Häufigkeit von HES beträgt 5-7% aller Schwangerschaften, während sie nach wie vor mit einem Anteil von 12-22% zu den häufigsten Ursachen mütterlicher Mortalität zählen (41; 119). Darüber hinaus sind HES mit einem Anteil von 20-25% eine der wichtigsten Ursachen der Frühgeburtlichkeit und perinatalen Mortalität (115; 141).

Grundlage der Beurteilung hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen ist deren Einteilung anhand international gültiger Kriterien.

Einteilung der hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft (Empfehlung der AG Schwangerschaftshochdruck/ Gestose der DGGG (1999) in Anlehnung an die Klassifikation der ISSHP (1986); [DGGG]=„Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe“; [ISSHP]=„International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy“):

- **Gestationshypertonie** Hypertonie, die weder vor der 20.SSW bestand noch länger als 6 Wochen nach der Geburt anhält; Hypertonie ohne Proteinurie
 - **Präeklampsie** Hypertonie mit Proteinurie mit/ohne Ödeme
- Schwere Verlaufsformen:
- Eklampsie** Zusätzlich tonisch-klonische Krampfanfälle
 - HELLP-Syndrom** (H) Hemolysis = Hämolyse
(EL) Elevated Liver enzymes = erhöhte Leberenzyme
(LP) Low Platelets = erniedrigte Thrombozytenzahl
- **Chronische Hypertonie** Hypertonie vor Eintritt der Schwangerschaft, zumindest vor der 20.SSW oder Fortbestehen der

- Hypertonie über 6 Wochen postpartal hinaus
- **Pfropfgestose** Auftreten von charakteristischen Gestosesymptomen, meistens einer neu aufgetretenden Proteinurie oder einem plötzlichen Anstieg von Blutdruck und Eiweissausscheidung im Urin bei Schwangeren mit chronischer Hypertonie

Definitionsgemäss liegt eine Schwangerschaftshypertonie vor, wenn bei einer zuvor normotensiven, nicht proteinurischen Patientin der systolische Blutdruck ≥ 140 mmHg und/oder der diastolische Blutdruck ≥ 110 mmHg bei einmaliger Messung oder ≥ 90 mmHg bei zweimaliger Messung im Abstand von 4-6 Stunden beträgt. Als signifikante Proteinurie gilt eine Eiweissausscheidung von $> 0,3$ g/l im 24-Stunden-Sammelurin (41; 117; 119).

Durch das in der zweiten Schwangerschaftshälfte erstmalige kombinierte Auftreten der Kardinalsymptome Hypertonie und Proteinurie wird die Präeklampsie definiert, die mit einer erheblichen maternalen sowie perinatalen Mortalität einhergeht (15;115). Von grosser klinischer Bedeutung sind die beiden schweren Verlaufsformen der Präeklampsie: die Eklampsie und das HELLP-Syndrom. Mögliche Prodromalsymptome für ein HELLP-Syndrom sind vor allem rechtsseitige Oberbauchschmerzen. Mit einer drohenden Eklampsie können zentrale neurologische Symptome wie Kopfschmerzen, Augenflimmern, Ohrensausen, Schwindel und Hyperreflexie einhergehen. Hauptprobleme sind, von fetaler Seite aus gesehen, die intrauterine Wachstumsretardierung und die Frühgeburtlichkeit. Lebensgefährliche Komplikationen für die Mutter stellen das akute Nieren- und Lungenversagen, die Leberruptur, die vorzeitige Plazentalösung bzw. die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) und das Multiorganversagen. Darüber hinaus besteht bei einem eklamptischen Anfall Lebensgefahr durch Aspiration, Laryngospasmus mit konsekutivem Atemstillstand und intrazerebrale Blutung (45; 116).

2.3.2 Ätiologie

Die Ätiologie der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen ist nach wie vor ungeklärt. Diskutiert wird als Hauptursache eine im Rahmen der Implantation mögliche Störung der

Interaktion zwischen dem mütterlichen Immunsystem einerseits und dem Fremdeiweiss des Schwangerschaftsprodukts andererseits im Sinne einer immunologischen Inkompatibilität (41; 116).

Prädisponierende Faktoren

Prädisponierende Faktoren für die Entwicklung hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen sind Alter der Gebärenden < 18 Jahre bzw. > 35 Jahre, Mehrlingsschwangerschaft, Diabetes mellitus, Lupus erythematoses visceralis, chronische Hypertonie, vorbestehende Nierenerkrankung, Trophoblastenerkrankung, Rhesus-Inkompatibilität, Adipositas und hypertensive Schwangerschaftserkrankung in der vorangegangenen Gravidität. Etwa 2/3 aller Präeklampsieformen treten bei Erstgebärenden auf (116; 117).

Genetische bzw. immunologische Faktoren

Eine positive Familienanamnese ist ein weiterer Risikofaktor für das Auftreten von HES, weswegen eine genetische Komponente der Erkrankung vermutet wird (45). Wahrscheinlich wird die Erkrankung nicht monogen vererbt, da monozygote Zwillinge nur eine geringe Konkordanz in der Entwicklung einer Präeklampsie aufweisen (146). Vielmehr scheinen multiple Genmutationen oder Genpolymorphismen, die primär mit einer Thrombophilie, Hypertonie oder Arteriosklerose assoziiert sind, zum Phänotyp beizutragen: Die Glu298Asp-Variante im endothelialen *Stickstoffmonoxidsynthase*-Gen (*NOS3*), ein 4G/5G-Polymorphismus im *PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)*-Gen, die Faktor-V-Leiden-Mutation und die M235T-Variante im *Angiotensinogen*-Gen erhöhen das Risiko für eine Präeklampsie erheblich. Mutationen im *Methylentetrahydrofolatreduktase*-Gen, die G20210A-Variante im *Prothrombin*-Gen und eine Variante des *Gluthation-S-Transferase*-Gens sind ebenso als Risikofaktoren identifiziert wie alle Mutationen, die zu einer reduzierten Funktion von Protein C, Protein S und Antithrombin III führen. Da bei Patientinnen mit einer Präeklampsie vermehrt familiäre Dyslipidämien, eine Insulinresistenz oder eine familiäre Adipositas gefunden werden, haben vermutlich auch Mutationen, die zu diesen Erkrankungen führen, eine Bedeutung in der Pathogenese der Präeklampsie. Eine besondere Rolle scheint auch das fetale und damit das paternale Genom zu spielen, da bei Blasenmolen - bei denen das paternale Genom doppelt vorliegt - besonders schwere und sich früh manifestierende Präeklampsien nachweisbar sind (15). Tatsache ist, dass weitere grosse Studien notwendig

sind, um die genetischen Determinanten der Präeklampsie ausreichend genau zu definieren und deren Bedeutung in der Pathogenese der Erkrankung im Vergleich zu erworbenen Faktoren und Umwelteinflüssen zu verstehen.

Generell kann man davon ausgehen, dass das Wiederholungsrisiko für eine HES besonders gross ist, wenn die Präeklampsie/ Eklampsie vor der 30.SSW auftrat, der systolische Blutdruck über 160 mmHg lag und Hypertonie und Proteinurie 10 Tage post partum noch nachweisbar waren (116).

2.3.3 Pathologische Anatomie und Pathogenese

Während die klinische Symptomatik bei einer hypertensiven Schwangerschaftserkrankung vorwiegend in der Mitte der zweiten Schwangerschaftshälfte zum Vorschein kommt, treten die zugrunde liegenden pathophysiologischen Veränderungen wesentlich früher auf. Die gegenwärtige Hypothese für die Entwicklung einer HES beruht darauf, dass infolge einer generalisierten endothelialen Dysfunktion ein Ungleichgewicht zwischen den vasoaktiv wirkenden Substanzen Prostacyclin (PGI₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂) auftritt. Es kommt zu einer vermehrten Synthese des vasokonstriktorisches und aggregatorischen Thromboxans A₂, das von den Thrombozyten synthetisiert wird, bei gleichzeitig verminderter Produktion des vasodilatatorischen und antiaggregatorischen Prostacyclins (PGI₂) im Gefässendothel. Dies führt zu einer Erhöhung des peripheren Gefässwiderstandes und insbesondere zu einer verminderten Uterusdurchblutung (116).

Zusätzlich findet sich häufig eine gestörte Trophoblastinvasion, die histomorphologisch ähnliche Merkmale wie bei der IUGR aufweist (s. Kap. 2.2.3).

Nach Angaben in der Literatur korreliert auch eine laterale Plazentalokalisation mit einer erhöhten Präeklampsierate (92).

Histopathologische Befunde von Plazenten und Plazentabettbiopsien präeklampsischer Schwangerer zeigen eine gute Korrelation zu den dopplersonographischen Befunden der A.uterina (143). Da bei Präeklampsie eine enge Verflechtung mit dem Problem der IUGR besteht, sei bezüglich dopplersonographischer Diagnostik auch auf das entsprechende Kapitel der vorliegenden Arbeit (Kap. 2.2.4.2) verwiesen.

2.4 Wachstumsfördernde Faktoren und Regulation der Plazentaentwicklung

Die Entwicklung der Plazenta setzt intakte Stoffwechselabläufe voraus, die wiederum von verschiedenen Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Bezüglich der Zottenreifung ist der *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* in Verbindung mit seinem spezifischen Rezeptor *IGF-IR* seit Jahren von besonderem wissenschaftlichen Interesse und hat zunehmende klinische Bedeutung erlangt. Die Gene für *IGF-I* und *IGF-IR* wurden lokalisiert und kloniert, ihre Funktion und Wirkungsmechanismen werden noch erforscht.

2.4.1 *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)*

Der *IGF-I* (OMIM *147440) gehört zu einer Familie von Polypeptiden, den *Insulin-like Growth Factors (IGFs)*, die unmittelbar wachstumsfördernd wirken. Nachdem Daughaday et al. (1972) ihre Hypothese, dass es einen Vermittler zwischen Wachstumshormon (GH) und dessen wachstumsstimulierender Wirkung geben müsse, formuliert hatten, wurden die IGFs zunächst unter verschiedenen Synonymen („Multiplication-Stimulating Activity“, [MSA]; „NonSuppressible Insulin-Like Activity“, [NSILA]; Somatomedin A, B und C) charakterisiert (37; 123; 124; 125). Inzwischen belegen zahlreiche Forschungsergebnisse, dass *IGF-I* (synonym: Somatomedin C) sowohl embryonal als auch postnatal gewebespezifische, mitogene, differenzierende und funktionelle Abläufe unterstützt und somit in das jeweilige biologische Gesamtkonzept integriert ist (11; 62; 118).

2.4.1.1 Molekulargenetik und Struktur von *IGF-I*

Das Gen für *IGF-I* liegt beim Menschen auf Chromosom 12q22-q24.1 (96; 97; 158). Es überspannt etwa 45 kb, weist 5 Exons auf (s. Abb. 4-1 in Kap. 4.1.1) und kodiert für ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 7,5 kD. Dieses basische Peptid mit 70 Aminosäuren und drei Disulfidbrücken ist strukturell mit dem Proinsulin verwandt (87; 120) (s. Abb. 2-7).

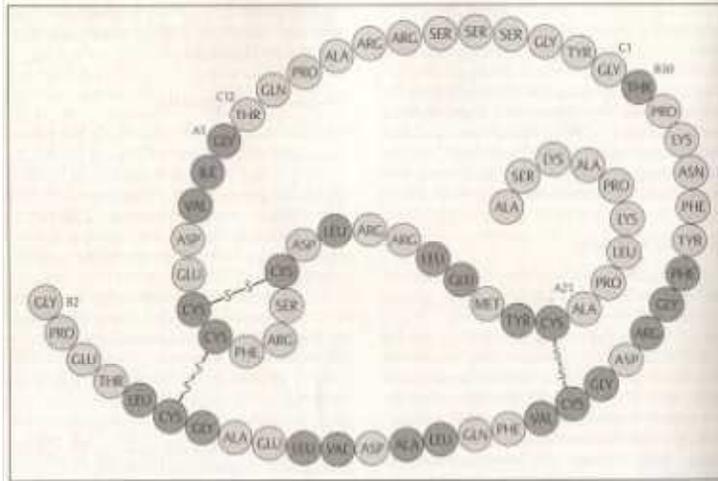


Abb. 2-7: Primärstruktur des *IGF-I*. Die schwarzen Symbole markieren Aminosäuren, die im Proinsulin-Molekül identisch sind

(Aus: Kiess 1999)

Die Transkription über zwei Promotoren, differente Transkriptionsstartorte, alternatives „RNA-splicing“ sowie eine unterschiedliche Wahl der Polyadenylationsstelle führen zu verschiedenen *IGF-I*-mRNAs, die *IGF-I*-Vorläuferpeptide (Präpro-/ Pro-*IGF-I*) in varianten Formen kodieren. Anhand dieser Befunde wird eine mögliche Regulationsebene der *IGF-I*-Biosynthese posttranslational diskutiert (6; 71; 90; 124; 125; 126).

2.4.1.2 Expression und Funktion von *IGF-I*

IGF-I wird in zahlreichen embryonalen und maternalen Geweben sowie in der Plazenta exprimiert (3; 18; 20; 35; 36; 38; 101; 136). Nachdem Han et al. (1988) und Wang et al. (1988) die *IGF-I*-Synthese in der menschlichen Plazenta durch Identifikation von *IGF-I*-mRNA etabliert haben, konnte nachgewiesen werden, dass *IGF-I* im villösen Trophoblasten exprimiert wird (18; 102).

Die wachstumsfördernde Wirkung von *IGF-I* wird durch den *IGF-Rezeptor Typ I (IGF-IR)* moderiert (78; 99; 159), der ebenso wie *IGF-I* in breiter Verteilung und in der Plazenta vornehmlich im villösen Trophoblasten exprimiert wird (18; 102). So ergibt sich eine parakrine und autokrine *IGF-I*-Wirkung auf die plazentare Zottenentwicklung (50; 102).

Darüber hinaus wird *IGF-I* in der Plazenta und in anderen Kompartimenten mit hoher Affinität an spezifische Bindungsproteine (*IGFBPs*) gebunden, die unter anderem auch intraplazentar exprimiert werden (64). Experimentelle und klinische Daten sprechen dafür,

dass die Bindung an die *IGFBPs* die *IGF-I*-Wirkungen moduliert, wobei die genauen Regulationsmechanismen noch unklar sind (83).

Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass *IGF-I* in Verbindung mit dem *IGF-IR* und den *IGFBPs* als sogenanntes *IGF-I*-System in die funktionelle Regulation der Zottenzytotrophoblastproliferation eingebunden ist (66; 102). Zudem scheint das *IGF-I* die Produktion von *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* zu beeinflussen (75). Dabei gehört *VEGF* zu den Wachstumsfaktoren, die bei der Steuerung von angiogenetischen Prozessen beteiligt sind (27; 160). Das *IGF-I*-System wird damit für die Vorgänge der Angiogenese, die zentraler Bestandteil der Zottenreifung sind, bedeutsam (s. auch Kap. 2.4.2.2).

Ausserdem ist die Rolle von *IGF-I* beim intrauterinen Wachstum durch Experimente mit transgenen Mäusen durch spezifisches Ausschalten der Expression des *IGF-I* sowie seines Rezeptors auf der Zelloberfläche in den letzten Jahren sehr detailliert erarbeitet worden. Im Tiermodell zeigten Knock-out-Mäuse mit einer kompletten Ausschaltung der *IGF-I*-Expression eine schwere intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung (12; 89; 108).

Beim Menschen zeigten verschiedene Untersuchungen, dass *IGF-I*-Konzentrationen im Nabelschnurblut sowie in der maternalen Zirkulation mit dem Geburtsgewicht signifikant korrelieren (34; 44; 58; 68; 81; 85; 94). Ebenso lassen Studien zur plazentaren Expression von *IGF-I* eine Assoziation mit dem fetalen Geburtsgewicht vermuten (3; 136; 139).

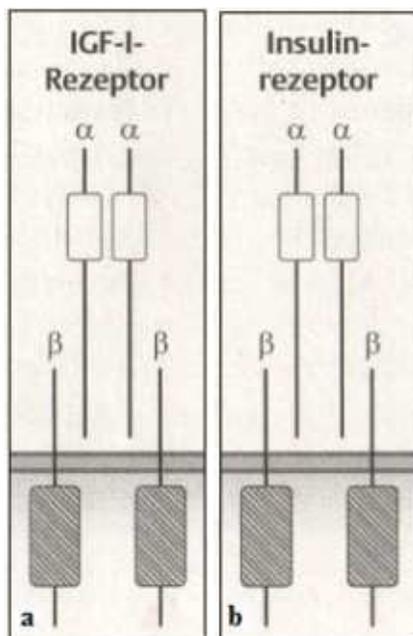
Für das *IGF-I*-Gen sind in der Datenbank HGMD („Human Gene Mutation Database“) insgesamt drei Mutationen beschrieben. Woods et al. (1996) berichteten als Erste über eine grosse Deletion im *IGF-I*-Gen bei einem Patienten mit *IGF-I*-Defizienz und Beeinträchtigung des intrauterinen sowie des postnatalen Wachstums (157). Darüber hinaus identifizierten Bonapace et al. (2003) eine Nukleotidsubstitution des *IGF-I*-Gens bei einem weiteren Patienten mit Einschränkung der *IGF-I*-Funktion (19). Zusammengefasst scheint *IGF-I* eine wichtige Rolle in der Regulation des menschlichen Wachstums in utero zu spielen.

2.4.2 *Insulin-like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR)*

Der *IGF-I-Rezeptor* (*IGF-IR*, OMIM *147370) gehört zu der Familie der Tyrosinkinase Rezeptoren und vermittelt unter anderem die wachstumsfördernde Wirkung von *IGF-I* auf die Entwicklung der Plazenta und der Zottengefäßstrukturen (78; 99; 159).

2.4.2.1 Molekulargenetik und Struktur von *IGF-IR*

Das *IGF-IR*-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 15q25-q26 lokalisiert (53; 106; 122). Es überspannt etwa 100 kb und besteht aus 21 Exons (1; s. Abb. 4-2 in Kap. 4.1.2). Cooke et al. (1991) analysierten die Promoterregion des Gens und zeigten, dass die 5'-untranslatierte Region besonders GC-reich ist (29).



Strukturell besitzt der *IGF-I-Rezeptor* (*IGF-IR*) grosse Homologie mit dem *Insulinrezeptor* (*INSR*) (99; 151) (s. Abb. 2-8b). Der *IGF-IR* ist ein heterotetrameres Glykoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität. Die ligandenbindende Domäne besteht aus den beiden extrazellulären α-Hälften (135 kD); die β-Hälften (95 kD) sind kinaseaktiv, werden nach Bindung des Liganden phosphoryliert und enthalten die Signaldomäne (s. Abb. 2-8a). Die α- bzw. β- Untereinheiten des *IGF-I-Rezeptors* können mit den entsprechenden Anteilen des Insulinrezeptors hybridisieren, was für die funktionelle Breite bedeutsam sein dürfte (99; 100).

Abb. 2-8 a, b: *IGF-I-Rezeptor*. Der *IGF-I-Rezeptor* besteht aus zwei α-Bindungseinheiten und aus zwei β-Untereinheiten mit Tyrosinkinaseaktivität (a), und weist grosse Ähnlichkeit mit dem Insulinrezeptor auf (b)

(Aus: Kiess 1999)

2.4.2.2 Expression und Funktion von *IGF-IR*

Für die Expression von *IGF-IR* ist neben verschiedenen embryonalen sowie maternalen Geweben auch das plazentare Gewebe verantwortlich (3; 18; 20; 38). Dabei scheint die *IGF-IR*-Expression hauptsächlich im villösen Trophoblasten lokalisiert zu sein (18; 102).

Über den *IGF-IR* wird die mitogene Wirkung von *IGF-I* vermittelt, welche für die Reifung der Plazenta entscheidend ist (38; 78; 99; 159). Die Bindung von *IGF-I* an *IGF-IR* bewirkt die Stimulation von wichtigen Signalübertragungswegen. Autophosphorylierung des Rezeptors und Phosphorylierung von intrazellulären Substanzen wie *Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)* und -2 (*IRS-2*) sowie *Mitogen-Aktivierte Protein-Kinase (MAP-Kinase)* und *Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI-3-Kinase)* sind für die biologische Wirkung des *IGF-I-Rezeptors* von zentraler Bedeutung (5; 40; 99) (s. Abb. 2-9).

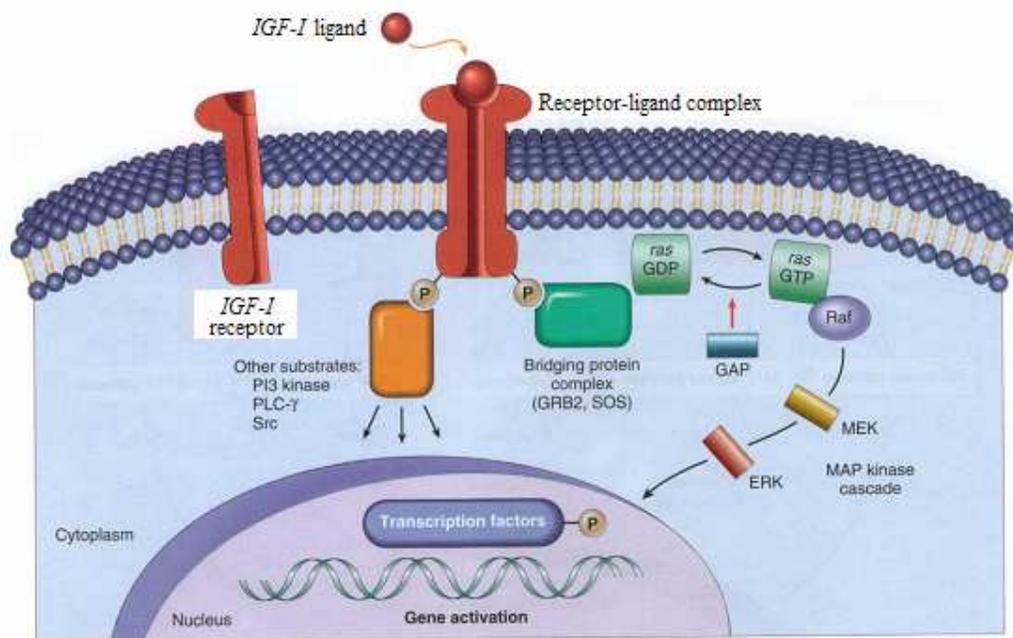


Abb. 2-9: Modell der *IGF-I*-vermittelten Signaltransduktion. Durch Bindung von *IGF-I* an den *IGF-I-Rezeptor* wird dieser aktiviert, wodurch ein intrazellulärer Signalkaskadenweg angeschaltet wird, der über eine gesteigerte Transkription von für den Zellzyklus notwendigen Genen letztendlich den Wachstumseffekt von *IGF-I* bewirkt (Aus: Cotran 1999; modifiziert)

Wie bereits erwähnt, fördert das *IGF-I*-System, das aus *IGF-I*, *IGF-IR* und den *IGFBPs* besteht, die Proliferation des villösen Zytotrophoblasten (66; 102). Zusätzlich wird dem *IGF-I*-System eine lokale *VEGF*-vermittelte angiogenese-modulierende Wirkung zugeschrieben (75). Eine positive Korrelation zwischen dem *IGF-I*-System und der *VEGF*-Expression konnte bereits zu einem früheren Zeitpunkt im Tiermodell an retinalen Epithelzellen nachgewiesen werden (111). Vor kurzem konnten Treins et al. (2005) durch Versuche mit Epithelzellen der menschlichen Retina einen Mechanismus beschreiben, über den *IGF-I* die *VEGF*-vermittelte Wirkung mittels des *IGF-I-Rezeptors* beeinflussen kann. Dabei stimuliert *IGF-I* durch Bindung an *IGF-IR* einen *PI-3-Kinase*- und *MAP-Kinase*-abhängigen Signalübertragungsweg und somit die Aktivität des Transkriptionsfaktors *HIF-1* (*Hypoxia Inducible Factor-1*). Dies wiederum führt zur Expression von *VEGF*-mRNA (147). Hohe *VEGF*-Spiegel korrelieren in der menschlichen Schwangerschaft mit Dominanz der „branching“-Angiogenese, während niedrige *VEGF*-Spiegel mit Dominanz der „non-branching“-Angiogenese assoziiert sind (74; 80). Diese Daten unterstützten die Annahme, dass die Interaktion von *IGF-I* mit *IGF-IR* über *VEGF* einen stimulierenden Effekt auf die Neovaskularisation hat.

Darüber hinaus konnte im Rahmen von Expressionsstudien im Tiermodell gezeigt werden, dass *IGF-IR* eine entscheidende Bedeutung für das intrauterine Wachstum hat. Liu et al. (1993) berichteten, dass die Ausschaltung des *IGF-IR*-Gens bei der Maus zu einer ausgeprägten Einschränkung des fetalen Wachstums führt (Reduktion des Geburtsgewichtes um etwa 45%) (89).

Zudem konnten Abu-Amero et al. (1998) zeigen, dass die Expression von *IGF-IR* in der menschlichen Plazenta mit dem Geburtsgewicht korreliert (3). Weiterhin wurde eine reduzierte Bindungsaffinität von *IGF-IR* bei einer Interaktion mit *IGF-I* mit intrauteriner Wachstumsretardierung beim Menschen in Verbindung gebracht (34; 44).

Für das *IGF-IR*-Gen sind in der Datenbank HGMD („Human Gene Mutation Database“) zwei Mutationen beschrieben. Nachdem Faivre et al. (2002) als Erste eine Mutation im *IGF-IR*-Gen bei einem Patienten mit Wachstumsstörung identifiziert haben (49), konnten Abuzzahab et al. (2003) zeigen, dass zwei Missense-Mutationen und eine Nonsense-Mutation des *IGF-IR*-Gens mit Einschränkung der Funktion oder Anzahl von *IGF-I-Rezeptoren* bei Patienten

mit intrauteriner und postnataler Wachstumsretardierung einhergehen(4). Eine weitere Missense-Mutation im *IGF-IR*-Gen konnte von Kawashima et al. (2005) bei einem Patienten mit Beeinträchtigung des intrauterinen sowie des postnatalen Wachstums nachgewiesen werden (76). Diese Daten weisen darauf hin, dass *IGF-IR* an der Regulation des intrauterinen Wachstums beim Menschen beteiligt ist.

2.4.3 Regulation der Expression von *IGF-I* und *IGF-IR*

Die lokale, auf die Plazenta beschränkte *IGF-I*- und *IGF-IR*-Expression ist komplex und obwohl eine gewebsspezifische Regulation durch verschiedene Faktoren nachweisbar ist (50; 61; 64; 134; 153), sind diese Faktoren sowie deren genaues Zusammenspiel noch nicht gänzlich geklärt.

Eine entscheidende Rolle spielen dabei molekulare Eigenschaften. Die *IGF-I*-Genexpression und damit die physiologische *IGF-I*-Synthese wird durch die in Kap. 2.4.1.1 skizzierten molekularen Mechanismen strukturiert, wobei das „set“ der *IGF-I*-mRNA mit ihren unterschiedlichen Translationseigenschaften einen speziellen Aspekt darstellt. Bezüglich der Expression von *IGF-IR* konnten mehrere Studien zeigen, dass an einem Precursorprotein zahlreiche Modifikationen während und nach der Translation stattfinden, die zu differenzierten Rezeptorformen mit funktionsmodulierenden Domänen führen. Diese Erkenntnisse waren Ausgangspunkt für weitere Studien, mit denen *IGF-I* bzw. insulin spezifische Bindungsdomänen definiert wurden (151).

Weiterhin scheinen die *IGF-Bindungsproteine (IGFBPs)* für die Regulation der Expression und Bioverfügbarkeit von *IGF-I* bedeutsam zu sein (83). So konnten frühere Untersuchungen zeigen, dass erhöhte *IGFBP*-Werte mit einer verminderten *IGF-I*-Expression korrelieren (58; 81; 104; 121). Nach In-vitro-Versuchen mit fetalen Leberzellen ist das kritische Signal für die Stimulation der Synthese von *IGFBP* der Mangel an Sauerstoff (145), während auch weitere pathologische Mechanismen wie mangelnde Substratzufuhr mit verminderter Insulinproduktion und fetaler Stress mit gesteigerter Glukokortikoidausschüttung in dem komplexen Regulationsprozess eingebunden sind (31; 54; 65; 135).

Averbukh et al. (1998) untersuchten im Tiermodell die retinale Genexpression von *IGF-I*, *IGF-IR* und *IGFBPs* unter hypoxischen Bedingungen und zeigten, dass die lokale Hypoxie

über verstärkte Expression von *IGF-IR* und *IGFBPs*, und unveränderte oder reduzierte *IGF-I*-Expression zu einer Stimulation des *IGF-I*-Systems führt (10). Umgekehrt wird eine verminderte Aktivität des *IGF-I*-Systems mit einer lokal erhöhten Sauerstoffkonzentration in Verbindung gebracht.

Ausserdem konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass Östrogen und Androstendione die plazentare *IGF-I*-Synthese beeinflussen können (112).

Zusätzlich vermuteten Sheikh et al. (2001), dass das *Placental Growth Hormone (PGH)* neben der *IGF-I*-Konzentration in der maternalen Zirkulation (8; 48) auch die lokale Produktion von *IGF-I* in der Plazenta reguliert (136).

3 Material und Methoden

3.1 Probandenkollektiv

In der vorliegenden Studie wurde ein Kollektiv aus 33 Probandinnen und deren 33 Kindern erfasst, bei denen die Diagnose einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) aufgrund klinischer, ultrasonographischer und morphologischer Befunde gestellt worden war.

Im Vorfeld der Studie liess sich dieses Kollektiv mit Hilfe der nichtinvasiven Dopplersonographie der umbilikalen und uteroplazentaren Gefässe unterteilen in: ein Patientenkollektiv mit IUGR und ARED-Flow in der A.umbilicalis (19 Patientinnen und deren 19 Kinder); und ein Kontrollkollektiv mit IUGR und unauffälligem Dopplerbefund der Umbilikalarterie jedoch pathologischem Dopplerprofil der A.uterina (Notch) (14 Patientinnen und deren 14 Kinder). Um dabei auch die Plazentamorphologie zu berücksichtigen, waren die Plazenten von der Arbeitsgruppe von Prof. P. Kaufmann im Institut für Anatomie der RWTH Aachen pathoanatomisch untersucht und nach histomorphologischen Kriterien entsprechend eingeteilt worden. Bei einem Teil der Patientinnen waren hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft (HES) diagnostiziert worden, wobei die Häufigkeit der HES in beiden Kollektiven vergleichbar war. Ausserdem war bei allen in die Studie aufgenommenen Fällen eine diagnostische Ursachenabklärung vorgenommen worden, mit Ausschluss von Fehlbildungen und Chromosomenanomalien sowie von immunologischen und infektiösen Ursachen für eine IUGR.

Die Probanden sowohl des Patientenkollektives als auch des Kontrollkollektives wurden für die Mutationsanalyse der Gene *IGF-I* und *IGF-IR* ausgewählt. Übersichtstabellen über die beiden Kollektive sind dem Anhang (8.1.1 und 8.1.2) zu entnehmen.

Genomische DNA von 100 gesunden Probanden (50 Mütter und deren 50 Kindern) europäischer Herkunft diente zur Kontrolle.

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Acrylamidlösung	Bio Rad	Hercules, CA, USA
Agarose	Initrogen	Karlsruhe
Aqua bidest.	Merck	Darmstadt
Bisacrylamidlösung	Bio Rad	Hercules, CA, USA
EDTA	Roth	Karlsruhe
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Ethanol	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid 1%	Merck	Darmstadt
Formaldehyd 37%	Merck	Darmstadt
Formamid	Merck	Darmstadt
Glycerin	Merck	Darmstadt
Harnstoff	Merck	Darmstadt
Längenstandard:		
50bp-Leiter (1 µg/µl)	Invitrogen	Karlsruhe
100bp-Leiter (1 µg/µl)	Invitrogen	Karlsruhe
Nukleotid-Stammlösungen:		
dNTP 100 mM Solutions	Invitrogen	Karlsruhe
Phenol	Roth	Karlsruhe
Q-Solution	Qiagen	Hilden
Salpetersäure, HNO ₃ , 65%	Merck	Darmstadt
Salzsäure, HCl, 37%	Merck	Darmstadt
SDS Roth	Karlsruhe	
Silbernitrat, AgNO ₃	Merck	Darmstadt
TEMED	Merck	Darmstadt

3.2.2 Puffer

PCR-Puffer (10x)	200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl
TBE (10x)	89 mM Tris-HCl (pH 8,3), 89 mM Borsäure, 10 mM EDTA (pH 8,0)
SSCP-Puffer	[Blaupuffer/Formamid 1:4] Blaupuffer: 10 ml

Sequenzierpuffer	Formamid; 10 mg Bromphenolblau; 10 mg Xylen-Xyanol; 200 µl 0,5 M EDTA (pH 7,0); ad 100 ml A.dest.; Formamid: 100%, deion. 10 ml Formamid, 2 ml EDTA (25 mM), 40 mg Dextranblau
Frischblutlysispuffer	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA
Kernlysispuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 400 mM NaCl, 2 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
Loading-Buffer für Agarosegel	2,5xTBE, 20% Ficoll 400, 0,1% Bromphenolblau
Puffer für DNA-Isolation aus Paraffingewebe	200 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA
Fällungsmix	250 ml absolutes Ethanol, 10 ml 3M Na-Acetat (pH 5,2)

3.2.3 Kits

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing	Applied Biosystems	Weierstadt
QIAquick PCR-Purifikation Kit	Qiagen	Hilden

3.2.4 Enzyme

Proteinase K	Boehringer	Mannheim
Restriktionsendonukleasen:		
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs	Frankfurt/Main
<i>Dde</i> I	New England Biolabs	Frankfurt/Main
<i>Sac</i> II	Takara Biomedicals	Frankfurt/Main
<i>Pvu</i> II	MBI Fermentas	St-Leon-Rot
Taq-Polymerase, 5000 U/ml	Invitrogen	Karlsruhe

3.2.5 Oligonukleotid-Primer

PCR- und Sequenzierprimer (Sequenzen s. Anhang 8.2)	MWG-Biotech AG	Ebersberg
--	----------------	-----------

3.2.6 Geräte und sonstige Arbeitsutensilien

ABI PRISM 377 Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Weiterstadt
ABI PRISM™ 377 Collection Software	Applied Biosystems	Weiterstadt
Autoklav Hiclave HV85	BPW	Süssen
Elektrophorese-Kammern:		
Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-200	Pharmacia	Cambridge, GB
Geldokumentation:		
Imaging-System Gel Doc 200	Bio Rad	Hercules, USA
Software: Quantity One 4.1.1	Bio Rad	Hercules, USA
Geltrockner GelDryer 583	Bio Rad	Hercules, USA
Photometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech	Cambridge, GB
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Spannungsquelle:		
Elektrophoresis power supply	Life Technologies	Paisley, Sc
SSCP-Kammern:		
Multigel-Long-Gelkammern	Biometra	Göttingen
Thermocycler:		
PTC 100, MJ Research	Biozym	Oldendorf
PTC 200 DNA Engine, MJ Research	Biozym	Oldendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf	Hamburg
Whatman-Papier Whatman Gb002	Schleicher und Schüll	Dassel

3.3 Molekulargenetische Methoden

3.3.1 DNA-Isolation

Genomische DNA kann aus unterschiedlichen Probenmaterialien isoliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA der Mütter und der lebenden Kinder aus Frischblut, der bereits verstorbenen Kinder aus Paraffinblöcken extrahiert.

3.3.1.1 DNA-Isolation aus Frischblut

Bei der Mehrzahl der Fälle wurden von jedem Probanden 2-10ml venöses EDTA-Blut zur Verfügung gestellt. Die genomische DNA wurde aus den Leukozyten mittels Salzfällung nach der nicht-toxischen Ansatzmethode nach Miller et al. (93) isoliert.

3.3.1.2 DNA-Isolation aus Paraffinblöcken

Oftmals war von verstorbenen Patienten nur in Paraffin eingebettetes Gewebe vorhanden. Durch die Dehydrierung und Fixierung des Gewebes in Formamid vor der Einbettung in Paraffin war die DNA dabei dann teilweise schon degradiert. Die Extraktion erfolgte mit organischen Lösungsmitteln (einem Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol) nach dem von Eggermann et al. (46) beschriebenen Protokoll.

3.3.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten DNA wurde durch photometrische Messung bei 260nm, dem Absorptionsmaximum von doppelsträngiger DNA, ermittelt. Dazu wurde die DNA 1:70 mit A.dest. verdünnt. Als Referenz wurde der Leerwert von A.dest. eingesetzt. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ließ sich die DNA-Konzentration errechnen:

DNA-Konzentration C [$\mu\text{g/ml}$] = Optische Dichte $A(260)$ x Verdünnung (Faktor 70) x

Extinktionskoeffizient für DNA (Faktor 50)

3.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Durchführung der Mutationsanalyse des aus 5 Exons bestehenden *IGF-I*-Gens und des aus 21 Exons bestehenden *IGF-IR*-Gens wurde zunächst die Patienten-DNA mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt. Die Polymerasekettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, [PCR]) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation von bestimmten DNA-Fragmenten. Im ersten Schritt wird die Matrizen-DNA durch thermische *Denaturierung* in einzelsträngige DNA überführt. An diese hybridisieren im folgenden Schritt synthetische Oligonukleotid-Primer (*Annealing*). Davon ausgehend synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase im letzten Schritt die komplementären Stränge (*Extension*). Durch mehrfache Wiederholung dieses aus drei Schritten bestehenden Zyklus erfolgt eine exponentielle Amplifikation (13; 98; 127).

Die PCR-Reaktion erfolgte nach den in den Tabellen Tab. 3-1 und Tab. 3-2 dargestellten Protokollen. Es wurde immer auch eine Wasserprobe untersucht, um eine eventuelle Kontamination der übrigen Reagenzien mit Fremd-DNA auszuschliessen. Die PCR-Bedingungen wurden für jedes Exon etabliert (s. Anhang, 8.2), wobei verschiedene Annealing-Temperaturen und teilweise die Zugabe spezieller Reagenzien ausgetestet wurden. So wurde Q-Solution (Qiagen), die Formamid und DMSO enthält, als Cosolvent eingesetzt, um die Amplifikation problematischer Matrizen-DNA mit ungünstiger Konformation oder hohem GC-Anteil durch Modifikation des Nukleinsäuren-Schmelzverhaltens zu erleichtern. Durch Zugabe von Q-Solution sowie durch Erhöhung der Annealing-Temperatur kam es bis zu einem gewissen Grad zu einer Steigerung der PCR-Spezifität jedoch bei gleichzeitiger Abnahme der PCR-Produkt-Menge. Um eine ausreichende Produkt-Menge zu erhalten, wurde die Extensionszeit abweichend vom „Standard-PCR-Programm“ (s. Tab. 3-2) verlängert.

Zur Amplifikation wurden automatische Thermocycler (PTC 200 DNA Engine, MJ Research, Biozym, Oldendorf, Deutschland) verwendet.

<u>Komponente</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
Autoklaviertes A.dest.	12,8 µl	-----
dNTPs (5 mM)	4,0 µl	0,8 mM
*10xPCR-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCL)	2,5 µl	1x
*MgCl ₂ (15 mM)	2,5 µl	1,5 mM
Primer F (Forward) (10 µM)	1,0 µl	0,4 µM
Primer R (Reverse) (10 µM)	1,0 µl	0,4 µM
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	1,0 unit
DNA-Template (20 ng/µl)	1,0 µl	-----

Tab. 3-1: Zusammensetzung der PCR-Reaktion für ein Ansatzvolumen von 25µl

*Diese beiden Komponenten wurden bei der Amplifikation der Fragmente *IGF-IR-5'-UTR1*, *-5'-UTR2*, *-5'-UTR3* und *-5'-UTR4* durch Q-Solution (5xSolution; Volumen: 5,0µl; Endkonzentration: 1x) in Kombination mit einem speziellen PCR-Puffer (10xSolution, Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂; Volumen: 2,5µl; Endkonzentration: 1x) von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) ersetzt

<u>Schritt-Nr.</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Bezeichnung</u>
1.	94°C	5,0 min	initiale Denaturierung
2.	94°C	0,5 min	Denaturierung
*3.	TA	0,5 min	Primerannealing
**4.	72°C	1,5 min	Extension
	Wiederholung der	Schritte 2.-4. :39 mal	
5.	72°C	10,0 min	finale Extension

Tab. 3-2: Standard-PCR-Programm

TA: Annealing-Temperatur (s. Anhang, 8.2)

* Bei der Amplifikation von *IGF-IR-5'-UTR1*, *-5'-UTR2*, *-5'-UTR3* und *-5'-UTR4* wurde dieser Schritt auf 1min verlängert

** Bei der Amplifikation von *IGF-I-Ex.3*, *-Ex.5* sowie von *IGF-IR-Ex.4*, *-5'-UTR1*, *-5'-UTR2*, *-5'-UTR3* und *-5'-UTR4* wurde dieser Schritt auf 2min verlängert

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob die Amplifikation mittels PCR erfolgreich war, wurden die PCR-Produkte auf 1%ige Agarosegele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, die die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld zu deren Trennung ausnützt. Aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrats der DNA wandern die Proben bei Anlegen von Spannung von der Kathode zur Anode. Dabei hängt die Laufgeschwindigkeit von der Grösse der Fragmente, der Höhe der angelegten Spannung und der Konzentration des Agarosegels ab.

In der vorliegenden Studie dienten 1%ige Agarosegele der Überprüfung der Qualität von PCR-Produkten, bevor diese für weitere Untersuchungen verwendet werden konnten.

Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarosegel-Ansatz)

Agarose	3 g
10xTBE-Puffer (89 mM Tris-HCl [pH 8,3]; 89 mM Borsäure; 10 mM EDTA [pH 8,0])	30 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ml in A.dest.)	30 µl
A.dest.	ad 300 ml

Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose wurde in 10xTBE-Puffer und A.dest. (Gesamtvolumen: 300 ml) aufgeköcht, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlung des Gemisches auf ca. 45°C wurde Ethidiumbromid zugegeben, das in die helikale Struktur der DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar wird. Anschliessend wurde die Gellösung in einen Gelträger gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 1xTBE als Laufpuffer versetzt. Jeweils 5 µl der zu testenden PCR-Produkte wurden mit je 5 µl Loadingbuffer aufgetragen. Zur Grössenbestimmung der Fragmente wurde bei jedem Testvorgang auch eine 100bp-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese lief ca. 40 min bei 120 V. Zur Detektion der Produkte wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert.

3.3.4 Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (SSCP)

Um die PCR-Produkte auf das Vorhandensein von Sequenzveränderungen zu untersuchen, wurde die Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen („Single-Strand-Conformation-Polymorphism/ Analysis“, [SSCP/ SSCA]) durchgeführt.

Die SSCP-Analyse beruht darauf, dass ein mutierter DNA-Einzelstrang unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgrund unterschiedlicher Konformation veränderte Laufeigenschaften aufweist (63; 103; 144).

Die elektrophoretische Auftrennung der Einzelstränge erfolgte auf nativen 10%igen Polyacrylamidgelen mit einem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 49:1.

Das SSCP-Muster liefert allerdings nur einen Hinweis auf das Vorhandensein von Sequenzvarianten, nicht aber über deren Art und Position. Daher wurden Fragmente, die abweichende SSCP-Muster zeigten, mittels Methoden der direkten Mutationsanalyse weiteruntersucht.

Reagenzien für die SSCP

10xTBE-Puffer : 89 mM Tris-HCl (pH 8,3); 89 mM Borsäure; 10 mM EDTA (pH 8,0)

10% Gelstocklösung [Acrylamid/Bisacrylamid 49:1] : 122,5 ml 40%iges Acrylamid; 50 ml 2%iges Bisacrylamid; 25 ml 10xTBE; 500 µl TEMED; ad 500 ml A.dest.

10% APS : 10 g Ammoniumpersulfat; 100 ml A.dest.

10% Glycerol

SSCP-Probenpuffer [Blaupuffer/Formamid 1:4] : Blaupuffer: 10 ml Formamid; 10 mg Bromphenolblau; 10 mg Xylen-Xyanol; 200 µl 0,5 M EDTA (pH 7,0); ad 100 ml A.dest. ; Formamid: 100%, deionisiert.

70% Ethanol

Durchführung der SSCP

Es wurden native Polyacrylamidgele vorbereitet. Für ein Gel wurden 20 ml Gelstocklösung benötigt, die mit 250 µl 10%igem APS versetzt wurden. Es wurden jeweils 3 µl PCR-Produkt mit 5 µl SSCP-Probenpuffer vermischt und auf jedes Gel wurden 8 µl des Probengemisches sowie 4 µl einer 100bp-Leiter aufgetragen.

Da die SSCP je nach Laufbedingung unterschiedliche Ergebnisse liefern kann, wurde das Laufverhalten der amplifzierten DNA-Fragmente unter vier Bedingungen untersucht. Je ein Gel mit und ohne Glycerol liefen bei Raumtemperatur und 180 V, je ein Gel mit und ohne Glycerol im Kühlschrank bei 4°C und 200 V für drei Stunden. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte anschließend durch Silberfärbung (s. Tab. 3-3). Die Gele wurden schließlich zur Archivierung auf Whatman-Papier aufgezogen und auf einem Vakuumtrockner bei 80°C drei Stunden getrocknet.

Schritt-Nr.	Zeit	Reagenzium (Konz.)	Effekt
1.	10 min	Ethanol (10%)	Fixierung
2.	10 min	HNO ₃ (1%)	Ansäuerung
3.	30 min	AgNO ₃ (0,2%)	Färbung
4.	3x1 min	A.dest.	Waschen
5.	2x kurz	Na ₂ CO ₃ (3%)+ Formaldehyd (0,05% in Na ₂ CO ₃)	Entwicklung
6.	5 min	Essigsäure (10%)	Fixierung

Tab. 3-3: Ablauf der Silberfärbung

3.3.5 Direkter Mutationsnachweis

Zum direkten Mutationsnachweis werden verschiedene Methoden eingesetzt. Zu diesen Methoden gehören unter anderem die direkte DNA-Sequenzierung und der Restriktionsverdau.

3.3.5.1 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (128) wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Das Prinzip der Sequenzierreaktion besteht im Abbruch der DNA-Polymerisation durch Einbau von verschiedenartig fluoreszenzmarkierten 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) (109; 113; 137).

Das zu sequenzierende Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (100 µl-Ansatz). Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel getestet, über den *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) von Primerresten und anderen niedermolekularen Substanzen gereinigt und anschließend mit 30 µl HPLC-gereinigtem Wasser eluiert. Das Produkt wurde auf einem Agarosegel nochmals auf seine Reinheit und DNA-Gehalt hin überprüft. Davon ausgehend wurden 80 ng Template in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Zur automatisierten, nicht-radioaktiven Sequenzierung wurde der *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) verwendet. Als Sequenzierprimer dienten die entsprechenden PCR-Primer; die meisten Fragmente wurden in beiden Richtungen sequenziert.

Reagenzien für die *Seq-PCR* (20 µl-Ansatz)

DNA-Template	80 ng/µl
Primer F oder R	5 pmol/µl
Terminator Ready Reaction Mix	4 µl
HPLC-Wasser	ad 20 µl

Programm der *Seq-PCR*

Schritt 1. 96°C	10 sec
Schritt 2. T _A (≤60°C)	5 sec
Schritt 3. 60°C	4 min

Wiederholung der Schritte 1.-3. : 24 mal

Um einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erreichen, wurden die Produkte der Sequenzierreaktion gefällt. Dazu wurde der komplette Ansatz der Sequenzierreaktion mit 80 µl A.dest., 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und 250 µl 100% Ethanol versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurde das Pellet getrocknet, anschließend in 25 µl HPLC-Wasser aufgenommen und vorsichtig gelöst.

Die elektrophoretische Auftrennung der zu sequenzierende Produkte, die Detektion der Fluoreszenzdaten und die Datenauswertung erfolgten auf einem *ABI PRISM 377-Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.3.5.2 Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)

Die Untersuchung von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen („Restriction Fragment Length Polymorphism“, [RFLP]) nutzt die Eigenschaft von Restriktionsendonukleasen, an spezifischen Erkennungssequenzen der DNA zu schneiden. Liegen Mutationen vor, können diese Schnittstellen neu entstehen oder entfallen, so dass es zu einer Veränderung des Fragmentmusters nach enzymatischer Spaltung und elektrophoretischer Auftrennung der genomischen DNA kommt.

Wenn es kein Restriktionsenzym gibt, das in der Region schneidet, in der eine Mutation liegt, kann durch sogenannte Mutageneseprimer/Mismatchprimer gezielt eine Basenänderung im zu amplifizierenden PCR-Produkt hervorgerufen und eine Schnittstelle geschaffen werden. In der vorliegenden Studie war die Herstellung eines Mutageneseprimers für die Untersuchung der Sequenzvariante c. 3161 G>A (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in IGF IR-Ex.16 notwendig:

IGF-IR-Ex.16 Fmis: 5'-TAAAACAGTGAACGAGGCCGCAAGCATGCC-3'

R' : 5'-GATGCCTGTGTTGTCTGGAAC-3'

Die im Rahmen dieser Studie mittels DNA-Sequenzierung detektierten Sequenzveränderungen konnten durch Restriktionsanalysen bestätigt werden. Dabei wurden die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland), *Dde*I (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland), *Sac*II (Takara Biomedicals, Frankfurt/Main, Deutschland) und *Pvu*II (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) verwendet (s. Tab. 4-1; Kap. 4.1.2).

Die PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen versetzt und verdaut.

Reagenzien für den Restriktionsverdau (15 µl-Ansatz)

PCR-Produkt	5 µl
Restriktionsenzym	6 units
10xEnzypuffer	1,5 µl
BSA (wenn nötig)	0,8 µl
A.dest.	ad 15 µl

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend den Angaben des Enzymherstellers für vier Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es wurden jeweils 5 µl Verdauprodukt mit 5 µl Agaroseblaupuffer vermischt und zusammen mit einem unverdauten PCR-Produkt und einer 50bp-Leiter auf 10%ige Polyacrylamidgele mit 10%Glycerol aufgetragen. Die Gele liefen eine Stunde bei 250 V und wurden anschließend mittels Silberfärbung gefärbt (s.Tab. 3-3).

4 Ergebnisse

4.1 Mutationsanalyse der Gene *IGF-I* und *IGF-IR*

Die Gene für *IGF-I* und *IGF-IR* wurden mittels SSCP-Analyse im Hinblick auf Sequenzveränderungen untersucht. Um eine Aussage über die Art und Position solcher Sequenzvarianten machen zu können, wurden Fragmente, die abweichende SSCP-Muster zeigten, im weiteren Verlauf sequenziert. Die in der DNA-Sequenzierung detektierten Sequenzveränderungen wurden schließlich durch Restriktionsanalysen bestätigt.

Es wurde genomische DNA von 38 Probanden eines Patientenkollektives mit IUGR und ARED-Flow in der A.umbilicalis (19 Patientinnen und deren 19 Kindern) und von 28 Probanden eines Kontrollkollektives mit IUGR und normalem Dopplerprofil der Umbilikalarterie bei pathologischem Dopplerbefund der A.uterina (Notch) (14 Patientinnen und deren 14 Kindern) untersucht. Im Anhang findet sich eine Auflistung der untersuchten Probanden (Anhang 8.1.1 und 8.1.2). Wurden Auffälligkeiten gefunden, so wurde in einem Kontrollkollektiv von 100 gesunden Kontrollen (50 Müttern und deren 50 Kindern) überprüft, ob dieselben Varianten hier auch auftraten.

4.1.1 Ergebnisse der Analyse des *IGF-I*-Gens

Das auf Chromosom 12 lokalisierte *IGF-I*-Gen umfasst 5 Exons (s. Abb. 4-1).



Abb. 4-1 a, b: Ideogramm des menschlichen Chromosoms 12 mit der chromosomalen Region 12q22-q24.1, wo das Gen für *IGF-I* lokalisiert ist (a). Schematische Darstellung der *IGF-I*-Genstruktur (b)

Die einzelnen Exons sind durch Rechtecke gekennzeichnet. Die Länge eines Rechtecks gibt in etwa die Länge des Exons an. Die kodierenden Regionen sind schwarz, die nicht-kodierenden Regionen weiss dargestellt

Die Patienten-DNA wurde zunächst mit dem für jedes der fünf Exons spezifischen Primerpaar (s. Anhang, 8.2) mittels PCR vervielfältigt. Es folgte die SSCP-Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente. Dabei fielen bei jedem der fünf Exons des *IGF-I*-Gens jeweils Patienten mit abweichendem Laufmuster auf. Dennoch liessen sich in den anschließend durchgeführten DNA-Sequenzierungen der auffälligen DNA-Fragmente keine Sequenzabweichungen vom Wildtyp im Bereich der Exons sowie der Exon/ Intron-Grenzen nachweisen, so dass anzunehmen ist, dass die Auffälligkeit ausserhalb des kodierenden Bereiches lag oder durch Artefakte der SSCP-Analyse bedingt war.

4.1.2 Ergebnisse der Analyse des *IGF-IR*-Gens

Das *IGF-IR*-Gen ist auf Chromosom 15 lokalisiert. Zusätzlich zu den 21 Exons, die das *IGF-IR*-Gen umfasst, wurden auch die 5'-untranslatierte Region und die 3'-untranslatierte Region des Gens untersucht (s. Abb. 4-2).

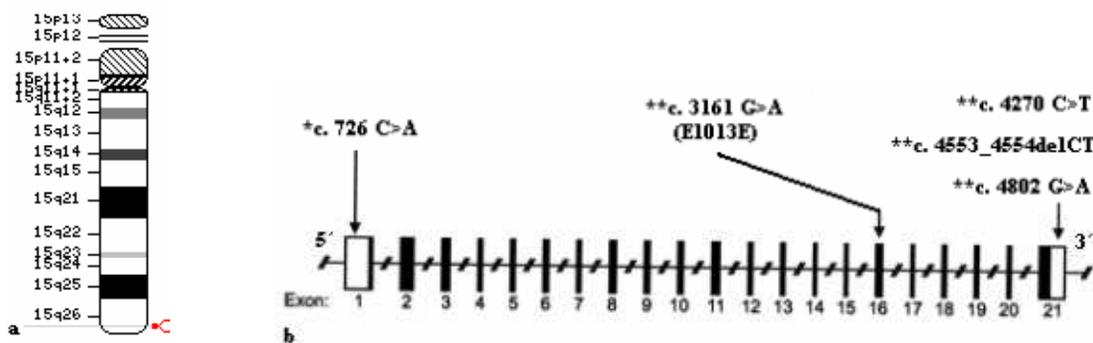


Abb. 4-2 a, b: Ideogramm des menschlichen Chromosoms 15 mit der chromosomalen Region 15q25-q26, wo das Gen für *IGF-IR* lokalisiert ist (a). Schematische Darstellung der *IGF-IR*-Genstruktur mit Angabe der im *IGF-IR*-Gen identifizierten Varianten (b) (*c bezieht sich auf GI: 184837; **c bezieht sich auf GI: 14752196)

Die einzelnen Exons sind durch Rechtecke gekennzeichnet. Die Länge eines Rechtecks gibt in etwa die Länge des Exons an. Die kodierenden Regionen sind schwarz, die nicht-kodierenden Regionen weiss dargestellt

Da einige DNA-Fragmente zu groß waren, um aussagekräftig analysiert zu werden, wurden diese durch interne Primer in Fragmente unterteilt: das Exon 2 wurde in drei, die Exons 3 und 21 in zwei Fragmente unterteilt; die 5'-untranslatierte Region bestand aus vier, die 3'-untranslatierte Region aus drei Abschnitten (s. Anhang, 8.2). Jedes DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert und mittels SSCP auf Sequenzveränderungen hin untersucht. In den Fällen, wo auffälliges Laufverhalten in der SSCP-Analyse zu beobachten war, wurden die entsprechenden Fragmente anschließend sequenziert. Bei den Sequenzierungen fielen bei *IGF-IR-5'-UTR1*, *-Ex.16*, *-3'-UTR1*, *-3'-UTR2* und *-3'-UTR3* Patienten mit Sequenzveränderungen auf, die bis auf *IGF-IR-3'-UTR2* mittels Restriktionsverdau analysiert wurden (s. Tab. 4-1). Im Falle von *IGF-IR-3'-UTR2* war keine Restriktionsanalyse erforderlich, da das SSCP-Muster eindeutig genug mit den in den DNA-Sequenzierungen detektierten Varianten korrelierte. Eine Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Varianten im *IGF-IR*-Gen ist der Abbildung Abb. 4-2b zu entnehmen.

	Sequenz-Variante	Enzym	Erkennungssequenz	Wildtyp (bp)	Sequenz-Variante(bp)
<i>IGF IR-5'-UTR1</i>	*c. 726 C>A	<i>BamHI</i>	5'...G→GATCC...3' 3'...CCTAG←G...5'	125-76	201
<i>IGF IR-Ex.16</i>	**c. 3161 G>A***	<i>DdeI</i>	5'...C→TNAG...3' 3'...GANT←C...5'	33-223-47	256-47
<i>IGF IR-3'-UTR1</i>	*c. 4270 C>T	<i>SacII</i>	5'...CCGC→GG...3' 3'...GG←CGCC...5'	134-164	298
<i>IGF IR-3'-UTR3</i>	*c. 4802 G>A	<i>PvuII</i>	5'...CAG→CTG...3' 3'...GTC←GAC...5'	157-174	331

Tab. 4-1: Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen für das *IGF-IR*-Gen

*c bezieht sich auf GI: 184837; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

**c bezieht sich auf GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

***Mutageneseprimer erforderlich (s. Kap. 3.3.5.2)

4.1.2.1 5'-untranslatierte Region des *IGF-IR*-Gens

Die 5'-untranslatierte Region des *IGF-IR*-Gens wurde in vier Abschnitte unterteilt (*IGF-IR-5'-UTR1*, *-5'-UTR2*, *-5'-UTR3* und *-5'-UTR4*). Die SSCP-Analyse von *IGF-IR-5'-UTR2* zeigte keine Auffälligkeit. Die in der SSCP-Analyse von *IGF-IR-5'-UTR3* und *-5'-UTR4* bei einigen Patienten beobachteten abweichenden Bandenmuster konnten durch die nachfolgenden Sequenzierungen nicht bestätigt werden, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Analyse von *IGF-IR-5'-UTR1*.

Die SSCP-Bandenmuster der *IGF-IR-5'-UTR1*-PCR-Fragmente waren bei der Patientin 9 und den Kontrollpersonen 69 und 70 verändert (s. Abb. 4-3). In den anschließend durchgeführten Sequenzierungen ließ sich nachweisen, dass alle drei Probanden heterozygot für eine C>A-Transition an Position c. 726 (GI: 184837; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) waren (s. Abb. 4-5; Anhang 8.3). Diese Variante (c. 726 C>A) ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden.

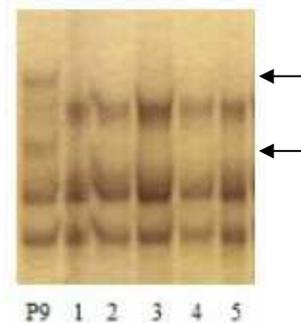


Abb. 4-3: SSCP-Analyse von *IGF-IR-5'-UTR1* (RT+Glycerol)

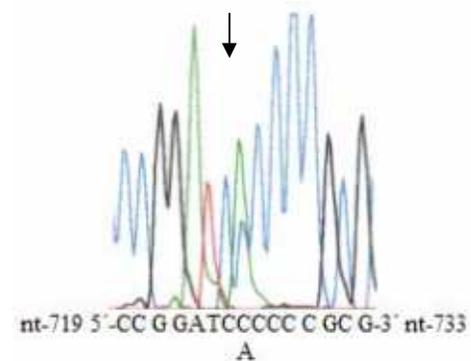


Abb. 4-4: Automatisierte DNA-Sequenzanalyse von *IGF-IR-5'-UTR1* (F-Primer, P9)

Mobilitätsunterschiede bzw. Heterozygotie sind mit Pfeilen markiert (P: Pat.Nr.; 1-5 = Kontrollen)

Durch die Sequenzveränderung fällt eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle weg (s. Tab. 4-1; Abb. 4-5). Um die Häufigkeit der Sequenzvariante zu bestimmen und um das Vorkommen der Variante in einem Normalkollektiv zu untersuchen, wurden mittels Restriktionsverdau alle 38 Probanden des Patientenkollektives, die 28 Probanden des Kontrollkollektives sowie weitere 100 gesunde Kontrollen analysiert. Die Variante lag neben den drei Patienten auch bei drei Kontrollen im heterozygoten Zustand vor (s. Tab. 4-2).

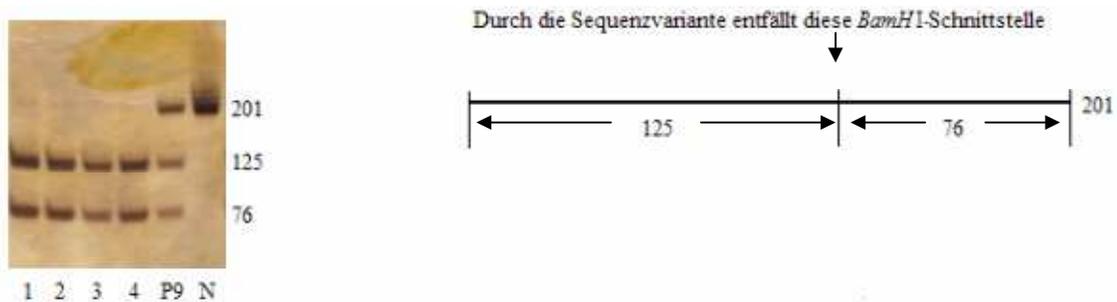


Abb. 4-5: Restriktionsverdau von *IGF-IR-5'-UTR1* mit der Endonuklease *Bam*HI. Die Strichzeichnung gibt die Restriktionsmuster der Wildtyp- und der veränderten PCR-Fragmente schematisch wieder. Die Zahlen an der rechten Seite des Gels und in der Skizze geben die Größe der Verdauprodukte in Basenpaaren (bp) an. P: Pat.Nr.; 1-4 = Kontrollen; N: nicht-verdautes PCR-Produkt

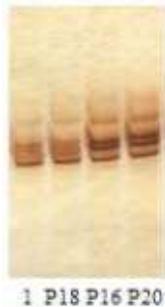
	<u>Patienten</u>		<u>Kontrollen</u>		<u>Kontrollen</u>	
	IUGR mit ARED		IUGR mit Notch		Gesund	
	M (n=19)	K (n=19)	M (n=14)	K (n=14)	M (n=50)	K (n=50)
C/C	18	19	13	13	48	49
C/A	1	0	1	1	2	1
A/A	0	0	0	0	0	0
Allelfrequenz (A)	1/76 → 1,3%		2/56 → 3,6%		3/200 → 1,5%	

Tab. 4-2: Ergebnisse der Mutationsanalyse bei *IGF-IR-5'-UTR1*; Sequenzvariante C>A an Position c. 726 (GI: 184837; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (M: Mütter; K: Kinder)

Da diese Sequenzvariante auch bei den gesunden Kontrollen nachweisbar war, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um einen seltenen Polymorphismus.

4.1.2.2 Kodierende Region des *IGF-IR*-Gens

Die SSCP-Analyse der Exons 1-21 des *IGF-IR*-Gens zeigte bei mehreren Patienten auffällige Laufmuster. Allerdings erbrachten die anschließend durchgeführten DNA-Sequenzierungen nur im Fall von Exon 16 den Nachweis einer Sequenzveränderung.



Die SSCP-Analyse der PCR-Fragmente, die mit dem für Exon 16 spezifischen Primerpaar amplifiziert wurden, ergab ein Laufmuster mit vier und ein Laufmuster mit fünf Banden (s. Abb. 4-6).



Abb. 4-6: SSCP-Analyse von *IGF-IR-Ex.16*. Die PCR-Produkte der Probanden 1 und P18 weisen eine zusätzliche Konformationsbande auf (s. Pfeil). P: Pat.Nr.; 1 = Kontrolle

In der direkten DNA-Sequenzierung liessen sich die Patienten mit dem vierbandigen SSCP-Muster in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe bildeten Patienten, die an Position c. 3161 (GI: 14752196) homozygot für G waren (G/G) (s. Abb. 4-7A), in Übereinstimmung mit der veröffentlichten Sequenz (1; 151; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die zweite Gruppe bestand aus Patienten, die homozygot für einen G>A-Nukleotidaustausch an Position c. 3161 waren (A/A) (s. Abb. 4-7C). Die Patienten mit dem fünfbändigen SSCP-Muster waren heterozygot für diese Sequenzveränderung (G/A) (s. Abb. 4-7B; Anhang 8.3).

Der Austausch betrifft die dritte Base, die sogenannte „Wobble-Base“, in dem Triplet GAG, welches für Glutamin kodiert; das neu entstehende Triplet GAA kodiert ebenfalls für Glutamin (E1013E; [Glu1013Glu]). Es handelt sich um eine stille Mutation, die bereits in der Literatur beschrieben worden ist (SNP ID: rs2229765; 2).

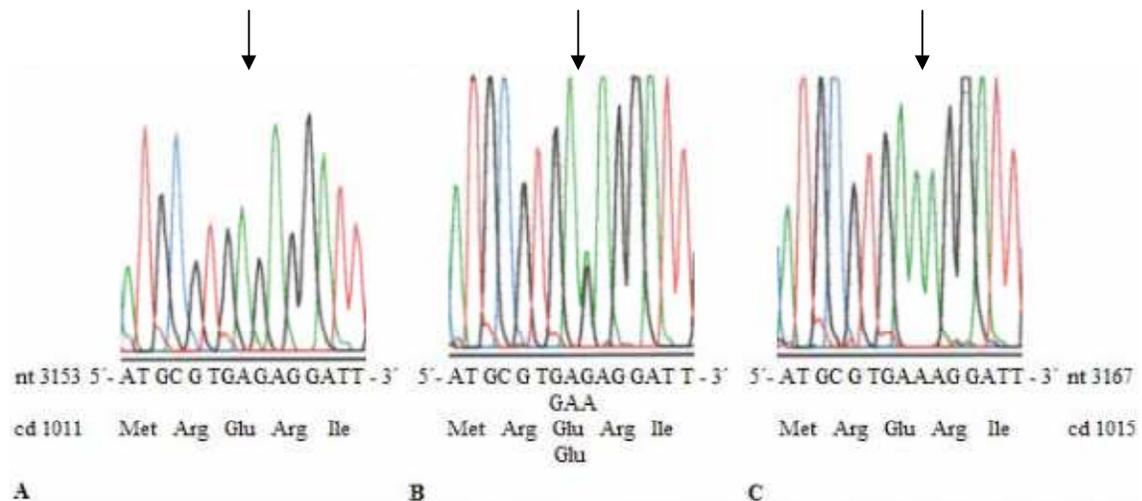


Abb. 4-7: Automatisierte DNA-Sequenzanalyse von *IGF-IR-Ex.16*. (A) F-Primer, Pat.Nr.20 (Wildtyp); (B) F-Primer, Pat.Nr.18 (heterozygot für die Mutation); (C) F-Primer, Pat.Nr.16 (homozygot für die Mutation)

Die Restriktionsanalyse mit der Endonuklease *DdeI* bestätigte die in der DNA-Sequenzierung detektierte Sequenzveränderung. Durch den Basenaustausch G>A fällt bei Mutanten eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *DdeI* weg. Wird das entsprechende PCR-Produkt mit *DdeI* inkubiert, so wird nur das Wildtypallel geschnitten, die Mutante nicht (s. Tab. 4-1; Abb. 4-8). Um die Häufigkeit der Sequenzvariante zu bestimmen und um das Vorkommen der Variante in einem Normalkollektiv zu untersuchen, wurden mittels Restriktionsverdau alle 38 Probanden des Patientenkollektives, die 28 Probanden des Kontrollkollektives sowie weitere 100 gesunde Kontrollen analysiert. Für die Sequenzvariante c. 3161 G>A zeigten sich bei den Patienten und den gesunden Kontrollen gleiche Verteilungen (s. Tab. 4-3).

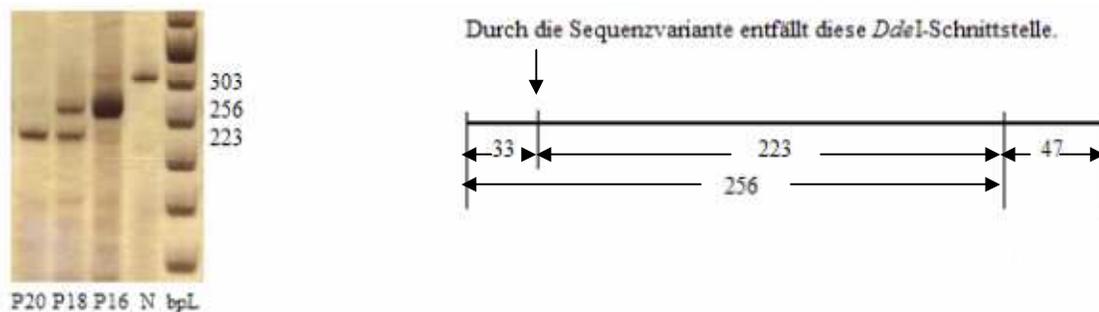


Abb. 4-8: Restriktionsverdau von *IGF-IR-Ex.16* mit der Endonuklease *DdeI*. Die Strichzeichnung gibt die Restriktionsmuster der Wildtyp- und der veränderten PCR-Fragmente schematisch wieder. Die Zahlen an der rechten Seite des Gels und in der Skizze geben die Grösse der Verdauprodukte in Basenpaaren (bp) an. Die kleinen 33 und 47 bp Fragmente konnten unter den gewählten Elektrophoresebedingungen nicht dargestellt werden. P: Pat.Nr.; N: nicht-verdautes PCR-Produkt; bpL: 50bp-Leiter

	<u>Patienten</u>		<u>Kontrollen</u>		<u>Kontrollen</u>	
	IUGR mit ARED		IUGR mit Notch		Gesund	
	M (n=19)	K (n=19)	M (n=14)	K (n=14)	M (n=50)	K (n=50)
G/G	6	7	4	8	14	11
G/A	9	5	10	5	28	30
A/A	4	7	0	1	8	9
Allelfrequenz (A)	36/76 → 47,4%		17/56 → 30,4%		92/200 → 46%	

Tab. 4-3: Ergebnisse der Mutationsanalyse bei *IGF-IR-Ex.16*; Sequenzvariante G>A an Position c. 3161 (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (M: Mütter; K: Kinder)

4.1.2.3 3'-untranslatierte Region des *IGF-IR*-Gens

Die in drei Abschnitte unterteilte *IGF-IR-3'-UTR* (*IGF-IR-3'-UTR1*, *-3'-UTR 2* und *-3'-UTR3*) wurde zunächst mittels SSCP untersucht. In allen drei Abschnitten fielen Patienten mit verändertem Laufverhalten auf. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden aufgrund dessen im weiteren Verlauf sequenziert.

IGF-IR-3'-UTR1

Bei den Patienten 19 und 20 sowie der Kontrollperson 60 konnten in der SSCP-Analyse abweichende Bandenmuster der *IGF-IR-3'-UTR1*-PCR-Produkte nachgewiesen werden (s. Abb. 4-9). Die Sequenzierungen der entsprechenden PCR-Produkte zeigten einen heterozygoten C>T-Basenaustausch an Position c. 4270 (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (s. Abb. 4-10; Anhang 8.3). Diese Variante (c. 4270 C>T) ist bisher noch nicht beschrieben worden.

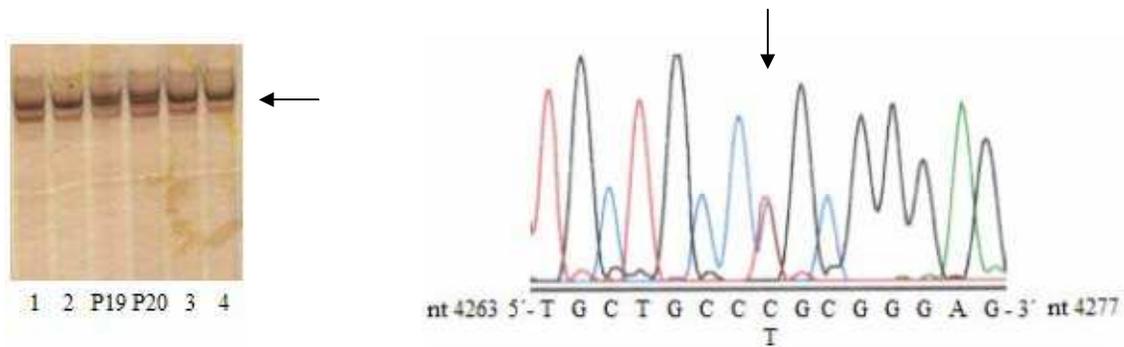


Abb. 4-9: SSCP-Analyse von *IGF-IR-3'-UTR1* (RT+Glycerol)

Abb. 4-10: Automatisierte DNA-Sequenzanalyse von *IGF-IR-3'UTR1* (F-Primer, P19)

Mobilitätsunterschiede bzw. Heterozygotie sind mit Pfeilen markiert (P: Pat.Nr.; 1-4 = Kontrollen)

Die Sequenzveränderung führt dazu, dass eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SacII* entfällt (s. Tab. 4-1; Abb. 4-11). Um die Häufigkeit der Sequenzvariante zu bestimmen und um das Vorkommen der Variante in einem Normalkollektiv zu untersuchen, wurden mittels Restriktionsverdau alle 38 Probanden des Patientenkollektives, die 28 Probanden des Kontrollkollektives sowie weitere 100 gesunde Kontrollen analysiert. Die Variante lag weder bei den restlichen Patienten noch bei den Kontrollfällen vor (s. Tab. 4-4).

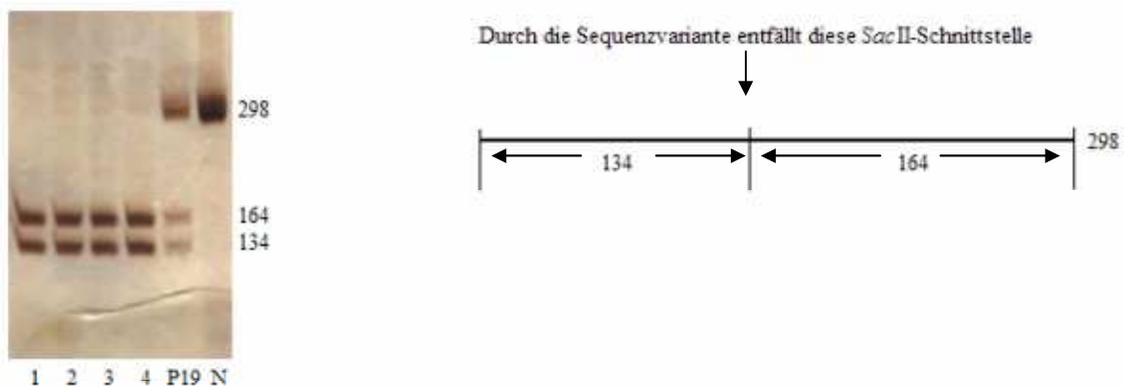


Abb. 4-11: Restriktionsverdau von *IGF IR-3'-UTR1* mit der Endonuklease *SacII*. Die Strichzeichnung gibt die Restriktionsmuster der Wildtyp- und der veränderten PCR-Fragmente schematisch wieder. Die Zahlen an der rechten Seite des Gels und in der Skizze geben die Größe der Verdauprodukte in Basenpaaren (bp) an. P: Pat.Nr.; N: nicht-verdautes PCR-Produkt

	<u>Patienten</u>		<u>Kontrollen</u>		<u>Kontrollen</u>	
	IUGR mit ARED		IUGR mit Notch		Gesund	
	M (n=19)	K (n=19)	M (n=14)	K (n=14)	M (n=50)	K (n=50)
C/C	18	18	14	13	50	50
C/T	1	1	0	1	0	0
T/T	0	0	0	0	0	0
Allelfrequenz (T)	2/76 → 2,6%		1/56 → 1,8%		0	

Tab. 4-4: Ergebnisse der Mutationsanalyse bei *IGF-IR-3'-UTR1*; Sequenzvariante C>T an Position c. 4270 (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (M: Mütter; K: Kinder)

IGF-IR-3'-UTR2

In der SSCP-Analyse von *IGF-IR-3'-UTR2* wurden drei verschiedene Bandenmuster beobachtet (s. Abb. 4-12).

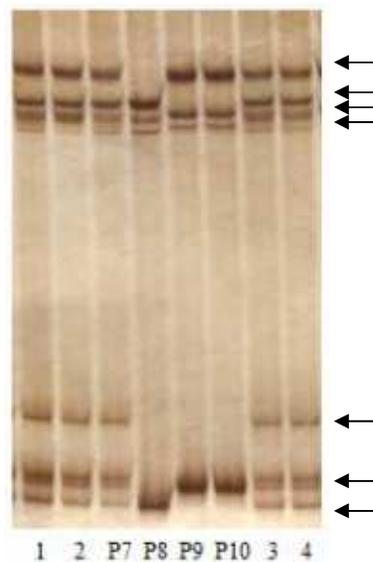


Abb. 4-12: SSCP-Analyse von *IGF-IR-3'-UTR2* (RT+Glycerol)

Mobilitätsunterschiede sind mit Pfeilen markiert (P: Pat.Nr.; 1-4 = Kontrollen)

Die erfolgten Sequenzierungen erbrachten den Nachweis einer Deletion: c. 4553_4554delCT (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Das eine SSCP-Laufmuster entsprach dem Wildtyp im homozygoten Zustand (CT/CT), das zweite dem heterozygoten Zustand (CT/delCT) und das dritte der Mutation im homozygoten Zustand (delCT/delCT) (s. Abb. 4-13 A, B, C; Anhang 8.3). Es handelt sich um einen bereits beschriebenen Polymorphismus (SNP ID: rs 3833015).

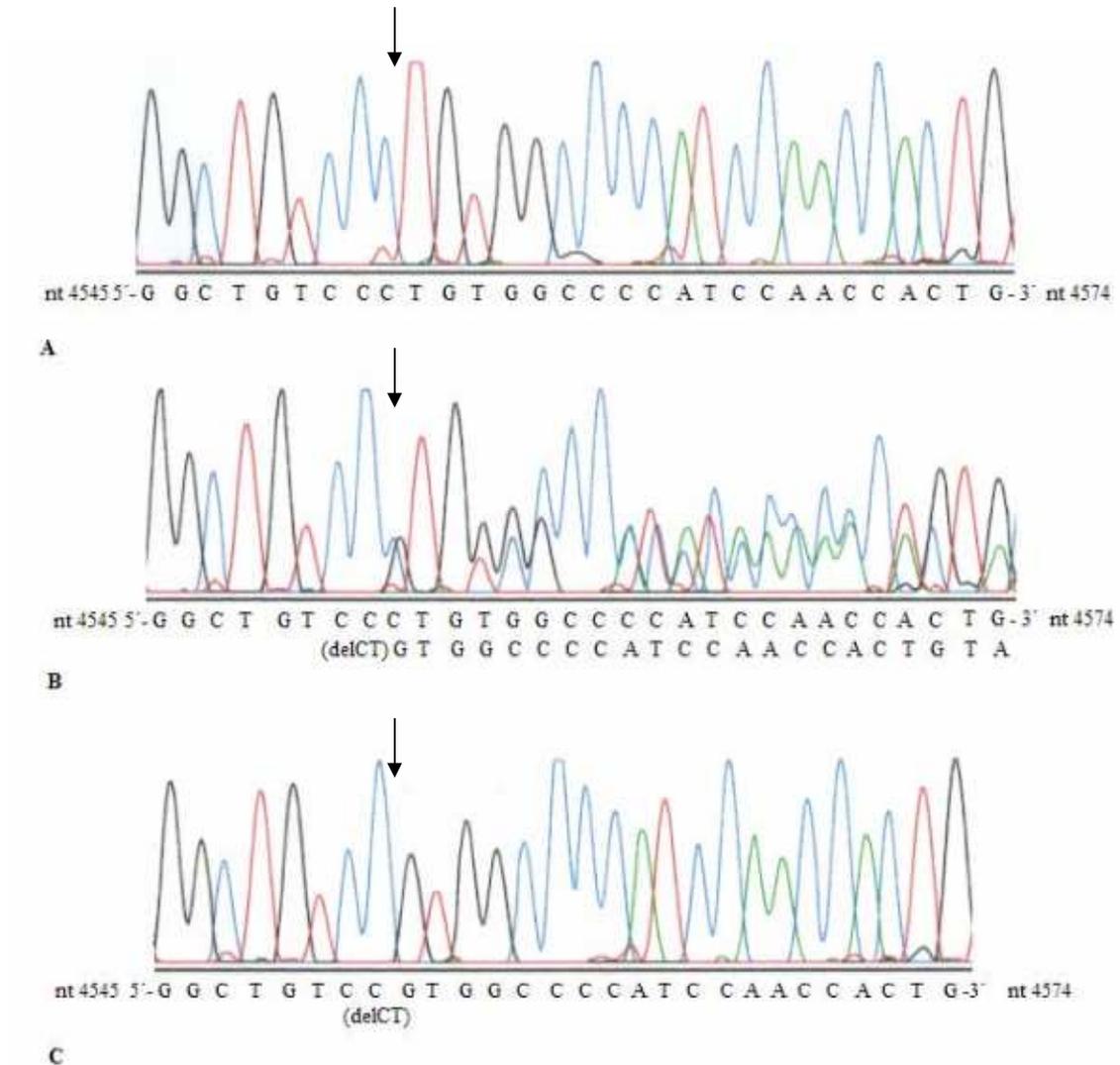


Abb. 4-13: Automatisierte DNA-Sequenzanalyse von *IGF-IR-3'-UTR2*. (A) F-Primer, Pat.Nr.9 (Wildtyp); (B) F-Primer, Pat.Nr.7 (heterozygot für die Mutation); (C) F-Primer, Pat.Nr.8 (homozygot für die Mutation)

Da die jeweiligen SSCP-Bandenmuster den entsprechenden Sequenzvarianten sehr eindeutig zugeordnet werden konnten, wäre eine zusätzliche Restriktionsanalyse in diesem Fall nicht erforderlich und wurde deswegen nicht durchgeführt. Um die Häufigkeit der Sequenzvariante zu bestimmen und um das Vorkommen der Variante in einem Normalkollektiv zu untersuchen, wurden mittels SSCP alle 38 Probanden des Patientenkollektives, die 28 Probanden des Kontrollkollektives sowie weitere 100 gesunde Kontrollen analysiert.

Für die Sequenzvariante c. 4553_4554delCT zeigten sich bei den Patienten und den gesunden Kontrollen gleiche Verteilungen (s. Tab. 4-5).

	<u>Patienten</u>		<u>Kontrollen</u>		<u>Kontrollen</u>	
	IUGR mit ARED		IUGR mit Notch		Gesund	
	M (n=19)	K (n=19)	M (n=14)	K (n=14)	M (n=50)	K (n=50)
CT/CT	9	11	6	8	21	20
CT/delCT	9	5	8	5	25	23
delCT/delCT	1	3	0	1	4	7
Allelfrequenz (CT)	22/76 → 28,9%		15/56 → 26,8%		70/200 → 35,0%	

Tab. 4-5: Ergebnisse der Mutationsanalyse bei *IGF-IR-3'-UTR2*; Sequenzvariante delCT an Position c. 4553_4554 (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (M: Mütter; K: Kinder)

IGF-IR-3'-UTR3

Die SSCP-Analyse von *IGF-IR-3'-UTR3* zeigte bei der Kontrollperson 48 ein verändertes Laufverhalten (s. Abb. 4-14). In der anschließend durchgeführten Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass dieser Proband heterozygot für eine G>A-Transition an Nukleotidposition c. 4802 (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) war (s. Abb. 4-15; Anhang 8.3). Diese Variante (c. 4802 G>A) ist bisher noch nicht beschrieben worden.

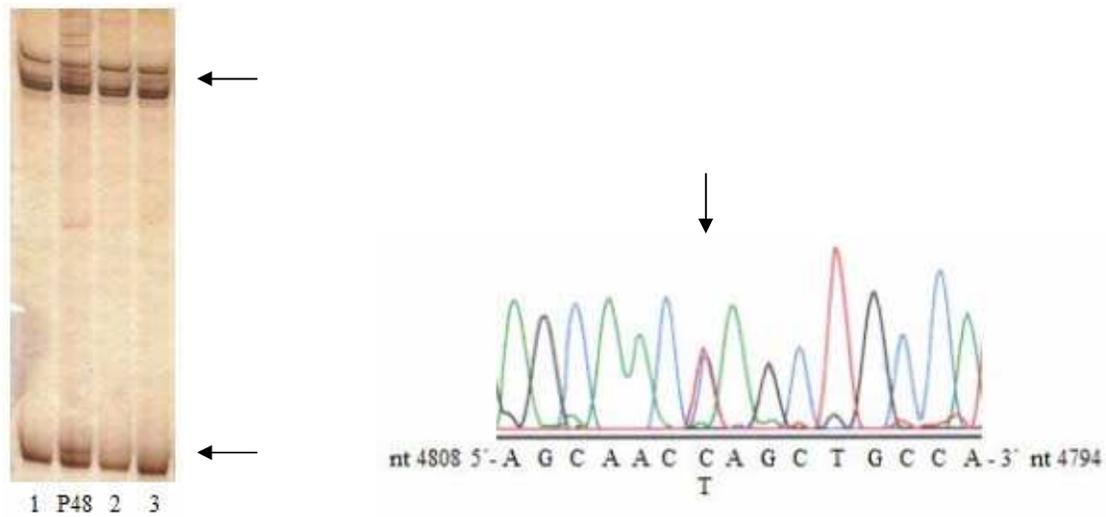
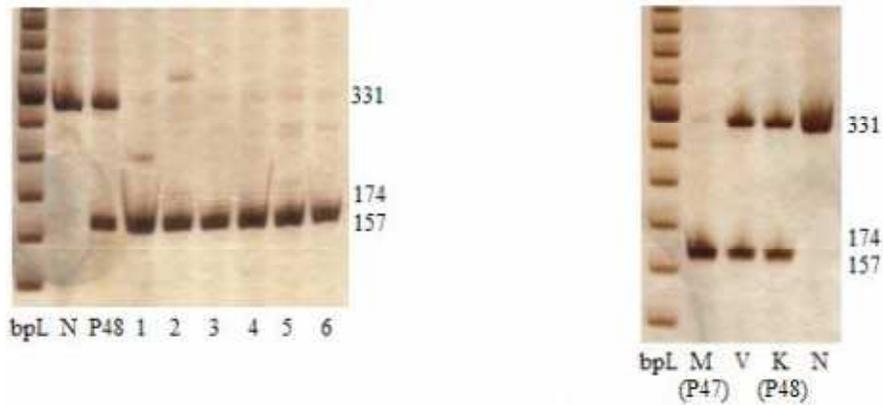


Abb. 4-14: SSCP-Analyse von *IGF-IR-3'-UTR3* (RT+Glycerol) Abb. 4-15: Automatisierte DNA-Sequenzanalyse von *IGF-IR-3'-UTR3* (R-Primer, P48)

Mobilitätsunterschiede bzw. Heterozygotie sind mit Pfeilen markiert (P: Pat.Nr.; 1-3 = Kontrollen)

Die weitere Analyse mit der Restriktionsendonuklease *PvuII* bestätigte die Existenz der in der Sequenzierung detektierten Sequenzveränderung (s. Tab. 4-1; Abb. 4-16). Um die Häufigkeit der Sequenzvariante zu bestimmen und um das Vorkommen der Variante in einem Normalkollektiv zu untersuchen, wurden mittels Restriktionsverdau alle 38 Probanden des Patientenkollektives, die 28 Probanden des Kontrollkollektives sowie weitere 100 gesunde Kontrollen analysiert. Das dieser Sequenzvariante entsprechende Fragmentmuster wurde bei keinem der Kontrollfälle entdeckt, auch nicht bei der Mutter, jedoch bei dem Vater des Patienten (s. Tab. 4-6).



Durch die Sequenzvariante entfällt diese *PvuII*-Schnittstelle

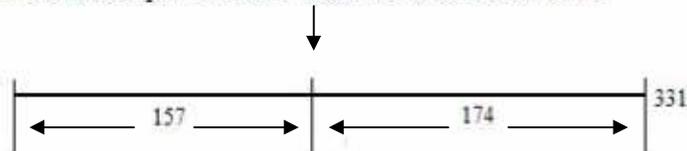


Abb. 4-16: Restriktionsverdau von *IGF-IR-3'-UTR3* mit der Endonuklease *PvuII*. Die Strichzeichnung gibt die Restriktionsmuster der Wildtyp- und der veränderten PCR-Fragmente schematisch wieder. Die Zahlen an der rechten Seite des Gels und in der Skizze geben die Größe der Verdauprodukte in Basenpaaren (bp) an. Die 157 und 174 bp Fragmente konnten aufgrund ihrer ungefähr gleichen Größe unter den gewählten Elektrophoresebedingungen nicht voneinander aufgetrennt werden. P: Pat.Nr.; 1-6 = Kontrollen; N: nicht-verdautes PCR-Produkt; bpL: 50bp-Leiter; M: Mutter (von P48); V: Vater (von P48); K: Kind (P48)

	<u>Patienten</u>		<u>Kontrollen</u>		<u>Kontrollen</u>	
	IUGR mit ARED		IUGR mit Notch		Gesund	
	M (n=19)	K (n=19)	M (n=14)	K (n=14)	M (n=50)	K (n=50)
G/G	19	19	14	13	50	50
G/A	0	0	0	1	0	0
A/A	0	0	0	0	0	0
Allelfrequenz (A)	0		1/56 → 1,8%		0	

Tab. 4-6: Ergebnisse der Mutationsanalyse bei *IGF-IR-3'-UTR3*; Sequenzvariante G>A an Position c. 4802 (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (M: Mütter; K: Kinder)

5 Diskussion

Das intrauterine Wachstum ist das Endresultat gut aufeinander abgestimmter Vorgänge, die sowohl von endogenen als auch von exogenen Faktoren beeinflusst werden. Von zentraler Bedeutung für das intrauterine Wachstum ist eine intakte Funktion der Plazenta, wobei letztere eine normale Entwicklung der uteroplazentaren und der fetoplazentaren Gefäßgebiete voraussetzt. Dagegen basiert die intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) einerseits auf einer Schädigung der uteroplazentaren Gefäße, andererseits auf einer Pathologie der Plazentazotten (131). Störungen der Angiogenese sowie der Zottenreifung sind mit früh in der Schwangerschaft auftretenden und schweren Formen der IUGR mit ARED-Flow in der Dopplersonographie der A.umbilicalis als Ausdruck einer ausgeprägten Widerstandserhöhung im Umbilikalkreislauf verbunden (67; 69; 79; 80; 91). Um die Auswirkungen dieser Kreislaufveränderungen zu erfassen, war im Vorfeld der vorliegenden Arbeit ein Kollektiv von 33 Patientinnen und deren 33 Kindern mit IUGR dopplersonographisch untersucht und in ein Patienten- und ein Kontrollkollektiv unterteilt worden. Das Patientenkollektiv umfasste 19 Patientinnen und deren 19 Kinder mit IUGR und pathologischem Dopplerprofil der A.umbilicalis im Sinne eines Verlustes des enddiastolischen Flusses bis hin zur Strömungsumkehr (ARED-Flow). Dem Kontrollkollektiv waren 14 Patientinnen und deren 14 Kinder zugeteilt, die eine IUGR mit normalem Dopplerprofil der Umbilikalarterie bei gleichzeitig pathologischem Dopplerbefund der A.uterina (Notch) zeigten. Die Häufigkeit von hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft (HES) war in beiden Kollektiven vergleichbar. Zur Berücksichtigung der morphologischen Veränderungen im plazentaren Gewebe hatte mit Hilfe von histologischen Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe von Prof. P. Kaufmann im Institut für Anatomie der RWTH Aachen eine Einteilung der Plazenten stattgefunden.

5.1 Angewandte molekulargenetische Methoden

5.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde angewandt, um die zu untersuchende DNA-Abschnitte zu vervielfältigen und der Mutationsanalyse zugänglich zu machen. Die PCR-Bedingungen wurden für jedes Exon der beiden untersuchten Gene *IGF-I* und *IGF-IR*

etabliert. Um eine eventuelle Kontamination mit Fremd-DNA auszuschliessen, wurde bei jedem PCR-Experiment eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle Komponenten ausser der Proben-DNA enthielt. Zur Amplifikation von Problemfällen, vor allem in den untranslatierten Regionen der Gene, wurden Primer neu konstruiert. In diesen Fällen wurde teilweise Q-Solution (Qiagen) als Cosolvent eingesetzt und die Annealing-Temperatur erhöht. Dadurch kam es zu einer Steigerung der PCR-Spezifität. War dabei die Produktbildung nicht ausreichend, wurde zusätzlich die Extensionszeit verlängert.

5.1.2 Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (SSCP)

Die Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (SSCP) wurde aus Zeit- und Kostengründen als sogenanntes „Prescreening“-Verfahren verwendet. Varianten, die dabei detektiert wurden, konnten dann in einem nachfolgenden Schritt direkt sequenziert werden.

Die SSCP-Analyse ist eine relativ kostengünstige, gut zu etablierende und schnelle Methode zur Suche nach Mutationen in einem gegebenen DNA-Fragment. Um dabei auch eine möglichst hohe Mutationsdetektionsrate zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Laufverhalten der zu untersuchenden durch PCR amplifizierten Fragmente unter vier unterschiedlichen Bedingungen untersucht.

Nachteile der SSCP-Methode sind, dass sie eine relativ eingeschränkte Sensitivität von 80-90% besitzt, und manchmal schwer zu interpretieren ist. Ausserdem liefert das SSCP-Muster nur einen Hinweis auf das Vorhandensein von Sequenzvarianten, nicht aber über deren Art und Position. Dazu dient als sensitivste Methode die Sequenzierung. Es ist jedoch nur schwer praktikabel und auch sehr teuer, bei der Suche nach Mutationen jedes Fragment zu sequenzieren. Daher wurden nur DNA-Fragmente, die in der SSCP-Analyse veränderte Laufeigenschaften zeigten, mittels Methoden der direkten Mutationsanalyse weiteruntersucht.

Im untersuchten Gesamtkollektiv der vorliegenden Arbeit waren durch die SSCP-Analyse mehrere auffällige Bandenmuster sowohl bei *IGF-I* als auch bei *IGF-IR* zu beobachten. Allerdings konnten in den anschliessend durchgeführten DNA-Sequenzierungen nur insgesamt fünf Polymorphismen im *IGF-IR*-Gen identifiziert werden (s. Kap 4.1.2). Die übrigen auffälligen SSCP-Muster konnten durch die direkte Mutationsanalyse nicht bestätigt werden. Die Begründung dafür könnte darin bestehen, dass die Auffälligkeit ausserhalb des

kodierenden Bereiches lag oder dass die auffälligen Bandenmuster durch Artefakte der SSCP-Analyse entstanden waren. Darüber hinaus lässt sich sagen, dass obwohl Unterschiede in der Basenabfolge meistens ein unterschiedliches Laufverhalten im SSCP-Gel bewirken, es auch denkbar ist, dass in seltenen Fällen die Sekundärstruktur trotz veränderter Basensequenz unverändert bleibt und es zu keinem auffälligen Laufverhalten kommt. So könnten eventuell weitere seltene Polymorphismen der beiden Gene aufgrund fehlender Auffälligkeit in der SSCP-Analyse unentdeckt geblieben sein.

5.1.3 DNA-Sequenzierung

Durch die SSCP-Methode identifizierten Varianten wurden mittels DNA-Sequenzierung weiteruntersucht.

Die elektrophoretische Auftrennung der zu sequenzierenden PCR-Produkte, die Detektion der Fluoreszenzdaten sowie die Datenauswertung wurden auf einem ABI PRISM 377-Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Dabei stellt die DNA-Sequenzierung die sensitivste Methode (97-99%) des Mutationsnachweises dar.

Bei den durchgeführten Sequenzierungen fielen im Patienten- und Kontrollkollektiv insgesamt fünf Sequenzvarianten im *IGF-IR*-Gen auf: drei bisher noch unbekannte Polymorphismen, in den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen, und zwei bereits zuvor beschriebene Polymorphismen, in Exon 16 der kodierenden Sequenz und in der 3'-untranslatierten Region von *IGF-IR* (s. Kap. 4.1.2).

5.1.4 Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)

Die mittels DNA-Sequenzierung identifizierten Sequenzvarianten konnten durch Analysen von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) bestätigt werden. Darüber hinaus konnten durch die Restriktionsanalysen die Häufigkeiten der jeweiligen Sequenzvarianten sowohl im Patienten- und Kontrollkollektiv als auch in einem Kollektiv von gesunden Kontrollen untersucht werden (s. Kap. 4.1.2). Im Falle der Deletion delCT an Position c. 4553_4554 in der 3'-untranslatierten Region von *IGF-IR* war keine Restriktionsanalyse erforderlich, da das SSCP-Muster eindeutig genug mit den in den DNA-Sequenzierungen detektierten Varianten korrelierte.

5.2 Rolle von *IGF-I* und *IGF-IR* bei der Entstehung von IUGR mit ARED-Flow

5.2.1 Mögliche funktionelle Folgen von Mutationen der Gene *IGF-I* und *IGF-IR*

Veränderungen einer Gensequenz durch verschiedene Arten von Mutationen können zu vielfältigen Auswirkungen auf die Funktion eines Genproduktes führen.

Deletionen und Insertionen in kodierenden Bereichen können ebenso wie Nonsense-Mutationen Störungen des Leserasters und damit einen vorzeitigen Stop in der Translation bewirken. So brachten Woods et al. (1996) eine grosse Deletion im kodierenden Bereich des *IGF-I*-Gens mit einer Funktionseinschränkung von *IGF-I* bei einem Patienten mit intrauteriner und postnataler Wachstumsretardierung in Verbindung (157). Weitere Einflussmöglichkeiten auf die Genfunktion haben Mutationen in Bereichen, die für die mRNA-Stabilität, die posttranskriptionale Prozessierung oder die zelluläre Lokalisation verantwortlich sind. Bonapace et al. (2003) identifizierten bei einem Patienten mit *IGF-I*-Defizienz eine Nukleotidsubstitution in der 3'-untranslatierten Region des *IGF-I*-Gens, die über eine veränderte E-Domäne des *IGF-I*-Vorläuferpeptides zu einer gestörten Regulation der *IGF-I*-Genexpression führen soll (19).

Darüber hinaus können Mutationen auch mit einer Beeinträchtigung der Interaktion des Wachstumsfaktors *IGF-I* mit seinem Rezeptor *IGF-IR* einhergehen, wenn durch die Sequenzveränderung die spezifische Ligandenerkennung eingeschränkt oder die Bindungsaffinität reduziert wird. Nachdem eine Assoziation zwischen intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) beim Menschen und verminderter Bindungsaffinität von *IGF-IR* bei der Interaktion mit seinem Liganden *IGF-I* diskutiert wurde (34; 44), konnten Abuzzahab et al. (2003) bei einem Mädchen mit ausgeprägter intrauteriner und postnataler Wachstumsretardierung Punktmutationen in Exon 2 des *IGF-IR*-Gens mit Änderung der Aminosäuresequenz, R108Q (Arg108Gln) in einem Allel und K115N (Lys115Asn) in dem anderen, sowie eine reduzierte *IGF-IR*-Funktion in Fibroblasten-Kulturen nachweisen. Neben den beschriebenen Missense-Mutationen identifizierten Abuzzahab et al. (2003) auch eine Nonsense-Mutation im *IGF-IR*-Gen, R59X (Arg59Stop), und eine verminderte Anzahl von *IGF-IR*-Rezeptoren in den kultivierten Fibroblasten von einem Jungen, der ebenfalls intrauterin und postnatal wachstumsretardiert war (4). Ausserdem berichteten Kawashima et al. (2005) über eine weitere Missense-Mutation, R709Q (Arg709Gln), im Vorläuferpeptid von

IGF-IR (Pro-IGF-IR), und eine reduzierte Anzahl von Bindungsstellen in Fibroblasten von einem Mädchen mit IUGR (76).

Diese Daten sowie die Erkenntnisse über die Rolle von *IGF-I* und *IGF-IR* bei der Regulation der plazentaren Zottenreifung (s. Kap. 2.4) unterstützen die Annahme, dass Mutationen im *IGF-I*- oder im *IGF-IR*-Gen über eine veränderte Genaktivität für die Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) mit ARED-Flow in der Dopplersonographie der A.umbilicalis bedeutsam sein könnten.

5.2.2 Ergebnisse der Mutationsanalyse der Gene *IGF-I* und *IGF-IR*

In der vorliegenden Arbeit konnte bei dem untersuchten Probandenkollektiv keine Mutation im *IGF-I*-Gen nachgewiesen werden. Mögliche Gründe dafür könnten die relativ eingeschränkte Sensitivität der SSCP-Analyse als angewandtes „Prescreening“-Verfahren und die begrenzte Anzahl der untersuchten Patienten sein.

Im *IGF-IR*-Gen konnten insgesamt fünf Polymorphismen identifiziert werden:

- Die bisher noch nicht beschriebene Variante c. 726 C>A (GI: 184837; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in der 5'-untranslatierten Region des *IGF-IR*-Gens. Diese Sequenzvariante trat im heterozygoten Zustand sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen mit etwa gleicher Häufigkeit auf, so dass es sich hierbei wahrscheinlich um einen seltenen Polymorphismus handelt, der aufgrund seiner Lokalisation im untranslatierten Bereich die Expression des Gens nicht zu beeinflussen scheint.
- Die bereits in der Literatur beschriebene Nukleotidsubstitution G>A an Position c. 3161 (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in Exon 16 der kodierenden Sequenz von *IGF-IR* (SNP ID: rs2229765; 2). Der Austausch, der im gesamten Probandenkollektiv und im gesunden Kontrollkollektiv mit etwa gleicher Verteilung auftrat, betrifft die dritte Base, die sogenannte „Wobble-Base“, im Triplet der 1013.Aminosäure (E1013E, [Glu1013Glu]) und hat keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des *IGF-IR*-Moleküls. Bei diesem Polymorphismus handelt es sich also um eine sogenannte stille Mutation.

- Eine weitere noch nicht beschriebene Variante c. 4270 C>T (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) im 3'-untranslatierten Bereich des *IGF-IR*-Gens. Die Nukleotidsubstitution lag im heterozygoten Zustand bei zwei Patienten (einer Mutter und dem ihr zugehörigen Kind) sowie bei einem Kontrollkind, jedoch bei keiner der gesunden Kontrollen vor. Da die Variante in der 3'-untranslatierten Region des Gens liegt und auch bei einer Kontrollperson auftrat, scheint es unwahrscheinlich, dass sie eine Rolle bei der Entstehung von IUGR mit ARED-Flow spielt.
- Die zweite zuvor beschriebene Variante c. 4553_4554 delCT (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in der 3'-untranslatierten Region von *IGF-IR* (SNP ID: rs 3833015). Für die Deletion zeigten sich bei den Patienten und den gesunden Kontrollen gleiche Verteilungen, so dass dieser Polymorphismus keine bedeutende Rolle bei der Genexpression von *IGF-IR* zu spielen scheint.
- Ein dritter bisher noch unbekannter Nukleotidaustausch G>A an Position c. 4802 (GI: 14752196; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ebenfalls im 3'-untranslatierten Bereich des *IGF-IR*-Gens. Die Variante, die im heterozygoten Zustand bei einem Kontrollkind identifiziert wurde, kam weder bei den Patienten und den restlichen Kontrollen, einschliesslich der Mutter des Kindes, noch bei den gesunden Kontrollen, jedoch bei dem Vater des Patienten vor. Da der Basenaustausch in der nicht-kodierenden Region des *IGF-IR*-Gens liegt und der einzige Betroffene ein Kontrollkind war, hat die Variante vermutlich keine Bedeutung für die Entwicklung von IUGR mit ARED-Flow. Vielmehr legen das Auftreten bei einem gesunden Elternteil (dem Vater des Kindes) und der fehlende Nachweis in den gesunden Kontrollfällen nahe, dass es sich um einen seltenen familiären Polymorphismus handelt.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten durch die molekulargenetische Analyse der Gene *IGF-I* und *IGF-IR* keine für die Entstehung von IUGR mit ARED-Flow relevanten Mutationen nachgewiesen werden. Die Begründung dafür besteht möglicherweise darin, dass auf der einen Seite die SSCP-Analyse eine relativ eingeschränkte Sensitivität aufweist, auf der anderen Seite die Anzahl der untersuchten Patienten begrenzt war. Auch wenn es nicht auszuschliessen ist, dass im Rahmen grösserer Studien solche Mutationen in einzelnen Fällen mit IUGR und ARED-Flow nachzuweisen sind, scheint es unwahrscheinlich, dass Sequenzveränderungen der Gene *IGF-I* und *IGF-IR* eine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung der Erkrankung haben.

Für die Zukunft wird es von grossem Interesse sein, Faktoren zu untersuchen, die mit dem *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* und dem *Insulin-like Growth Factor-I Receptor (IGF-IR)* interagieren und als Regulatoren ihrer Expression wirken (s. Kap. 2.4.3). Ein Beispiel dafür stellen die *IGF-Bindungsproteine (IGFBPs)* dar, die zusammen mit *IGF-I* und *IGF-IR* ein funktionelles System bilden. Darüber hinaus sollten Faktoren wie *IRS-1*, *IRS-2*, *MAP*, *PI-3* und *GRB2* untersucht werden, die für die biologische Wirkung des *IGF-I-Rezeptors* wichtig sind. Weitere Erkenntnisse über diese Faktoren werden wesentlich zu einem besseren Verständnis der molekularen Pathomechanismen beitragen, die über eine gestörte Plazentaentwicklung zu intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) mit ARED-Flow in der Dopplersonographie der A.umbilicalis führen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit sollte die Korrelation zwischen Mutationen in den Genen *IGF-I* und *IGF-IR* und intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) mit ARED-Flow in der Dopplersonographie der A.umbilicalis untersuchen.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Kollektiv aus 33 Probandinnen und deren 33 Kindern analysiert. Unterteilt wurde dieses in ein Patientenkollektiv mit IUGR und ARED-Flow an der Umbilikalarterie (19 Patientinnen und deren 19 Kinder), und ein Kontrollkollektiv mit IUGR und normalem Dopplerprofil der A.umbilicalis bei gleichzeitig pathologischem Dopplerbefund der A.uterina (Notch) (14 Patientinnen und deren 14 Kinder). Zur Berücksichtigung der Plazentamorphologie war eine pathoanatomische Aufarbeitung und histologische Einteilung der Plazenten durch die Arbeitsgruppe von Prof. P. Kaufmann im Institut für Anatomie der RWTH Aachen vorgenommen worden.

Die Vorgänge des Zellwachstums und der Proliferation und Angiogenese der Plazentazotten werden von verschiedenen Wachstumsfaktoren, insbesondere dem *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)*, gesteuert (27; 66; 75; 102; 160), der seine Wirkung über die Interaktion mit seinem spezifischen Rezeptor *IGF-IR* vermittelt (38; 78; 99; 159). Die reduzierte Aktivität des funktionellen *IGF-I*-Systems scheint mit einer eingeschränkten Proliferation des Zytotrophoblasten und einer mangelnden Zottenvaskularisierung einherzugehen, wobei die geschilderten morphologischen Veränderungen der Plazentazotten typisch für eine IUGR mit ARED-Flow sind (79; 80). Diese Erkenntnisse waren Ausgangspunkt für die vorliegende Studie, in der die Gene *IGF-I* und *IGF-IR* hinsichtlich möglicher pathogener Mutationen molekulargenetisch untersucht wurden.

Im *IGF-I*-Gen konnten bei dem untersuchten Gesamtkollektiv keine Mutationen identifiziert werden. Dagegen konnten im *IGF-IR*-Gen insgesamt fünf Polymorphismen nachgewiesen werden: drei bisher noch nicht beschriebene Sequenzveränderungen, davon eine (c. 726 C>A) im 5'- und zwei (c. 4270 C>T und c. 4802 G>A) im 3'-untranslatierten Bereich des *IGF-IR*-Gens, sowie zwei bekannte Varianten: eine stille Mutation (c. 3161 G>A; E1013E, [Glu1013Glu]) in Exon 16 (SNP ID: rs2229765) und eine Deletion (c. 4553_4554 delCT) in der 3'-untranslatierten Region des *IGF-IR*-Gens (SNP ID: rs3833015), die bereits in der Literatur beschrieben worden sind. Es ist denkbar, dass einige der identifizierten

Polymorphismen die *IGF-IR*-Genexpression beeinflussen, mögliche relevante Mechanismen sind aber zur Zeit nicht bekannt. Vielmehr legt der Befund, dass die meisten Varianten im untranslatierten Bereich des Gens liegen und dass sie in den meisten Fällen mit etwa gleicher Häufigkeit unter den Patienten und unter den gesunden Kontrollen auftraten, nahe, dass es sich um funktionell nicht-relevante Polymorphismen handelt, die keine entscheidende Rolle bei der Entstehung von IUGR mit ARED-Flow spielen.

Abschliessend lässt sich sagen, dass nach den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen keine krankheitsrelevanten Mutationen in den Genen *IGF-I* und *IGF-IR* identifiziert werden konnten. Dies kann einerseits auf die eingeschränkte Sensitivität der SSCP-Analyse als angewandtes „Prescreening“-Verfahren, andererseits auf die relativ begrenzte Fallzahl des untersuchten Kollektives zurückgeführt werden. Obwohl es möglich ist, dass bei einem grösseren Patientenkollektiv solche Mutationen nachweisbar sind, scheint es unwahrscheinlich, dass Veränderungen der Gensequenz von *IGF-I* und *IGF-IR* verantwortlich für die Entwicklung von IUGR mit ARED-Flow sind. In Zukunft sollten weitere Studien zu verschiedenen Faktoren, die in dem funktionellen *IGF-I*-System eingebunden sind oder dieses beeinflussen, zeigen, in welchem Umfang dieses System in die Ätiopathogenese der IUGR mit ARED-Flow involviert ist. Der daraus zu erwartende Erkenntnisgewinn könnte die Voraussetzungen für neue Möglichkeiten zur besseren prognostischen Abschätzung und Therapie der Erkrankung schaffen.

7 Literatur

1. Abbott AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM, Smith RJ (1992) Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem* 267: 10759-10763
2. Abu-Amero S, Price S, Wakeling E, Stanier P, Trembath R, Preece MA, Moore GE (1997) Lack of hemizyosity for the insulin-like growth factor I receptor gene in a quantitative study of 33 Silver-Russell Syndrome probands and their families. *Eur J Hum Genet* 5: 235-241
3. Abu-Amero SN, Ali Z, Bennett, Vaughan JI, Moore GE (1998) Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in term placentas: a comparison between normal and IUGR births. *Mol Reprod Dev* 49: 229-235
4. Abuzzahab M, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Smith R, Chernausek S (2003) IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and post-natal growth retardation. *N Engl J Med* 349: 2211-2222
5. Accili D, Nakae J, Kim JJ, Park BC, Rother KI (1999) Targeted gene mutations define the roles of insulin and IGF-I receptors in mouse embryonic development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 12(4): 475-485
6. Adamo ML, Koval A, LeRoith D, Roberts CTJr (1994) Posttranscriptional regulation of IGF-I gene expression. In: Baxter RC, Gluckman PD, Rosenfeld RG (eds) *The insulin-like growth factors and their regulatory proteins*. Elsevier, Amsterdam: 23-31
7. Alfirevic Z, Neilson JP (1995) Doppler ultrasonography in high-risk pregnancies. Systematic review with metaanalysis. *Am J Obstet Gynaecol* 172: 1379-1387
8. Alsat E, Guibourdenche J, Luton D, Frankenne F, Evain-Brion D (1997) Human placental growth hormone. *Am J Obstet Gynecol* 177(6): 1526-1534

9. Arabin B, Bergmann PL, Saling E (1987) Qualitative Analyse von Blutflußspektren uteroplazentarer Gefäße, der Nabelarterie, der fetalen Aorta und der fetalen A.carotis communis in normaler Schwangerschaft. *Ultraschall Klin Prax* 2: 114-119
10. Averbukh E, Weiss O, Halpert M, Yanko R, Moshe R, Nephesh I, Flyvbjerg A, Yanko L, Raz I (1998) Gene expression of insulin-like growth factor-I, its receptor and binding proteins in retina under hypoxic conditions. *Metabolism* 47(11): 1331-1336
11. Bach MA, Bondy CA (1992) Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 131: 2588-2594
12. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75: 73-82
13. Bangsow T, Male DA (1999) Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Gassen HG, Schimpf G (Hrsg) *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* 2.Aufl. Spektrum, Akad. Verl. , Heidelberg; Berlin 333-347
14. Barker DJD (1990) Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Br Med J* 301: 259-262
15. Beinder E (2002) Genetische Aspekte der Präeklampsie. In: Beckmann MW, Dall P, Fasching PA, Krüssel JS, Niederacher D, Tutschek B (Hrsg) *Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde, Diagnostik und Therapie*. Steinkopff Verlag Darmstadt 145
16. Bernischke K, Kaufmann P (1999) Classification of villous maldevelopment. In: *Pathology of the human placenta*. Springer Verlag New York 15: 437-460
17. Bewley S, Cooper D, Campbell S (1991) Doppler investigation of uteroplacental blood flow resistance in the second trimester: a screening study for preeclampsia and intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynecol* 98: 871-879
18. Boehm KD, Kelley MF, Ilan J (1989) Expression of insulin-like growth factors by the human placenta. In: Le Roith D, Raizada MK (eds) *Molecular and Cellular Biology of Insulin-Like Growth Factors and Their Receptors*. Plenum, New York: 179-193

19. Bonapace G, Concolino D, Formicola S, Strisciuglio P (2003) A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J Med Genet* 40: 913-917
20. Bondy CA, Werner H, Roberts CTJr, Le Roith D (1990) Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol Endocrinol* 4: 1386-1398
21. Brar HS (1982) Classification of intrauterine growth retardation. *Semin Perinatol Los Angeles: Grune & Stratton, Los Angeles* 12: 2-10
22. Brosens I, Dixon HG, Robertson WB (1977) Fetal growth retardation and the arteries of the placental bed. *Br J Obstet Gynaecol* 84: 656-663
23. Brosens I, Robertson WB, Dixon HG (1967) The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol* 67: 569
24. Burton GJ, Reshetnikova OS, Milovanov AP, Teleshova OV (1996) Stereological evaluation of vascular adaptations in human placental villi to differing forms of hypoxic stress. *Placenta* 17: 49-55
25. Campbell S, Bewley S, Cohen-Overbeek T (1987) Investigation of the uteroplacental circulation by Doppler ultrasound. *Semin Perinatol* 11: 362-368
26. Carlson DE (1988) Maternal diseases associated with intrauterine growth retardation. *Semin Perinatol* 12(1): 17-22
27. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM (2004) Aspects of human feto-placental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25: 103-113
28. Clark SL (1992) Patterns of intrauterine growth retardation: case examples. *Clin Obstet Gynecol* 35: 194-201
29. Cooke DW, Bankert LA, Roberts CTJr, Le Roith D, Casella SJ (1991) Analysis of the human type I insulin-like growth factor receptor promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 1113-1120

30. Cotran RS, Kumar V, Collins T (1999) Tissue repair: cellular growth, fibrosis, and wound healing: Control of normal cell growth. In: Robbins pathologic basis of disease. WB Saunders Company 6(4): 89-98
31. Crawford RAF, Hills FA, Farkas A, Chard T (1995) Elevated levels of insulin-like growth factor binding protein-1 in fetal distress. *Br J Obstet Gynaecol* 102: 538-540
32. Crombach G, Tandü-Umba B (2001) Intrauterine Wachstumsretardierung. *Gynäkologie* 34: 42-54
33. Crum CP (1999) Gestational and placental disorders. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T (eds) Robbins pathologic basis of disease. WB Saunders Company 6(24): 1079-1091
34. Cutfield WS, Hofman PL, Vickers M, Breier B, Blum WF, Robinson EM (2002) IGFs and binding proteins in short children with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 235-239
35. D'Ercole AJ (1991) The insulin-like growth factors and fetal growth. In: Spencer EM (eds) Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors. New York: Elsevier 9-23
36. D'Ercole AJ, Hill DJ, Strain AJ, Underwood LE (1986) Tissue and plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I concentrations in the human fetus during the first half of gestation. *Pediatr Res* 20: 253-255
37. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WDJr, van den Brande LJ, van Wyk JJ (1972) Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235: 107
38. De Pablo F, Scott LA, Roth J (1990) Insulin and insulin-like growth factor I in early development: peptides, receptors and biological events. *Endocr Rev* 11: 558-577
39. DeVore GR (1988) Examination of the fetal heart in the fetus with intrauterine growth retardation using M-Mode echocardiography. *Semin Perinatol* 12/1: 66-79
40. Dey BR, Furlanetto RW, Nissley SP (1998) Cloning of human p55-gamma, a regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, by a yeast two-hybrid library screen with the insulin-like growth factor-I receptor. *Gene* 209: 175-183

41. Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider KTM, Weiss J (2000) Gynäkologie und Geburtshilfe. Springer Verlag Berlin Heidelberg 126-256
42. Divon MY, Guidetti DA, Braverman JJ (1988) Intrauterine growth retardation: a prospective study of the diagnostic value of real-time sonography combined with umbilical artery flow velocimetry. *Obstet Gynaecol* 72: 611-614
43. Droste S (1992) Fetal growth in aneuploid conditions. *Clin Obstet Gynecol* 35(1): 119-125
44. Ducos B, Cabrol S, Houang M, Perin L, Holzenberger M, Bouc YL (2001) IGF type I receptor ligand binding characteristics are altered in a subgroup of children with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5516-5524
45. Dürig P (1997) Schwere Komplikationen der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen. *Gynäkologe* 30: 702-711
46. Eggermann T, Nöthen MM, Propping P, Schwanitz G (1993) Molecular diagnosis of trisomy 18 using DNA recovered from paraffin embedded tissues and possible implications for genetic counseling. *Ann Genet* 36: 214-216
47. Elgin RG, Busby WHJr, Clemmons DR (1987) An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3254-3258
48. Evain-Brion D (1999) Maternal endocrine adaptations to placental hormones in humans. *Acta Paediatr* 428: 12-16
49. Faivre L, Gosset P, Cormier-Daire V, Odent S, Amiel J, Giurgea I, Nassogne MC, Pasquier L, Munnich A, Romana S, Prieur M, Vekemans M, DeBlois MC, Turleau C (2002) Overgrowth and trisomy 15q26.1-qter including the IGF1 receptor gene: report of two families and review of the literature. *Eur J Hum Genet* 10(11): 699-706
50. Fant M, Munro H, Moses AC (1986) An autocrine/ paracrine role for insulin-like growth factors in the regulation of human placental growth. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 499-505

51. Fleischer A, Schulman H, Farmakides G, Bracero L, Grunfeld L, Rochelson B, Koenigsberg M (1986) Uterine artery Doppler velocimetry in pregnant women with hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 154: 806-813
52. Fox H (1964) The villous cytotrophoblast as an index of placental ischemia. *J Obstet Gynecol Br Commonw* 71: 885-893
53. Francke U, Yang-Feng TL, Brissenden JE, Ullrich A (1986) Chromosomal mapping of genes involved in growth control. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 855-866
54. Gallagher BW, Oliver MH, Elchhorn K, Kessler U, Kiess W (1994) *Eur J Endocrinol* 131: 398-404
55. Gardosi J, Chang A, Kalyan B, Sahota D, Symonds EM (1992) Customised antenatal growth charts. *Lancet* 339: 283-287
56. Ghezzi F, Tibiletti MG, Raio L, Di Naro E, Lischetti B, Taborelli M, Franchi M (2003) Idiopathic fetal intrauterine growth restriction: a possible inheritance pattern. *Prenat Diadn* 23: 259-264
57. Giles WB, Trudinger BJ, Cook CM (1982) Fetal umbilical artery velocity waveforms. *J Ultrasound Med* 1: 98
58. Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins in term and preterm human fetus and neonates with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 80(5): 1548-1555
59. Goldenberg RL, Cliver SP (1997) Small for gestational age and intrauterine growth restriction: definitions and standards. *Clin Obstet Gynaecol* 40: 704-714
60. Gortner L, van Husen M, Landmann E (2001) Die Entwicklung des im Wachstum retardierten Neugeborenen. *Gynäkologe* 34: 1153-1159

61. Han VKM, Lund PK, Lee DC, D'Ercole AJ (1988) Expression of somatomedin/ insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in the human fetus: Identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 499-505
62. Han VKM, Matsell DG, Delhanty PJD, Hill DJ, Shimasaki S, Nygard K (1996) IGF-binding protein mRNAs in the human fetus: tissue and cellular distribution of developmental expression. *Horm Res* 45: 160-166
63. Hayashi K (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1:34-38
64. Hill DJ, Clemmons DR, Riley SC, Bassett N, Challis JRF (1993) Immunohistochemical localization of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins-1, -2 and -3 in human placenta and fetal membranes. *Placenta* 14: 1-12
65. Hills F, Crawford R, Harding S, Farkas A, Chard T (1994) The effects of labor on maternal and fetal levels of insulin-like growth factor binding protein-1. *Am J Obstet Gynecol* 171: 1292-1295
66. Hills FA, Elder MG, Chard T, Sullivan MH (2004) Regulation of human villous trophoblast by insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding protein-1. *J Endocrinol* 183(3): 487-496
67. Hitschold T, Weiss E, Beck T, Huntefering H, Berle P (1993) Low target birth weight or growth retardation? Umbilical Doppler velocity wave forms and histometric analysis of fetoplacental vascular tree. *Am J Obstet Gynecol* 168: 1260-1264
68. Holmes RP, Holly JMP, Soothill PW (1998) Aprospective study of maternal serum IGF-I in pregnancies with appropriately grown or growth restricted fetuses. *Br J Obstet Gynecol* 105: 1273-1278
69. Jackson MR, Walsh N, Morraw W, Mullen JB, Lye SJ, Ritchie JW (1995) Reduced placental villous tree elaboration in small-for-gestational-age pregnancies: relationship with umbilical Doppler wave forms. *Am J Obstet Gynecol* 172: 518-525

70. Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH (1996) Histologie (Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen). Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 4: 605-619
71. Kajimoto Y, Umayahara Y (1998) AP-1-like motif as a key role to understanding the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene regulation. *Endocr J* 45: 1-12
72. Karsdorp VH, van Vugt JM, van Geijn HP, Kostense PJ, Arduini D, Montenegro N, Todros T (1994) Clinical significance of absent or reversed enddiastolic velocity waveforms in umbilical artery. *Lancet* 344: 1664-1668
73. Kaufmann P, Luckhardt M, Leiser R (1988) Three dimensional representation of the fetal vessel system in the human placenta. *Trophoblast Res* 3: 113-137
74. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 25: 114-126
75. Kawano Y, Nakamura S, Fukuda J, Miyakawa I (2004) The effect of insulin-like growth factor-I on production of vascular endothelial growth factor by amnion-derived (WISH) cells. *Growth Horm IGF Res* 14(5): 376-381
76. Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, Kinoshita T, Hanaki K, Nagaishi J, Ohtsuka Y, Hisatome I, Ninomoya H, Nanba E, Fukushima T, Takahashi Si (2005) Mutation at cleavage site of IGF receptor in a short stature child born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocr Metab* 90(8): 4679-4687
77. Kiess W (1999) Störungen des Wachstums. In: Kruse K (Hrsg) Pädiatrische Endokrinologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York 2(6): 227-270
78. Kiess W, Kessler U, Schmitt S, Funk B (1993) GH and IGF-I: basic aspects. In: Flyvbjerg A, Orskov H, Alberi KGMM. GH and IGF-1 in Human and Experimental Diabetes: Basic and Clinical Aspects. John Wiley, Chichester
79. Kingdom JC, Kaufmann P (1997) Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 18: 613-626

80. Kingdom JC, Kaufmann P (1999) Oxygen and placental vascular development. *Adv Exp Med Biol* 474: 259-275
81. Klauwer D, Blum WF, Hanitsch S, Rascher W, Lee PD, Kiess W (1997) IGF-I, IGF-II, free IGF-I and IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 levels in venous cord blood: relationship to birthweight, length and gestational age in healthy newborns. *Acta Paediatr* 86(8): 826-833
82. Kurjak A (1992) Antepartum and intrapartum management of the growth-retarded fetus. *Clin Obstet Gynaecol* 35/1: 185-193
83. Lamson G, Giudice LC, Rosenfeld RG (1991) IGF binding proteins: structural and molecular relationships. *Growth Factors* 5: 19-28
84. Larsen T, Petersen S, Greisen G (1992) Detection of small-for-gestational-age fetuses by ultrasound screening in a high risk population: a randomized controlled study. *Br J Obstet Gynaecol* 99: 469-474
85. Lassarre C, Hardouin S, Daffos F, Forestier F, Frankenne F, Binoux M (1991) Serum insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 29: 219-225
86. Law CM (1993) Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. *Br Med J* 306: 24-27
87. Li CH, Yamashiro D, Gospodarowicz D, Kaplan SL, VanVliet G (1983) Total synthesis of insulin-like growth factor I (somatomedin C). *Proc Nat Acad Sci* 80: 2216-2220
88. Lindhard A, Nielsen PV, Mouritsen LA, Zachariassen A, Sørensen HU, Rosenö H (1990) The implications of introducing the symphyseal-fundal height-measurement. A prospective randomized controlled trial. *Br J Obstet Gynaecol* 97: 675-680
89. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Mice carrying null mutations of the gene encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59-72

90. Lowe WI, Roberts CTJr, Lasky SRJr, Le Roith D (1987) Differential expression of alternative 5'untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8946-8950
91. Macara LM, Kingdom JCP, Kaufmann P, Kohnen G, Hair J, More IAR, Lyall F, Greer IA (1996) Structural analysis of placental terminal villi from growth-restrictive pregnancy with abnormal umbilical doppler wave forms. *Placenta* 17: 37-48
92. Merz E (2002) *Sonographische Diagnostik in Gynäkologie und Geburtshilfe: Lehrbuch und Atlas, Bd 2 Geburtshilfe*. Thieme, Stuttgart; New York 2: 469-515
93. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 16: 1215
94. Mirlesse V, Frankenne F, Alsat E, Poncelet M, Hennen G, Evain-Brion D (1993) Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 34(4): 439-442
95. Montenegro N, Santos F, Tavares E, Matias A, Barros H, Leite LP (1998) Outcome of 88 pregnancies with absent or reversed end-diastolic blood flow (ARED-flow) in the umbilical arteries. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 79: 43-46
96. Morton C, Rall L, Bell G, Shows T (1985) Human insulin-like growth factor-1 (IGF1) is encoded at 12q22-q24.1, and insulin-like growth factor-2 (IGF2) is at 11p15. *Cytogenet Cell Genet* 40: 703
97. Morton CC, Byers MG, Nakai H, Bell GI, Shows TB (1986) Human genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor are located on 12q22-q24.1, 11p15, and 4q25-q27, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 41: 245-249
98. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
99. Nissley SP, Lopeszinsky W (1991) IGF receptors. *Growth Factors* 5: 29-43

100. Oh Y, Müller HL, Neely EK, Lamson G, Rosenfeld RG (1993) New concepts on IGF receptor physiology. *Growth Regul* 3: 113-123
101. Ohlsson R (1989) Growth factors, protooncogenes and human placental development. *Cell Differ Dev* 28: 1-16
102. Ohlsson R, Holmgren L, Glaser A, Szpecht A, Pfeifer-Ohlsson S (1989) Insulin-like growth factor 2 and short range stimulatory loops in control of human placental growth. *EMBO J* 8: 1993-1999
103. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770
104. Oskerby JC, Gadd TS, Wathes DC (1999) Expression of insulin-like growth factor binding protein I (IGFBP-1) mRNA in the ovine uterus throughout the oestrus cycle and early pregnancy. *J Endocrinol* 162: 279-287
105. Pessin JE (1994) Transmembrane signaling properties of the insulin and IGF-I tyrosine kinase receptors. In: Baxter RC, Gluckman PD, Rosenfeld RG (eds) *The insulin-like growth factors and their regulatory proteins*. Elsevier, Amsterdam: 87-94
106. Poduslo SE, Dean M, Kolch U, O'Brien SJ (1991) Detecting high-resolution polymorphisms in human coding loci by combining PCR and single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Am J Hum Genet* 49: 106-111
107. Pollack RN, Divon MY (1992) Intrauterine growth retardation: definition, classification and etiology. *Clin Obstet Gynaecol* 35: 99-107
108. Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA (1993) IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* 7: 2609-2617
109. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) A system of rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341

110. Pryor J (1996) The identification and longterm effects of fetal growth restriction. *Br J Obstet Gynecol* 103: 1116-1122
111. Punglia RS, Lu M, Hsu J, Kuroki M, Tolentino MJ, Keough K, Levy AP, Levy NS, Goldberg MA, D'Amato RJ, Adamis AP (1997) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I. *Diabetes* 46(10): 1619-1626
112. Putney DJ, Pepe GJ, Albrecht ED (1991) Influence of the fetus and estrogen on serum concentrations and placental formation of insulin-like growth factor I during baboon pregnancy. *Endocrinology* 127: 2400-2407
113. Rao VB (1994) Direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Anal. Biochem* 216: 1-14
114. Rasmussen K, Lautier C, Hansen L, Echwald SM, Hansen T, Ekstrom CT, Urhammer SA, Borch-Johnsen K, Grigorescu F, Smith RJ, Pedersen O (2000) Studies of the variability of the genes encoding the insulin-like growth factor I receptor and its ligand in relation to type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1606-1610
115. Rath W (1997) Die Behandlung hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen – allgemeine Massnahmen und orale Langzeittherapie. *Z Geburtsh Neonatol* 201: 240-246
116. Rath W (1998) Mütterliche Erkrankungen – Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft (HES). In: Martius G, Rath W. *Geburtshilfe und Perinatologie. Praxis der Frauenheilkunde Bd 2*, Georg Thieme Verlag 2: 246-263
117. Rath W, Heilmann L, Faridi A, Wacker J, Knockenbusch W. Leitlinien für Diagnostik und Therapie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe AWMF-Leitlinien Register Nr. 015/018
118. Read LC, Howarth GS, Steeb CB, Lemmey AB (1994) In vivo effects of IGF-I on gut growth and function. In: Baxter RC, Gluckman PD, Rosenfeld RG (eds) *The insulin-like growth factors and their regulatory proteins*. Elsevier, Amsterdam: 409-416
119. Retzke U, Graf H (1994) The new terminology and classification of hypertensive diseases in pregnancy. *Zentralbl Gynaekol* 116: 61-63

120. Rinderknecht E, Humbel RE (1978) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776
121. Ritvos O, Ranta T, Jalkanen J, Suikkari AM, Voutilainen R, Bohn H, Rutanen EM (1988) Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 122(5): 2150-2157
122. Roback EW, Barakat AJ, Dev VG, Mbikay M, Chretien M, Butler MG (1991) An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15(q26.1-qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene. *Am J Med Genet* 38: 74-79
123. Rosenfeld RG (2003) Insulin-like growth factors and the basis of growth. *New Eng J Med* 349: 2184-2186
124. Rotwein P (1986) Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. *Proc Nat Acad Sci* 83: 77-81
125. Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG (1986) Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene: alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem* 261: 4828-4832
126. Rotwein P, Thomas MJ, Gronowski AM, Bichell DP, Kikuchi K (1994) The somatomedin hypothesis revisited: early events in growth hormone action. In: Baxter RC, Gluckman PD, Rosenfeld RG (eds) *The insulin-like growth factors and their regulatory proteins*. Elsevier, Amsterdam: 13-21
127. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Scienc* 239: 487-491
128. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1997) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467

129. Sarmandal P (1990) Effectiveness of ultrasound determination of fetal abdominal circumference and fetal ponderal index in the diagnosis of asymmetrical growth retardation. *Br J Obstet Gynecol* 97: 118-123
130. Schaffer H, Lassmann R, Staudach A, Steiner H (1989) Aussagewert qualitativer Doppler-Untersuchungen in der Schwangerschaft. *Ultraschall Klin Prax* 4: 8-15
131. Schneider H, Schneider KTM (1999) Intrauterine Wachstumsretardierung. In: Schneider H, Husslein P, Schneider KTM (Hrsg) *Geburtshilfe*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio 27: 511-538
132. Schneider KTM (1993) IUGR-Probleme der Diagnostik. In: Schmidt W (Hrsg) *Jahrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe 1992/93*. Biermann, Zülpich 113-123
133. Secher NJ, Lundbye-Christensen S, Qvist I, Bagger P (1991) An evaluation of clinical estimation of fetal weight and symphysis fundal distance for detection of SGA infants. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 38: 91-96
134. Shaikh S, Bloomfield FH, Bauer MK, Phua HH, Gilmour RS, Harding JE (2005) Amniotic IGF-I supplementation of growth-restricted fetal sheep alters IGF-I and IGF receptor type 1 mRNA and protein levels in placental and fetal tissues. *J Endocrinol* 186(1): 145-155
135. Shambarugh G, Cglick R, Radosevich J, Unterman T (1993) Insulin-like growth factor-I and binding protein-1 can modulate fetal brain cell growth during maternal starvation. *Ann NY Acad Sci* 692: 270-272
136. Sheikh S, Satoskar P, Bhartiya D (2001) Expression of insulin-like growth factor-I and placental growth hormone mRNA in placentae: a comparison between normal and intrauterine growth retardation pregnancies. *Mol Hum Reprod* 7(3): 287-292
137. Smith LM, Sanders SZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SBH, Hood LE (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321: 674-679

138. Soothill PW, Campbell S (1993) Prediction of morbidity in small and normally grown fetuses by fetal heart rate variability, biophysical profile score and umbilical artery Doppler studies. *Br J Obstet Gynaecol* 100: 742-745
139. Sorem KA, Siler-Khodr TM (1998) Placental IGF-I in Severe Intrauterine Growth Retardation. *The Journal of Maternal-Fetal Medicine* 7: 1-7
140. Speer CP (2004) Neonatologie. In: Koletzko B, von Harnack GA. *Kinderheilkunde und Jugendmedizin*. Springer Verlag Berlin Heidelberg 12: 49-116
141. Spinillo A, Capuzzo E, Piazzì G, Baltaro F, Stronati M, Ometto A (1997) Significance of low birthweight for gestational age among very preterm infants. *Br J Obstet Gynaecol* 104: 668-673
142. Standardkommission der Arbeitsgemeinschaft Doppler-Sonographie und materno-fetale Medizin (AGDMFM) (1996) Standards in der Perinatalmedizin-Dopplersonographie in der Schwangerschaft. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 56: 69-73
143. Steiner H, Schneider KTM (2000) *Dopplersonographie in Geburtshilfe und Gynäkologie: Leitfaden für die Praxis*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 3-166
144. Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T (1990) Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 5: 1037-1043
145. Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, Carland G, Faessen GH, Suen LF, Irwin JC, Powell DR, Giaccia AJ, Giudice LC (1998) Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: A possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10188-10193
146. Thornton JG, Onwude JL (1991) Preeclampsia: Discordance among identical twins. *Br Med J* 303: 1241-1242

147. Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Monthouel-Kartmann MN, van Obberghen E (2005) Regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and expression of HIF hydroxylases in response to insulin-like growth factor I. *Mol Endocrinol* 19(5): 1304-1317
148. Trudinger BJ (1987) The umbilical circulation. *Semin Perinatol* 11: 311-321
149. Trudinger BJ, Giles WB, Cook CM (1985) Flow velocity waveforms in the maternal uteroplacental and fetal umbilical placental circulations. *Am J Obstet Gynaecol* 152: 15
150. Trudinger BJ, Giles WB, Cook CM (1985) Uteroplacental blood flow velocity-time waveforms in normal and complicated pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 92: 39-45
151. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, Jacobs S, Francke U, Ramachandran J, Fujita-Yamaguchi Y (1986) Insulin-like growth factor I receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5: 2503-2512
152. Voigt M, Schneider KTM, Jährig K (1997) Analyse des Geburtsgutes des Jahrgangs 1992 der Bundesrepublik Deutschland Teil 2: Mehrdimensionale Zusammenhänge zwischen Alter, Körpergewicht und Körperhöhe der Mutter und dem Geburtsgewicht. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 57: 246-255
153. Wang CY, Daimon M, Shen SJ, Engelmann GL, Ilan J (1988) Insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid in the developing human placenta and in term placenta of diabetics. *Mol Endocrinol* 2: 217-229
154. Winick M (1971) Cellular changes during placental and fetal growth. *Am J Obstet Gynaecol* 109: 166-176
155. Wladimiroff JW (1991) A review of the etiology, diagnostic techniques and management of IUGR, and the clinical application of Doppler in the assessment of placental blood flow. *J Perinat Med* 19: 11-13
156. Wollmann HA (1998) Intrauterine Wachstumsretardierung. *Monatsschrift Kinderheilkd* 146: 714-726

-
157. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ (1996) Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335: 1363-1367
 158. Yang-Feng TL, Brissenden JE, Ullrich A, Francke U (1985) Sub-regional localization of human genes for insulin-like growth factors I (IGF1) and II (IGF2) by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 40: 782
 159. Zhu J, Kahn CR (1997) Analysis of a peptide hormone receptor interaction in the yeast two-hybrid system. *Proc Nat Acad Sci* 94: 13063-13068
 160. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110: 10-18

8 Anhang

8.1 Übersicht des Probandenkollektives

8.1.1 Patientenkollektiv

PATIENTEN- NUMMER	GESCHLECHT	PATHOLOGIE	BEGLEITPATHOLOGIE
1.	weiblich	----	----
2.	männlich	IUGR/ARED	----
3.	weiblich	----	PE/HELLP
4.	weiblich	IUGR/ARED	----
5.	weiblich	----	PE/HELLP
6.	weiblich	IUGR/ARED	----
7.	weiblich	----	PE
8.	männlich	IUGR/ARED	----
9.	weiblich	----	PE
10.	männlich	IUGR/ARED	----
11.	weiblich	----	PE
12.	weiblich	IUGR/ARED	----
13.	weiblich	----	PE
14.	männlich	IUGR/ARED	----
15.	weiblich	----	PE/HELLP
16.	weiblich	IUGR/ARED	----
17.	weiblich	----	PE/HELLP
18.	weiblich	IUGR/ARED	----
19.	weiblich	----	PE/HELLP
20.	weiblich	IUGR/ARED	----
21.	weiblich	----	----
22.	weiblich	IUGR/ARED	----
23.	weiblich	----	PE
24.	männlich	IUGR/ARED	----
25.	weiblich	----	PE/HELLP
26.	weiblich	IUGR/ARED	----
27.	weiblich	----	----
28.	weiblich	IUGR/ARED	----
29.	weiblich	----	----
30.	männlich	IUGR/ARED	----
31.	weiblich	----	PE/HELLP
32.	weiblich	IUGR/ARED	----
33.	weiblich	----	----
34.	o.A.	IUGR/ARED	----
35.	weiblich	----	PE/HELLP
36.	männlich	IUGR/ARED	----
37.	weiblich	----	PE/HELLP
38.	weiblich	IUGR/ARED	----

Anmerkung: Es ist jeweils eine Mutter gefolgt von dem ihr zugehörigen Kind dargestellt. Die einzelnen Mutter-Kind-Paare lassen sich durch die abwechselnde Schwarz-Grau-Abfolge voneinander abgrenzen (ungerade Patienten-Nummern: Mütter; gerade Patienten-Nummern: Kinder; o.A.: ohne Angabe)

8.1.2 Kontrollkollektiv

PATIENTEN- NUMMER	GESCHLECHT	PATHOLOGIE	BEGLEITPATHOLOGIE
47.	weiblich	Notch	PE/HELLP
48.	o.A.	IUGR	----
49.	weiblich	Notch	----
50.	o.A.	IUGR	----
51.	weiblich	Notch	----
52.	o.A.	IUGR	----
53.	weiblich	Notch	----
54.	o.A.	IUGR	----
55.	weiblich	Notch	----
56.	o.A.	IUGR	----
57.	weiblich	Notch	PE
58.	o.A.	IUGR	----
59.	weiblich	Notch	PE
60.	o.A.	IUGR	----
61.	weiblich	Notch	PE/HELLP
62.	o.A.	IUGR	----
63.	weiblich	Notch	PE/HELLP
64.	o.A.	IUGR	----
65.	weiblich	Notch	PE
66.	o.A.	IUGR	----
67.	weiblich	Notch	----
68.	o.A.	IUGR	----
69.	weiblich	Notch	PE/HELLP
70.	o.A.	IUGR	----
71.	weiblich	Notch	PE/HELLP
72.	o.A.	IUGR	----
73.	weiblich	Notch	PE/HELLP
74.	o.A.	IUGR	----

Anmerkung: Es ist jeweils eine Mutter gefolgt von dem ihr zugehörigen Kind dargestellt. Die einzelnen Mutter-Kind-Paare lassen sich durch die abwechselnde Schwarz-Grau-Abfolge voneinander abgrenzen (ungerade Patienten-Nummern: Mütter; gerade Patienten-Nummern: Kinder; o.A.: ohne Angabe)

8.2 Primer-Sequenzen für das *IGF-I*-Gen und das *IGF-IR*-Gen

	<i>Forward-Primer</i>	<i>Reverse-Primer</i>	Prod. Gr. (bp)	TA (°C)
<i>IGF-I-</i>				
<i>Ex.1</i>	*5'-TGCTAAATTCAGAGCAGATAGA-3'	*5'-GAATTCCTCAATGACTTCAAAG-3'	246	55
<i>Ex.2</i>	*5'-TGGGAGTCAATGCACTTCTGT-3'	*5'-AGAGCTGTACACTTTAGACTT-3'	296	55
<i>Ex.3</i>	*5'-GGAAGACTGAAGAAAGCAGAT-3'	*5'-GATCCCACCCAGGTGGGCTTA-3'	254	55
<i>Ex.4</i>	*5'-GAACCACTTGTCTCAATGCAA-3'	*5'-TGCTGTCTGCTCCTCTCTCAT-3'	285	55
<i>Ex.5</i>	*5'-GTTGAGGCCCAATGTTAGAA-3'	*5'-CTTATTTTTTGGTAGGTGTTC-3'	236	53
<i>IGF-IR-</i>				
<i>5'-UTR1</i>	5'-GAAAAAACCCGAGGAGGAGCGAGC-3'	5'-TCGCTGAAGGTCACAGCCGAGGCGA-3'	201	60
<i>5'-UTR2</i>	5'-TCGCCTCGGCTGTGACCTTCAGCGA-3'	5'-CGGAGTCAAAATGAATGAGCGGCTC-3'	309	55
<i>5'-UTR3</i>	5'-GAGCCGCTCATTCATTTGACTCCG-3'	5'-TGTCGGCGTCGTCGGCCTCCATTTT-3'	254	50
<i>5'-UTR4</i>	5'-AAAATGGAGGCCGACGACGCCGACA-3'	5'-CCCTCCTCCGAGCCAGACTTCAT-3'	318	57
<i>Ex.1</i>	5'-ATGAAGTCTGGCTCCGAGGAGGG-3'	*5'-ACAGCTGCGACGGTGGCAA-3'	191	60
<i>Ex.2.1</i>	*5'-CTGAGACGTTTACCCTCTTGT-3'	*5'-GCTCTCGAGGCCAGCCACT-3'	222	60
<i>Ex.2.2</i>	*5'-TCCCCAAGCTCACGGTCATT-3'	*5'-CCCCACAATGTAGTTATTGGA-3'	290	55
<i>Ex.2.3</i>	5'-ATCAGGATTGAGAAAAATGCT-3'	5'-GGCAGAGAGAAAGCAGCAGTCA-3'	254	53
<i>Ex.3.1</i>	*5'-GTGAATGACCCAGAAGGATG-3'	*5'-CCCTCAAACCTGTAGGTGTT-3'	268	60
<i>Ex.3.2</i>	*5'-GTGTAGCTTGCCGCACTA-3'	*5'-GTCTACCTTTGTGTGCTAGG-3'	282	60
<i>Ex.4</i>	*5'-AGAAGACAGACTCAATTATGTG-3'	5'-CGGGAGCATGAAAAGCATCA-3'	274	55
<i>Ex.5</i>	*5'-TACACCAAGTGAGCACACA-3'	5'-GTAATAGAACGTCAGCTCATG-3'	224	55
<i>Ex.6</i>	5'-TGCCTAACATCGATTCTG-3'	*5'-CGGTGTTTTGGATGCTGTCA-3'	268	60

Ex.7	*5'-TGCTTTTCAGAGACACATG-3'	*5'-CCTGTCAACAGAATGGCAT-3'	221	55
Ex.8	5'-CCCGAACTTCTCTGAACTT-3'	5'-GCTTGCGAAGAAGTGTGGATG-3'	319	60
Ex.9	*5'-GCCAGAGTATCTGATAGCCTGAC-3'	*5'-TCCGTCCAGGCCGCTGCT-3'	267	60
Ex.10	*5'-CGGCTTTCATTCCCACTCTT-3'	*5'-TGCCAACCTGAAATTCACAT-3'	281	60
Ex.11	*5'-AAAGCCACATTTCTCTCCTCCTT-3'	*5'-AATGGGGCCAGCTGGATCAT-3'	338	60
Ex.12	5'-GTCACCTGTTTAAATTGTAC-3'	*5'-ATGGAAGTACATGCAGGCA-3'	204	56
Ex.13	*5'-TGACATGTATGTTTTATTTC-3'	5'-GTTTTACCACGTTTCTTCTC-3'	231	55
Ex.14	*5'-GTATGATGGGGAGTAAACGAA-3'	*5'-CATCAAACCACTCAGCCACA-3'	275	60
Ex.15	5'-TGTTGTAGCGAAGATGAAAGTA-3'	*5'-CAAATAATGCAAACCTCCTT-3'	253	55
Ex.16	*5'-TGCTTTAATTACGGTTTCTTC-3'	*5'-GCTTTTCAGGAACCTTCTCTT-3'	287	60
Ex.17	5'-TGACCCTCTGAGTCTTTCT-3'	*5'-CCGGTGAAAATGAAAACCTG-3'	169	55
Ex.18	*5'-AAATCCAAAATTCTCATGTGAAT-3'	*5'-GCCCAGACCTGGAAAGCTA-3'	230	58
Ex.19	*5'-GTGCTGCTCCAGCGTGT-3'	*5'-CTAGAGACTGAGCTGGTGGAA-3'	247	60
Ex.20	*5'-TTCAGTCCATCCCTTTCCAA-3'	*5'-CCTAATCTCCTGTGACCCAA-3'	262	60
Ex.21.1	*5'-CTCCCGTGTGTCTTGGCTGC-3'	*5'-GCCTTGTGTCTCTGAGTGTCT-3'	273	60
Ex.21.2	5'-ACTGCCCGACAGACACTCAGGACA-3'	5'-GTAAAACTCTCTCTCCCCCCCCAC-3'	237	62
3'-UTR1	5'-TCCTTGATCCTGAATCTGTGCAAACAG-3'	5'-GTGAGGACACTGGTTCTCAAGTGTCT-3'	298	57
3'-UTR2	5'-ACCTTAATGACAACACTTAATAGCAAC-3'	5'-TAACAGCCTTGATGAACGATGGCCCT-3'	320	60
3'-UTR3	5'-CACCTTCTAGGGACATGAAATTTAC-3'	5'-GCCGGTTCAGCTTCTCCCCACCTTCA-3'	331	63

*Rasmussen et al. 2000

Für die *IGF-IR-5'*-untranslatierte Region (*IGF-IR-5'-UTR*) und die *IGF-IR-3'*-untranslatierte Region (*IGF-IR-3'-UTR*) sowie in den Fällen, wo eine Amplifikation mit den bekannten Primern nicht möglich war, wurden anhand der veröffentlichten DNA-Sequenz (Abbott et al. 1992; Ullrich et al. 1986; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) eigene Primer konstruiert.

8.3 Übersicht der Ergebnisse aus der Mutationsanalyse in dem *IGF-IR*-Gen

8.3.1 Patientenkollektiv

Pat.- Nr.	<i>IGFIR-5'-UTR1</i> (C.726 C>A) (GI: 184837)	<i>IGFIR-Ex.16</i> (C.3161 G>A) (GI: 14752196)	<i>IGFIR-3'-UTR1</i> (C.4270 C>T) (GI: 14752196)	<i>IGFIR-3'-UTR2</i> (C.4553_4554 delCT) (GI: 14752196)	<i>IGFIR-3'-UTR3</i> (C.4802 G>A) (GI: 14752196)
1.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
2.	C/C	A/A	C/C	CT/CT	G/G
3.	C/C	A/A	C/C	CT/delCT	G/G
4.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
5.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
6.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
7.	C/C	G/G	C/C	CT/delCT	G/G
8.	C/C	G/G	C/C	delCT/delCT	G/G
9.	C/A	G/A	C/C	CT/CT	G/G
10.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
11.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
12.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
13.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
14.	C/C	A/A	C/C	delCT/delCT	G/G
15.	C/C	A/A	C/C	CT/delCT	G/G
16.	C/C	A/A	C/C	CT/delCT	G/G
17.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
18.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
19.	C/C	G/G	C/T	CT/CT	G/G
20.	C/C	G/G	C/T	CT/CT	G/G
21.	C/C	A/A	C/C	delCT/delCT	G/G
22.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
23.	C/C	G/G	C/C	CT/delCT	G/G
24.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
25.	C/C	A/A	C/C	CT/delCT	G/G
26.	C/C	A/A	C/C	CT/delCT	G/G
27.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
28.	C/C	A/A	C/C	CT/CT	G/G
29.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
30.	C/C	A/A	C/C	CT/CT	G/G
31.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
32.	C/C	A/A	C/C	CT/CT	G/G
33.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
34.	C/C	G/A	C/C	delCT/delCT	G/G
35.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
36.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
37.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
38.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G

Anmerkung: Es ist jeweils eine Mutter gefolgt von dem ihr zugehörigen Kind dargestellt. Die einzelnen Mutter-Kind-Paare lassen sich durch die abwechselnde Schwarz-Grau-Abfolge voneinander abgrenzen (ungerade Patienten-Nummern: Mütter; gerade Patienten-Nummern: Kinder; o.A.: ohne Angabe)

8.3.2 Kontrollkollektiv

Pat.- Nr.	<i>IGFIR-5'-UTR1</i> (C.726 C>A) (GI: 184837)	<i>IGFIR-Ex.16</i> (C.3161 G>A) (GI: 14752196)	<i>IGFIR-3'-UTR1</i> (C.4270 C>T) (GI: 14752196)	<i>IGFIR-3'-UTR2</i> (C.4553_4554 delCT) (GI: 14752196)	<i>IGFIR-3'-UTR3</i> (C.4802 G>A) (GI: 14752196)
47.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
48.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/A
49.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
50.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
51.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
52.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
53.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
54.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
55.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
56.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
57.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
58.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
59.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
60.	C/C	G/G	C/T	CT/CT	G/G
61.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
62..	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
63.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
64.	C/C	G/G	C/C	CT/delCT	G/G
65.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
66.	C/C	G/G	C/C	CT/delCT	G/G
67.	C/C	G/A	C/C	CT/CT	G/G
68.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G
69.	C/A	G/G	C/C	CT/CT	G/G
70.	C/A	G/G	C/C	CT/delCT	G/G
71.	C/C	G/A	C/C	CT/delCT	G/G
72.	C/C	A/A	C/C	delCT/delCT	G/G
73.	C/C	G/G	C/C	CT/delCT	G/G
74.	C/C	G/G	C/C	CT/CT	G/G

Anmerkung: Es ist jeweils eine Mutter gefolgt von dem ihr zugehörigen Kind dargestellt. Die einzelnen Mutter-Kind-Paare lassen sich durch die abwechselnde Schwarz-Grau-Abfolge voneinander abgrenzen (ungerade Patienten-Nummern: Mütter; gerade Patienten-Nummern: Kinder; o.A.: ohne Angabe)

9 Abkürzungsverzeichnis

A	= Adenin
A(a).	= Arteria(e)
A. dest.	= (lat.) Aqua destillata
Abb.	= Abbildung
ARED	= (engl.) Absent or Reversed EndDiastolic
AS	= Aminosäure(n)
bp	= Basenpaare
C	= Cytosin
CTG	= Cardiotokographie
DNA	= (engl.) DeoxyriboNucleic Acid
dNTP	= Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	= Ethylendiamintetraacetat
<i>ERK</i>	= durch <i>Extrazelluläre Signale Regulierte Kinase</i> (= <i>MAP-Kinase</i>)
G	= Gramm
G	= Guanin
<i>GAP</i>	= (engl.) <i>GTPase Activating Protein</i>
<i>GDP</i>	= (engl.) <i>Guanosine DiPhosphate</i>
<i>GRB2</i>	= (engl.) <i>Growth factor Receptor Binding protein 2</i>
<i>GTP</i>	= (engl.) <i>Guanosine TriPhosphate</i>
HCG	= Humanes ChorionGonadotropin
HCS	= Humanes ChorionSomatotropin
HELLP	= (engl.) Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet counts
HES	= Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft
HGMD	= (engl.) Human Gene Mutation Database
<i>HIF-1</i>	= (engl.) <i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i>
HPLC	= (engl.) High Performance Liquid Chromatography
<i>IGFBP</i>	= (engl.) <i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein</i>
<i>IGF-I</i>	= (engl.) <i>Insulin-like Growth Factor-I</i>
<i>IGF-IR</i>	= (engl.) <i>Insulin-like Growth Factor-I Receptor</i>
<i>IRS-1/-2</i>	= (engl.) <i>Insulin Receptor Substrate-1/-2</i>
IUGR	= (engl.) IntraUterine Growth Retardation/ Restriction
kD	= KiloDalton

kb	= Kilobasen
mA	= Milliampere
MAP	= <i>MitogenAktiviertes Protein</i>
MEK	= <i>MAP/ERK-Kinase</i>
mg	= Milligramm
min	= Minute
ml	= Milliliter
mM	= Millimolar
mmHg	= Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	= (engl.) Messenger RNA
n	= Anzahl
ng	= Nanogramm
nm	= Nanometer
NOS3	= (engl.) <i>Stickstoffmonoxidsynthase 3</i>
OMIM	= (engl.) Online Mendelian Inheritance in Man
PAI-1	= (engl.) <i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
Pat.Nr. (P)	= Patienten-Nummer
PCR	= (engl.) Polymerase chain reaction
PI-3	= <i>Phosphatidyl-Inositol-3</i>
PLC- γ	= (engl.) <i>PhosphoLipase Cγ</i>
pmol	= Pikomol
pO ₂	= Sauerstoffpartialdruck
Ras	= <i>Rattensarkom (-Protein)</i>
RFLP	= (engl.) Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	= (engl.) RiboNukleic Acid
RT	= Raumtemperatur
SDS	= (engl.) Sodium dodecyl sulfate
sec.	= Sekunde
SGA	= (engl.) Small for Gestational Age
SIH	= SchwangerschaftsInduzierte Hypertonie
SOS	= (engl.) <i>Son-Of-Sevenless</i>
Src	= (engl.) <i>Sarcoma (-protein)</i>
SSCP / SSCA	= (engl.) Single Strand Conformation Polymorphism / Analysis
SSW	= Schwangerschaftswoche

T	= Thymin
T _A	= (engl.) Annealing-Temperature
Tab.	= Tabelle
TBE	= Tris-Borat-EDTA
TE	= Tris-EDTA
U	= (engl.) Unit
Upm	= Umdrehungen pro Minute
V	= Volt
<i>VEGF</i>	= (engl.) <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
W	= Watt
°C	= Grad Celsius
μl	= Mikroliter

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. med. K. Zerres für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums der RWTH Aachen und für die Übernahme des Referates,

Herrn Prof. Dr. med. W. Rath für die freundliche Übernahme des Korreferates,

Frau Dr.med. P. Neumaier-Wagner für die wissenschaftliche Betreuung und Zusammenarbeit,

Herrn PD Dr. rer. nat. T. Eggermann für die optimale Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen und für die freundliche Bereitschaft zur Korrektur der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. med. P. Kaufmann und seiner Arbeitsgruppe für die pathoanatomische Aufarbeitung und histologische Einteilung der Plazenten,

allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit im praktischen Teil der Arbeit,

allen Probandinnen und ihren Kindern für die freundliche Teilnahme an der Studie,

meinen Eltern, Epameinondas und Irimi Kapagerof, für die vielfältige Unterstützung auf meinem Ausbildungsweg,

meiner Schwester, Anastasia Kapagerof, und meinem Bruder, Christos Kapagerof, für die menschliche Unterstützung,

meinem Lebenspartner, Ioannis Pegiazoglou, für die tatkräftige Mitwirkung bei der Durchführung der Arbeit und für die uneingeschränkte Unterstützung.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kapagerof
Vorname: Athina
Geburtsdatum: 28.04.1980
Geburtsort: Amarousio/GR
Staatsangehörigkeit: Griechisch
Familienstand: ledig
Familie: Epameinondas und Irimi Kapagerof,
Schwester Anastasia, Bruder Christos

Schulbildung

1986-1992 Grundschule Erasmeios Griechisch-Deutsche Schule, Athen
1992-1998 Gymnasium Deutsche Schule Athen
06/1998: Abschluss Allgemeine Hochschulreife,
Griechisches Apolytirion und Deutsches Abitur

Schulbegleitende Tätigkeiten

Teilnahme an "Model United Nations" (MUN)

- in Dublin/Irland (1996)
- in Den Haag/Niederlanden (1997)
- in Athen/Griechenland (1998)

Teilnahme an Schüleraustauschprogrammen

- Athen/Griechenland – Oxford/Grossbritannien (1995)
- Athen/Griechenland – Bad Reichenhall/Deutschland (1996)

Studium

10/1998-06/2005 Humanmedizin-Studium an der RWTH Aachen, Deutschland
09/2000: Ärztliche Vorprüfung
08/2001: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2004: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04/2004 - 08/2004	Chirurgie am Universitätsklinikum Aachen
08/2004 - 11/2004	Gynäkologie und Geburtshilfe am Kantonsspital Winterthur /CH
11/2004 - 03/2005	Innere Medizin am Universitätsklinikum Aachen

Famulaturen

03/2001	Innere Medizin – Nephrologie, Universitätsklinikum Aachen
03/2001	Humangenetik, Universitätsklinikum Aachen
08/2002	Gynäkologie und Geburtshilfe, ärztliche Praxis Athen
02/2003	Pädiatrie, Universitätsklinikum Aachen
03/2001	Anästhesie, Luisenhospital Aachen

Studiumbegleitende Tätigkeiten

07/2001	Laborpraktikum „Molekulargenetische Diagnostik“, Universitätsklinikum Aachen
10/2002 - 03/2003	Chirurgischer Basic Skill-Course am Universitätsklinikum Aachen
04/2003 - 09/2003	Chirurgischer Advanced Skill-Course am Universitätsklinikum Aachen
06/2004 - 07/2004	Sonographie Kurs am Universitätsklinikum Aachen
09/2004	Ultraschall-Fortbildungskurs „Sonographisch diagnostizierte fetale Nierenpathologie in der Schwangerschaft“
03/2005	Fortbildung Frauenheilkunde „Endometriose-zwischen „State of the Art“ und Grundlagenforschung“
04/2005	Fortbildung Frauenheilkunde „I. Aachen Update Gynäkologische Onkologie-Zervixkarzinom“

Aachen, 01. September 2005