

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

Der Einfluss freier Fettsäuren auf humane plazentare Endothelzellen *in vitro*

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

vorgelegt von
Dženana Bajramović
aus Velika Kladuša in Bosnien und Herzegowina

promoviert am 15. Januar 2026

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

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

Köln, den 23.07.2025

Unterschrift:

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Professor Dr. med. J. Dötsch meinen Dank für die stetige Unterstützung und die Überlassung der Forschungsarbeit aussprechen.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. rer. nat. Sarah Appel für die hervorragende Betreuung. Danke, dass Du mir stets mit Kompetenz, Zuverlässigkeit und Geduld zur Seite gestanden hast.

Dr. med. Eva-Maria Turnwald danke ich ebenso vielmals für die hilfreiche und engagierte Betreuung.

Besonders möchte ich mich bei Maria Wohlfarth bedanken, die mich mit Effizienz und enormer Hilfsbereitschaft an die Arbeiten im Labor herangeführt hat.

Allen Mitarbeiter/innen des Forschungspavillons der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin danke ich für den wertvollen Austausch und die stets angenehme Zusammenarbeit. Auch dem Team der Imaging Facility des CECAD danke ich für die freundliche Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Danke für eure Liebe und euer Vertrauen.

Mojim roditeljima – Emina i Edin

Meinen Eltern – Emina und Edin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	11
2. EINLEITUNG	12
2.1. Adipositas in der Schwangerschaft	12
2.2. Die Plazenta	12
2.2.1. Anatomie und Funktion	12
2.2.2. Die maternofetale Interaktionszone	13
2.2.3. Die Rolle der plazentaren Endothelzellen	14
2.3. Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress	15
2.4. Plazentarer Lipidstoffwechsel	16
2.5. Fettsäuren: Palmitin-, Öl- und Linolsäure	17
2.6. Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1. Material	21
3.2. Zellkulturmodell	27
3.2.1. Zelllinie und Kultivierung	28
3.2.2. Subkultivierung und Aussaat	28
3.2.3. Bestimmung der Zellzahl	29
3.2.4. Stimulationsmedium	29
3.3. DCFDA Cellular ROS Detection Assay – Oxidativer Stress	29
3.4. Zelluläre Homöostase	30
3.4.1. Caspase-Glo® 3/7 Assay – Apoptose	30
3.4.2. ELISA BrdU (colorimetric) – Zellproliferation	31
3.4.3. β -Galaktosidase-Färbung – Seneszenz	31
3.5. Zelluläre Funktionalität	32
3.5.1. Tube Formation – Angiogenese	32
3.5.2. Endotheliale Zellverbindungen: VE-Cadherin, β -Catenin und CD31	32
3.5.3. Proteinisolation	33
3.5.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	33

3.5.5.	Western Blot (semi-dry)	34
3.5.6.	Immunhistochemie	35
3.6.	Statistische Methoden der Datenanalyse	36
4.	ERGEBNISSE	37
3.7.	Oxidativer Stress	37
3.8.	Zelluläre Homöostase	38
3.8.1.	Apoptose	38
3.8.2.	Proliferation	39
3.8.3.	Seneszenz	39
3.9.	Zelluläre Funktionalität	40
3.9.1.	Angiogenese	40
3.9.2.	Endothelverbindungsmarker VE-Cadherin, β -Catenin und CD31	42
3.9.3.	Lokalisation des Endothelverbindungsmarkers VE-Cadherin als Marker von Adherens Junctions	44
4.	DISKUSSION	46
4.1.	Effekt von Linolsäure auf HPVEC	46
4.2.	Effekt von Palmitinsäure auf HPVEC	49
4.3.	Effekt von Ölsäure auf HPVEC	52
4.4.	Zell-Zell-Kontakte: VE-Cadherin, β -Catenin und CD31	54
4.5.	Limitationen, Fazit und Ausblick	56
5.	LITERATURVERZEICHNIS	59
6.	ANHANG	67
6.1.	Abbildungsverzeichnis	67
6.2.	Tabellenverzeichnis	67
6.3.	Curriculum Vitae	68

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Akt	Proteinkinase B
BCA	Bicinchoninsäure
BeWo	immortalisierte humane Trophoblast-Zelllinie
BMI	Body-Mass-Index
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
Caspase	Cystein-Aspartyl-spezifische Proteasen
CD31	Cluster of Differentiation 31
CH	Schweiz
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	2',7'-Dichlorfluoreszein
DCFDA	2',7'-Dichlorfluoreszeindiacetat
DE	Deutschland
DHA	Docosahexaensäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	Endothelial Cell Medium/ Endothelzellmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FABP	Fettsäure-Bindungsprotein
FAT	Fettsäure-Translokase
FATP	Fettsäure-Transport-Protein
FBS	Fetales Kälberserum
FS	Fettsäure
g	Gramm <i>oder</i> relative Zentrifugalbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCL	Salzsäure
4-HNE	4-Hydroxynonenal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPVEC	humane plazentare vaskuläre Endothelzellen

HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
I.E.	Internationale Einheiten
IT	Italien
IUGR	intrauterine growth restriction
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LGA	large for gestational age
5-LOX	5-Lipoxygenase
LS	Linolsäure
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Methyl-Ethyl-Keton
mg	Milligramm
Milli-Q®	Reinstwasser
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase
NaF	Natriumfluorid
Na ₃ Vo ₄	Natriumorthovanadat
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
ÖS	Ölsäure
P	Passage
p.a.	pro analysi
PECAM	platelet and endothelial cell adhesion molecule
p-Wert	Signifikanzwert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pH	potentia Hydrogenii
PI3k	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Palmitinsäure
rel.	relativ
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SA- β -Galaktosidase	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	standard error of the mean
Std.	Stunde/n
TBS	Tris-buffered saline/ Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TBHP	tert-Butylhydroperoxid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
VE-Cadherin	vascular endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
Z-DEVD-AMC	Z- Asparaginsäure- Glutaminsäure- Valin- Asparaginsäure - 7Amino- 4- Methylcumarin
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ m ²	Quadratmikrometer
μ M	Mikromolar

1. Zusammenfassung

Plazentare Störungen sind die Grundlage vieler Erkrankungen in der Schwangerschaft, die den Schwangerschaftsverlauf und die kindliche Entwicklung beeinflussen. Erkenntnisse zur Pathogenese sind von klinischer Relevanz für die Ableitung von präventiven Maßnahmen und Therapien. Freie Fettsäuren (FS) erfüllen physiologische Funktionen und sind essenziell für das fetale Wachstum. Ihr Ungleichgewicht bzw. der Exzess einiger FS wird jedoch als ursächlich in der Entstehung von Erkrankungen vermutet. Anderen FS werden protektive Eigenschaften zugeschrieben. Adipöse Schwangere sind verstärkt von Dyslipidämie betroffen. Sie haben ein besonderes Risiko für die Entwicklung schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen mit Folgen für Mutter und Kind. Auf plazentarer Ebene finden sich bei adipösen Müttern Vaskularisierungsstörungen und Veränderungen auf metabolischer, molekularer und zellulärer Ebene. Bisherige Erkenntnisse legen nahe, dass unter anderem vermehrtem oxidativem Stress eine Rolle in der Entstehung von plazentaren Störungen zukommt. Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Zusammenhänge zwischen freien Fettsäuren, oxidativem Stress und einer plazentaren endothelialen Dysfunktion zu erkennen. Die Eigenschaften von humanen plazentaren Endothelzellen (HPVEC) unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von Linolsäure (LS), Ölsäure (ÖS) und Palmitinsäure (PS) wurden *in vitro* erforscht. Im Zellkulturmodell wurden die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), homöostatische Eigenschaften (Proliferation, Apoptose und Seneszenz) und die Funktionalität (Tube Formation, Ausbildung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte, Proteinlevel der endothelialen Zell-Zell-Kontakt-Komponenten VE-Cadherin, β -Catenin und CD31) nach FS-Stimulation untersucht. Nach LS- und ÖS-Exposition waren konzentrationsabhängig erhöhte Mengen ROS in HPVEC nachweisbar. Eine PS-Stimulation hatte keinen Effekt auf die ROS-Produktion von HPVEC. LS, ÖS und PS schränkten die Proliferation von HPVEC ein. Die Apoptoserate war nach LS- und PS-Stimulation erhöht. Keine der untersuchten FS hatte Einfluss auf die Seneszenz und Tube Formation-Kapazität von HPVEC. HPVEC unterliegen hinsichtlich ihrer homöostatischen Eigenschaften dem Einfluss freier Fettsäuren. Oxidativer Stress ist eine mögliche Ursache für die nachgewiesene zelluläre Schädigung durch LS und ÖS. Die Exposition mit PS hat negative Auswirkungen auf das homöostatische Gleichgewicht von HPVEC, ohne dass es Hinweise auf die Induktion von oxidativem Stress gibt, sodass hier eine andere Genese in Betracht gezogen werden muss. FS kommen als Verursacher einer endothelialen Dysfunktion im Rahmen plazentarer Störungen in Frage. Widersprüche ergeben sich hinsichtlich des mangelnden Einflusses von FS auf die Seneszenz und Angiogenese von HPVEC. Die Versuche zu den Zell-Zell-Kontakten bedürfen einer Optimierung der Methodik. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die genauen Pathomechanismen der beobachteten Effekte zu verstehen und ihre klinische Relevanz zu definieren.

2. Einleitung

2.1. Adipositas in der Schwangerschaft

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind nahezu 60% der Erwachsenen in Europa von Übergewicht und Adipositas betroffen. Die 2022 veröffentlichten Daten verdeutlichen, dass es sich um ein gesundheitliches Problem mit steigender Prävalenz in der europäischen Bevölkerung handelt.¹ Die gängige Klassifikation von Übergewicht und Adipositas in Wissenschaft und Medizin richtet sich nach der Definition der WHO. Als orientierendes Maß gilt der Body-Mass-Index (BMI), der das Verhältnis des Körpergewichts zum Quadrat der Körperlänge (kg/m^2) beschreibt. Ab einem BMI von $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ geht man von Übergewicht aus. Adipositas ist mit einem BMI ab $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ assoziiert. Letztere wird in drei Schweregrade unterteilt, wobei Grad III (BMI $\geq 40 \text{ kg/m}^2$) die Adipositas permagna bzw. morbide Adipositas darstellt.²

Untersuchungen aus Deutschland verdeutlichen, dass auch Frauen im gebärfähigen Alter unter den Betroffenen sind. Das Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen hat in der Bundesauswertung „Perinatalmedizin: Geburtshilfe“ im Jahr 2022 insgesamt 653.221 Erstuntersuchungen in der Schwangerschaft erfasst. 25,26 % der Frauen hatten zu diesem Zeitpunkt leichtes Übergewicht (BMI 25 bis <30). Bei 11,42 % der Frauen wurde ein Klasse I (BMI 30 bis <35), bei 4,65 % ein Klasse II (BMI 35 bis <40) und bei 2,48% ein Klasse III Übergewicht (BMI ≥ 40) festgestellt.³

Maternales Übergewicht während der Schwangerschaft birgt diverse gesundheitliche Folgen für Mutter und Kind. Es ist unter anderem mit Erkrankungen, wie Präeklampsie, Gestationshypertonie und -diabetes assoziiert.⁴ Kinder adipöser Mütter sind einem Risiko für kongenitale Herzfehler⁵, erhöhte Mortalität⁶ und plötzlichen Kindstod⁷ ausgesetzt. Sie entwickeln häufiger ein Geburtsgewicht „large for gestational age“ (LGA)⁴ und auch eine intrauterine Wachstumsrestriktion (Intrauterine Growth Restriction, IUGR) scheint von maternaler Adipositas negativ beeinflusst⁸. Gegenstand aktueller Forschung sind die Ursachen, die diesen Komplikationen zugrunde liegen. Studien legen nahe, dass maternale Adipositas mit plazentaren Störungen auf zellulärer und metabolischer Ebene assoziiert ist.⁹⁻

11

2.2. Die Plazenta

2.2.1. Anatomie und Funktion

Die fetale Versorgung während der Schwangerschaft wird von der Plazenta sichergestellt, indem sie den regulierten Nährstoff- und Gasaustausch vermittelt¹²⁻¹⁴ und den Fetus vor schädigenden Substanzen aus dem mütterlichen Kreislauf schützt.^{15,16} Plazentare Störungen

sind unter anderem mit IUGR assoziiert.¹⁷ Eine regelrechte plazentare Entwicklung und Funktion sind daher essenziell, um eine optimale kindliche Entwicklung zu gewährleisten.

Die Plazenta entsteht im mütterlichen Uterus aus maternalen und embryonalen Zellen und durchläuft im Verlauf der Schwangerschaft eine Reihe von Entwicklungs- und Reifungsprozessen.¹⁸ Die reife Plazenta besteht aus drei Kompartimenten. Betrachtet man den Aufbau von fetal nach maternal, findet sich zunächst der fetale Anteil: die Chorionplatte. Hier inseriert die kindliche Nabelschnur mit den Umbilikalgefäßen. Zur kindlichen Seite ist die Chorionplatte von Amnionepithel umgeben. In maternaler Richtung bildet die Chorionplatte sogenannte Villi: verzweigte, zottenförmige Ausstülpungen, die fetale Gefäße beherbergen. Aus dem fetalen Kreislauf hervorgehend, speist die Umbilikalarterie ein arterielles Gefäßnetz innerhalb der Chorionplatte, welches in Richtung der Villi verläuft und dort in ein fetales Kapillarbett mündet. Von hier aus erfolgt die Rückführung in den fetalen Körperkreislauf über ein venöses Gefäßnetz, über welches das Blut in die Umbilikalvene und zurück in den fetalen Kreislauf fließt. Die Villi ragen in den sogenannten intervillösen Raum zwischen Chorion- und Basalplatte. Die Basalplatte besteht aus einer fetalen Trophoblastenschicht an der Oberfläche und der darunterliegenden Dezidua basalis. Letztere bildet den maternalen Anteil der Plazenta und beinhaltet, neben venösen Gefäßen, die Spiralarterien, die dem intervillösen Raum Blut aus dem mütterlichen Kreislauf zuführen.¹⁹

2.2.2. Die maternofetale Interaktionszone

Eine wesentliche anatomische Eigenschaft der Plazenta ist die Trennung von maternaler und fetaler Blutzirkulation. Die „maternofetale Interaktionszone“ erfüllt die Funktion einer Barriere und ermöglicht gleichzeitig die Kommunikation zwischen Mutter und Kind.²⁰

Sie besteht aus einem Verband fetaler Zellen in den terminalen Villi der Plazenta.^{19,20} In der reifen Plazenta speisen die mütterlichen Spiralarterien den intervillösen Raum mit maternalem Blut, welches die Villi umspült. Die humane Plazenta ist hämochorial: maternales Blut befindet sich an der villösen Oberfläche in unmittelbarem Kontakt mit fetalen Synzytiotrophoblasten.²⁰ Eine gemeinsame Basalmembran trennt die Synzytiotrophoblasten von fetalem Kapillarendothel, welches seinerseits das Lumen der villösen Gefäße umkleidet und somit in direktem Kontakt mit kindlichem Blut steht. Zu erwähnen sind außerdem mononukleare Stammzellen, die Zytotrophoblasten, die im Rahmen der plazentaren Entwicklung temporär als zusätzliche Schicht zwischen Synzytiotrophoblasten und fetalem Kapillarendothel liegen.^{19,21}

Der Stofftransfer bedient sich unterschiedlicher Mechanismen des aktiven und passiven Transports. Diffusion, Exo- und Endozytose und Membrantransporter^{16,22} ermöglichen den Austausch zwischen Mutter und Kind.

2.2.3. Die Rolle der plazentaren Endothelzellen

Plazentare Endothelzellen sind von maternal nach fetal betrachtet der letzte Bestandteil der maternofetalen Interaktionszone.²¹ Sie kleiden das villöse Kapillarnetz aus und entstehen im Rahmen der Vaskulogenese aus mesenchymalen Stammzellen innerhalb der Villi.²³ Endothelzellen sind durch Proliferation an der Angiogenese villöser Gefäße beteiligt. Ein neues Gefäßnetz entsteht aus bereits existierenden Blutgefäßen - entweder durch Verästelung oder Längenwachstum.²³ Die Angiogenese unterliegt dem Einfluss von einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, die als Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) zusammenfasst werden, Angiopoietin und auch die Rolle von Sauerstoff wird diskutiert.²⁴

Der Zusammenhalt der Zellen innerhalb des Endothels wird durch Adherens und Tight Junctions gewährleistet.²⁵ Charakteristisch für Endothelzellen ist die Expression von CD31 (PECAM-1) und des Adherens Junction Markers VE-Cadherin (Vascular Endothelial Cadherin).²⁵ VE-Cadherin bindet als Transmembranprotein an das Ankerprotein β -Catenin, das seinerseits über weitere Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung steht.^{25,26} CD31 (Cluster of Differentiation 31) – auch PECAM-1 (Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule) genannt - akkumuliert im Bereich der Zell-Zell-Kontakte und gewährleistet über homophile Adhäsion die endotheliale Integrität.²⁷ VE-Cadherin, β -Catenin und CD31 vermitteln stabile interzelluläre Kontakte, kontrollieren so die parazelluläre endotheliale Permeabilität und tragen zur Barrierefunktion von Endothelzellen bei.^{27,28} Außerdem regulieren Endothelzellen den Blutfluss zwischen Plazenta und Fetus, indem sie die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (endothelial Nitric Oxide Synthase, eNOS), ausschütten, die über Stickstoffmonoxid (NO) Produktion Vasodilatation- und Konstriktion plazentarer Gefäße steuert.²⁹

Der wichtigste Energieträger für Endothelzellen ist Glukose. Sie sind allerdings auch zur Energiegewinnung über die Lipidoxidation von Fettsäuren in der Lage, wobei dieser Prozess eine untergeordnete Rolle im Vergleich zur Glykolyse spielt.³⁰

Endothelzellen können in Seneszenz eintreten, die einen irreversiblen Zustand des Zellzyklus-Arrests beschreibt. Sie ist häufig eine regulatorische Reaktion auf einen Endothelzellschaden, ähnlich wie die Apoptose. Die Proliferation geschädigter Zellen wird verhindert, aber sie verbleiben dennoch im Endothelverband. Vermittelt wird die Seneszenz über Signalwege der Tumorsuppression, wie p53/p21 oder pRB/p16. Seneszente Zellen sind sekretorisch aktiv und schütten beispielsweise die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal), Zytokine, Wachstumsfaktoren und reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) aus. Die Exposition gegenüber ROS und Zytokinen kann wiederum - neben Lipiden, Proteinen und Glukose - zelluläre Seneszenz induzieren. Der Eintritt von Endothelzellen in einen seneszenten Zustand beeinflusst sowohl die Angiogenese als auch ihre Barrierefunktion negativ.³¹

2.3. Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Oxidativer Stress definiert den Zustand eines gestörten Gleichgewichts zugunsten oxidativer gegenüber antioxidativen Substanzen, sodass eine Schädigung auf zellulärer und molekularer Ebene innerhalb eines Organismus stattfindet. Zu den Oxidantien zählen unter anderem ROS und Reaktive Stickstoffspezies (RNS). Auch Röntgen- und ultraviolette (UV) Strahlung sind bekannt für die Induktion von oxidativem Stress.^{32,33} Im Zusammenhang mit oxidativem Stress wird seit langer Zeit die Entstehung von Erkrankungen diskutiert.³⁴

Außerhalb des plazentaren Milieus spielen ROS unter anderem eine Rolle in der Immunabwehr. Phagozytischen Zellen, wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten schütten mittels phagozytischer Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) in hohen Mengen ROS zur direkten Abwehr von Pathogenen aus. Der Mechanismus wird von Bakterien, Lipoproteinen und Zytokinen aktiviert. Zusätzlich vermitteln ROS in Lymphozyten Signalkaskaden für immunologische Prozesse.³⁵

Im Rahmen der plazentaren Entwicklung beteiligen sich ROS an physiologischen Prozessen, indem sie als Transkriptionsfaktoren wirken und Signalkaskaden induzieren.³⁶ Auf zellulärer Ebene entstehen ROS im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette durch die Reduktion von Sauerstoff im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung.^{37,38} Endothelzellen produzieren des Weiteren ROS über die NADPH-Oxidase.³⁹ ROS aktivieren an ihrem intrazellulären Zielort Signalkaskaden, beispielsweise über ihre Wirkungen an Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die regulatorisch hinsichtlich der zellulären Homöostase wirken.⁴⁰ Die Aktivität der NADPH-Oxidase wird durch hormonelle, mechanische und hämodynamische Faktoren beeinflusst.^{35,40} Die endogene Entstehung von ROS via NADPH-Oxidase kann durch VEGF angetrieben werden, wenn Letztere zuvor von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), einer ROS, aktiviert worden ist. Über diesen Mechanismus fördern ROS die endotheliale Angiogenese.⁴¹ Zudem ist bekannt, dass ROS eNOS entkoppeln und dabei Einfluss auf die endotheliale Regulation des Vasotonus nehmen kann. Ist dieser Prozess eingetreten, beginnt eNOS anstelle der NO-Produktion Superoxide freizusetzen, wodurch der Effekt weiter verstärkt wird.⁴² ROS interagieren nicht nur mit Proteinen, sondern sind auch zur Peroxidation von Lipiden in der Lage. ROS oxidieren ungesättigte Fettsäuren zu Fettsäure-Radikalen. Aus deren Bindung an Sauerstoff resultieren hochreaktive Lipidperoxyl-Radikale. Diese lösen eine Kettenreaktion aus, indem sie weitere ungesättigte Fettsäuren oxidieren.⁴³ Die Zellmembran besteht aus Phospholipiden und wird durch die Radikale geschädigt. Sie oxidieren die mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide und rufen strukturelle Schäden hervor.^{44,45} Der Zelltod durch Apoptose kann durch Lipidperoxidation vermittelt werden.^{43,46} Ein Produkt der Lipidperoxidation ist 4-Hydroxynonenal. Tasta et. al. konnten nachweisen, dass das Aldehyd in humanen Trophoblasten zelluläre Seneszenz induziert.⁴⁷ Für primäre Endothelzellen der

bovinen Aorta ist dieser Effekt ebenfalls beschrieben worden.⁴⁸ Des Weiteren schädigen ROS im Rahmen von oxidativem Stress die zelluläre Desoxyribonukleinsäure (DNA).⁴³

Zusammenfassend unterliegen Endothelzellen in ihrer Funktion in vielerlei Hinsicht dem Einfluss von ROS. Daher ist es denkbar, dass sie eine gewisse Sensibilität für oxidativen Stress aufweisen. Oxidativer Stress wird nicht nur als potenzielle Ursache im Hinblick auf Schwangerschaftskomplikationen, wie Präeklampsie, Totgeburten und IUGR erforscht,⁴⁹⁻⁵¹ sondern ist auch mit maternaler Adipositas assoziiert.⁵²⁻⁵⁴ Malti et. al. haben nachgewiesen, dass zur termingerechten Geburt via Sectio Caesarea bei maternaler Adipositas – verglichen mit normalgewichtigen Schwangeren – maternale, plazentare und fetale Biomarker für oxidativen Stress signifikant erhöht waren. Gleichzeitig wurden in mütterlichem und kindlichem Serum, sowie in der Plazenta erhöhte Triglyceridspiegel gemessen. Die Autoren suggerieren vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse einen Einfluss mütterlicher Adipositas auf die maternofetale Interaktionszone.⁵⁵ Brombach et. al. haben 2022 in einer Übersichtsarbeit unter anderem die Korrelation zwischen mütterlicher Adipositas und metabolischen Veränderungen, sowie oxidativem Stress in der Plazenta zusammengefasst: Plazenten adipöser Mütter weisen erhöhte Marker für oxidativen Stress und höhere ROS-Level auf. Gleichzeitig ist das Niveau antioxidativer Gegenspieler reduziert. Sie haben einen höheren Gehalt an Triglyceriden, Gesamtfett und Cholesterol.⁵⁴ In Bezug auf plazentare Pathologien wird unter anderem die Rolle von oxidativem Stress für Vaskularisierungsstörungen diskutiert.⁵⁶⁻⁵⁹ Es gibt Hinweise darauf, dass die nachweislich erhöhte Lipidakkumulation in Plazenten adipöser Mütter^{60,61} mit Lipotoxizität, oxidativem Stress und gestörter Expression von Angiogenesefaktoren in Verbindung stehen.⁶² Andere Autoren vermuten, dass die plazentare Lipidakkumulation bei Adipositas eine regulatorische Gegenmaßnahme darstellt, um eine fetale Überversorgung mit Fetten zu vermeiden.⁶¹

2.4. Plazentarer Lipidstoffwechsel

Sowohl ein maternales Übergewicht bzw. Adipositas vor als auch eine stärkere Gewichtszunahme während der Schwangerschaft sind mit erhöhten mütterlichen Fettsäurespiegeln assoziiert.⁶³ Fettsäuren sind ein wichtiger Energieträger innerhalb der fetalen Entwicklung.⁶⁴ Der transplazentare Transfer ist so reguliert, dass bevorzugt langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Docosahexaensäure (DHA), den Fetus erreichen.⁶⁵ In der Schwangerschaft reagiert der mütterliche Metabolismus mit einem erhöhten Angebot an Fettsäuren im maternalen Serum.⁶⁶ Die maternale Reaktion ist dynamisch und an den fetalen Bedarf angepasst. Mütterliche Serum-Lipidspiegel erreichen ihren Höhepunkt im dritten Trimester, wenn das fetale Wachstum am größten ist.⁶⁷ Hellmuth et. al. haben gezeigt, dass freie Fettsäuren von diesem Anpassungseffekt nicht betroffen sind und auch die mütterliche Diät während der

Schwangerschaft keinen signifikanten Einfluss nimmt. Allerdings korrelierte in ihrer Untersuchung im ersten und zweiten Trimester die Höhe an freien Fettsäuren im maternalen Serum maßgeblich mit dem mütterlichen BMI vor der Schwangerschaft. Im dritten Trimester zeigte sich dieser Effekt nicht. Die Autoren gehen davon aus, dass die Unterschiede in den Fettsäure-Spiegeln zu normalgewichtigen Frauen durch die Lipolyse maternaler Fettdepots übergewichtiger und adipöser Mütter entstehen. Sie vermuten, dass die Unterschiede im dritten Trimester aufgrund einer regulär zu diesem Zeitpunkt stattfindenden Lipolyse, die das fetale Wachstum unterstützt, ausgeglichen werden.⁶⁸

Im Serum zirkulieren langkettige Fettsäuren, die 90 Prozent der Lipide ausmachen, hauptsächlich in Form von Lipoproteinen.³⁰ Für den Transfer zum Fetus werden maternale Lipoproteine, Triglyceride und Phospholipide durch Lipoproteinlipasen – hauptsächlich aus Synzytiotrophoblasten- und endothelialen Lipasen hydrolysiert.^{14,69} Freie Fettsäuren hingegen können unmittelbar aus der maternalen Zirkulation aufgenommen werden.¹⁴ Sie passieren (plazentare) Endothelzellen und die übrigen Komponenten der fetomaternalen Interaktionszone über Fettsäure-Transport-Proteine (FATP), Fettsäure-Bindungsproteine (FABP) und Fettsäure-Translokasen (FAT/CD36).^{30,66,70} Die Expression dieser Proteine wird unter anderem von VEGF reguliert.^{30,71,72} Im Zytosol sind Fettsäuren an FABP gebunden. Die Abgabe an die fetale Zirkulation durch Endothelzellen erfolgt wahrscheinlich über FAT/CD36 und FATP.^{73,74} Hirschmugl et. al. haben in einem ex-vivo Perfusionsmodell humaner Plazenten nachgewiesen, dass auch eine Mobilisierung aus endogenen plazentaren Fettsäuredepots zur fetalen Fettsäureversorgung beiträgt. In Bezug auf maternale Adipositas konnten sie nachweisen, dass der plazentare maternofetale Transfer von exogen zugefügter Ölsäure, Linolsäure, Palmitinsäure und Docosahexaensäure (DHA) bei adipösen Müttern erhöht ist.⁷⁵ Versuche im Tiermodell zeigen, dass die Induktion von maternaler Adipositas durch Hochfettdiät zu einer Hochregulation von Lipoproteinlipasen und Transportproteinen zugunsten des plazentaren Lipidtransfers führt.⁶⁹ Versuche an der humanen Plazenta konnten diese Ergebnisse teilweise bestätigen.^{70,76} In der Zusammenschau lassen die Ergebnisse vermuten, dass alle Bestandteile der maternofetalen Interaktionszone, zumindest in den ersten zwei Trimestern, im Rahmen maternaler Adipositas einer erhöhten Fettsäure-Exposition ausgesetzt sind.

2.5. Fettsäuren: Palmitin-, Öl- und Linolsäure

Fettsäuren nehmen eine Vielzahl von Funktionen im menschlichen Körper ein. Sie sind Bestandteil von Zellmembranen, dienen der Energiegewinnung und fungieren als Signalmoleküle.⁷⁷ Ihre Rolle wird aber auch im Zusammenhang mit Entstehung, Prävention und Therapie von Erkrankungen diskutiert. Fettsäuren werden anhand der Anzahl ihrer Kohlenstoffatome in lang-, mittel- und kurzkettig, sowie anhand ihrer Anzahl an

Doppelbindungen in gesättigt (keine Doppelbindungen), einfach-ungesättigt (eine Doppelbindung) oder mehrfach-ungesättigt (mindestens 2 Doppelbindungen) unterteilt.^{78,79} Betrachtet man die Gesamtheit der Fettsäuren im menschlichen Serum und Plasma, bilden Palmitin-, Öl- und Linolsäure die größten Fraktionen.⁸⁰ Palmitinsäure ist von allen gesättigten Fettsäuren in menschlichen Organismus die Gängigste und beispielsweise Bestandteil von Triglyceriden und Phospholipiden der Zellmembranen. Sie ist eine nicht-essenzielle Fettsäure und wird entweder diätetisch zugeführt oder körpereigen synthetisiert. Palmitinsäure ist Teil von tierischen Produkten, Kakaobutter, Olivenöl und Muttermilch.⁸¹ In der Nahrungsmittelindustrie ist sie beispielsweise in Palmöl zu finden, wo sie in Triglyceriden organisiert ist und neben Ölsäure den Hauptanteil an Fettsäuren bildet.⁸² Ölsäure ist eine nicht-essenzielle Omega-9-Fettsäure und die häufigste einfach-ungesättigte Fettsäure im menschlichen Körper.⁸³ In der diätetischen Zufuhr macht sie ca. 90% der einfach-ungesättigten Fettsäuren aus. Sie ist der Hauptbestandteil von Olivenöl ist und auch in Nüssen und tierischen Nahrungsmitteln zu finden.⁸⁴ Linolsäure ist eine essenzielle und zweifach-ungesättigte Omega-6-Fettsäure, die dem Körper diätetisch zugeführt werden muss. Eine körpereigene Synthese ist nicht möglich. Die Aufnahme erfolgt zum Beispiel über Pflanzenöle, Fisch und Nüsse.⁸⁵

2.6. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die Arbeitsgruppe "Plazentare Störungen" der Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln beschäftigt sich unter anderem mit den Auswirkungen von maternaler Adipositas auf Störungen der plazentaren maternofetalen Interaktionszone. In früheren Studien wurde im Tiermodell gezeigt, dass eine durch Hochfettdiät induzierte maternale Adipositas ungünstige Auswirkungen auf die Vaskularisierung der Plazenta hat. Sie beeinflusst die Expression von Endothelzellmarkern, Adherens Junctions (E-Cadherin, β -Catenin) und die Ausbildung eines fetalen Kapillarnetzes, erhöht die Lipidakkumulation in der murinen Plazenta und steigert die Seneszenz plazentarer Endothelzellen.^{86,87} Ein wesentlicher Bestandteil der Hochfettdiät in diesem Tiermodell ist ein hoher Gehalt an freien Fettsäuren, insbesondere Palmitin-, Öl- und Linolsäure (s. Tabelle S1 der Supplements in Kretschmer et al. "Effect of Maternal Obesity in Mice on IL-6 Levels and Placental Endothelial Cell Homeostasis." in *Nutrients* 2020)⁸⁶. Die Autoren konnten feststellen, dass eine Exposition von BeWo-Zellen (immortalisierte humane Trophoblast-Zelllinie) gegenüber Linolsäure die β -Catenin Expression eingeschränkt und die zelluläre Permeabilität erhöht hat. Die Behandlung mit Ölsäure führte zu einer zellulären Lipidakkumulation. Öl-, Linol- und Palmitinsäure hatten keinen Effekt auf die Expression von VE-Cadherin.⁸⁷

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werfen die Frage auf, ob maternale Adipositas auch im menschlichen Organismus eine plazentare Schädigung in Bezug auf die Vaskularisierung, Adherens Junctions und die zelluläre Permeabilität hervorruft. Der hohe Fettsäuregehalt der Hochfettdiät scheint dabei eine besondere Rolle zu spielen. Die molekularen Mechanismen zellulärer Schädigung durch Fettsäuren sind noch nicht endgültig erforscht. Sie stehen allerdings im Verdacht, oxidativen Stress zu verursachen. In jedem Fall birgt eine Störung auf plazentarer Ebene das Risiko für eine Einschränkung des maternofetalen Austauschs und für ein negatives Outcome für Mutter und Kind. Die regelrechte plazentare Vaskularisierung und endotheliale Integrität sind wesentlicher Bestandteil eines uneingeschränkten transplazentaren Stoffaustausches und essenziell für eine optimale fetale Entwicklung. Sowohl oxidativer Stress, als auch ein veränderter Lipidmetabolismus, sind in Plazenten adipöser Frauen nachgewiesen worden. Die Induktion von oxidativem Stress durch maternale Dyslipidämie wird als Grundlage plazentarer Vaskularisierungsstörungen diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen ausgewählter Fettsäuren auf primäre humane Plazentaendothelzellen untersucht werden. Humane plazentare Endothelzellen sind als Äquivalent zu den plazentaren fetalen Kapillaren des Mausmodells zu betrachten. Sie sind Bestandteil der maternofetalen Interaktionszone, tragen zur Regulation des Stoffaustauschs zwischen Mutter und Kind bei und sind an der plazentaren Angiogenese beteiligt. Die Auswahl

der Fettsäuren und der jeweiligen Konzentrationen wurde in Anlehnung an die Versuche von Kretschmer et. al. getroffen.⁸⁷

Die Arbeitshypothese lautet, dass Fettsäuren oxidativen Stress in HPVEC induzieren und eine endotheliale Dysfunktion herbeiführen. Sie soll anhand folgender Fragen überprüft werden:

- I. Induzieren Fettsäuren oxidativen Stress in HPVEC?
- II. Haben Fettsäuren Auswirkungen auf die zelluläre Homöostase von HPVEC?
- III. Beeinflussen Fettsäuren die Funktionalität der HPVEC im Hinblick auf
 - a. die Fähigkeit zur Angiogenese?
 - b. die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten in Form von Adherens Junctions?

3. Material und Methoden

3.1. Material

Chemikalie	Hersteller (Artikelnummer)
Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung; ROTIPHORESE® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#3029.1)
Anti Evaporation Oil	Ibidi, Gräfelfing, DE (#50051)
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#8076.3)
BSA, Fraktion V, Protease- und Fettsäurefrei	Serva, Heidelberg, DE (#11945.03)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (A3678-25G)
Antibody Diluent	DAKO Agilent, Santa Clara, USA (S0809832)
Aprotinin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (A1153-1MG)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK (#14190-094)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (D8418)
ECL Prime Western Blotting Detection Agent	GE Healthcare, Solingen, DE (RPN2232)
Endothelial Cell Growth Supplements	ScienCell, Carlsbad, USA (#1052)
Endothelial Cell Medium	ScienCell, Carlsbad, USA (#1001)
Endothelial Cell Medium, phenolrotfrei	ScienCell, Carlsbad, USA (#1001-prf)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (E6635-500G)
Ethanol ≥ 99,8 %, vergällt mit 1% Methyl- Ethyl-Keton (MEK)	Carl Roth, Karlsruhe, DE (K928.3)
Ethanol vergällt 99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE (K928.3)
Fetales Kälberserum (FBS)	ScienCell, Carlsbad, USA (S0815)
Fluoromount™ Aqueous	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (F4680)
Formaldehyd 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#4979.1)
Gelatine Lösung 2%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (G1393)
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#3908.3)
Igepal® CA-630	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (6741-250ML-F)
Leupeptin ≥ 90 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (L2884-1MG)
Linolsäure Natriumsalz (Natriumlinoleat)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (#L8134)
Matrigel®, wachstumsfaktorreduziert	BD Corning, Manassas, USA (#354230)
Methanol ≥ 99,8 %, p.a.	Merck, Darmstadt, DE (#1.06008.2500)

Magnesiumchlorid (MgCl ₂) ≥ 99%	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#KK36.1)
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE (T145.3)
Milli-Q®- Reinstwasser	Merck, Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#9265.2)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (S6776-100G)
Natriumorthovanadat, Na ₃ VO ₄	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (S6508-10G)
Ölsäure Natriumsalz (Natriumoleat)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (#O7501)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (#26616)
Palmitinsäure Natriumsalz (Natriumpalmitat)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (#P9767)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Merck, Darmstadt, DE (P3813-10PAK)
Penicillin (10.000 I.E./ml) /Streptomycin (10.000 µg/ml)	ScienCell, Carlsbad, USA (#0503)
Pepstatin A ≥ 75 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (P3813-10PAK)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) ≥98,5 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (P7626-5G)
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#5938.1)
Kaliumhexacyanoferrat (III) 99% Pulver	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (#702587)
Roti-Histo Fix 4%, phosphatgepuffert, pH 7	Carl Roth, Karlsruhe, DE (P087.5)
Salzsäure 32% (HCl)	Merck, Darmstadt, DE (#1.09057.2500)
Sea Block Blocking Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (#37527)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#2326.2)
Staurosporin	Cell Signaling, Danvers, USA (#9953)
Tetramethylethyldiamin (TEMED) ≥99.0%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (T9281-25ML)
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#5429.3)
Trypanblau 0,4%	Invitrogen, Carlsbad, USA (#15250-061)
Trypsin EDTA-Lösung 0,25%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (#4049)
Tween® 20	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (P1379-500ML)
X-Gal	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (B4252)
β-Mercaptoethanol ≥99 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, DE (#4227.3)

Tabelle 1: Chemikalien

Primär- Antikörper (Größe), Hersteller, Artikelnummer	Verdünnung in 5% Milch/TBST	Sekundär- Antikörper, Hersteller, Artikelnummer	Verdünnung in 5% Milch/TBST
Anti-VE-Cadherin (115 kDa) Abcam, ab33168	1:5000	Anti-rabbit IgG (HRP), Cell-Signaling, #7074	1:1000
Anti-β-Catenin (92 kDa), Cell Signaling, #8480	1:1000	Anti-rabbit IgG (HRP), Cell-Signaling, #7074	1:2000
Anti-CD 31 (110-120 kDa), Abcam, ab28364	1:1000	Anti-rabbit IgG (HRP), Cell-Signaling, #7074	1:2000
Anti-GAPDH (37 kDa), Cell Signaling, #2118	1:3000	Anti-rabbit IgG (HRP), Cell-Signaling, #7074	1:2000
Anti-β-Actin (45 kDa), Cell Signaling, #3700	1:7000	Anti-mouse IgG (HRP), Cell Signaling, #7076	1:10 000

Tabelle 2: Antikörper für Western Blot

Primär- Antikörper Hersteller, Artikelnummer	Verdünnung in Antibody Diluent	Sekundär- Antikörper, Hersteller, Artikelnummer	Verdünnung in Antibody Diluent
Anti-VE-Cadherin Abcam, ab33168	1:600	Cy™3 AffiniPure® Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Jackson Immuno Research, #111165003	1:400

Tabelle 3: Antikörper für Immunhistochemie

Pufferlösung/ Stammlösung	Zusammensetzung
10x TBS, pH 7,5	1 M NaCl 0,1 M Tris pH 7,5 mit HCl
1x TBS-T Puffer, pH 7,5	100 mM NaCl 10 mM Tris 0,05 % (v/v) Tween® 20
10x Lämmli Puffer, pH 8,3	240 mM Tris 1,91 M Glycin

	1 % (m/v) SDS
Modifizierter Radioimmunopräzipitationsassay Puffer (RIPA-Puffer)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% (v/v) Igepal® CA-630 0,25% (m/v) Desoxycholsäure Natriumsalz 1mM EDTA 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Pepastatin A 1 µg/ml Leupeptin 1 mM PMSF 1 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄
10x Towbin Puffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin
Trenngelpuffer, pH 8,8	1,5 M Tris pH 8,8 mit HCl
Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,5 M Tris pH 6,8 mit HCl
Ponceau-S-Färbelösung	0,2 % (m/v) Ponceau S 3 % (v/v) Trichloressigsäure
X-Gal Stocklösung	20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid
β-Gal Färbelösung	1 mg/ml X-Gal 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III) 5mM Kaliumhexacyanidoferrat(II) 2 mM MgCl ₂ PBS (pH 6)
β-Gal Fixierlösung	2 % (v/v) Formaldehyd 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd PBS

Tabelle 4: Puffer- und Stammlösungen

Polyacrylamid-Gele für SDS-PAGE	Zusammensetzung
Trenngel 8 %,	8 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung 0,375 M Trenngelpuffer (Tris pH 8,8) 0,1 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) SDS 0,06 % (v/v) TEMED
Trenngel 10 %,	9,9 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung 0,375 M Trenngelpuffer (Tris pH 8,8) 0,1 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) SDS 0,04 % (v/v) TEMED
Sammelgel	5,1 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung 0,065 M Sammelgelpuffer (Tris pH 6,8) 0,1 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) SDS 0,1% (v/v) TEMED

Tabelle 5: Polyacrylamid-Gele für SDS-PAGE

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well Platte, transparent	Sarstedt, Nümbrecht, DE
96 Well Microplatte schwarz	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
6-Well Platte, transparent	Sarstedt, Nümbrecht, DE
24-Well Platte, transparent	Sarstedt, Nümbrecht, DE
96-Well Platte weiß	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Cast-it Gelgießstand	PeqLab, Erlangen, DE
Coverslips 13 mm Durchmesser	VWR, Darmstadt, DE
Falcons 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Glasplatte (Western Blot)	PeqLab, Erlangen, DE
Kamm (Western Blot)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Neubauer Zählkammer improved	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Nitrozellulose (Transfermembran) Protran BA 85 0,45µm	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Parafilm „M“	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Whatman-Papier	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Zellkultur Flasche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellschaber	Techno Plastic Products (TTP), CH
μ-Plate 96-Well 3D	Ibidi, Gräfelfing, DE

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Assay	Hersteller (Artikelnummer)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA (#23225)
Caspase-Glo® 3/7 Assay Kit	Promega, Fitchburg, USA (#G8090)
Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric)	Roche Applied Science, Penzberg, DE (#11647229001)
DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit	Abcam, Cambridge, UK (ab113851)

Tabelle 7: Assays

Gerät	Hersteller
Axiovert 25 (Mikroskop)	Zeiss, Oberkochen, DE
Blotting Kammer	PeqLab, Erlangen, DE
ChemiDoc™ XRS+ Imager	Bio-Rad, Hercules, USA
Crosslinker UV-Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
EVOS™ FL Auto2 Imaging System, Invitrogen™ ¹	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EV231 Power Supply	PeqLab, Erlangen, DE
Feinwaage ES 320A	Precisa, Dietikon, CH
Folienschweißgerät	Carl Roth, Karlsruhe, DE
GloMax Multi Detection System	Promega, Fitchburg, USA
Heiz-Thermo-Mixer MHR 23	HLC BioTech, Bovenden, DE
Hera Cell 150 CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Infinite® M200 PRO	Tecan, Männedorf, CH
Leica SP8 konfokales Mikroskop ¹	Leica, Wetzlar, DE
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S	PeqLab, Erlangen, DE
PerfectBlue™ Semi-Dry Electroblotter	PeqLab, Erlangen, DE
Sicherheitswerkbank BS48	Tecniplast, Varese, IT

¹ Das EVOS™ FL Auto2 Imaging System, Invitrogen™ und das Leica SP8 konfokale Mikroskop wurden von der Imaging I Facility des CECAD (Cologne Excellence Cluster for Aging and Aging-Associated Diseases) der Universität zu Köln (Institutsleitung: Dr. Astrid Schauss) bereitgestellt.

Schüttler Duomax 130	Heidolph, Schwabach, DE
Vortex V-1 plus	G Kisker, Steinfurt, DE
Wärmeschrank UFE 550	Memmert, Schwabach, DE
Wasserbad 1004	GFL, Burgwedel, DE
Zähluhr (Handstückzähler)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Zentrifuge ROTINA 420R	Hettich, Tuttlingen, DE
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE

Tabelle 8: Geräte

Software	Hersteller
CellProfiler 3.1.0	Eli and Edythe L. Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, USA
Endnote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
EVOS™ Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GraphPad Prism 10	Dotmatics, Boston, USA
ImageJ Fiji 2.3.1	Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA
ImageLab 5.2.1	Bio-Rad, Hercules, USA
Microsoft Word 16.78	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Excel 16.78	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Tecan iControl 2.0	Tecan, Männedorf, CH

Tabelle 9: Softwares

3.2. Zellkulturmodell

Die *in vitro* Eigenschaften der humanen plazentaren Endothelzellen (HPVEC, human placental vascular endothelial cells) wurden unter Einfluss von Fettsäuren im Zellkulturmodell untersucht. Für die Arbeit an humanen Zellen liegt eine Genehmigung durch die Ethikkommission vor (#14-244).

Gegenstand der Untersuchungen waren oxidativer Stress (DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit, Abcam), Apoptose (Caspase-Glo® 3/7 Assay, PROMEGA), Proliferation (BrdU Assay, Roche), Seneszenz (β -Galaktosidase-Färbung), Angiogenese (Tube Formation Assay) und Ausbildung der endothelialen Zellkontakte (VE-Cadherin, CD31 und β -Catenin Nachweis im Western Blot und in der Immunhistochemie).

3.2.1. Zelllinie und Kultivierung

Die Versuche wurden an HPVEC von ScienCell (Artikelnummer: #7100) durchgeführt. Das Kulturmedium setzte sich aus Endothelial Cell Medium (ECM) von ScienCell mit 5% fetalem Kalbsserum (FBS, fetal bovine serum), 1% Wachstumsfaktoren (endothelial cell growth supplements) und 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zusammen. Spezielle Abweichungen von dieser Zusammensetzung sind in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

Die HPVEC lagen vor Versuchsbeginn bei -152°C kryokonserviert vor und wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Für die Kultivierung wurden sie in Kulturmedium aufgenommen und in Gelatine (1:10 in Milli-Q®-Reinstwasser verdünnt) beschichteten Flaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm² bei 37°C, 21% O₂ und 5% CO₂ inkubiert. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin von der Oberfläche gelöst und die gewonnene Zellsuspension subkultiviert, oder für die Versuche ausgesät.

3.2.2. Subkultivierung und Aussaat

Die Subkultivierung bezeichnet das Überführen der Zellen in neue Kulturflaschen. Dafür wurden die am Flaschenboden adhärennten HPVEC mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen und eine Minute mit Trypsin bei 37°C vom Untergrund abgelöst. Der Vorgang wurde mit Hinzugabe von Kulturmedium beendet. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 20°C und 180 g wurden die HPVEC in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen (im Verhältnis 1:2) verteilt. Der Vorgang der Subkultivierung wird als Passagieren bezeichnet und die Passage (P) fortlaufend nummeriert. Zu Versuchsbeginn lagen alle Aliquots der Zellen nach vorheriger dreimaliger Subkultivierung in P4 kryokonserviert vor. Der Western Blot wurde mit HPVEC zweier nah beieinanderliegender Passagen (P8-9) durchgeführt. Alle übrigen Versuche erfolgten jeweils mit Zellen des gleichen Passage-Alters, um eine Passagen-Varianz der Ergebnisse auszuschließen. Die Aussaat auf entsprechende Versuchsplatten fand frühestens in P6 und maximal in P9 statt. Zellen eines Aliquots wurden für unterschiedliche Versuche verwendet. Allerdings wurde ein Versuch nie mit Zellen des gleichen Aliquots wiederholt. Alle Arbeiten in der Zellkultur fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Die Versuchsplatten wurden in der Regel mit Gelatine beschichtet, um ein Anhaften der Zellen am Grund der Versuchsplatte zu ermöglichen. Dies gilt auch für zellfreie Blank Wells. Die Aussaat der Zellen zur Stimulation mit dem jeweiligen Stimulationsmedium erfolgte in Triplikaten. Bei Abweichungen von diesem Vorgehen findet sich jeweils ein Hinweis in den einzelnen Versuchsbeschreibungen.

3.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Vor jeder Aussaat wurde zunächst die Zellzahl der jeweiligen Kultur bestimmt. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension zu 90 µl Trypanblau gegeben. 10 µl der so in Suspension gefärbten Zellen wurden auf eine Zählkammer Neubauer improved aufgetragen. Die vitalen Zellen wurden lichtmikroskopisch in vier Großquadranten gezählt. Trypanblau färbt tote Zellen bzw. tote Zellbestandteile an, sodass diese beim Zählen ausgeschlossen wurden. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte anhand folgender Formel: (Summe aller gezählten Zellen/ Anzahl der gezählten Großquadrat) * 10 * 10⁴ = Zellen / ml. Mittels dieser Methode konnte für den jeweiligen Versuch die gewünschte Zellzahl ausgesät werden.

3.2.4. Stimulationsmedium

Die Eigenschaften der HPVEC sollten unter Einfluss ausgewählter Fettsäuren in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht werden. Dazu wurden Palmitinsäure, Ölsäure und Linolsäure in jeweils vier Konzentrationen in ECM und 5% fettsäurefreiem BSA (bovines Serumalbumin) als Stimulationsmedien angesetzt (Tabelle 10: Stimulationsmedien).

Die Fettsäuren wurden jeweils in Form einer 50 mM Stock- Lösung in sterilem Milli-Q®-Reinstwasser im Heizblock bei 70°C gelöst und dann bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde die Stock- Lösung zunächst auf eine Konzentration von 2,5 mM Fettsäure in ECM und 5 % fettsäurefreiem BSA verdünnt und 15 Min. bei 40°C inkubiert. In einem weiteren Schritt wurde durch Verdünnung der Fettsäuren in ihre finalen Konzentrationen das jeweilige Stimulationsmedium angesetzt.

Fettsäure	Palmitinsäure	Ölsäure	Linolsäure
Konzentration in µM	100	50	50
	500	200	100
	700	300	200
	1000	500	400
Verdünnungsmedium	ECM + 5% fettsäurefreies BSA		

Tabelle 10: Stimulationsmedien

3.3. DCFDA Cellular ROS Detection Assay – Oxidativer Stress

Oxidativer Stress in HPVEC wurde anhand des DCFDA (2',7'-Dichlorfluoreszeindiacetat) Cellular ROS Detection Assay Kit (Abcam) ermittelt. Basierend auf der Detektion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde der Versuch nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die HPVEC wurden an P7 mit 12.500 Zellen pro Well als Duplikate auf einer schwarzen 96-Well-Platte mit flachem, transparentem Boden ausgesät und zunächst 12 Stunden (Std.) in Kulturmedium inkubiert, damit die Zellen anwachsen konnten. Anschließend erfolgte nach einem Waschschrift mit 1x Buffer (50 µl pro Well) die Färbung mit DCFDA Working Solution (50µl pro Well 25 µM DCFDA in 1X Buffer) für 45 Minuten bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschschrift in 1x Buffer wurden die HPVEC in Stimulationsmedium in Duplikaten für 4 Std. bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Die Herstellung des Stimulationsmediums erfolgte durch die Verdünnung der Fettsäuren in die jeweiligen Konzentrationen mit Supplemented Buffer. Zudem wurden Duplikate von Negativkontrollen (HPVEC in Supplemented Buffer), Hintergrundkontrollen (reiner Supplemented Buffer ohne Zellen) und Positivkontrollen angelegt. Letztere entstanden durch die Induktion von oxidativem Stress in HPVEC mittels 100 µM tert-Butylhydroperoxid (TBHP) gelöst in Supplemented Buffer. Die Fluoreszenzspektroskopie erfolgte mit Blaufilter bei einer Wellenlänge von Ex/Em= 490/510-570 nm (GloMax Multi Detection System, Promega). Aus den Messwerten der Duplikate wurde ein Mittelwert berechnet. Das Fluoreszenzsignal der Hintergrundkontrolle wurde von jeder Messung subtrahiert, bevor die Ergebnisse der stimulierten Zellen in Relation zur Negativkontrolle gesetzt wurden.

3.4. Zelluläre Homöostase

3.4.1. Caspase-Glo® 3/7 Assay – Apoptose

Die Apoptoserate der HPVEC wurde anhand des Caspase-Glo® 3/7 Assays (Promega) untersucht. Die Versuchsdurchführung richtete sich nach Angaben des Herstellers. Auf einer 96-Well-Platte mit transparentem Boden und weißen Wänden wurden in Duplikaten 15.000 Zellen pro Well an P6 ausgesät. Die Zellen wurden zunächst für 12 Std. in Kulturmedium kultiviert. Im Anschluss wurden sie nach einem Waschschrift mit PBS für weitere 12 Std. mit Fettsäuren stimuliert. Die Platte wurde daraufhin auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Hinzugabe des Caspase-Glo Reagenz wurden die HPVEC für eine weitere Std. bei Raumtemperatur (RT) lichtgeschützt inkubiert. Die Positivkontrolle in Form einer induzierten Apoptose entstand durch Verdünnung von Staurosporin (100 µM gelöst in Dimethylsulfoxid, DMSO) auf 2µM in Kulturmedium und einer Expositionszeit von 6 Std. In den Negativkontrollen wurden HPVEC lediglich Kulturmedium ausgesetzt. Blank-Wells enthielten ausschließlich Caspase-Glo-Reagenz. Abschließend wurde das Lumineszenz-Signal ermittelt (GloMax Multi Detection System, Promega). Für Messergebnisse der Duplikate wurde ein Mittelwert berechnet und der Lumineszenz-Wert der Blank Wells wurde von den Messungen subtrahiert. Für die statistische Auswertung der Daten wurden das Verhältnis zur Negativkontrolle berechnet.

3.4.2. ELISA BrdU (colorimetric) – Zellproliferation

Die Zellproliferation wurde mit dem BrdU (Bromdesoxyuridin) - ELISA (Roche) kolorimetrisch ermittelt. Die Aussaat der Zellen erfolgte auf einer 96-Well-Platte mit 10.000 Zellen pro Well an P6. In einem ersten Schritt folgte zunächst die Inkubation in Kulturmedium für 12 Std. Nach Absaugen des Kulturmediums und Waschen der Zellen mit PBS folgten weitere 24 Std. der Inkubation in Stimulationsmedium, wobei das Stimulationsmedium einmalig nach 12 Std. erneuert wurde. Negativkontrollen und zellfreie Hintergrundkontrollen (Blank Wells) wurden mit ECM und 5% fettsäurefreiem BSA versetzt. Die Zellen wurden weitere 24 Stunden in Präsenz von BrdU inkubiert, indem sie der BrdU Labeling Solution aus BrdU Labeling Reagent und Kulturmedium (1:100, entsprechend 100 µM BrdU) ausgesetzt wurden. Es folgte die Fixierung der Zellen mit FixDenat für 30 Minuten bei RT. Nach Absaugen der Lösung wurden die HPVEC für 90 Minuten mit anti-BrdU-POD Working Solution bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung (1x PBS) und Entfernung der Reagenzien wurde ein BrdU-Substrat (Substrate Solution) zu den Zellen gegeben. Sobald ein Farbumschlag eintrat, begann die Zeitmessung. Ohne den Einsatz von Stop Solution wurde die Absorption bei einer Wellenlänge 370 nm (Referenzwellenlänge von 492 nm) nach 5, 10, 20 und 30 Minuten im Infinite® M200 PRO (Tecan) gemessen. Aus den Triplikaten der Messergebnisse nach 30 Minuten wurden Mittelwerte berechnet. Die Absorptionsdaten der Blank-Wells wurden von den Messungen der Proben subtrahiert. Die statistische Auswertung erfolgte in Relation zur Negativkontrolle.

3.4.3. β-Galaktosidase-Färbung – Seneszenz

Das Eintreten in den Zustand von Seneszenz in HPVEC wurde unter Einsatz des Biomarkers β- Galaktosidase untersucht. Die Expression und Aktivität des Enzyms β-Galaktosidase ist mit dem Zustand zellulärer Seneszenz assoziiert. So zeigt sich durch Färbung mit X-Gal, einem Substrat der β-Galaktosidase, bei einem pH von 6 in seneszenten Zellen ein blauer Farbumschlag.⁸⁸ Der hier angewandte Versuchsaufbau entspricht dem von Kretschmer et al.⁸⁶, der in Anlehnung an Kipkeew et al.⁸⁹ entstand. Zur Ermittlung der Gesamtzahl aller Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

Die Zellen wurden mit 10.000 Zellen pro Well an P6 für 12 Std. in Kulturmedium inkubiert. Die Positivkontrolle enthielt die dreifache Zellmenge mit 30.000 Zellen pro Well. Es folgte nach zweimaligem Waschen mit PBS die Inkubation mit Stimulationsmedium für 48 Std. In diesem Zeitraum wurde das Medium nach 24 Std. einmalig erneuert. Daraufhin folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS (pH6), die Denaturierung der Zellen mit 60µl Fixierlösung pro Well für 5 Min.

bei Raumtemperatur und ein weiterer Waschvorgang. Die Zellen wurden für 12 Std. bei 37°C mit 60 µl pro Well unmittelbar davor angesetzter β -Gal Färbelösung behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellkerne bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit DAPI (1:1000 in PBS) gefärbt. Zum Schluss wurden die HPVEC mit 60 µl pro Well Methanol fixiert, das Methanol abgesaugt und 60 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Von jedem Well wurde eine lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung erstellt (EVOS FL Auto2, Life Technologies). Die Darstellung und Fotografie der β -Galaktosidase-Färbung erfolgte licht-, die der DAPI-Färbung fluoreszenzmikroskopisch. Für die Auswertung wurden seneszente Zellen mit β -Galaktosidase Nachweis in Relation zur Gesamtheit der Zellen im Bildausschnitt gesetzt. Aus den Ergebnissen der Triplikate wurden Mittelwerte erstellt. Final wurde das Verhältnis der Daten zur Negativkontrolle bestimmt. Die manuelle Auswertung der seneszenten Zellen anhand des mikroskopischen Bildmaterials erfolgte verblindet. Die Gesamtzellzahl wurde automatisiert mit der Softwares CellProfiler anhand der DAPI-Färbung ermittelt.

3.5. Zelluläre Funktionalität

3.5.1. Tube Formation – Angiogenese

Die Fähigkeit von HPVEC zur Angiogenese wurde mit dem Tube Formation Assay in Anlehnung an Arnaoutova et. al.⁹⁰ erfasst. Nach Aussaat der Zellen in Matrigel wurde sie einem zweidimensionalen Modell annäherungsweise anhand der Ausbildung von gefäßähnlichen Strukturen, sogenannten Tubes, ermittelt.

Zunächst wurde eine 96-Well μ -Platte (ibidi) für den Versuch vorbereitet. Die Wells wurden mit vorgekühlten Pipettenspitzen mit 10 µl pro Well wachstumsfaktorreduziertem und auf 4° C gekühltem Matrigel beschichtet. Eine Inkubation der Platte erfolgte für 1 Std. bei 37°C zur Polymerisation des Matrigels. Im Anschluss wurden die HPVEC an P8 mit 4000 Zellen pro Well in Stimulationsmedium ausgesät und für eine Std. inkubiert. Negativkontrollen enthielten lediglich Kulturmedium. Nach o.g. Zeitraum wurde jedes Well mit 20 µl Anti-Evaporation Oil versehen und die Platte wurde in ein Lichtmikroskop mit integriertem Inkubator überführt. Hier wurden die HPVEC nach einer Gesamtinkubationszeit von 12 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in 4-facher Vergrößerung fotografiert (EVOS FL Auto2, Life Technologies). Die Auszählung geschlossener Tubes erfolgte verblindet und manuell mit der Software ImageJ Fiji.

3.5.2. Endotheliale Zellverbindungen: VE-Cadherin, β -Catenin und CD31

Auswirkungen von Fettsäuren auf endotheliale Zell-Zell-Kontakte sollten anhand der Transmembranproteine VE-Cadherin und CD 31 und des intrazellulären Ankerproteins β -

Catenin analysiert werden. Im Western Blot sollte anhand einer semi-quantitativen Methode die relative Proteinmenge der o.g. Proteine in HPVEC untersucht werden. Entscheidend für die aktive Ausübung der Barrierefunktion ist jedoch neben des Proteinlevels der Zell-Zell-Kontakt-Faktoren auch die Lokalisation derer an der Zellmembran.⁹¹ Daher sollte mit dem Verfahren der Immunhistochemie anhand mikroskopischen Bildmaterials die genaue Lokalisation von VE-Cadherin untersucht und die aktive Beteiligung an der Vermittlung interzellulärer Kontakte dargestellt werden.

3.5.3. Proteinisolation

In Vorbereitung für den Western Blot wurden die HPVEC an P9 mit 1×10^5 Zellen/Well auf 6-Well Platten ausgesät und für 12 Std. in Kulturmedium inkubiert. Es wurde eine Einfachbestimmung angelegt. Die Stimulation mit Fettsäuren erfolgte für 24 Stunden. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und das Stimulationsmedium abpipettiert, bevor die HPVEC in zwei Schritten mit kaltem PBS gewaschen, von der Platte abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt wurden. Durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 400g für 3 Min. bei 4°C setzten sich Zellpellets am Grund des Reagenzgefäßes vom PBS-Überstand ab. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets wurden zur Proteinextraktion in 30-50 µl frisch angesetzten modifizierten RIPA-Puffer überführt. Darin wurden sie 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie einer erneuten Zentrifugation (18407 g, 4°C) für 5 Minuten unterzogen wurden. Der so isolierte Proteinüberstand wurde von den Zellpellets getrennt und bei -80 °C konserviert.

3.5.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im isolierten Proteinüberstand wurde das BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) eingesetzt.

Proteine reduzieren in alkalischem Milieu zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}). Durch Hinzufügen von Bicinchoninsäure (BCA) zu einwertigen Kupferionen (Cu^{1+}) entstehen Farbkomplexe, die kolorimetrisch ermittelt werden. Auf diese Weise kann die Proteinkonzentration der Proben quantifiziert werden.⁹² Der Versuch wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierten Proteinproben wurden in einer Doppelbestimmung 1:10 in RIPA-Puffer verdünnt. Eine Albumin-Standardreihe wurde durch die folgende Verdünnungsreihe von BSA (2mg/ml) in RIPA-Puffer angelegt: pur, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32. Blank-Wells enthielten lediglich RIPA-Puffer. Jeweils 10µl der verdünnten Proben oder Standards wurden mit 200 µl Working Reagent (aus dem mitgelieferten Reagenz A und B 50:1) auf eine transparente 96-Well Platte aufgetragen. Die Platte wurde für 30 Min. bei 37°C inkubiert und im Anschluss die optische Dichte photometrisch bei 562 nm gemessen (i-control, Tecan NanoQuant). Für die Auswertung

wurden Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen ermittelt. Anhand eines linearen Trenddiagramms aus der optischen Dichte der Albumin-Standardreihe konnte jeder isolierten Proteinprobe eine Gesamtproteinkonzentration zugeordnet werden.

3.5.5. Western Blot (semi-dry)

Im Western Blot sollte anhand eines semi-quantitativen Verfahrens über eine Lumineszenz-Messung⁹³ die relative Proteinmenge von VE-Cadherin, β -Catenin und CD31 in HPVEC ermittelt werden. Als Referenz diente ein Housekeeping-Protein (β -Actin), zu dem die Messergebnisse der zu untersuchenden Proteine in Relation gesetzt werden.

Via SDS-PAGE⁹³ erfolgte zunächst eine Größenaufftrennung der Proteine. Dafür wurde ein mehrschichtiges Polyacrylamid-Gel angefertigt. Der Anteil an Acrylamid bestimmt die Porengröße und somit die Laufgeschwindigkeit der Proteine unterschiedlicher Molekulargewichte. Das Stufengel wurde so gegossen, dass die Proteine zunächst das Sammelgel, dann zunächst ein 8%-iges und im Anschluss ein 10%-iges Trenngel durchlaufen (s. Tabelle 5: Polyacrylamid-Gele). Bei der SDS-PAGE hat die Eigenladung der Proteine keine Relevanz. Sie werden durch SDS denaturiert. Gleichzeitig bewirkt die Bindung an SDS in allen Proteinen eine negative Ladung, sodass sie im Rahmen der Gelelektrophorese ausschließlich nach Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Von jeder isolierten Proteinprobe wurden jeweils 10 μ g Protein mit vollentsalztem Wasser (VE-H₂O) auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l gebracht und mit 2,5 μ l 5x Probenpuffer versetzt. Das Gemisch wurde bei 70°C für 10 Min. inkubiert, abzentrifugiert und anschließend auf das Sammelgel aufgetragen. Außerdem wurde als Größenreferenz für die spätere Analyse ein standardisierter Marker (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) mit auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden via Gelelektrophorese mit 80 V für das Sammelgel und 120 V für das Trenngel in 1x Lämmli-Puffer nach Größe aufgetrennt. In einer semi-dry Blotting-Kammer (PeqLab) wurden die aufgetrennten Proteine vom Trenngel bei 1,3 mA/cm² auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (2 Std. bei RT). Als Transferpuffer diente eine Lösung aus 1x Towbin-Puffer mit 10% Methanol in VE-H₂O. Der Erfolg der Proteinübertragung wurde mithilfe einer Ponceau-Rot-Färbung überprüft. Zur Detektion der an die Membran gebundenen Proteine wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Blotten für 2 Min. in Ponceau S-Lösung geschwenkt und anschließend mit VE-H₂O differenziert. Vor Inkubation mit spezifischen Antikörpern wurde die Nitrocellulosemembran bei 100, 70, 55, 40 und 25 kDa Proteingröße getrennt. Die einzelnen Membranen wurden für 60 min bei RT in 5% Milch in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween® 20 (TBST) und 2% BSA blockiert, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden.

Die primären Antikörper, verdünnt in 5% Milch in TBST, wurden über Nacht bei 4°C schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST für jeweils 10 Min. bei RT folgte die Inkubation für 1 Std. bei RT mit einem Sekundär-Antikörper, verdünnt in 5% Milch TBST. Dieser bindet an den Primär-Antikörper, da er über spezifische Bindungsstellen für die Spezies des 1. Antikörpers verfügt (s. Tabelle 2: Antikörper). Nachfolgend wurde erneut dreimalig in TBST gewaschen.

Der Western Blot wurde mit ECL-Prime Western Blotting Detection Reagent entwickelt. Dazu wurde das Reagenz 1:1 gemischt und für eine Minute auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde das Lumineszenzsignal mit Hilfe des ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) aufgenommen, ebenso wie ein kolorimetrisches Bild vom Marker als Referenz zu den Proteingrößen. Die Densitometrie des Chemilumineszenz-Signals erfolgte mit der Software ImageLab (Bio-Rad).

3.5.6. Immunhistochemie

In Vorbereitung auf die Immunhistochemie wurden Cover Slips in einer 24-Well-Platte mit 100 µl pro Well Matrigel in einer 1:5 Verdünnung in Milli-Q®-Reinstwasser beschichtet. Die Polymerisationszeit betrug 1 Std. bei 37 °C. Im Anschluss wurden 80.000 Zellen pro Well (P9) auf den beschichteten Cover Slips in jeweils 500 µl Kulturmedium ausgesät. Nach 12-stündigem Anwachsen in Kulturmedium wurden die HPVEC mit PBS gewaschen und daraufhin für 24 Std. dem Stimulationsmedium ausgesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (Roti-Histofix phosphatgepuffert pH7, Carl Roth) bei RT fixiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Unspezifische Bindungsstellen wurden mittels Blocking Puffer (Sea Block, Thermo Scientific) 1 Std. lang bei RT mit 200 µl pro Well blockiert. Der Primär- Antikörper mit spezifischer Bindungsstelle für VE-Cadherin (s. Tabelle 3: Antikörper für Immunhistochemie) wurde 1:600 in Antibody Diluent verdünnt und mit 200 µl pro Well auf die Cover Slips aufgetragen. Die Inkubation der Zellen mit Primär-Antikörper erfolgte für 1,5 Std. bei RT. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen.

Ab hier fanden alle Arbeiten unter lichtgeschützten Bedingungen statt. Der CY3-konjugierte Zweit-Antikörper, der sich gegen die Spezies des Primärantikörpers richtet (s. Tabelle 3: Antikörper für Immunhistochemie), wurde 1:400 in Antibody Diluent verdünnt. Die Inkubation der HPVEC mit jeweils 200 µl pro Well Zweit-Antikörper erfolgte für 30 Min. bei RT. Es schlossen sich drei weitere Waschschriffe mit PBS an, bevor die Zellkerne für 15 Min. bei RT mit 200 µl pro Well DAPI (1:000 in PBS) gefärbt wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS und abschließend mit Milli-Q®-Reinstwasser gewaschen. Die Deckgläser

wurden den Wells entnommen und mit einem Eindeckungsmedium (Fluoromount™ Aqueous, Sigma Aldrich) auf Objektträger übertragen. Zur Auswertung sollten von jedem Präparat zehn zufällig gewählte Bildausschnitte in 40-facher Vergrößerung mikroskopisch aufgenommen werden (Leica SP8 konfokales Mikroskop). In den Ausschnitten sollten die Zellkerne anhand der DAPI-Färbung zur Bestimmung der Gesamtzellzahl ausgezählt werden. In einer zweiten Aufnahme sollte die Vermittlung membranständiger Kontakte durch die immunhistochemische Darstellung von VE-Cadherin beurteilt werden.

3.6. Statistische Methoden der Datenanalyse

Mithilfe der Software GraphPad Prism 10 wurden die Versuchsergebnisse statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Waren Versuche in Duplikaten bzw. Triplikaten durchgeführt worden, wurde zunächst der Mittelwert der Messergebnisse bestimmt und in Relation zur Negativkontrolle gesetzt. Der daraus entstandene Datensatz wurde dann mit dem D'Agostino- Pearson Test auf Normalverteilung geprüft. Von einer solchen konnte bei einer Stichprobengröße von $n=5$ in keinem der Datensätze ausgegangen werden, sodass ein non-parametrischer Test Anwendung fand. Die Messergebnisse wurden anhand des Kruskal-Wallis-Test ausgewertet, wobei eine Rangvarianzanalyse jeweils aller Gruppen einer Fettsäure und der Negativkontrolle erfolgte. Im Anschluss wurde für den paarweisen Vergleich jeder einzelnen Fettsäurekonzentration mit der Negativkontrolle eine non-parametrische Post-Hoc-Analyse via Dunn-Test durchgeführt. Unterschiede ab einem p-Wert von $<0,05$ gelten hier als statistisch signifikant und sind in den entsprechenden Grafiken markiert. Der Standardfehler (SEM, standard error of the mean) wurde stets im Rahmen der graphischen Darstellung mit angegeben.

4. Ergebnisse

3.7. Oxidativer Stress

Anhand des DCFDA Cellular ROS Assay Kits wurde in einer semi-quantitativen Methode das Vorliegen von ROS in HPVEC nach Stimulation mit Fettsäuren untersucht.

Nach Stimulation mit Linolsäure wurde ein erhöhtes Maß an ROS und somit oxidativem Stress in HPVEC nachgewiesen (s. Abbildung 1). Dabei zeigte sich ein gewisser Trend in Abhängigkeit von der Linolsäure-Konzentration. Ein sehr signifikanter Unterschied ($p=0,0036$) mit dem ca. 57-fachen Nachweis an ROS im Vergleich zur Negativkontrolle entstand nach Stimulation mit 200 μM Linolsäure. Hochgradig signifikant ($p>0,0001$) war das Ergebnis nach Stimulation mit einer Konzentration von 400 μM , welches ein ca. 126-faches Level an ROS und oxidativem Stress belegt. Obwohl auch eine niedrigkonzentrierte Linolsäureexposition mit 50 und 100 μM einen 2- bzw. 8-fachen ROS-Anstieg andeuteten, blieben die Unterschiede zur Negativkontrollen in diesen Bereichen ohne statistische Signifikanz. Die Stimulation der HPVEC mit 300 μM Ölsäure erzeugte das 13-Fache an ROS und somit oxidativem Stress in HPVEC ($p=0,0117$). Nach Exposition mit den übrigen Konzentrationen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle. Es zeichnete sich lediglich ab, dass nach Inkubation mit 200 und 500 μM tendenziell höhere, nach Inkubation mit 50 μM tendenziell niedrigere ROS-Level vorlagen. Nach Stimulation der HPVEC mit Palmitinsäure in den Konzentrationen 500, 700 und 1000 μM ließ sich kein Unterschied im ROS-Niveau im Vergleich zur Negativkontrolle feststellen. Die Exposition gegenüber 100 μM Palmitinsäure deutete ein geringeres Ausmaß an oxidativem Stress an, allerdings blieben alle Ergebnisse ohne Signifikanz.

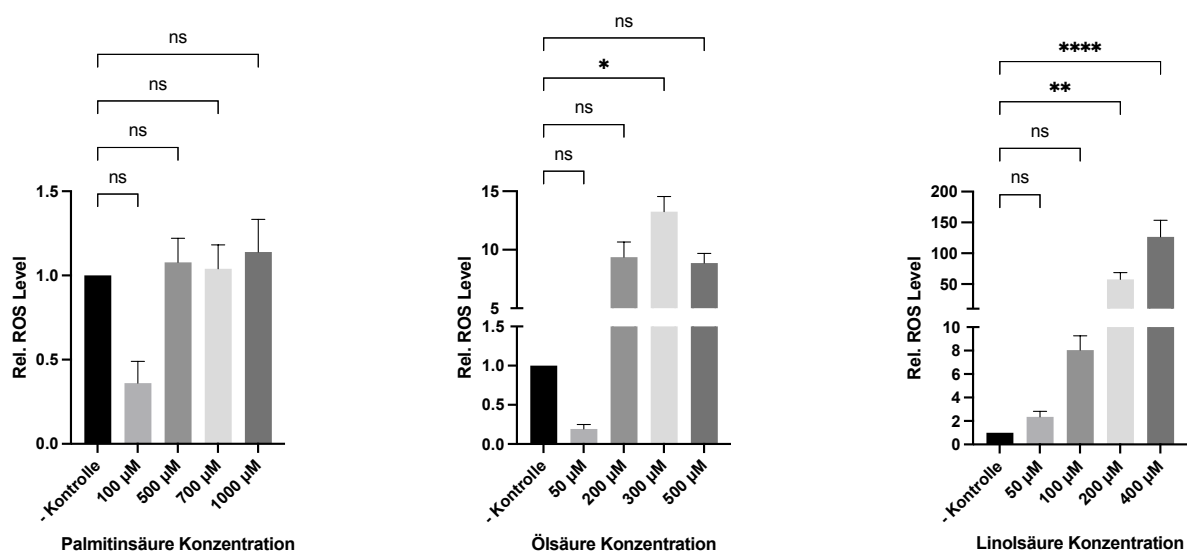


Abbildung 1: Relatives Vorkommen von ROS in HPVEC nach Stimulation mit Fettsäuren.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des DCFDA ROS Detection Kit Assay. Dargestellt sind die relativen Level an ROS in HPVEC nach 4-stündiger Stimulation mit Palmitin-, Öl- und Linolsäure in unterschiedlichen Konzentrationen. n=5 je Fettsäure und Konzentration. ns = nicht signifikant; * = p- Wert <0,05; ** = p- Wert <0,01; **** = p- Wert <0,0001

3.8. Zelluläre Homöostase

3.8.1. Apoptose

Mit dem Caspase-Glo 3/7 Assay wurde die Aktivität von Caspase-3 und -7 gemessen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle konnte dabei in der höchsten Palmitinsäure-Konzentration und in den höheren Linolsäure-Konzentrationen festgestellt werden (s. Abbildung 2). Nach Inkubation mit 1000 µM Palmitinsäure war die relative Apoptoserate 3-fach erhöht (p= 0,0231). 200 µM Linolsäure lösten einen 1,6-fachen Anstieg der Apoptose in HPVEC im Vergleich zur Negativkontrolle aus (p= 0,0340). Die höchste Signifikanz bot eine hochkonzentrierte Linolsäure-Exposition mit Verdopplung der relativen Rate apoptotischer Zellen (p= 0,0076). Die Stimulation mit Ölsäure zeigte lediglich einen Trend zur Apoptose, der allerdings keiner Signifikanz unterlag.

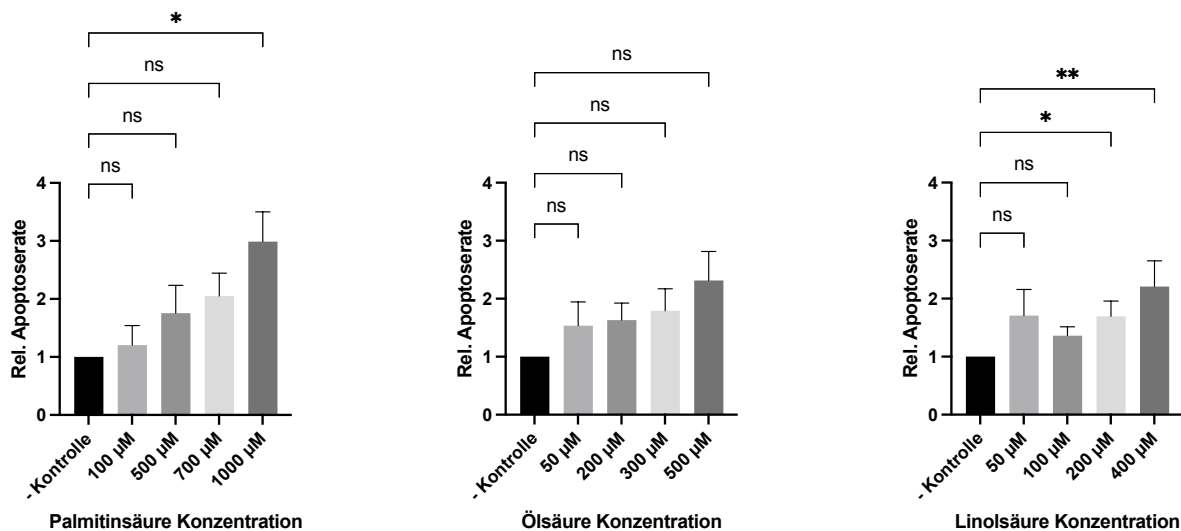


Abbildung 2: Relative Apoptoserate von HPVEC nach 12-stündiger Fettsäuren-Stimulation.

Die Grafik veranschaulicht die Ergebnisse des Caspase-Glo 3/7 Assay Kit. Die Messwerte unter Stimulation der HPVEC mit unterschiedlichen Konzentrationen an Palmitin-, Öl- und Linolsäure wurden in Relation zur Negativkontrolle gesetzt, nachdem Mittelwerte der Triplikate bestimmt worden waren. n=5 je Fettsäure und Konzentration. ns = nicht signifikant; * = p- Wert <0,05; ** = p- Wert <0,01

3.8.2. Proliferation

Mit Hilfe des BrdU Cell Proliferation ELISA wurde die Proliferationsrate von HPVEC unter Einfluss von Linol-, Öl- und Palmitinsäure untersucht. Unter Exposition gegenüber allen drei Fettsäuren zeigte sich ein signifikanter Abfall der Proliferationsrate (s. Abbildung 3). Nach Stimulation durch Palmitinsäure mit 500 ($p=0,0437$), 700 ($p=0,0177$) und 1000 μM ($p=0,0010$) korrelierte das Ausmaß der Signifikanz mit der Höhe der Fettsäure-Konzentration. Gleiches galt für die Linolsäure mit 100 ($p=0,0494$), 200 ($p=0,0177$) und 400 μM ($p=0,0042$). Auch die Stimulation mit Ölsäure in den Konzentrationen 200 ($p=0,0154$), 300 ($p=0,0494$) und 500 ($p=0,0076$) μM verringerte maßgeblich die Proliferationsrate der HPVEC.

Lediglich die Ergebnisse einer Stimulation mit niedrigkonzentrierter Palmitinsäure (100 μM , $p=0,3379$), Ölsäure (50 μM , $p=0,0890$) und Linolsäure (50 μM , $p=0,1241$) zeigten im Vergleich zur Kontrolle keine veränderte Proliferationsrate.

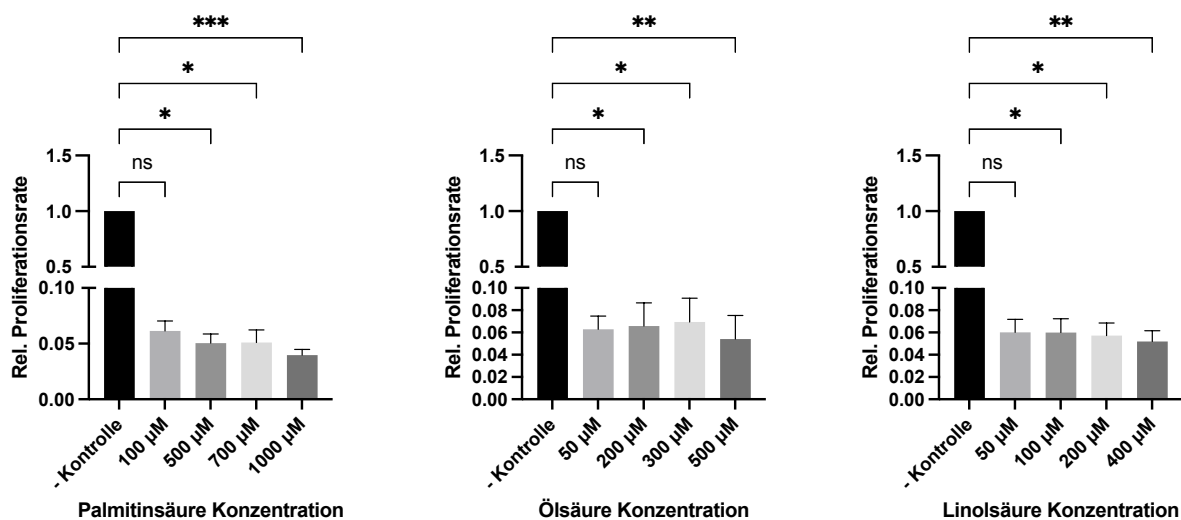


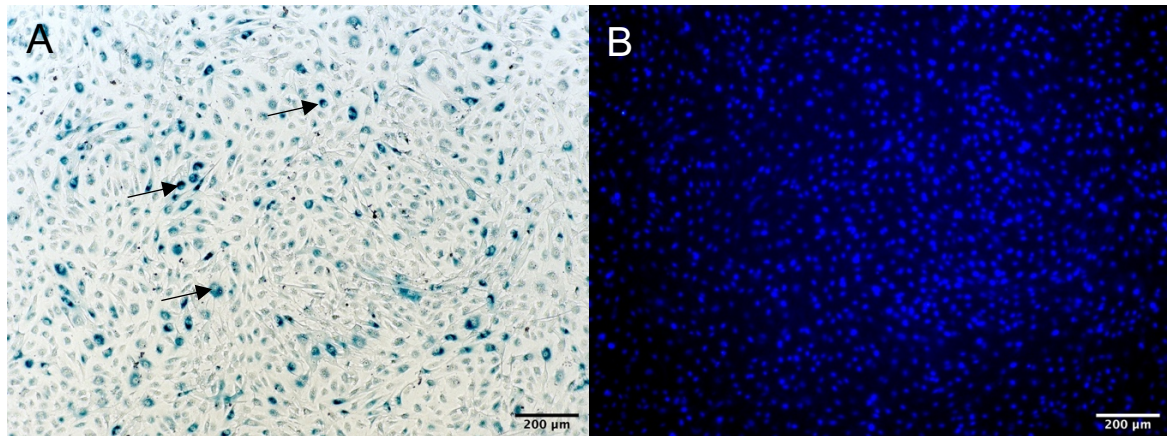
Abbildung 3: Relative Proliferationsrate von HPVEC nach 36-stündiger Stimulation mit Fettsäuren.

Die Grafik stellt die relative Proliferationsrate unter Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Palmitin-, Öl- und Linolsäure im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Die Daten wurden mit dem BrdU Cell Proliferation ELISA erhoben. $n=5$ je Fettsäure und Konzentration.

ns = nicht signifikant; * = p -Wert $<0,05$; ** = p -Wert $<0,01$; *** = p -Wert $<0,001$

3.8.3. Seneszenz

In der β -Galaktosidase Färbung wurde das Eintreten in die Seneszenz von HPVEC unter Einfluss von Fettsäuren untersucht. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Auswirkungen von Palmitin-, Öl- und Linolsäure auf die Seneszenzrate von HPVEC in Relation zur Negativkontrolle (s. Abbildung 4).



C

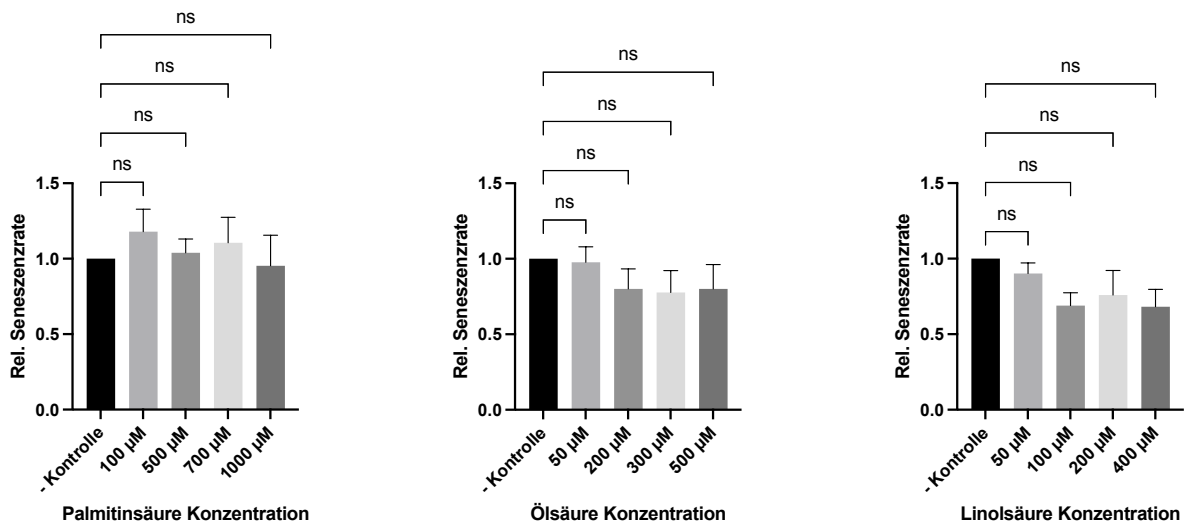


Abbildung 4: β -Galaktosidase- und DAPI-Färbung und relative Seneszenzrate von HPVEC nach 48-stündiger Fettsäuren-Stimulation.

A und B: Exemplarische Darstellung des im Rahmen des β -Galaktosidaseversuchs erstellten Bildmaterials (nach Farbkorrektur zur besseren Visualisierung). (A) β -Galaktosidasefärbung. Die Pfeile demonstrieren beispielhaft β -Galaktosidase positive HPVEC. (B) die DAPI-Färbung der Zellkerne. Skalierungsbalken = 200 μ m.

C: Die Seneszenzrate der HPVEC unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen an Palmitin-, Öl- und Linolsäure wurde anhand einer β -Galaktosidase Färbung untersucht und ist hier in Relation zur Negativkontrolle grafisch dargestellt. Die Versuchsdurchführung erfolgte in Triplikaten, aus denen für die weitere Auswertung jeweils der Mittelwert bestimmt wurde. n=5 je Fettsäure und Konzentration. ns = nicht signifikant

3.9. Zelluläre Funktionalität

3.9.1. Angiogenese

Zur Beurteilung der Funktionalität von HPVEC unter Einfluss von Fettsäuren wurde in der vorliegenden Arbeit das Potenzial zur Angiogenese mittels Tube Formation Assay untersucht. Durch *in vitro* Imitation einer Extrazellulärmatrix befähigte die Aussaat in Matrigel die Endothelzellen zur Ausbildung von gefäßähnlichen Strukturen, sogenannten Tubes (s.

Abbildung 5). Diese wurden anhand von mikroskopischem Bildmaterial ausgezählt und in ein Verhältnis zur Gesamtfläche des ausgewerteten Bildausschnitts gebracht (Tubes/inch²). Die Ergebnisse wurden in Relation zur Negativkontrolle ausgewertet. Die relative Rate an Tubes unterschied sich nach Stimulation nicht von der Negativkontrolle. Es konnte somit kein Effekt seitens Palmitin-, Öl- und Linolsäure auf die Tube Formation Kapazität von HPVEC nachgewiesen werden.

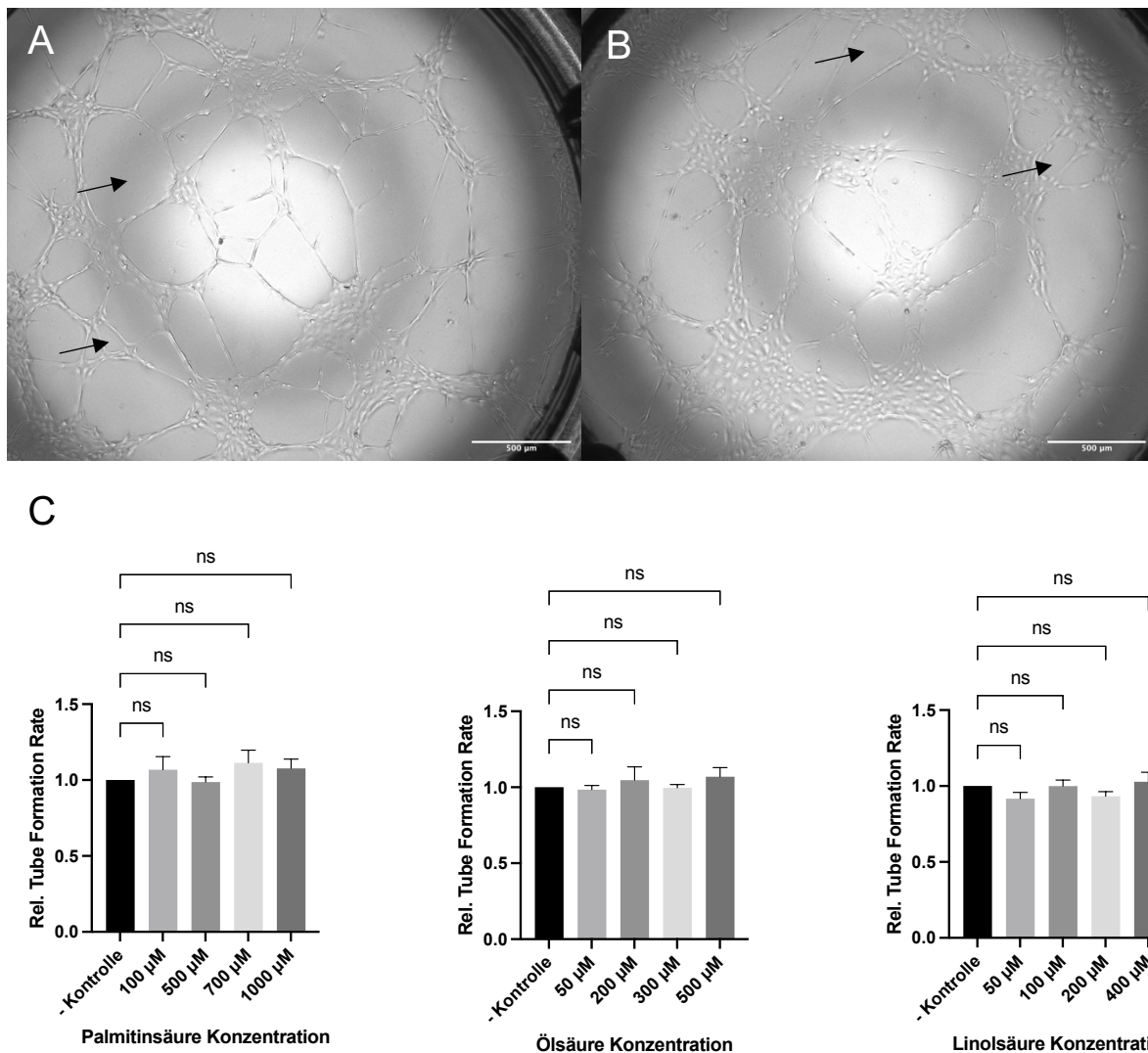


Abbildung 5: Tube Formation Assay und relative Tube Formation Rate von HPVEC nach 12-stündiger Stimulation mit Fettsäuren.

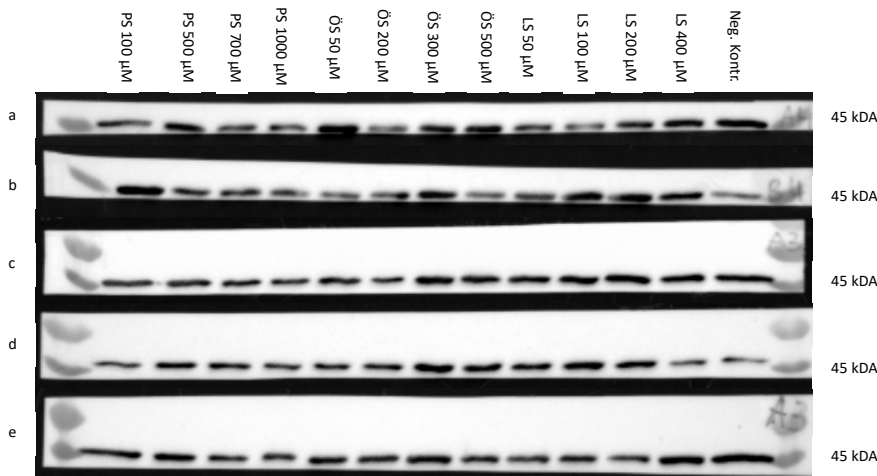
A und B: Exemplarische Darstellung des Tube Formation Assay. Die HPVEC wurden zuvor 12-Stunden in Matrigel inkubiert. Die Pfeile markieren beispielhaft geschlossene Tubes. Farbkorrektur zur besseren Visualisierung. Skalierungsbalken = 500 µm.

C: Die Angiogenese-Kapazität der HPVEC wurde anhand des Tube Formation Assay untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte in Triplikaten. Anhand dieser wurden Mittelwerte für die Rate an neu gebildeten Tubes/inch² pro Versuchsdurchlauf (n) kalkuliert, die dann in Relation zur Negativkontrolle gesetzt wurden. n=4 je Fettsäure und Konzentration. ns = nicht signifikant

3.9.2. Endothelverbindungsmarker VE-Cadherin, β -Catenin und CD31

Eine valide Analyse der Proteinlevel von VE-Cadherin, β -Catenin und CD31 unter Einfluss von Fettsäuren konnte nicht erfolgen, da eine belastbare Normalisierung auf das gewählte Housekeeping-Protein nicht möglich war. In Vorbereitung auf die Versuche wurden vier Housekeeping-Proteine in HPVEC getestet: HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), α -Tubulin und β -Actin. Bis auf β -Actin mussten alle der oben genannten Proteine primär ausgeschlossen werden, da sie im Vorversuch sehr variable Proteinlevel zeigten. β -Actin war im Rahmen der Testung am wenigsten von Irregularitäten betroffen und sollte daher als Housekeeping-Protein der Normalisierung dienen. Allerdings wurde im Versuchsverlauf deutlich, dass auch β -Actin keine ausreichend gleichmäßigen Proteinlevel in HPVEC nach Fettsäurestimulation aufweist. In der Densitometrie ist dabei kein eindeutiges Muster dieser Variabilität erkennbar (s. Abbildung 6).

A



B

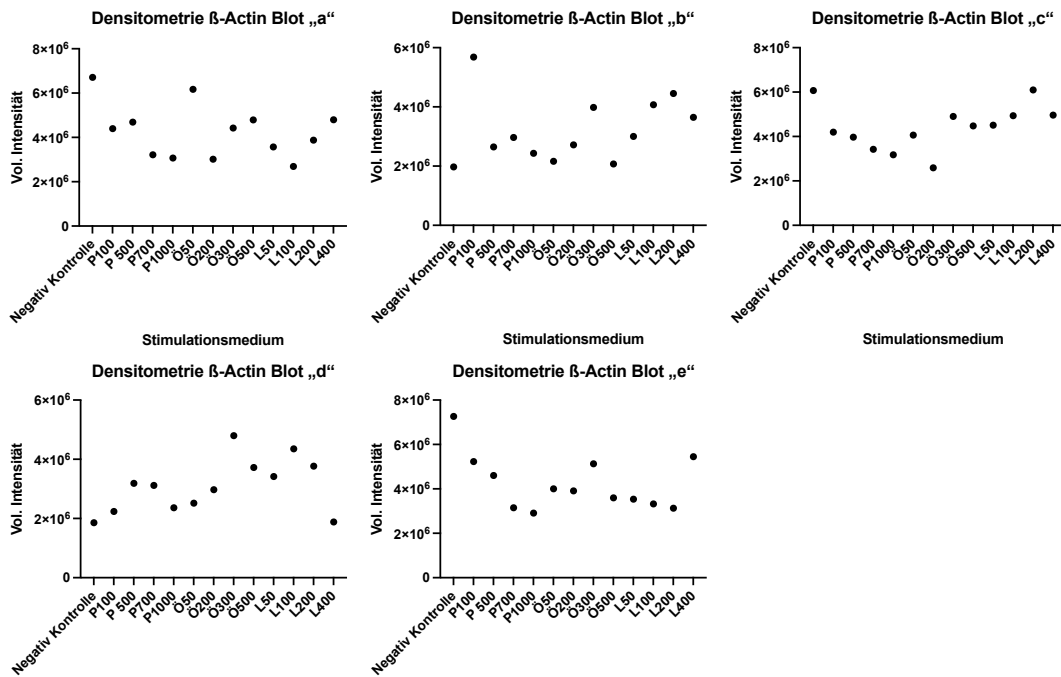


Abbildung 6: Western Blot und Densitometrie des Housekeeping-Proteins β -Actin.

A: Dargestellt sind die Western Blots des verwendeten Housekeeping Proteins β -Actin aus 5 verschiedenen Versuchsreihen (a-e). Die Beschriftung am oberen Bildrand verweist auf die jeweils verwendeten Stimulationsmedien in allen vertikal darunterliegenden Banden. Die Proteinlevel von β -Actin sind innerhalb der einzelnen Blots irregulär ausgeprägt. Diese Ungleichmäßigkeit folgt über die verschiedenen Blots hinweg keinem Muster. Betrachtet man exemplarisch β -Actin in Blot „a“ in der Negativkontrolle, ist es sichtbar stärker exprimiert als nach Stimulation mit 100 μ M PS. Im Blot „b“ verhält es sich umgekehrt und die Expression von β -Actin ist stärker nach Stimulation mit 100 μ M PS als in der Negativkontrolle.

PS = Palmitinsäure, ÖS = Ölsäure, LS = Linolsäure. Neg. Kontr. = Negativkontrolle.

B: Graphische Darstellung der Messergebnisse der Densitometrie von den jeweiligen Blots a-e. Die Y-Achse zeigt die Intensitätsmessung. Auf der X-Achse sind die Stimulationsmedien aufgetragen.

P= Palmitinsäure. Ö= Ölsäure. L= Linolsäure. Mit Konzentrationsangabe [μ M].

Aufgrund der Schwierigkeiten hinsichtlich der Normalisierung auf das Housekeeping-Protein wird hier lediglich ein Western Blot (D) als ausgewähltes Beispiel gezeigt (s. Abbildung 7). Die Darstellung ist nicht als exemplarisch zu betrachten.

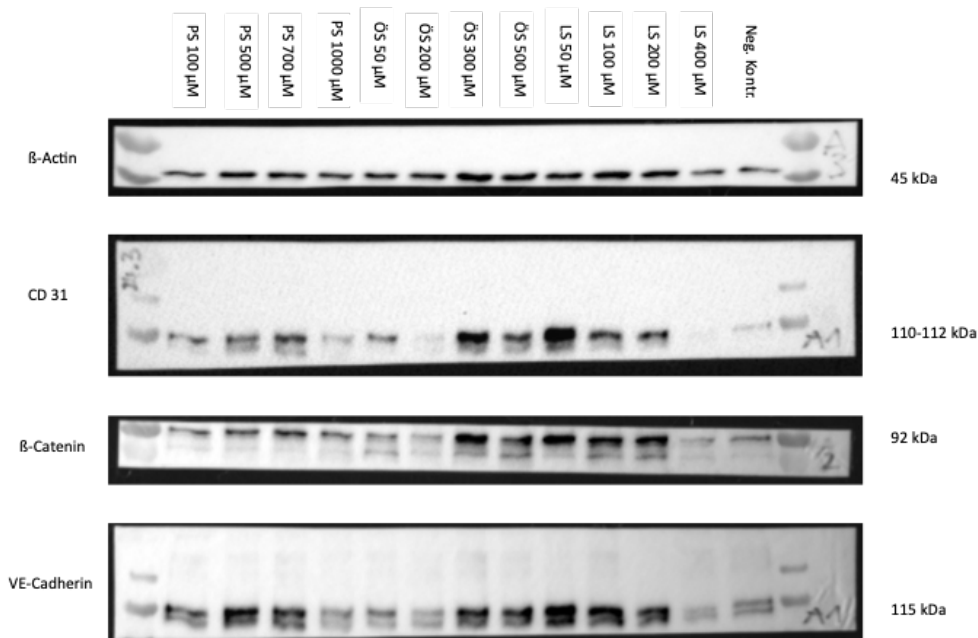


Abbildung 7: Endothelzell-Verbindungsmarker in HPVEC nach 24-stündiger Fettsäurestimulation.

Western Blot (D) von HPVEC nach 24-stündiger Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Fettsäuren. Detektiert wurden CD31, β -Catenin und VE-Cadherin, sowie das Housekeeping-Protein β -Actin zur Normalisierung.

PS = Palmitinsäure, ÖS = Ölsäure, LS = Linolsäure. Neg. Kontr. = Negativkontrolle.

3.9.3. Lokalisation des Endothelverbindungsmarkers VE-Cadherin als Marker von Adherens Junctions

Ziel der immunhistochemischen Färbung war die Detektion der Adherens Junctions, visualisiert durch die Detektion von VE-Cadherin, im Zellverband. Es sollte spezifisch die Akkumulation an der Zellmembran unter Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten nach Stimulation mit Fettsäuren untersucht werden. Zu diesem Zweck war das Ziel, einen kohärenten Zellrasen über die gesamte Fläche der Cover Slips auszusäen. Initial war, wie auch in den meisten übrigen Versuchen, eine Beschichtung mit Gelatine vorgesehen. Auf dieser Grundlage gelang es jedoch nicht, die HPVEC in einem Zellverband anwachsen zu lassen. Probatorisch wurden die Cover Slips mit Matrigel in unterschiedlichen Verdünnungen beschichtet, um die Ausbildung von Tubes zu vermeiden, aber ein Anhaften der Zellen auf dem Untergrund zu ermöglichen. In diesem Vorversuch erzielte eine 1:5 Verdünnung von Matrigel die besten Ergebnisse bezüglich der Ausbildung eines kohärenten Zellverbands und wurde daher als Beschichtung ausgewählt. In den nachfolgenden Stimulationsversuchen gelang allerdings keine zuverlässige Reproduktion dieser Bedingungen. Es bildeten sich größtenteils nur

einzelne Inseln mit zellulären Kontakten. Sie waren neben einzelnen Zellen und zellfreien Bereichen nicht in ausreichender Menge auf den Cover Slips gewachsen, um die Präparate nach der beschriebenen Methode mit 10 zufälligen Bildausschnitten pro Cover Slip valide auszuwerten. In Abbildung 8 sind exemplarische Aufnahmen der Präparate gezeigt, um einen Eindruck von der Problematik zu vermitteln.

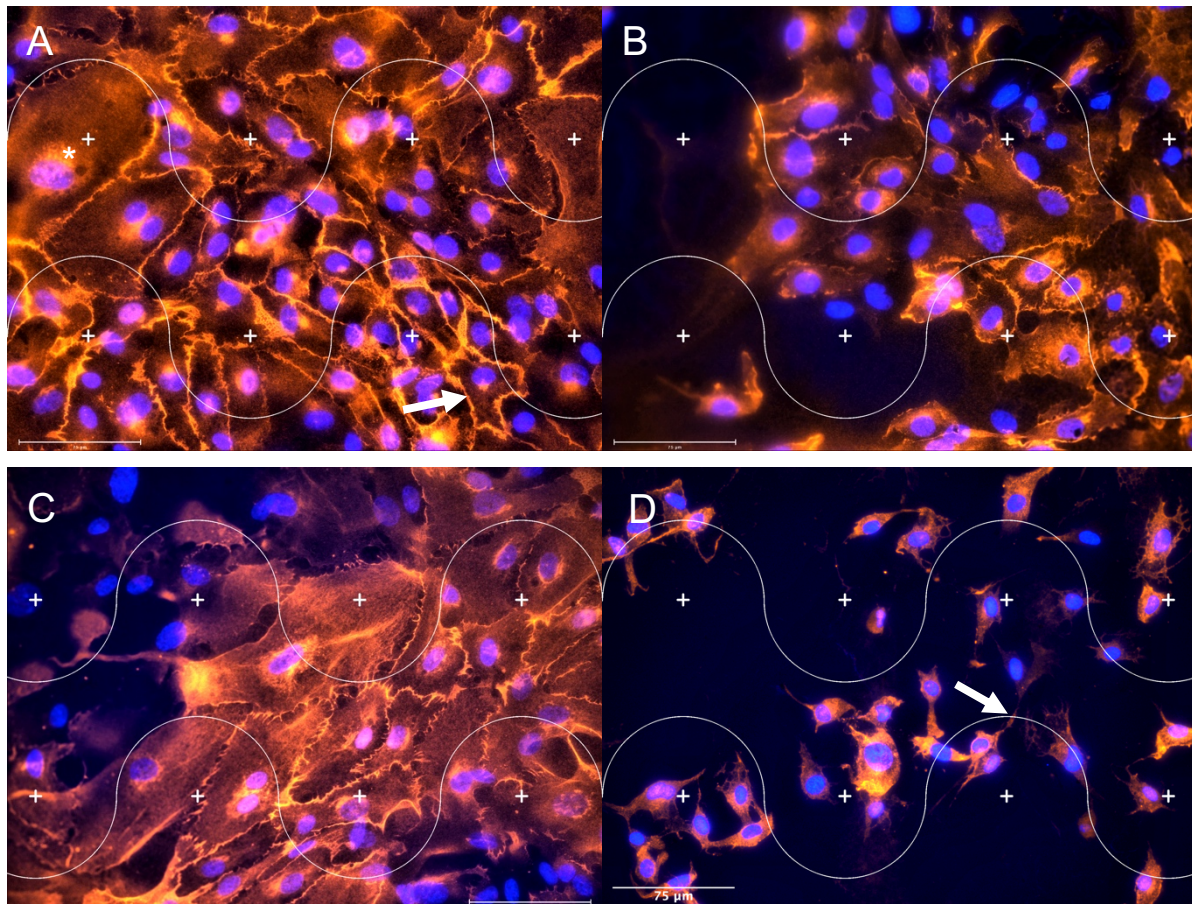


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von HPVEC zur Lokalisation von VE-Cadherin.

Detektion von VE-Cadherin (orange) mittels spezifischem Antikörper, sowie der Zellkerne mittels DAPI (blau) in HPVEC. Die Bilder wurden mit einem Grid versehen, um die vorgesehene Auswertungsmethode zu demonstrieren.

(A) Darstellung einer Zielaufnahme: die HPVEC wachsen in einem kohärenten Zellverband und bilden Zell-Zell-Kontakte aus. An den membranständigen Kontaktstellen sieht man eine Akkumulation von VE-Cadherin (Pfeil). Es ist teilweise auch im Zytosol in der Nähe von Zellkernen (*) erkennbar. In (B) und (C) ist die Bildung von Zellinseln zu sehen. Der HPVEC-Verband ist nicht in einem kohärenten Monolayer auf dem Untergrund angewachsen und die Zellen haben teilweise nicht die Möglichkeit miteinander in Kontakt zu treten. (D) demonstriert eine Probe mit singular vorliegenden Zellen, die allenfalls über Ausläufer (Pfeil) miteinander in Verbindung stehen. Skalierungsbalken = 75 µm.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit *in vitro* Eigenschaften humaner placentarer Endothelzellen (HPVEC) nach Stimulation mit Fettsäuren im Zellkulturmodell. Im Folgenden soll diskutiert werden, inwiefern die einleitende Fragestellung durch die Versuchsergebnisse beantwortet werden konnte. Aufgrund der Assoziation maternaler Adipositas bzw. Dyslipidämie und placentaren Störungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass freie Fettsäuren oxidativen Stress in HPVEC induzieren, der in einer endothelialen Dysfunktion resultiert. Einleitend sind bereits potenziell schädigende Auswirkungen von ROS auf Endothelzellen beschrieben worden. Vor dem Hintergrund der Versuchsergebnisse sollen hier vor allem die speziellen Eigenschaften einzelner Fettsäuren in Bezug auf oxidativen Stress und homöostatische Veränderungen anhand der Literatur eingeordnet werden.

4.1. Effekt von Linolsäure auf HPVEC

Nach Stimulation mit Linolsäure war ein erhöhter Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in HPVEC nachweisbar (s. Abbildung 1), der von Veränderungen der zellulären Homöostase begleitet wurde (s. Abbildung 2 und Abbildung 3). Besonders eine hochkonzentrierte Linolsäureexposition zeigte signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe mit erheblich erhöhten ROS-Leveln (57-fach mit 200 μM , 126-fach mit 400 μM), maßgeblich inhibierter Proliferation und gesteigerter Apoptose. Nach Stimulation mit niedrigeren Linolsäurekonzentrationen fand sich eine ähnliche Konstellation, jedoch blieben die Ergebnisse ohne statistische Signifikanz. Vor dem Hintergrund erhöhter ROS-Produktion scheint es plausibel, dass Linolsäure oxidativen Stress in placentaren Endothelzellen verursacht, der sich in einer gestörten Homöostase äußert. Ein Effekt auf die Tube Formation und den Seneszenz-Zustand der HPVEC konnte nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 4 und Abbildung 5).

Die erhöhte ROS-Produktion in HPVEC nach Linolsäureexposition steht im Einklang mit den Ergebnissen von Young et al., die einen ähnlichen Effekt in HUVEC zeigen konnten.⁹⁴ Cao et al. haben in Muskelzellen eine übermäßige Linolsäureexposition als Ursache für oxidativen Stress über die enzymatische Lipidperoxidation via 5-Lipoxygenase (5-LOX) definiert.⁹⁵ Da es sich hier um unterschiedliche Zellpopulationen handelt, ist eine direkte Übertragung dieser Zusammenhänge auf HPVEC nicht möglich. Allerdings wird 5-LOX auch von Endothelzellen exprimiert, setzt Leukotriene als Signalmoleküle frei und scheint in HUVEC eine VEGF-vermittelte pro-angiogenetische Wirkung zu entfalten.⁹⁶ Daher kann vermutet werden, dass Linolsäure über enzymatische Lipidperoxidation via 5-LOX oxidativen Stress in HPVEC hervorruft. Alternativ könnten die ausgeprägte ROS-Akkumulation der mit Linolsäure versetzten HPVEC zumindest anteilig auch Ausdruck einer nicht-enzymatischen

Lipidperoxidation sein. Sie kann einerseits von ROS eingeleitet werden und zugleich die Produktion von ROS steigern.^{97,98} Linolsäure qualifiziert sich als zweifach-ungesättigte Fettsäure für eine nicht-enzymatische Lipidperoxidation durch ROS. Es entstehen hochreaktive Lipidperoxyl-Radikale und Lipidperoxide, die durch die Oxidation zusätzlicher Fettsäuren eine lokale Kettenreaktion auslösen. Infolgedessen wird eine Lipidperoxidation weiter unterhalten.^{43,99} Der Prozess ist in Endothelzellen beschrieben worden.¹⁰⁰ Ein solcher Ablauf ist daher für HPVEC nach Linolsäureexposition denkbar. Das hier angewandte Versuchsprinzip zur Ermittlung von ROS basiert auf der Diffusion von DCFDA nach intrazellulär, wo es von zellulären Esterasen zu DCFH deacetyliert wird. ROS oxidiert DCFH zu fluoreszierendem 2'-7'-DCF (2',7'-Dichlorfluoreszein). Das ausgehende Fluoreszenzsignal von 2'-7'-DCF wird spektroskopisch gemessen. Allerdings kann DCFH auch von Peroxyl-Radikalen aus der Lipidperoxidation oxidiert werden, wohingegen Lipidperoxide keinen Einfluss auf 2'-7'-DCFDA-basierte Versuche nehmen.¹⁰¹ Folglich kommt prinzipiell eine Lipidperoxidation von Linolsäure in HPVEC als Ursache für den Exzess der ROS infrage. Die Konsequenzen wären nicht minder relevant für die endotheliale Integrität und Homöostase. Die Zellmembran enthält als Bestandteil von Phospholipiden ungesättigte Fettsäuren, die der Kettenreaktion ausgesetzt wären. Im Ergebnis der Lipidperoxidation käme es zu einer Schädigung der Zellmembran durch strukturelle Veränderungen dieser Phospholipide.^{41,45,100} Diese Überlegungen werden von einer älteren *in vitro* Studie an Endothelzellen von Herbst et. al. gestützt. Darin wurde gezeigt, dass die Stimulation von HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) mit Linolsäure zu einer Akkumulation von 4-Hydroxynonenal (4-HNE), einem Produkt der Lipidperoxidation von Linolsäure, führt. Die Stimulation in der Zellkultur mit 4-HNE induzierte in HUVEC eine erhöhte Apoptoserate, senkte die Zellviabilität und führte zu oxidativem Stress.¹⁰² Die Autoren schlossen zusätzlich vom Nachweis eines vermehrten Albumintransfers in PAEC (Porcine Aortic Endothelial Cells) nach 4-HNE-Stimulation auf eine gestörte endotheliale Barrierefunktion.¹⁰² Diverse Übersichtsarbeiten weisen auf die Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress, Lipidperoxidation und verschiedenen Formen des Zelltods hin.^{97,98,103-105} In Anbetracht dieser Arbeit ist besonders der Zelltod durch Apoptose hervorzuheben. Zum einen wird beschrieben, dass ROS durch Lipidperoxidation die mitochondriale Membran degradiert und dadurch die Apoptose über Cytochrom-C und Caspase-3 vermittelt. Zum anderen wird insbesondere 4-HNE eine besondere Bedeutung zugesprochen. Es initiiert eine apoptotische Signalkaskade, die in der Aktivierung von Caspase-3 mündet.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen unserer Versuche, da die Linolsäurestimulation neben der ROS-Akkumulation auch die Apoptose von HPVEC maßgeblich begünstigte. Die Bedeutung von 4-HNE für die Apoptose von HPVEC wurde hier nicht untersucht und bleibt daher unklar. Vor dem Hintergrund der Literatur scheint ein Zusammenhang allerdings plausibel. Anzumerken ist in diesem Kontext, dass Linolsäure

keine zelluläre Seneszenz in HPVEC induziert hat, obwohl die Entstehung von 4-HNE⁴⁸ und ROS dieses Potenzial durchaus für Endothelzellen birgt.³¹ 4-HNE löst beispielsweise in humanen Trophoblasten⁴⁷ und in primären bovinen Aorten-Endothelzellen Seneszenz aus.⁴⁸ Hier handelt es sich jedoch um Versuche an einer anderen Zellpopulation der humanen Plazenta bzw. um Endothelzellen, die gänzlich anderen Ursprungs sind, als HPVEC. ROS können prinzipiell sowohl pro-, als auch antiangiogenetisch auf Endothelzellen wirken (vergleiche Übersicht von Huang et. al.⁴¹). Kretschmer et. al. haben im Tiermodell gezeigt, dass eine Hochfettdiät eine plazentare Vaskularisierungsstörung hervorruft.⁸⁶ Hier konnte allerdings, trotz des Nachweises erhöhter ROS-Level und einer eingeschränkten Proliferation, keine Veränderung der Angiogenese-Kapazität von HPVEC durch einen direkten Einfluss von Linolsäure bestätigt werden. Die Zellkultur ist ein vereinfachtes Modell einer Zellpopulation und kann daher nicht die Interaktionen zwischen HPVEC und benachbarten plazentaren Strukturen widerspiegeln. Ähnliches gilt für den Tube Formation Assay, der zwar in einem zweidimensionalen Modell theoretisch Rückschlüsse auf die *in vitro* Angiogenese-Kapazität der HPVEC erlaubt, aber kein vollständiges Abbild der komplexeren *in vivo* Angiogenese bieten kann. Die Hochfettdiät aus Kretschmer et. al. beinhaltete zudem nicht nur Linolsäure, sondern eine Kombination aus verschiedenen im Gehalt erhöhten Fettsäuren.⁸⁶ Darüber hinaus muss angenommen werden, dass Fettsäuren ihre Wirkung im Tiermodell anders entfalten können als in der Zellkultur auf ein isoliertes Zellsystem.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit Hinweise auf die Induktion von oxidativem Stress in HPVEC nach Linolsäurestimulation, da sie eine Koinzidenz von erhöhter ROS-Akkumulation und einer gestörten Homöostase, als Ausdruck einer endothelialen Schädigung, zeigen. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen werden auf Grundlage der Ergebnisse nicht abschließend geklärt werden können, sodass tiefgreifendere Untersuchungen erforderlich sind. Murphy et. al. fassen diese Problematik in einer Übersichtsarbeit zusammen. Sie weisen ausführlich darauf hin, dass die Erfassung von ROS als Gesamtheit ohne eine Differenzierung der individuellen Akteure aus dieser Gruppe ungeeignet ist, um die molekularen Mechanismen hinter einer Schädigung durch oxidativen Stress und die Rolle einzelner ROS z.B. für zelluläre Signalkaskaden zu erkennen und zu verstehen.⁹⁹ Die Bedeutung von Linolsäure-Metabolisierung durch 5-LOX in Bezug auf oxidativen Stress in HPVEC bleibt unklar. Dass der Einfluss einer Lipidperoxidation von Linolsäure auf die Ergebnisse der ROS-Messung unter Anwendung von 2'-7'-DCFDA nicht ausgeschlossen werden kann, wirft eine Alternativhypothese für die Einordnung der Versuchsergebnisse auf. Vor diesem Hintergrund gilt es daher auch die potenziell schädigenden Radikale aus der Lipidperoxidation zu identifizieren. Zur Bestätigung dieser Annahme wäre gegebenenfalls eine Ergänzung durch einen Lipidperoxidations-Versuch auf Grundlage einer Messung von 4-Hydroxynonenal, einem Metaboliten der Linolsäure-Peroxidation, zielführend.¹⁰⁸

Sowohl die vorliegenden Ergebnisse als auch die folglich aufgeworfenen Fragen könnten wegweisend für das Verständnis plazentarer Störungen in Verbindung mit maternalen metabolischen Veränderungen sein. Anhand humaner Plazenten konnten Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress, Lipidperoxidation und dem Zelltod in der Entstehung einer late-onset Präeklampsie demonstriert werden.¹⁰⁹ Die Präeklampsie ist dabei nur eines von vielen Beispielen für Schwangerschaftskomplikationen bzw. plazentare Störungen, die im Rahmen maternaler Adipositas auftreten können.⁹⁻¹¹ Linolsäure liefert den größten Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der menschlichen Diät.^{110,111} Als essenzielle Fettsäure muss sie über die Ernährung zugeführt werden und endogene Metabolite der Linolsäure-Peroxidation können nachweislich diätetisch gesenkt werden.¹¹¹ Die diätetische Zufuhr konjugierter Linolsäure könnte protektiv gegen oxidativen Stress wirken.¹¹² Es bedarf weiterer Forschung, um die metabolischen Einflüsse auf die komplexen Strukturen der humanen Plazenta und die Ätiologie plazentarer Störungen im Rahmen maternaler Adipositas zu verstehen. Sollten sich negative Auswirkungen von exzessiven Linolsäurekonzentrationen im Rahmen einer maternalen Dyslipidämie auf die maternofetale Interaktionszone bestätigen, wäre die diätetische Kontrolle ein möglicher präventiver Ansatz zur Förderung von maternaler und fetaler Gesundheit. Linolsäure ist zugleich essenziell für die fetale Entwicklung.¹¹³ Insbesondere der hier erbrachte Nachweis einer konzentrationsabhängigen Schädigung von HPVEC durch Linolsäure könnte dann ein Hinweis für Notwendigkeit einer Abgrenzung zwischen physiologischen und toxischen Linolsäure-Serumspiegeln sein.

4.2. Effekt von Palmitinsäure auf HPVEC

Die Stimulation von HPVEC mit Palmitinsäure wirkte sich negativ auf die zelluläre Homöostase aus. So war die Proliferation unabhängig von der Palmitinsäurekonzentration deutlich eingeschränkt (s. Abbildung 3), während die Apoptoserate mit zunehmender Konzentration der Fettsäure stieg (s. Abbildung 2). Auswirkungen auf die ROS-Level zeigten sich nicht (s. Abbildung 1), sodass nicht davon auszugehen ist, dass die Effekte auf oxidativen Stress zurückzuführen sind. Vielmehr müssen andere Ursachen des homöostatischen Ungleichgewichts in Betracht gezogen werden. Dies steht teilweise im Widerspruch zu den *in vitro* Effekten der Fettsäure auf Endothelzellen, die von Khoi et. al. in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst worden sind. Palmitinsäure wurde vielfach als Auslöser von oxidativem Stress mittels ROS-Produktion beschrieben. Die Untersuchungen an humanen Zellen erfolgten im Wesentlichen anhand von HUVEC und arteriellen Endothelzellen. Die verwendeten Palmitinsäurekonzentrationen lagen meist zwischen 100 und 500 μM .¹¹⁴ Sie befanden sich damit in ähnlichen bzw. teilweise niedrigeren Bereichen als in der vorliegenden Arbeit. Die Induktion von Apoptose und die negativen Folgen auf die Zellproliferation werden in HUVEC einerseits durch ROS bzw. oxidativen Stress vermittelt. Palmitinsäure fördert

sowohl die Aktivität der NADPH-Oxidase als auch die Expression der Isoformen NOX-2 und -4 des Enzymkomplexes, woraus ROS resultieren.^{115,116} Sowohl ROS als auch Palmitinsäure inhibieren die Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt) Signalkaskade und damit die Dephosphorylierung und Aktivierung von eNOS. Dies resultiert neben der Reduktion der NO-Produktion in der Aktivierung der Caspase-3 und leitet damit die Apoptose ein.¹¹⁶⁻¹²⁰ Die durch Palmitinsäure verursachte endotheliale Dysfunktion entsteht außerdem durch Schädigung des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien.¹¹⁴ Ein Herabsetzen des mitochondrialen Membranpotenzials durch Palmitinsäure führt zu einer intrazellulären Freisetzung der mitochondrialen DNA. Daraus resultiert eine Einschränkung der zellulären Proliferation über die Inaktivierung des Hippo-YAP Signalwegs.¹²¹ Die Veränderungen der Apoptose- und Proliferationsrate von HPVEC scheinen vor dem Hintergrund der o.g. molekularen Mechanismen plausibel. Sie decken sich mit der aktuellen Datenlage zum Einfluss von Palmitinsäure auf Endothelzellen, wobei von einigen Autoren anstelle der Proliferation die Zellviabilität untersucht worden ist.¹¹⁶⁻¹²³ Für die Signalwege PI3K/Akt und Hippo-YAP ist außerdem die Inhibition der Angiogenese durch Einwirkung von Palmitinsäure beschrieben worden.^{121,124-126} Eine eingeschränkte Tube Formation nach Palmitinsäurestimulation konnte in HPVEC nicht beobachtet werden (s. Abbildung 5). Ähnlich verhält es sich mit ihrem fehlenden Einfluss auf die Seneszenz von HPVEC (s. Abbildung 4), da die Ergebnisse auch hier im Widerspruch zu den Erkenntnissen anderer Autoren stehen. Palmitinsäure ist als Auslöser von Seneszenz in Endothelzellen identifiziert worden, was unter anderem mit der Produktion von ROS in Verbindung gebracht wird,¹²⁷⁻¹²⁹ welche in unserem System nicht induziert wurde.

Vor dem Hintergrund der hinreichend untersuchten pro-oxidativen Wirkung von Palmitinsäure auf die Homöostase von Endothelzellen müssen die Ergebnisse der ROS-Detektion in Frage gestellt werden. Es ist lediglich für sehr niedrige Palmitinsäurekonzentrationen (0,5 µM) eine anti-oxidative Wirkung in Endothelzellen beschrieben worden.¹³⁰ In HPVEC zeigte sich eine reduzierte ROS-Rate nach Stimulation mit 100 µM Palmitinsäure. Die anti-oxidative Wirkung der Fettsäure ist aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz dennoch nicht anzunehmen. Da es sich bei dem angewandten Versuch zur ROS-Detektion um ein semi-quantitatives Verfahren handelt, ist zu beachten, dass die nachweislich veränderte Apoptoserate der HPVEC zu Ungunsten der Zellzahl (pro Well) nach Stimulation mit Palmitinsäure auch die Ergebnisse der ROS-Detektion beeinflusst haben könnte. Zudem sind im Zusammenhang mit der *in vitro* Stimulation mit Palmitinsäure auch andere Formen des Zelltods, wie Nekroptose und Ferroptose, in Endothelzellen beschrieben worden,¹¹⁴ die hier nicht untersucht worden sind. Eine signifikant reduzierte Gesamt-Zellzahl würde sich folglich auch auf den Umsatz von DCFDA zu DCFH durch zelluläre Esterasen auswirken, die der Oxidation zu fluoreszierendem 2'-7-DCF durch ROS vorangeht. Dies ist in der statistischen Datenanalyse nicht berücksichtigt

worden, da allen genannten Experimenten semi-quantitative Messverfahren zu Grunde lagen. Andererseits ist anzumerken, dass die Apoptoserate nach 12-stündiger Inkubation mit Palmitinsäure untersucht worden ist, wohingegen der ROS-Gehalt nach einer kürzeren Stimulationsdauer von 4 Stunden gemessen wurde, sodass anhand der vorliegenden Daten der Einfluss der vermehrten Apoptose auf die Testergebnisse des ROS-Assay nicht zu ermitteln ist und eher unwahrscheinlich erscheint. In Aorten-Endothelzellen von Mäusen wurde eine deutliche Abhängigkeit der Zellviabilität von der Stimulationsdauer und der Konzentration von Palmitinsäure im Stimulationsmedium gezeigt.¹²³ Zhu et. al. berichten zwar zugleich von erhöhter ROS-Produktion, vermehrter Apoptose und reduzierter Zellviabilität in HUVEC, verwendeten allerdings zur Stimulation nur Palmitinsäurekonzentrationen bis 200 μM .¹²² Aufschluss über die Bedeutung der Zellviabilität bei der Interpretation der ROS-Level in Versuchen mit HPVEC könnte eine zusätzliche Untersuchung der Zellviabilität nach 4-stündiger Fettsäurestimulation liefern.

Palmitinsäure bildet den größten Anteil an freien Fettsäuren im menschlichen Serum¹³¹ und maternale Adipositas ist mit erhöhten Palmitinsäure-Spiegeln assoziiert⁶³. Rhee et. al. haben zudem gezeigt, dass HUVEC im Hinblick auf oxidativen Stress insbesondere sensibel auf dynamische Schwankungen der Konzentration von Palmitinsäure reagieren.¹³² Der Einfluss von Palmitinsäure auf einzelne Bestandteile der maternofetalen Interaktionszone ist zwar untersucht worden, allerdings sind HPVEC insgesamt eine in Studien unterrepräsentierte Zellpopulation. Die Stimulation von Trophoblasten mit Palmitinsäure führte beispielsweise zu erhöhten pro-inflammatorischen Markern, ROS-Produktion und Apoptose.¹³³ Aus der humanen Plazenta isolierte Makrophagen reagierten ebenfalls mit der Sekretion pro-inflammatorischer Marker und apoptotischem Zelltod auf eine Palmitinsäurestimulation.¹³⁴ Zusammenfassend scheint Palmitinsäure das Potenzial für die Induktion plazentarer Störungen zu besitzen und die Pathogenese impliziert ein homöostatisches Ungleichgewicht, oxidativen Stress, Inflammation und Vaskularisierungsstörungen. Diverse molekulare Mechanismen einer durch Palmitinsäure verursachten Endothelzellschädigung sind bekannt. Lediglich eine Störung der Homöostase von HPVEC durch Palmitinsäure konnte hier bestätigt werden. Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Bezug zu oxidativem Stress oder zum Angiogenese- und Seneszenz-Verhalten von HPVEC erlauben, scheint vor dem Hintergrund der wissenschaftlichen Datenlage die Bedeutsamkeit dieser Faktoren für eine Palmitinsäure-induzierte endotheliale Dysfunktion dennoch plausibel und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.3. Effekt von Ölsäure auf HPVEC

Eine Stimulation mit Ölsäure hat in HPVEC die ROS-Produktion induziert (s. Abbildung 1) und die Proliferation eingeschränkt (s. Abbildung 3). Es konnte keine signifikante Veränderung der Apoptoserate festgestellt werden (s. Abbildung 2). Auf die Angiogenese und Seneszenz von HPVEC hatte die Ölsäurestimulation keine Auswirkungen (s. Abbildung 4 und Abbildung 5). Die Hypothese, dass Ölsäure oxidativen Stress in HPVEC und somit eine Störung der zellulären Homöostase verursacht, scheint insgesamt plausibel.

Im Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 2 und Insulinresistenz wurde bislang eine überwiegend protektive Wirkung von Ölsäure auf Endothelzellen beschrieben. Im Hinblick auf Untersuchungen von plazentaren Störungen ist die Fettsäure unterrepräsentiert. Dies gilt auch für die Erforschung molekularer Mechanismen, über die Ölsäure auf Endothelzellen einwirkt, ohne dass eine Beteiligung anderer Zellpopulationen (z.B. Makrophagen) oder die Auswirkungen auf andere Organsysteme einbezogen werden. Das Zellkulturmodell bildet diese komplexen Zusammenhänge des menschlichen Organismus nicht ab, sodass hier nur auf die direkte Wirkung von Ölsäure auf Endothelzellen eingegangen werden soll.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Ölsäure das Potenzial birgt, oxidativen Stress in Endothelzellen zu verursachen. Eine erhöhte ROS-Produktion von Endothelzellen konnte nach hochkonzentrierter Ölsäurestimulation (3000-4000 μM) durch Gremmels et al. nachgewiesen werden. Sie suggerieren, dass diese primär von einer mitochondrialen Entkoppelung verursacht wird, da eine Inhibition der Succinatdehydrogenase (mitochondrialer Komplex II) die ROS-Level unter Ölsäureexposition senkte.¹³⁵ Ihre Annahme wird einerseits dadurch gestützt, dass auch in HUVEC eine mitochondriale Dysfunktion nach Ölsäure-Exposition beschrieben worden ist.¹³⁶ Andererseits konnten andere Autoren durch Ölsäure allein keine Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials in HUVEC auslösen, wenn sie nicht gemeinsam mit Palmitin- und Linolsäure appliziert worden war.¹³⁷ Auf eNOS entfaltet Ölsäure zweierlei Wirkung. Die Insulin-vermittelte Enzymaktivität von eNOS wird einerseits durch die Fettsäure herunterreguliert,^{135,138,139} andererseits fördert sie den PI3K/Akt/eNOS Signalweg, der in einer Aktivierung von eNOS resultiert.¹⁴⁰ eNOS wirkt in seiner regulären Funktion mittels NO-Produktion anti-oxidativ, kann im Falle einer Enzymenkoppelung oxidativen Stress auch aggravieren.⁴² Für die Redox-Homöostase ist die Bedeutung des Effekts von Ölsäure auf eNOS bislang nicht beschrieben. Ein Zusammenhang ist denkbar, allerdings wurde über eine geringe Expression von eNOS in mikrovaskulären plazentaren Endothelzellen berichtet.¹⁴¹

Rehmann et. al. haben in einer Übersicht die protektive Funktion von Ölsäure auf die mitochondriale Funktion und oxidativen Stress samt molekularen Mechanismen zusammengefasst. Allerdings nehmen sie ausschließlich Bezug auf Untersuchungen, die nicht

an Endothelzellen durchgeführt worden sind, sondern beispielsweise pankreatische Betazellen, Muskel- und Gliazellen.¹⁴²

Homöostatische Veränderungen in Endothelzellen durch Ölsäure-Stimulation sind bislang unabhängig von der Frage nach oxidativem Stress beschrieben worden. Ölsäure kann *in vitro* mit Konzentrationen von 200 bis 400 μM in HUVEC die Apoptose einleiten, vermutlich im Rahmen einer Aktivierung der Proteinphosphatase Typ 2C.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Artwohl et. al. haben ebenfalls eine pro-apoptotische Wirkung von Ölsäure mit einer Konzentration von 300 μM auf HUVEC in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer festgestellt. Nach 24-stündiger Stimulation zeigte sich keine Auswirkung auf die Apoptoserate, die erst nach einer Expositionsdauer von 48 Stunden anstieg. Sie war allerdings nicht so ausgeprägt wie nach Stimulation mit anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren.¹⁴⁶ Der Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultiert daher möglicherweise auch aus der kürzeren 12-stündigen Stimulationsdauer von HPVEC mit Ölsäure. Die Apoptoserate war zwar erhöht, jedoch unterlagen die Ergebnisse keiner statistischen Signifikanz. In der vorliegenden Arbeit äußerte sich die homöostatische Störung von HPVEC nach Ölsäurestimulation vielmehr in einer erheblich reduzierten Proliferationsrate. Ölsäure kann *in vitro* zur Reduktion der Zellviabilität von HUVEC führen,¹³⁶ wobei die Ätiologie der verringerten Zellzahl unklar ist, da von den Autoren die Apoptose und Proliferation nicht explizit untersucht worden sind. Niedrige Ölsäurekonzentrationen bis 50 μM haben *in vitro* anti-oxidative Qualitäten für Endothelzellen und eine protektive Wirkung vor Viabilitätsverlust und Apoptose gezeigt.^{130,147} Nach Stimulation mit 50 μM Ölsäure wiesen HPVEC niedrigere ROS-Level im Vergleich zur Negativkontrolle auf. Allerdings blieb das Ergebnis ohne statistische Signifikanz, sodass ein anti-oxidativer Effekt auf Grundlage dieser Analyse nicht belegt werden kann.

Zusammenfassend scheint die nachgewiesene konzentrationsabhängige pro-oxidative und schädigende Wirkung von Ölsäure in HPVEC plausibel, wobei die Angaben in der Literatur teilweise widersprüchlich sind. Einige *in vitro* Effekte scheinen sich in Abhängigkeit von der Fettsäurekonzentration und der Dauer der Exposition zu entfalten, zumal es auch Hinweise auf anti-oxidative Effekte von Ölsäure auf Endothelzellen gibt. Die vorliegenden Untersuchungen im Zellkulturmodell bilden keinesfalls die komplexen Prozesse des menschlichen Organismus *in vivo* ab. Protektive und schädigende Effekte von Ölsäure auf HPVEC können theoretisch auch durch die Einwirkung der Fettsäure auf andere Organe und Zellen entstehen. Es bedarf weiterer *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen, um die Bedeutung erhöhter Ölsäurespiegel im Rahmen maternaler Adipositas für plazentare Störungen zu verstehen.

4.4. Zell-Zell-Kontakte: VE-Cadherin, β -Catenin und CD31

Eine Analyse hinsichtlich der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten durch HPVEC auf Grundlage der durchgeführten Versuche war nicht möglich. Daher sollen die Methoden der Immunfluoreszenzfärbung und des Western Blots zur Messung der Proteinlevel der Zell-Zell-Kontakt Komponenten an dieser Stelle diskutiert werden.

Im Western Blot sollten zunächst die Kontaktproteine VE-Cadherin, β -Catenin und CD31 quantifiziert werden. Die Schwierigkeit ergab sich aus der Auswahl der Housekeeping-Proteins für die semi-quantitative Auswertungsmethode. Vorab waren HPRT, α -Tubulin, GAPDH und β -Actin als potenzielle Housekeeping-Proteine an mehrfachen Proben unstimulierter HPVEC getestet worden, wovon nur Letzteres eine ausgeglichenes Proteinlevel aufzuweisen schien. Allerdings ergab sich in der Versuchsdurchführung durch starke Variation der Proteinlevel ein starker Hinweis auf eine Regulation von β -Actin. Der bestimmende Faktor der Regulation kann nicht identifiziert werden, weil die Intensität der β -Actin-Banden versuchsübergreifend sowohl innerhalb der Gruppen einzelner Fettsäurekonzentrationen als auch innerhalb der Gruppe der unstimulierten HPVEC stark schwankte (s. Abbildung 6). Es ist denkbar, dass die Stichprobengröße ($n=5$) zu klein ist, um ein Muster in der Variabilität zu erkennen. Fuenzalida et. al. haben β -Actin als Ladekontrolle für Western Blots an primär isolierten Endothelzellen aus placentaren Villi verwendet und nicht von einer Problematik der inhomogenen Proteinlevel der Ladekontrolle berichtet.¹⁴⁸ So kann vermutet werden, dass das Passagealter der HPVEC eine Auswirkung auf die inhomogenen Level von β -Actin genommen haben könnte. Gestützt wird diese Annahme durch eine ältere Arbeit von Galustian et. al., in der die Autoren auf den negativen Einfluss eines höheren Passagealters auf den β -Actin-Protein nachweis in der Immunfluoreszenzfärbung von mikrovaskulären placentaren Endothelzellen hinweisen.¹⁴⁹ Jedoch ist die Immunfluoreszenzfärbung als Methode in ihrer Aussagekraft für die Quantifizierung von Proteinleveln kritisch zu hinterfragen. Eine Passagenvarianz ist als Einflussfaktor nicht ausgeschlossen, da die Western Blots für den Stimulationsversuch an HPVEC der beieinanderliegenden Passagen 8 und 9 durchgeführt worden sind und es bleibt offen inwiefern das höhere Passagealter die Variabilität der Proteinlevel innerhalb des Experiments beeinflusst. Im Zusammenhang mit der Exposition mit Stimulationsmedien, die nachweislich oxidativen Stress verursachen, könnte außerdem die Regulation von eNOS durch β -Actin für die Eignung als Housekeeping-Protein bedeutsam sein.^{150,151} Ob oxidativer Stress die Proteinlevel von β -Actin beeinflussen könnte, ist unklar. β -Actin ist teilweise aufgrund dieser Variabilität als problematisches und „unzuverlässiges“ Housekeeping-Protein beschrieben.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Wang et. al. schlagen anstelle der Verwendung eines Housekeeping-Proteins die Ponceau-S-Färbung als eine Referenz vor, die auf der Detektion der Gesamtproteinmenge basiert und potenziell mehr Belastbarkeit bietet. Dabei weisen sie

darauf hin, dass die Bedingungen der Färbung gegenüber der üblichen Methode zu modifizieren sind, um seine Zuverlässigkeit als Referenz zu optimieren.¹⁵³ Für die Überprüfung des Proteintransfers auf die Nitrozellulose-Membran ist in der vorliegenden Arbeit zwar eine Ponceau-S-Färbung durchgeführt worden, allerdings waren die Bedingungen im Hinblick auf die Verwendung als Referenzgröße nicht ausreichend kontrolliert, um sie nachträglich als solche zu nutzen. Zusammenfassend wäre entweder eine Untersuchung an HPVEC jüngeren Passagealters mit β -Actin als Ladekontrolle oder die Etablierung einer an Wang et. al. angelehnten Ponceau-S-Färbung als Alternative zur Verwendung eines Housekeeping-Gens als Referenz eine Möglichkeit, um die Proteinlevel von VE-Cadherin, β -Catenin und CD31 in HPVEC nach Fettsäurestimulation zu untersuchen.

Um das VE-Cadherin intrazellulär zu lokalisieren und somit Adherens-Junction-vermittelte Zell-Zell-Kontakte immunhistochemisch zu identifizieren, war das Anwachsen der HPVEC in einem Monolayer gewünscht. Gelatine erwies sich für die Beschichtung von Glas Cover Slips als ungeeignet, da HPVEC keinen kontinuierlichen Zellrasen darauf ausbilden konnten. Ein Monolayer entstand zwar in Testversuchen an HPVEC durch Beschichtung der Cover Slips mit verdünntem Matrigel (1:5 in Milli-Q®). Der Effekt war jedoch in den anschließenden Experimenten nicht ausreichend reproduzierbar (s. Abbildung 8), um eine valide Auswertung anhand zufällig ausgewählter Bildausschnitte zu gewährleisten. In der Literatur finden Immunfluoreszenzfärbungen an placentaren mikrovaskulären Zellen hauptsächlich Erwähnung im Hinblick auf die Isolation von primären Zellen aus placentarem Gewebe für die Zellkultur. Immunhistochemische Methoden im Rahmen von Stimulationsversuchen mit HPVEC sind in der Literatur bislang unterrepräsentiert. Leach et. al. ist es in einer älteren Arbeit gelungen, primär aus placentaren Villi extrahierte Endothelzellen auf mit Gelatine beschichteten Coverslips für die Immunfluoreszenzfärbung zu kultivieren. Die Zellzahl, die die Autoren für die Aussaat und die 48-stündige Inkubation verwendet haben, ist in der Publikation nicht genauer spezifiziert. Betrachtet man die darin demonstrierten Abbildungen, lässt sich ein ähnliches Wachstumsmuster ohne Ausbildung eines kohärenten Monolayers nur vermuten. Die Autoren verweisen darauf, dass sowohl die Auswahl der Bestandteile der Extrazellulärmatrix als auch die Selektion der Zellpopulation durch höheres Passagealter den Phänotyp der Endothelzellen beeinflussen. Elektronenmikroskopisch haben sie Unterschiede in der interzellulären Kontaktausbildung zwischen *in vivo* Endothelzellen aus histologischen Schnitten placentarer Villi und den auf Gelatine ausgesäten *in vitro* kultivierten Endothelzellen festgestellt. Die Autoren weisen auf die Bedeutung von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix hin, die eine Annäherung an das *in vivo* Potenzial der interzellulären Kontakte bieten könnten.¹⁵⁵ In einer weiteren Publikation haben die Autoren weiteres exemplarisches Bildmaterial der Immunfluoreszenz-Färbung von VE-Cadherin in starker Vergrößerung demonstriert, das einen Monolayer villöser placentarer Endothelzellen zeigt. Allerdings

impliziert die dortige Fragestellung keinen Bedarf an der Reproduzierbarkeit des Wachstumsmusters, z.B. im Rahmen von Stimulationsversuchen.¹⁵⁶ So bleibt unklar, inwiefern Kohärenz des Monolayers innerhalb einer Probe bzw. eine zuverlässige Reproduzierbarkeit anhand der Methodik gegeben ist. Letzteres gilt auch für die Immunfluoreszenzfärbung an primären villösen plazentaren Endothelzellen von Jinga et. al., die von histomorphologischen Veränderungen ab Passage 12 berichten. Sie demonstrieren außerdem, dass die *in vitro* Morphologie des kultivierten endothelialen Zellverbands stark abhängig von der erreichten Konfluenz ist.¹⁵⁷ In der vorliegenden Arbeit wurde, wie auch in den Vorversuchen, ausschließlich mit Zellen der Passage 9 gearbeitet. Dennoch ist denkbar, dass das Erreichen des gewünschten Wachstums durch die Verwendung eines früheren Passagealters erleichtert werden könnte.

Die HPVEC wurden im Rahmen unserer Versuche durch die Aussaat in Matrigel-Bestandteilen einer Extrazellulärmatrix ausgesetzt. Die teilweise beobachtete Ausbildung von Tubes ist wahrscheinlich auf die darin enthaltenen Komponenten zurückzuführen, die die Angiogenese stimulieren. Das Vorliegen zellfreier bzw. -armer Areale neben konfluenten Zellinseln von HPVEC könnte hinweisend darauf sein, dass die zur Aussaat verwendete Zellzahl, entgegen der Ergebnisse in den Vorversuchen, zu gering ist. Einflussfaktoren könnten außerdem die Veränderung von Apoptose- und Proliferationsraten durch Fettsäurestimulation sein. Dagegen spricht jedoch, dass fehlende Kohärenz auch in den Negativkontrollen beobachtet worden ist. Insgesamt wird deutlich, dass eine Optimierung der Methodik notwendig ist, um stabile Versuchsbedingungen zu schaffen, die eine Immunfluoreszenzfärbung im Hinblick auf die intrazelluläre Lokalisation von VE-Cadherin in HPVEC ermöglichen. Das Material für die Beschichtung der Cover Slips, die zur Aussaat verwendete Zellzahl und das Passagealter der Zellen sind dabei maßgebliche Variablen.

Erkenntnisse über die Lokalisation von VE-Cadherin sind, neben der Quantität in der Expression von Zell-Zell-Kontaktproteinen, bedeutsam, wenn Auswirkungen von Fettsäuren auf die Barrierefunktion und Permeabilität des Endothels untersucht werden sollen. Eine Translokation von VE-Cadherin in zellulären Vesikeln von der Zellmembran in Richtung Zytoplasma ist mit einer gesteigerten Permeabilität des Zellverbands assoziiert.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

4.5. Limitationen, Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ausgewählte freie Fettsäuren das Potenzial bergen, oxidativen Stress in HPVEC auszulösen und auf Grundlage einer Disruption der endothelialen Homöostase zu plazentaren Störungen beizutragen. Linol-, Öl- und Palmitinsäure beeinflussen das homöostatische Gleichgewicht, indem sie die Proliferation von HPVEC einschränken und bzw. oder die Apoptoserate steigern. Gleichzeitig akkumulieren

vermehrt ROS nach Linol- und Ölsäurestimulation. Auf die Tube Formation und Seneszenz von HPVEC nimmt keine der Fettsäuren Einfluss.

Die Versuchsreihe wurde ausschließlich *in vitro* anhand eines Zellkulturmodells durchgeführt und wird somit nicht der anatomischen und pathophysiologischen Komplexität der *in vivo* Bedingungen gerecht. Stimulationsversuche in der Zellkultur bieten den Vorteil, die isolierten Effekte von einzelnen Fettsäuren auf HPVEC darzulegen und ermöglichen unter Umständen die eindeutige Identifikation potenziell schädigender Substanzen. Gleichzeitig schränkt dieses Modell die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen oder das Tiermodell ein. Protektive oder zusätzlich schädigende Faktoren durch Einfluss freier Fettsäuren aufeinander oder auf die übrigen zellulären Strukturen der maternofetalen Interaktionszone finden keine Beachtung.^{137,161,162} Die Ergebnisse verweisen lediglich auf die isolierten Konsequenzen einer direkten Fettsäure-Exposition auf plazentare Endothelzellen. Insbesondere handelt es sich bei den Untersuchungen im Hinblick auf oxidativen Stress lediglich um den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies. Oxidativer Stress ist allerdings durch eine gestörte Homöostase von Pro- und Antioxidantien definiert.^{32,33}

Die Verwendung semi-quantitativer Messverfahren ist insofern kritisch zu betrachten, da sich zum Teil maßgebliche Auswirkungen auf die Zellzahl der einzelnen Probenpopulationen aufgrund homöostatischer Einflüsse von Fettsäuren gezeigt haben. Der Einfluss, den eine signifikant reduzierte Proliferations- und eine erhöhte Apoptoserate auf die Ergebnisse der übrigen Versuche nehmen, konnte daher nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. Eine Möglichkeit einen solchen Effekt auszuschließen, wäre das Zählen von Duplikat-Zellen nach der Stimulation. Der Tube Formation Versuch und die β -Galaktosidase-Färbung sind von diesem Effekt nicht betroffen, da die Auszählung in ein Verhältnis zur analysierten Bildfläche bzw. Gesamtzellzahl des Bildausschnittes gesetzt wurde. Das Ausbleiben der Seneszenz nach Fettsäurestimulation bei erhöhten ROS-Leveln steht im Widerspruch zu den Angaben in der Literatur, wo ROS als Auslöser zellulärer Seneszenz beschrieben worden sind.³¹ Auch die Tube Formation-Kapazität blieb von der Fettsäurestimulation in allen Fällen unbeeinflusst, obwohl eine Inhibition der Proliferation nachweisbar war. Allerdings handelt es sich bei dem Versuch lediglich um ein *in vitro* Abbild der Angiogenese von HPVEC. Er ist als zweidimensionale Annäherung an das funktionelle Potenzial der HPVEC zu betrachten und kann letztlich der komplexen Funktion der Angiogenese *in vivo* nicht gerecht werden. Die Untersuchungen zur Funktionalität der HPVEC sollten weiterhin durch eine Optimierung der Methodik (Western Blot, Immunfluoreszenzfärbung) um die Betrachtung der Kontaktproteine VE-Cadherin, β -Catenin und CD31 vervollständigt werden. Stabile Zell-Zell-Verbindungen sind für die Regulation der Permeabilität des endothelialen Zellverbands wesentlich.¹⁵⁸ Außerdem könnte ein Permeabilitäts-Assay zusätzliche Erkenntnisse zu der Barrierefunktion von HPVEC liefern. Dafür müssten die HPVEC jedoch auch ein dichtes Monolayer bilden.

Weil die Untersuchungen nicht weit genug reichen, um direkte Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu erlauben, kann nur auf potenzielle Zusammenhänge vor dem Kontext der wissenschaftlichen Literatur verwiesen werden. So ermöglicht die vorliegende Arbeit es nicht, die beobachteten homöostatischen Veränderungen mit Sicherheit oxidativem Stress zuzuweisen. Für die Beantwortung tiefgreifenderer Fragen sind weitere Versuche notwendig. Insgesamt sind HPVEC in der experimentellen Erforschung plazentarer Störungen unterrepräsentiert, sodass die Einordnung überwiegend in Anlehnung an andere primären endotheliale Zellpopulationen erfolgen muss. Es ist wichtig anzumerken, dass die Eigenschaften makrovaskulärer Endothelzellen sich von mikrovaskulären unterscheiden können.¹⁶³ Gerade aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen an HPVEC erforderlich, um die Zusammenhänge zwischen Veränderungen im maternalen Metabolismus bei Übergewicht bzw. Adipositas und Schwangerschaftskomplikationen auf Grundlage plazentarer Störungen zu verstehen. Die vorliegende Arbeit weist auf die Notwendigkeit einer weiteren Auseinandersetzung mit der Bedeutung freier Fettsäuren für oxidativen Stress und eine endotheliale Dysfunktion im Bereich der maternofetalen Interaktionszone hin.

5. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Regional Office for Europe. (2022). WHO European Regional Obesity Report 2022. World Health Organization. Regional Office for Europe. Lizenz: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://iris.who.int/handle/10665/353747>. (accessed Zuletzt geöffnet: 11.12.2024).
2. WHO. WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva, Switzerland) & World Health Organization. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. 2000. <https://iris.who.int/handle/10665/42330> (accessed Zuletzt geöffnet: 11.12.2024).
3. IQTIG. IQTIG. Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen. Bundesauswertung Perinatalmedizin: Geburtshilfe Erfassungsjahr 2022, Veröffentlichungsdatum: 20. Juli 2023.
4. Santos S, Voerman E, Amiano P, et al. Impact of maternal body mass index and gestational weight gain on pregnancy complications: an individual participant data meta-analysis of European, North American and Australian cohorts. *BJOG* 2019; **126**(8): 984-95.
5. Persson M, Razaz N, Edstedt Bonamy AK, Villamor E, Cnattingius S. Maternal Overweight and Obesity and Risk of Congenital Heart Defects. *J Am Coll Cardiol* 2019; **73**(1): 44-53.
6. Tanner D, Ramirez JM, Weeks WB, Lavista Ferres JM, Mitchell EA. Maternal Obesity and Risk of Sudden Unexpected Infant Death. *JAMA Pediatr* 2024; **178**(9): 906-13.
7. Aune D, Saugstad OD, Henriksen T, Tonstad S. Maternal body mass index and the risk of fetal death, stillbirth, and infant death: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2014; **311**(15): 1536-46.
8. Tanner LD, Brock, Chauhan SP. Severity of fetal growth restriction stratified according to maternal obesity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2022; **35**(10): 1886-90.
9. Louwen F, Kreis NN, Ritter A, Yuan J. Maternal obesity and placental function: impaired maternal-fetal axis. *Arch Gynecol Obstet* 2024; **309**(6): 2279-88.
10. Kelly AC, Powell TL, Jansson T. Placental function in maternal obesity. *Clin Sci (Lond)* 2020; **134**(8): 961-84.
11. Beneventi F, Bellingeri C, De Maggio I, et al. Placental pathologic features in obesity. *Placenta* 2023; **144**: 1-7.
12. Brett KE, Ferraro ZM, Yockell-Lelievre J, Gruslin A, Adamo KB. Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int J Mol Sci* 2014; **15**(9): 16153-85.
13. O'Brien K, Wang Y. The Placenta: A Maternofetal Interface. *Annu Rev Nutr* 2023; **43**: 301-25.
14. Larqué E, Ruiz-Palacios M, Koletzko B. Placental regulation of fetal nutrient supply. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013; **16**(3): 292-7.
15. Tetro N, Moushaev S, Rubinchik-Stern M, Eyal S. The Placental Barrier: the Gate and the Fate in Drug Distribution. *Pharm Res* 2018; **35**(4): 71.
16. Arumugasaamy N, Rock KD, Kuo CY, Bale TL, Fisher JP. Microphysiological systems of the placental barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 2020; **161-162**: 161-75.
17. Sun C, Groom KM, Oyston C, Chamley LW, Clark AR, James JL. The placenta in fetal growth restriction: What is going wrong? *Placenta* 2020; **96**: 10-8.
18. Cindrova-Davies T, Sferruzzi-Perri AN. Human placental development and function. *Semin Cell Dev Biol* 2022; **131**: 66-77.
19. Burton GJ. Microscopic Survey. In: Baergen RN, Burton GJ, Kaplan CG, eds. Benirschke's Pathology of the Human Placenta. Cham: Springer International Publishing; 2022: 15-22.
20. Burton GJ. Placental Types. In: Baergen RN, Burton GJ, Kaplan CG, eds. Benirschke's Pathology of the Human Placenta. Cham: Springer International Publishing; 2022: 23-38.
21. Burton GJ. Basic Structure of a Placental Villus. In: Baergen RN, Burton GJ, Kaplan CG, eds. Benirschke's Pathology of the Human Placenta. Cham: Springer International Publishing; 2022: 59-109.

22. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; **370**(1663): 20140066.
23. Charnock-Jones DS, Jauniaux E, Burton GJ. The Placental Circulations. In: Baergen RN, Burton GJ, Kaplan CG, eds. Benirschke's Pathology of the Human Placenta. Cham: Springer International Publishing; 2022: 171-204.
24. Burton GJ, Charnock-Jones DS, Jauniaux E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction* 2009; **138**(6): 895-902.
25. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004; **84**(3): 869-901.
26. Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, et al. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* 1995; **129**(1): 203-17.
27. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol* 2016; **23**(3): 253-9.
28. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell* 2013; **26**(5): 441-54.
29. Wadsack C, Desoye G, Hiden U. The fetoplacental endothelium in pregnancy pathologies. *Wien Med Wochenschr* 2012; **162**(9-10): 220-4.
30. Liu B, Dai Z. Fatty Acid Metabolism in Endothelial Cell. *Genes (Basel)* 2022; **13**(12).
31. Bloom SI, Islam MT, Lesniewski LA, Donato AJ. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nat Rev Cardiol* 2023; **20**(1): 38-51.
32. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; **82**(2): 291-5.
33. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014; **224**: 164-75.
34. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021; **20**(9): 689-709.
35. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; **82**(1): 47-95.
36. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2011; **25**(3): 287-99.
37. Fisher JJ, Bartho LA, Perkins AV, Holland OJ. Placental mitochondria and reactive oxygen species in the physiology and pathophysiology of pregnancy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2020; **47**(1): 176-84.
38. Hernansanz-Agustín P, Enríquez JA. Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *Antioxidants (Basel)* 2021; **10**(3).
39. Aldosari S, Awad M, Harrington EO, Sellke FW, Abid MR. Subcellular Reactive Oxygen Species (ROS) in Cardiovascular Pathophysiology. *Antioxidants (Basel)* 2018; **7**(1).
40. Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**(10): 2175-83.
41. Huang YJ, Nan GX. Oxidative stress-induced angiogenesis. *J Clin Neurosci* 2019; **63**: 13-6.
42. Li H, Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2013; **13**(2): 161-7.
43. Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(9).
44. Yadav DK, Kumar S, Choi EH, Chaudhary S, Kim MH. Molecular dynamic simulations of oxidized skin lipid bilayer and permeability of reactive oxygen species. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 4496.
45. Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J* 2007; **93**(12): 4225-36.
46. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 5080843.

47. Tasta O, Swiader A, Grazide MH, et al. A role for 4-hydroxy-2-nonenal in premature placental senescence in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Free Radic Biol Med* 2021; **164**: 303-14.
48. Riahi Y, Kaiser N, Cohen G, et al. Foam cell-derived 4-hydroxynonenal induces endothelial cell senescence in a TXNIP-dependent manner. *J Cell Mol Med* 2015; **19**(8): 1887-99.
49. Sultana Z, Qiao Y, Maiti K, Smith R. Involvement of oxidative stress in placental dysfunction, the pathophysiology of fetal death and pregnancy disorders. *Reproduction* 2023; **166**(2): R25-r38.
50. Ashina M, Kido T, Kyono Y, et al. Correlation between Severity of Fetal Growth Restriction and Oxidative Stress in Severe Small-for-Gestational-Age Infants. *Int J Environ Res Public Health* 2021; **18**(20).
51. Nüsken E, Appel S, Saschin L, et al. Intrauterine Growth Restriction: Need to Improve Diagnostic Accuracy and Evidence for a Key Role of Oxidative Stress in Neonatal and Long-Term Sequelae. *Cells* 2024; **13**(6).
52. Napso T, Lean SC, Lu M, et al. Diet-induced maternal obesity impacts fetoplacental growth and induces sex-specific alterations in placental morphology, mitochondrial bioenergetics, dynamics, lipid metabolism and oxidative stress in mice. *Acta Physiol (Oxf)* 2022; **234**(4): e13795.
53. Santos-Rosendo C, Bugatto F, González-Domínguez A, Lechuga-Sancho AM, M MR, Visiedo F. Placental Adaptive Changes to Protect Function and Decrease Oxidative Damage in Metabolically Healthy Maternal Obesity. *Antioxidants (Basel)* 2020; **9**(9).
54. Brombach C, Tong W, Giussani DA. Maternal obesity: new placental paradigms unfolded. *Trends Mol Med* 2022; **28**(10): 823-35.
55. Malti N, Merzouk H, Merzouk SA, et al. Oxidative stress and maternal obesity: fetoplacental unit interaction. *Placenta* 2014; **35**(6): 411-6.
56. Pereira RD, De Long NE, Wang RC, Yazdi FT, Holloway AC, Raha S. Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 814543.
57. Pereira AC, Martel F. Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies. *Cell Biol Toxicol* 2014; **30**(5): 301-12.
58. Hu C, Yang Y, Li J, et al. Maternal Diet-Induced Obesity Compromises Oxidative Stress Status and Angiogenesis in the Porcine Placenta by Upregulating Nox2 Expression. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 2481592.
59. Hu C, Wu Z, Huang Z, et al. Nox2 impairs VEGF-A-induced angiogenesis in placenta via mitochondrial ROS-STAT3 pathway. *Redox Biol* 2021; **45**: 102051.
60. Hirschmugl B, Desoye G, Catalano P, et al. Maternal obesity modulates intracellular lipid turnover in the human term placenta. *Int J Obes (Lond)* 2017; **41**(2): 317-23.
61. Calabuig-Navarro V, Haghiac M, Minium J, et al. Effect of Maternal Obesity on Placental Lipid Metabolism. *Endocrinology* 2017; **158**(8): 2543-55.
62. Saben J, Lindsey F, Zhong Y, et al. Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. *Placenta* 2014; **35**(3): 171-7.
63. Vidakovic AJ, Jaddoe VWV, Gishti O, et al. Body mass index, gestational weight gain and fatty acid concentrations during pregnancy: the Generation R Study. *European Journal of Epidemiology* 2015; **30**(11): 1175-85.
64. Szajewska H, Horvath A, Koletzko B. Effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of women with low-risk pregnancies on pregnancy outcomes and growth measures at birth: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006; **83**(6): 1337-44.
65. Gil-Sánchez A, Larqué E, Demmelmair H, et al. Maternal-fetal in vivo transfer of [¹³C]docosahexaenoic and other fatty acids across the human placenta 12 h after maternal oral intake. *Am J Clin Nutr* 2010; **92**(1): 115-22.
66. Duttaroy AK, Basak S. Maternal Fatty Acid Metabolism in Pregnancy and Its Consequences in the Feto-Placental Development. *Front Physiol* 2021; **12**: 787848.

67. Albrecht M, Worthmann A, Heeren J, Diemert A, Arck PC. Maternal lipids in overweight and obesity: implications for pregnancy outcomes and offspring's body composition. *Semin Immunopathol* 2025; **47**(1): 10.
68. Hellmuth C, Lindsay KL, Uhl O, et al. Association of maternal prepregnancy BMI with metabolomic profile across gestation. *Int J Obes (Lond)* 2017; **41**(1): 159-69.
69. Qiao L, Guo Z, Bosco C, et al. Maternal High-Fat Feeding Increases Placental Lipoprotein Lipase Activity by Reducing SIRT1 Expression in Mice. *Diabetes* 2015; **64**(9): 3111-20.
70. Segura MT, Demmelmair H, Krauss-Etschmann S, et al. Maternal BMI and gestational diabetes alter placental lipid transporters and fatty acid composition. *Placenta* 2017; **57**: 144-51.
71. Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *Faseb j* 2009; **23**(11): 3865-73.
72. Hagberg C, Mehlem A, Falkevall A, Muhl L, Eriksson U. Endothelial fatty acid transport: role of vascular endothelial growth factor B. *Physiology (Bethesda)* 2013; **28**(2): 125-34.
73. Rebholz SL, Burke KT, Yang Q, Tso P, Woollett LA. Dietary fat impacts fetal growth and metabolism: uptake of chylomicron remnant core lipids by the placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; **301**(2): E416-25.
74. Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr* 2008; **27**(5): 685-93.
75. Hirschmugl B, Perazzolo S, Sengers BG, et al. Placental mobilization of free fatty acids contributes to altered materno-fetal transfer in obesity. *Int J Obes (Lond)* 2021; **45**(5): 1114-23.
76. Dubé E, Gravel A, Martin C, et al. Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-term placenta. *Biol Reprod* 2012; **87**(1): 14, 1-1.
77. de Carvalho C, Caramujo MJ. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules* 2018; **23**(10).
78. Müller-Esterl W. Biochemie : eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler: Berlin : Springer Spektrum; 2018.
79. White B. Dietary fatty acids. *Am Fam Physician* 2009; **80**(4): 345-50.
80. Buchanan CDC, Lust CAC, Burns JL, et al. Analysis of major fatty acids from matched plasma and serum samples reveals highly comparable absolute and relative levels. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2021; **168**: 102268.
81. Carta G, Murru E, Banni S, Manca C. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Front Physiol* 2017; **8**: 902.
82. Mancini A, Imperlini E, Nigro E, et al. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules* 2015; **20**(9): 17339-61.
83. Santa-María C, López-Enríquez S, Montserrat-de la Paz S, et al. Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. *Nutrients* 2023; **15**(1).
84. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients* 2012; **4**(12): 1989-2007.
85. Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol* 2009; **77**(6): 937-46.
86. Kretschmer T, Schulze-Edinghausen M, Turnwald EM, et al. Effect of Maternal Obesity in Mice on IL-6 Levels and Placental Endothelial Cell Homeostasis. *Nutrients* 2020; **12**(2).
87. Kretschmer T, Turnwald EM, Janoschek R, et al. Maternal high fat diet-induced obesity affects trophoblast differentiation and placental function in micedagger. *Biol Reprod* 2020; **103**(6): 1260-74.
88. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(20): 9363-7.
89. Kipkeew F, Kirsch M, Klein D, Wuelling M, Winterhager E, Gellhaus A. CCN1 (CYR61) and CCN3 (NOV) signaling drives human trophoblast cells into senescence and stimulates migration properties. *Cell Adh Migr* 2016; **10**(1-2): 163-78.
90. Arnaoutova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc* 2010; **5**(4): 628-35.

91. Kishimoto M, Akashi M, Kakei Y, et al. Ionizing Radiation Enhances Paracellular Permeability Through Alteration of Intercellular Junctions in Cultured Human Lymphatic Endothelial Cells. *Lymphat Res Biol* 2018; **16**(4): 390-6.
92. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; **150**(1): 76-85.
93. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**(5259): 680-5.
94. Young VM, Toborek M, Yang F, McClain CJ, Hennig B. Effect of linoleic acid on endothelial cell inflammatory mediators. *Metabolism* 1998; **47**(5): 566-72.
95. Cao X, Guo H, Dai Y, et al. Excessive linoleic acid induces muscle oxidative stress through 5-lipoxygenase-dependent peroxidation. *Redox Biol* 2024; **71**: 103096.
96. Kim TY, Kim J, Choo HY, Kwon HJ. Inhibition of 5-lipoxygenase suppresses vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; **478**(3): 1117-22.
97. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; **482**(3): 419-25.
98. Mortensen MS, Ruiz J, Watts JL. Polyunsaturated Fatty Acids Drive Lipid Peroxidation during Ferroptosis. *Cells* 2023; **12**(5).
99. Murphy MP, Bayir H, Belousov V, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab* 2022; **4**(6): 651-62.
100. Pacifici EH, McLeod LL, Peterson H, Sevanian A. Linoleic acid hydroperoxide-induced peroxidation of endothelial cell phospholipids and cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1994; **17**(4): 285-95.
101. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 2010; **594**: 57-72.
102. Herbst U, Toborek M, Kaiser S, Mattson MP, Hennig B. 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1999; **181**(2): 295-303.
103. Wang B, Wang Y, Zhang J, et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Arch Toxicol* 2023; **97**(6): 1439-51.
104. Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ* 2013; **20**(12): 1615-30.
105. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; **2014**: 360438.
106. Li J, Sharma R, Patrick B, et al. Regulation of CD95 (Fas) expression and Fas-mediated apoptotic signaling in HLE B-3 cells by 4-hydroxynonenal. *Biochemistry* 2006; **45**(40): 12253-64.
107. Liu W, Kato M, Akhand AA, et al. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* 2000; **113** (Pt 4): 635-41.
108. Spickett CM. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biol* 2013; **1**(1): 145-52.
109. Ortega MA, Garcia-Puente LM, Fraile-Martinez O, et al. Oxidative Stress, Lipid Peroxidation and Ferroptosis Are Major Pathophysiological Signatures in the Placental Tissue of Women with Late-Onset Preeclampsia. *Antioxidants (Basel)* 2024; **13**(5).
110. Marangoni F, Agostoni C, Borghi C, et al. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects. *Atherosclerosis* 2020; **292**: 90-8.
111. Ramsden CE, Ringel A, Feldstein AE, et al. Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2012; **87**(4-5): 135-41.
112. Suksatan W, Putera HD, Abdulkadhim AH, et al. The effect of conjugated linoleic acid supplementation on oxidative stress markers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr ESPEN* 2022; **49**: 121-8.
113. Shrestha N, Holland OJ, Kent NL, et al. Maternal High Linoleic Acid Alters Placental Fatty Acid Composition. *Nutrients* 2020; **12**(8).

114. Khoi CS, Lin TY, Chiang CK. Targeting Insulin Resistance, Reactive Oxygen Species, Inflammation, Programmed Cell Death, ER Stress, and Mitochondrial Dysfunction for the Therapeutic Prevention of Free Fatty Acid-Induced Vascular Endothelial Lipotoxicity. *Antioxidants (Basel)* 2024; **13**(12).
115. Mahmoud AM, Wilkinson FL, Jones AM, et al. A novel role for small molecule glycomimetics in the protection against lipid-induced endothelial dysfunction: Involvement of Akt/eNOS and Nrf2/ARE signaling. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017; **1861**(1 Pt A): 3311-22.
116. Liang Z, Sun G, Zhang J, et al. Protein phosphatase 4 mediates palmitic acid-induced endothelial dysfunction by decreasing eNOS phosphorylation at serine 633 in HUVECs. *Exp Cell Res* 2024; **437**(1): 113998.
117. Ahsan A, Han G, Pan J, et al. Phosphocreatine protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway. *Apoptosis* 2015; **20**(12): 1563-76.
118. Cui Y, Feng N, Gu X, et al. κ -Opioid receptor stimulation reduces palmitate-induced apoptosis via Akt/eNOS signaling pathway. *Lipids Health Dis* 2019; **18**(1): 52.
119. Lee CH, Lee SD, Ou HC, Lai SC, Cheng YJ. Eicosapentaenoic acid protects against palmitic acid-induced endothelial dysfunction via activation of the AMPK/eNOS pathway. *Int J Mol Sci* 2014; **15**(6): 10334-49.
120. Gu YY, Tan XH, Song WP, et al. Icariside II Attenuates Palmitic Acid-Induced Endothelial Dysfunction Through SRPK1-Akt-eNOS Signaling Pathway. *Front Pharmacol* 2022; **13**: 920601.
121. Yuan L, Mao Y, Luo W, et al. Palmitic acid dysregulates the Hippo-YAP pathway and inhibits angiogenesis by inducing mitochondrial damage and activating the cytosolic DNA sensor cGAS-STING-IRF3 signaling mechanism. *J Biol Chem* 2017; **292**(36): 15002-15.
122. Zhu W, Yang G, Chen N, et al. CTRP13 alleviates palmitic acid-induced inflammation, oxidative stress, apoptosis and endothelial cell dysfunction in HUVECs. *Tissue Cell* 2024; **86**: 102232.
123. Lu Y, Cheng J, Chen L, et al. Endoplasmic reticulum stress involved in high-fat diet and palmitic acid-induced vascular damages and fenofibrate intervention. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **458**(1): 1-7.
124. Mehra VC, Jackson E, Zhang XM, et al. Ceramide-activated phosphatase mediates fatty acid-induced endothelial VEGF resistance and impaired angiogenesis. *Am J Pathol* 2014; **184**(5): 1562-76.
125. Ke J, Wei R, Yu F, Zhang J, Hong T. Liraglutide restores angiogenesis in palmitate-impaired human endothelial cells through PI3K/Akt-Foxo1-GTPCH1 pathway. *Peptides* 2016; **86**: 95-101.
126. Peng J, Yang M, Li G, Zhang X, Huang Y, Tang Y. Effects of palmitic acid and eicosapentaenoic acid on angiogenesis of porcine vascular endothelial cells. *Vet Med Sci* 2021; **7**(6): 2260-7.
127. Zhu Q, Dong Q, Wang X, et al. Palmitic Acid, A Critical Metabolite, Aggravates Cellular Senescence Through Reactive Oxygen Species Generation in Kawasaki Disease. *Front Pharmacol* 2022; **13**: 809157.
128. Lee J, Yoo JH, Kim HS, et al. C1q/TNF-related protein-9 attenuates palmitic acid-induced endothelial cell senescence via increasing autophagy. *Mol Cell Endocrinol* 2021; **521**: 111114.
129. Hao W, Shan W, Wan F, et al. Canagliflozin Delays Aging of HUVECs Induced by Palmitic Acid via the ROS/p38/JNK Pathway. *Antioxidants (Basel)* 2023; **12**(4).
130. Palomino OM, Giordani V, Chowen J, Alfonso SF, Goya L. Physiological Doses of Oleic and Palmitic Acids Protect Human Endothelial Cells from Oxidative Stress. *Molecules* 2022; **27**(16).
131. Abdelmagid SA, Clarke SE, Nielsen DE, et al. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. *PLoS One* 2015; **10**(2): e0116195.
132. Rhee M, Lee J, Lee EY, Yoon KH, Lee SH. Lipid Variability Induces Endothelial Dysfunction by Increasing Inflammation and Oxidative Stress. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2024; **39**(3): 511-20.

133. Shirasuna K, Takano H, Seno K, et al. Palmitic acid induces interleukin-1 β secretion via NLRP3 inflammasomes and inflammatory responses through ROS production in human placental cells. *J Reprod Immunol* 2016; **116**: 104-12.
134. Rogers LM, Serezani CH, Eastman AJ, et al. Palmitate induces apoptotic cell death and inflammasome activation in human placental macrophages. *Placenta* 2020; **90**: 45-51.
135. Gremmels H, Bevers LM, Fledderus JO, et al. Oleic acid increases mitochondrial reactive oxygen species production and decreases endothelial nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2015; **751**: 67-72.
136. Bass VL, Soukup JM, Ghio AJ, Madden MC. Oleic acid and derivatives affect human endothelial cell mitochondrial function and vasoactive mediator production. *Lipids Health Dis* 2020; **19**(1): 128.
137. Robinson NJ, Minchell LJ, Myers JE, Hubel CA, Crocker IP. A potential role for free fatty acids in the pathogenesis of preeclampsia. *J Hypertens* 2009; **27**(6): 1293-302.
138. Davda RK, Stepniakowski KT, Lu G, Ullian ME, Goodfriend TL, Egan BM. Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension* 1995; **26**(5): 764-70.
139. Kim F, Tysseling KA, Rice J, et al. Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKK β . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**(5): 989-94.
140. Jackson KG, Newens KJ, Fry MJ, Thompson AK, Williams CM. Differential effects of single fatty acids and fatty acid mixtures on the phosphoinositide 3-kinase/Akt/eNOS pathway in endothelial cells. *Eur J Nutr* 2022; **61**(5): 2463-73.
141. Dye JF, Vause S, Johnston T, et al. Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelial cells. *Faseb j* 2004; **18**(1): 125-7.
142. Rehman K, Haider K, Jabeen K, Akash MSH. Current perspectives of oleic acid: Regulation of molecular pathways in mitochondrial and endothelial functioning against insulin resistance and diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2020; **21**(4): 631-43.
143. Hufnagel B, Dworak M, Soufi M, et al. Unsaturated fatty acids isolated from human lipoproteins activate protein phosphatase type 2C β and induce apoptosis in endothelial cells. *Atherosclerosis* 2005; **180**(2): 245-54.
144. Krieglstein J, Hufnagel B, Dworak M, et al. Influence of various fatty acids on the activity of protein phosphatase type 2C and apoptosis of endothelial cells and macrophages. *Eur J Pharm Sci* 2008; **35**(5): 397-403.
145. Schwarz S, Hufnagel B, Dworak M, Klumpp S, Krieglstein J. Protein phosphatase type 2C α and 2C β are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial cells. *Apoptosis* 2006; **11**(7): 1111-9.
146. Artwohl M, Roden M, Waldhäusl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *Faseb j* 2004; **18**(1): 146-8.
147. Harvey KA, Walker CL, Xu Z, et al. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 2010; **51**(12): 3470-80.
148. Fuenzalida B, Sobrevia B, Cantin C, et al. Maternal supraphysiological hypercholesterolemia associates with endothelial dysfunction of the placental microvasculature. *Sci Rep* 2018; **8**(1): 7690.
149. Galustian C, Dye J, Leach L, Clark P, Firth JA. Actin cytoskeletal isoforms in human endothelial cells in vitro: alteration with cell passage. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; **31**(10): 796-802.
150. Kondrikov D, Fonseca FV, Elms S, et al. Beta-actin association with endothelial nitric-oxide synthase modulates nitric oxide and superoxide generation from the enzyme. *J Biol Chem* 2010; **285**(7): 4319-27.
151. Kondrikov D, Elms S, Fulton D, Su Y. eNOS-beta-actin interaction contributes to increased peroxynitrite formation during hyperoxia in pulmonary artery endothelial cells and mouse lungs. *J Biol Chem* 2010; **285**(46): 35479-87.

152. Dittmer A, Dittmer J. Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 2006; **27**(14): 2844-5.
153. Wang Q, Han W, Ma C, Wang T, Zhong J. Western blot normalization: Time to choose a proper loading control seriously. *Electrophoresis* 2023; **44**(9-10): 854-63.
154. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 2017; **27**(1): 4-25.
155. Leach L, Bhasin Y, Clark P, Firth JA. Isolation of endothelial cells from human term placental villi using immunomagnetic beads. *Placenta* 1994; **15**(4): 355-64.
156. Leach L, Firth JA. Structure and permeability of human placental microvasculature. *Microsc Res Tech* 1997; **38**(1-2): 137-44.
157. Jinga VV, Gafencu A, Antohe F, et al. Establishment of a pure vascular endothelial cell line from human placenta. *Placenta* 2000; **21**(4): 325-36.
158. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 2008; **121**(Pt 13): 2115-22.
159. Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr* 2013; **7**(6): 455-61.
160. Kevil CG, Ohno N, Gute DC, et al. Role of cadherin internalization in hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability. *Free Radic Biol Med* 1998; **24**(6): 1015-22.
161. Manuel CR, Charron MJ, Ashby CR, Jr., Reznik SE. Saturated and unsaturated fatty acids differentially regulate in vitro and ex vivo placental antioxidant capacity. *Am J Reprod Immunol* 2018; **80**(3): e12868.
162. Rampersaud AM, Dunk CE, Lye SJ, Renaud SJ. Palmitic acid induces inflammation in placental trophoblasts and impairs their migration toward smooth muscle cells through plasminogen activator inhibitor-1. *Mol Hum Reprod* 2020; **26**(11): 850-65.
163. Lang I, Pabst MA, Hiden U, et al. Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 2003; **82**(4): 163-73.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relatives Vorkommen von ROS in HPVEC nach Stimulation mit Fettsäuren.	37
Abbildung 2: Relative Apoptoserate von HPVEC nach 12-stündiger Fettsäuren-Stimulation.	38
Abbildung 3: Relative Proliferationsrate von HPVEC nach 36-stündiger Stimulation mit Fettsäuren. ...	39
Abbildung 4: β -Galaktosidase- und DAPI-Färbung und relative Seneszenzrate von HPVEC nach 48- stündiger Fettsäuren-Stimulation.	40
Abbildung 5: Tube Formation Assay und relative Tube Formation Rate von HPVEC nach 12-stündiger Stimulation mit Fettsäuren.	41
Abbildung 6: Western Blot und Densitometrie des Housekeeping-Proteins β -Actin.	43
Abbildung 7: Endothelzell-Verbindungsmarker in HPVEC nach 24-stündiger Fettsäurestimulation. ...	44
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von HPVEC zur Lokalisation von VE-Cadherin.	45

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	22
Tabelle 2: Antikörper für Western Blot	23
Tabelle 3: Antikörper für Immunhistochemie	23
Tabelle 4: Puffer- und Stammlösungen	24
Tabelle 5: Polyacrylamid-Gele für SDS-PAGE	25
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 7: Assays.....	26
Tabelle 8: Geräte	27
Tabelle 9: Softwares	27
Tabelle 10: Stimulationsmedien.....	29

6.3. Curriculum Vitae

Wird aus Gründen des Datenschutzes in der digitalen Version nicht veröffentlicht.