

Ronny Peter Ettl  
Dr. sc. hum.

## **Expression und Lokalisation von $\alpha$ -Tokopherol-Transfer-Protein in der Plazenta und dessen Bedeutung für die prä- und postnatale Versorgung des Feten und Frühgeborenen mit Vitamin E**

Geboren am 22.04.1977 in Stuttgart - Bad Cannstatt

1. Staatsexamen der Pharmazie am 28.08.01 an der Universität Frankfurt am Main
2. Staatsexamen der Pharmazie am 28.11.03 an der Universität Frankfurt am Main
3. Staatsexamen der Pharmazie am 31.01.05 an der Universität Frankfurt am Main

Promotionsfach: Kinderheilkunde

Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. med. D. Rotzoll

Die wichtigste Funktion des Vitamin E wird darin gesehen, vor freien Sauerstoffradikalen zu schützen. Da wichtige Frühgeborenenenerkrankungen mit einem Vitamin E-Mangel in Verbindung gebracht werden, ist es wichtig zu erfahren, wie Feten mit Vitamin E versorgt werden und wie die Zufuhr dieses wichtigen Antioxidans vor der Geburt des Frühgeborenen optimiert werden kann. Eine zentrale Rolle spielt das  $\alpha$ -Tokopherol-Transfer-Protein ( $\alpha$ -TTP), welches wichtige Transportaufgaben für Vitamin E im Organismus erfüllt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde geklärt, ab welcher Schwangerschaftswoche das  $\alpha$ -TTP in der Plazenta vorhanden ist und in welcher Beziehung es zum mütterlichen und kindlichen Vitamin E-Status steht. Anhand von Blutproben der Mutter, der Nabelschnur und des Kindes am 1. und 4.-8. Lebenstag, wurde der Vitamin E-Spiegel im Plasma und in Erythrozyten bestimmt. Des Weiteren wurden Gewebeproben der Plazenta entnommen und sowohl der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tokopherolgehalt als auch das  $\alpha$ -TTP bestimmt. Besonderes Interesse galt dem möglichen Einfluss einer präpartalen Vitamin E-Substitution auf den Vitamin E-Status des Kindes. Das Vorhandensein von  $\alpha$ -TTP in humanen Chorio- und Endometriumkarzinomzellen wurde untersucht und die Regulierung der  $\alpha$ -TTP-Expression durch den Einfluss verschiedener Substanzen wie Glukokortikoide, Pro-Oxidantien und  $\alpha$ -Tokopherol, analysiert.

Die Tokopherolbestimmungen ergaben einen signifikant höheren  $\alpha$ -Tokopherol-Spiegel im Nabelschnurplasma der Frühgeborenen, welcher um  $170 \pm 56 \mu\text{g/dl}$  höher lag als bei den Neugeborenen. In den Erythrozyten der Mütter der Frühgeborenen zeigte sich ein 52% und in den Erythrozyten der NS ein 92% höherer  $\alpha$ -Tokopherol-Spiegel. Die  $\alpha$ -Tokopherol-Konzentrationen in den Erythrozyten der Mutter und des 1. LT korrelierten negativ mit dem Grad der RPM ( $p < 0,05$ ). Eine Vitamin E-Substitution während der Schwangerschaft bewirkte einen signifikant höheren  $\alpha$ -Tokopherol-Spiegel in der Plazenta.

In den Erythrozyten der Nabelschnur und des 1. LT lagen die  $\alpha$ -Tokopherol-Spiegel 9% bzw. 7% höher bei Vitamin E-Substitution. Eine signifikante Beziehung bestand ebenfalls zwischen  $\alpha$ -TTP und der SSW als auch dem GG.  $\alpha$ -TTP konnte bereits in sehr unreifen Plazenten der 23. SSW nachgewiesen werden. Die Expression in unreifen Plazenten lag um  $267 \pm 48 \text{ ODu} \cdot \text{mm}^2$  (Western Blot) höher als in reifen Plazenten ( $p < 0,01$ ). Die Ergebnisse der immunhistochemischen Bestimmung des  $\alpha$ -TTPs ergab eine um IRS-Score-Punkte  $5,18 \pm 0,88$  höhere  $\alpha$ -TTP-Expression in unreifen Plazenten im Vergleich zu reifen Plazenten. Die gemachten Beobachtungen gaben erste Anhaltspunkte dafür, dass Frühgeborene verstärkt mit  $\alpha$ -Tokopherol versorgt werden. Auch die Plazenta scheint eine wichtige Rolle als Speicher und Transportorgan für Vitamin E zu übernehmen. Es wäre denkbar, dass Frühgeborene bereits während der Schwangerschaft, durch eine Vitamin E-Substitution der Mutter, mit ausreichend Vitamin E-Reserven ausgestattet werden. Damit wären Frühgeborene nach der Geburt ausreichend vor oxidativen Schäden geschützt. Die verstärkte Expression von  $\alpha$ -TTP in unreifen Plazenten untermauert die Vermutung, dass  $\alpha$ -TTP eine besondere Funktion in der Frühphase der fetalen Entwicklung übernimmt.

Die Versuche mit den beiden Zelllinien zeigten signifikante Expressionsteigerungen des  $\alpha$ -TTPs in BeWo- und Ishikawa-Zellen. In BeWo-Zellen zeigte Betamethason in jeder eingesetzten Konzentration nach 24 Stunden eine deutliche Erhöhung der  $\alpha$ -TTP-Expression (z.B. IRS-Score  $8,0 \pm 0,0$  für  $0,1 \mu\text{g/ml}$  Betamethason vs.  $1,6 \pm 0,8$  für Kontrolle;  $p < 0,05$ ). Prednisolon zeigte keinen Einfluss. Die Pro-Oxidantien hatten ihren größten Einfluss auf die Expression nach 24 Stunden (AAPH und BSO;  $p < 0,05$ ).  $\alpha$ -Tokopherol zeigte ab einer Konzentration von  $40 \mu\text{g/ml}$  eine expressionsteigernde Wirkung, welche mit  $60$  und  $80 \mu\text{g/ml}$  eine Signifikanz aufwies ( $p < 0,05$ ). In Ishikawa-Zellen hatte Prednisolon in allen Konzentrationen nach 24h einen deutlichen Einfluss auf die  $\alpha$ -TTP-Expression ( $p < 0,05$ ). Betamethason hingegen zeigte keinen Einfluss. Auch in Gegenwart der beiden Pro-Oxidantien wurde die Expression in Ishikawa-Zellen signifikant erhöht. AAPH zeigte nach 8 Stunden seinen stärksten Einfluss auf die  $\alpha$ -TTP-Expression, BSO nach 24 Stunden ( $p < 0,05$ ).  $\alpha$ -Tokopherol zeigte wie schon in BeWo-Zellen konzentrationsabhängige Effekte auf die Expression seines Transportproteins. Wie auch in BeWo-Zellen konnte eine Steigerung der Expression bereits mit  $40 \mu\text{g/ml}$  nach 24 Stunden Inkubation beobachtet werden.

Die mit dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass BeWo- und Ishikawa-Zellen ein geeignetes Zellkulturmodell zur weiteren Charakterisierung der Regulierung der  $\alpha$ -TTP-Expression darstellen. Erste Anhaltspunkte zur Beeinflussung der  $\alpha$ -TTP-Expression durch Glukokortikoide, Pro-Oxidantien und  $\alpha$ -Tokopherol wurden erbracht.