

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

**Eine Strategie zur Reduktion plazentarer
Dysfunktion bei maternalem Übergewicht.
Eine Nahrungsintervention am Mausmodell.**

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

vorgelegt von
Ciara Nora Kallage
aus Mettingen

promoviert am 26. November 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2024

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

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch
2. Gutachter: Professor Dr. med. V. R. Burst

Erklärung

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

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

Universitätsprofessor Dr. Jörg Dötsch
Dr. rer. nat. Sarah Appel
Dr. med. Eva-Maria Turnwald
Dr. nat. med. Tobias Kretschmer
Dr. rer. nat. Ruth Janoschek
Maria Wohlfarth
Marion Handwerk
Peter Zentis

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

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

Die Planung und Durchführung des Tierversuchs, sowie die Asservierung der murinen Organe gemeinsam mit der Erhebung der phänotypischen Daten der Versuchstiere erfolgte durch Dr. rer. nat. Sarah Appel, Dr. med. Eva-Maria Turnwald, Dr. nat. med. Tobias Kretschmer, Marion Handwerk und Dr. rer. nat. Ruth Janoschek. Die Versorgung der Tiere wurde durch das Team der dezentralen Versuchstierhaltung der Pharmakologie der Uniklinik Köln sichergestellt.

Die im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführten Experimente wurden mit Unterstützung und Anleitung von Dr. rer. nat. Sarah Appel, Dr. med. Eva-Maria Turnwald, Dr. Tobias Kretschmer und den biologisch-technischen Assistentinnen Maria Wohlfarth und Marion Handwerk von mir eigenständig durchgeführt. Ausgenommen davon sind die Versuche der SD- und HFD-Gruppen ohne Nahrungsintervention. Die Ergebnisse aus diesen beiden Gruppen wurden im Rahmen verschiedener Projekte der AG Appel verwendet und daher erfolgte eine anteilmäßige Aufteilung der Versuche unter Dr. nat. med. Tobias Kretschmer sowie meinen Mitdotorandinnen Dr. med. Simone Jauch, Anna Lena Neweling, Dr. med. Antje Thiele und mir.

Die generierten Daten der Stereologie wurden zur bioinformatischen Analyse durch Peter Zentis, Imaging Core Facility des CECAD (Köln, Deutschland), bearbeitet und anschließend von mir ausgewertet und interpretiert.

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 14.06.2024

Unterschrift:

Danksagung

Herzlichen Dank für die Unterstützung, die ich während meiner Promotionsarbeit von so vielen Seiten erfahren durfte.

Vielen Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Jörg Dötsch und meine beiden Betreuerinnen Dr. rer. nat. Sarah Appel und Dr. med. Eva-Maria Turnwald für die Möglichkeit der experimentellen Arbeit, die kompetente, motivierende, ehrliche und allzeit zuverlässige Unterstützung sowie das herzliche Team-Gefühl, das im Forschungspavillon herrscht.

In dem Zusammenhang ein Dank an die gesamte Arbeitsgruppe Appel, vor allem Maria Wohlfarth, Marion Handwerk und Dr. nat. med. Tobias Kretschmer sowie meine Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden für eure Unterstützung. Ich habe die Zeit mit euch sehr genossen, das freundschaftliche Zusammensein, das gemeinsame Entgegenfeiern auf die ersten Ergebnisse, die Geduld, die es braucht und das gegenseitige Verständnis.

Vielen Dank an die Imaging Core Facility des CECAD (Köln, Deutschland), insbesondere Peter Zentis, für die kompetente Unterstützung.

Ein besonderer Dank von ganzem Herzen geht Antje Thiele, die beste Laborpartnerin, für unseren gemeinsamen Alltag - an den ich immer gerne zurückdenke und unsere daraus entstandene Freundschaft.

Danke an meinen Mann Tim, meine liebste Lia-Schwester und meine Eltern, die mich immer liebevoll unterstützen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	12
2. EINLEITUNG	15
2.1. Übergewicht und Adipositas	15
2.1.1. Definition und Epidemiologie	15
2.1.2. Auswirkungen in der Schwangerschaft	15
2.2. Plazentare Dysfunktion unter maternalem Übergewicht	16
2.2.1. Aufbau und Funktionen der Plazenta	16
2.2.1.1. Die humane Plazenta	16
2.2.1.2. Die murine Plazenta im Vergleich zur humanen Plazenta	17
2.2.2. Fetaler Phänotyp unter maternalem Übergewicht	19
2.2.3. Erklärungsansätze plazentarer Dysfunktion unter maternalem Übergewicht	20
2.2.3.1. Plazentare Dysfunktion durch morphologische Veränderungen	20
2.2.3.2. Plazentare Dysfunktion durch Inflamationsprozesse	21
2.2.3.3. Plazentare Dysfunktion durch eine Störung der Adherens Junctions	22
2.2.3.4. Plazentare Dysfunktion durch eine gestörte Endothelzellintegrität	23
2.2.3.5. Plazentare Dysfunktion durch vaskuläre Veränderungen	24
2.3. Eine Nahrungsintervention zur Reduktion plazentarer Dysfunktion	24
2.4. Zielsetzung und Fragestellung	27
3. MATERIAL UND METHODEN	28
3.1. Materialien und Geräte	28
3.1.1. Chemikalien und Enzyme	28
3.1.2. Stammlösungen und Puffer	31
3.1.3. Primer und Oligonukleotide	32
3.1.4. Erst- und Zweitantikörper	32
3.1.5. Geräte	34
3.1.6. Arbeits-/Verbrauchsmaterialien	35
3.1.7. Software	35
3.2. Generierung der Versuchsgruppen	36
3.2.1. Haltungsbedingungen	36

3.2.2.	Etablierung der Versuchsgruppen	36
3.2.3.	Verpaarung der Versuchstiere	37
3.2.4.	Präparation, Probenentnahme und -Asservierung	38
3.3.	Histologische Untersuchungen der Plazenta	38
3.3.1.	Anfertigung plazentarer Gewebeschnitte für histologische Untersuchungen	39
3.3.2.	Stereologie	39
3.3.2.1.	Einführung in die Stereologie	39
3.3.2.2.	Generierung plazentarer Gewebeschnitte für stereologische Untersuchungen	40
3.3.2.3.	Verwendung geometrischer Gitter	41
3.3.2.4.	Ermittlung von Referenzvolumina	41
3.3.2.5.	Ermittlung von Volumina der Plazentazonen	42
3.3.2.6.	Volumina, Oberflächen, Längen und Durchmesser innerhalb des Labyrinths	42
3.3.2.7.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	44
3.3.2.8.	CD31-Färbung	45
3.3.3.	Immunfluoreszenzfärbung	46
3.3.3.1.	BrdU-Assay	46
3.3.3.2.	TUNEL-Assay	47
3.3.3.3.	γ -H2AX-Assay	48
3.3.3.4.	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen	49
3.4.	Molekularbiologische Untersuchungen der plazentaren AJ- und Endothelzell-Marker	50
3.4.1.	Geschlechterbestimmung der Feten	50
3.4.1.1.	Isolation der genomischen DNA	50
3.4.1.2.	PCR zur Genotypisierung des Geschlechts	51
3.4.1.3.	Agarose-Gelelektrophorese zur Auswertung der PCR	51
3.4.2.	qRT-PCR zur Bestimmung der Genexpression	52
3.4.2.1.	RNA-Isolation	52
3.4.2.2.	Erfassung der Reinheit und Konzentration der RNA	53
3.4.2.3.	cDNA-Synthese	53
3.4.2.4.	TaqMan™-qRT-PCR	54
3.4.3.	Western Blot zur Bestimmung der Proteinmenge	55
3.4.3.1.	Proteinisolation	56
3.4.3.2.	Erfassung der Proteinkonzentration	56
3.4.3.3.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	57
3.4.3.4.	Western Blot	58
3.5.	Statistische Auswertung	59
4.	ERGEBNISSE	61
4.1.	Phänotypische Daten der Muttertiere, Feten und Plazenten	61

4.1.1.	Gewicht der Muttertiere und ihres epigonadalen weißen Fettgewebes	61
4.1.2.	Plazentagewicht und Plazentaeffizienz an G 15.5	62
4.1.3.	Gewicht, Wurfgröße und Resorptionsrate der Feten an G 15.5	63
4.2.	Plazenta-Integrität unter stereologischen Gesichtspunkten	64
4.2.1.	Plazentare Volumina	64
4.2.1.1.	Volumina der gesamten Plazenta und ihrer einzelnen Zonen	64
4.2.1.2.	Erfassung des Labyrinthvolumens durch zwei stereologische Methoden	65
4.2.2.	Strukturmerkmale innerhalb der Labyrinthzone	66
4.2.2.1.	Volumina und Oberflächenmaße	66
4.2.2.2.	Fetale Kapillarlängen und -durchmesser	68
4.3.	Zellintegrität innerhalb der plazentaren Labyrinthzone	69
4.3.1.	Nachweis der proliferierenden Zellen	69
4.3.2.	Nachweis der apoptotischen Zellen	70
4.3.3.	Nachweis der seneszenten Zellen	71
4.4.	Plazentare AJ- und Endothelzellmarker und auf Gen- und Proteinebene	73
4.4.1.	Genexpression der plazentaren AJ- und Endothelzellmarker	73
4.4.2.	Proteinmenge der plazentaren AJ- und Endothelzellmarker	74
4.4.2.1.	E-Cadherin	75
4.4.2.2.	VE-Cadherin	76
4.4.2.3.	β -Catenin	77
5.	DISKUSSION	78
5.1.	Einfluss einer NI bei maternalem Übergewicht auf phänotypische Aspekte	78
5.1.1.	Maternale Gewichtsentwicklung	78
5.1.2.	Fetale Gewichtsentwicklung	79
5.1.3.	Anzahl der Nachkommen	80
5.2.	Einfluss einer NI bei maternalem Übergewicht auf die Plazentaintegrität und auf ihre einzelnen Zonen	81
5.2.1.	Morphologie der gesamten Plazenta	81
5.2.2.	Morphologie der Plazentazonen	84
5.2.3.	Homöostase innerhalb der plazentaren Labyrinthzone	85
5.2.3.1.	Seneszenz-Rate plazentarer Trophoblasten	86
5.2.3.2.	Apoptoserate plazentarer Trophoblasten und Endothelzellen	87
5.2.3.3.	Proliferationsrate plazentarer Trophoblasten und Endothelzellen	88
5.2.4.	Plazentaintegrität auf Gen- und Proteinebene	88
5.2.4.1.	AJ-Marker auf Proteinebene unter einer NI	89

5.3.	Einfluss einer NI bei maternalem Übergewicht auf die plazentaren Gefäße	92
5.3.1.	Morphologie der fetalen Gefäße und der maternalen Blutsinuse	92
5.3.2.	Homöostase der Endothelzellen	94
5.3.3.	Endothelzellintegrität auf Gen- und Proteinebene	95
5.4.	Effekt der NI bei maternalem Übergewicht im Rahmen dieses Projektes	95
5.5.	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane Schwangerschaft	98
5.5.1.	Verständnis einer gesunden Ernährung	98
5.5.2.	Transfer von Ergebnissen an murinen Plazenten auf humane Plazenten	98
5.5.3.	Bewertung einer NI im klinischen Alltag	99
6.	LITERATURVERZEICHNIS	102
7.	ANHANG	114
7.1.	Abbildungsverzeichnis	114
7.2.	Tabellenverzeichnis	114

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AG	Arbeitsgruppe
AJ	Adherens Junctions
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BMI	Body-Mass-Index
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CECAD	Exzellenzcluster Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases Köln
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Schwellenwertzyklus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAM	Carboxyfluorescein
G	Gestationstag
g	Gramm
HCl	Salzsäure
HFD	High-Fat-Diet/hochkalorische Diät
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IUGR	Intrauterine growth restriction (intrauterine Wachstumsretardierung)

kcal	Kilokalorie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LGA	Large for gestational age („groß bezogen auf das Reifealter“)
M	Molar
mA	Milliampere
ME	metabolische Energie
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
m ²	Quadratmeter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
m/v	Gewicht pro Volumen
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NI	Nahrungsintervention
nm	Nanometer
o.ä.	oder ähnliches
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung + Tween® 20
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative real-time-PCR
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
RIPA	Radioimmunpräzipitation-Assay (Puffer)
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute

RT	Reverse Transkriptase
SD	Standard-Diät
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SGA	Small for gestational age („klein bezogen auf das Reifealter“)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung + Tween® 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling
U	Enzymeinheit
V	Volt
V	Volumen
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2
vgl.	Vergleiche/Vergleich
vWF	von-Willebrand-Faktor
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	World Health Organization
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin Köln

1. Zusammenfassung

Übergewicht bzw. Adipositas gelten heutzutage als Volkskrankheiten. Rund ein Drittel der Frauen im gebärfähigen Alter sind aktuell übergewichtig (BMI zwischen 25 und 30 kg/m²) oder adipös (BMI über 30 kg/m²). Dies stellt während einer Schwangerschaft einen erheblichen gesundheitlichen Risikofaktor für die Mutter und das ungeborene Kind dar. Übergewichtsassoziierte Erkrankungen aufseiten der Mutter sind beispielsweise Gestationsdiabetes oder Präeklampsie sowie auf fetaler Seite eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR), aber auch Makrosomie bis hin zu einer gesteigerten Frühgeburtlichkeitsrate und vermehrten Aborten.

Eine Schlüsselrolle während der gesamten Schwangerschaft und nach aktuellem Wissensstand auch in Zusammenhang mit den genannten Komplikationen spielt die Plazenta. Als Organ, welches für den Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind verantwortlich ist, besteht sie aus maternalen und fetalen Anteilen. Dabei bildet die Zone des plazentaren Labyrinths bei der Maus die wichtige fetomaternale Transferzone, welche in diesem Projekt genauer untersucht wurde.

Als mögliche Erklärungsansätze für den Zusammenhang zwischen mütterlichem Übergewicht und den oben genannten Schwangerschaftskomplikationen werden aktuell komplexe Zusammenhänge diskutiert. Ursächlich scheint ein Übergewichtsassoziierter Inflammationsprozess zu sein, mit daraus resultierenden morphologischen Veränderungen der Plazenta, der unter anderem eine gestörte Integrität der Adherens Junctions (AJ) zugrunde liegt. Zudem werden vaskulären Veränderungen der Plazenta angeführt, mit dem Nachweis einer gestörten plazentaren Endothelzellhomöostase. Schließlich führen diese Pathologien zu einer Beeinträchtigung der fetalen Versorgung.

Es gilt also, die zugrundeliegenden Pathomechanismen auf plazentarer Ebene genauer zu verstehen und optimalerweise den beschriebenen Komplikationen gezielt entgegenzuwirken, um das maternale und fetale Outcome positiv zu beeinflussen. Als eine risikoarme Lifestyle-Intervention bei maternalem Übergewicht sowohl für die Mutter als auch das ungeborene Kind gilt eine Umstellung auf eine gesunde Ernährung. Innerhalb dieser Promotionsarbeit wurde daher am Mausmodell der Einfluss einer Nahrungsideintervention (NI) ab dem Zeitpunkt der Schwangerschaft auf eine mögliche Reduktion der plazentaren Dysfunktion, sowie auf das maternale und fetale Outcome hin untersucht. Dafür wurden drei Versuchsgruppen generiert: Die normal gewichtige Kontrollgruppe erhielt während der gesamten Versuchsreihe eine Standard-Diät (SD). Parallel wurde eine Hoch-Fett-Diät (HFD)-Gruppe mit einer hochkalorischen Diät ernährt, um übergewichtige Muttertiere zu generieren. Die NI-Gruppe bestand aus weiblichen HFD-Tieren, welche ab dem Zeitpunkt der Verpaarung anstelle der HFD die SD erhielten. Eine Umstellung auf die SD simulierte somit die gesunde Ernährung ab

dem Zeitpunkt der Schwangerschaft. Die Sectio caesarea mit der Asservierung der Feten und Organe erfolgte am G 15.5.

In dieser Arbeit waren die Feten der übergewichtigen Muttertiere (HFD-Gruppe) signifikant am leichtesten und wiesen somit den beschriebenen IUGR-Phänotyp auf. Dabei konnte die NI diese Gewichtsentwicklung der Nachkommen positiv beeinflussen, indem sie dem fetalen IUGR-Phänotyp entgegenwirkte. Die Muttertiere zeigten unter der NI eine Reduktion der Gewichtszunahme über den Zeitraum der Schwangerschaft, bei zeitgleicher Minimierung des maternalen epigonadalen weißen Fettgewebes.

Zur Beurteilung der Plazentamorphologie wurde das gesamte Organ mithilfe der Methode der Stereologie betrachtet. Dabei zeigte sich eine Erhöhung des Plazentavolumens sowohl durch die HFD als auch durch die NI. Dieses erhöhte Volumen spiegelte sich bei Betrachtung der absoluten Volumenwerte der Plazentazonen, bestehend aus Labyrinth, Junktionalzone und Dezidua, wider. Im relativen Vergleich hingegen, bei denen die einzelnen Zonen ins Verhältnis zu dem Volumen der gesamten Plazenta gesetzt wurden, zeigten sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede. Widersprüchliche Ergebnisse ergaben sich außerdem bei der Bestimmung des Labyrinthvolumens. Um den möglichen Einfluss der NI auf die fetomaternalen Transferzone besser zu verstehen, wurde die Zellhomöostase in der Zone des Labyrinths mittels immunhistochemischer Färbungen bezogen auf die Seneszenz-, Apoptose- und Proliferations-Rate genauer untersucht. Dabei zeigte sich in der Gruppe der übergewichtigen Muttertiere eine gesteigerte Seneszenz-Rate im Vergleich zu der Kontrollgruppe, welche durch die NI, vor allem in der Zellpopulation der Trophoblasten, signifikant reduziert wurde. Die Apoptoserate war in der HFD-Gruppe gesteigert, allerdings konnte die NI darauf keinen positiven Einfluss nehmen. Bezüglich der Proliferations-Rate zeigten sich keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Zum weiteren Verständnis möglicher zugrundeliegender Pathologien der Plazentaintegrität wurde die Expression plazentarer AJ-Marker auf Gen- und Proteinebene mittels molekularbiologischer Analysen geschlechtsspezifisch untersucht. Dabei ergaben sich in den Genexpressionen keine relevanten Differenzen unter den Versuchsgruppen. Die quantifizierten Proteinmengen erbrachten jedoch einige geschlechtsspezifische Unterschiede, jeweils bezogen auf die Kontrollgruppe. Beispielsweise war das E-Cadherin, ein Transmembranprotein der AJ, welches sich in der plazentaren Labyrinthzone befindet, sowohl in der HFD- als auch in der NI-Gruppe der weiblichen Plazenten signifikant herunterreguliert. Bezogen auf das β -Catenin, welches innerhalb der AJ für die direkte Verbindung mit dem Zytoskelett sorgt, zeigte sich eine Hochregulation des Spiegels in der NI-Gruppe der männlichen Plazenten. Die Untersuchung des Adhäsionsmoleküls VE-Cadherin, das sowohl als AJ- als auch Endothelzellmarker fungierte, erbrachte eine Hochregulation der Proteinmenge in der HFD-Gruppe beider Geschlechter. Die Expression von P-Cadherin erbrachte keine signifikanten Unterschiede

unter den Versuchsgruppen. Dabei ist zu beachten, dass ausschließlich die Menge der Proteine und nicht ihre jeweilige Funktionalität im Rahmen dieses Projektes ermittelt wurde. Auch ihre Lokalisation wurde lediglich mithilfe vorangegangener Studien ermittelt, nicht jedoch genauer erfasst.

Um die Beschaffenheit der fetomaternalen Transferzone besser zu verstehen und daraus ggf. Schlüsse auf die fetale Versorgung ziehen zu können, wurden die fetalen Gefäße und maternalen Blutsinuse innerhalb der plazentaren Labyrinthzone ebenfalls stereologisch untersucht. Dabei wurden ihre Volumina, Oberflächen, Längen und Durchmesser ermittelt und es zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der fetalen Gefäßoberfläche und Kapillarlänge. Erstere war in der NI-Gruppe reduziert, letztere sowohl in der NI- als auch der HFD-Gruppe. Hinsichtlich der mittels immunhistochemischer Färbung betrachteten Apoptoserate zeigte sich ein Anstieg in der HFD- und in der NI-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Population der Endothelzellen. Die Betrachtung der Endothelzellintegrität auf Gen- und Proteinebene mittels der Marker CD31 und vWF ergab keine relevanten Unterschiede unter den drei Versuchsgruppen.

Abschließend ist zu sagen, dass eine NI bei maternalem Übergewicht am Mausmodell eindeutig zu einem verbesserten fetalen und maternalen Outcome führt, indem sie für eine Abnahme des maternalen Gewichts unter anderem durch eine Reduktion an weißem epigonadalem Fettgewebe sorgt und dem fetalen IUGR-Phänotyp entgegenwirkt. Durch die Herunterregulation der plazentaren Seneszenz gelingt eine verbesserte Zellhomöostase im Labyrinth, was einen zugrundeliegenden Erklärungsansatz hierfür darstellen könnte. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass keine einzelne Veränderung der Plazenta für das gestörte fetale Wachstum bei maternalem Übergewicht verantwortlich ist. Vielmehr ist es ein multifaktorielles Geschehen und das vorliegende Projekt kann einen Teil zum besseren Verständnis beitragen. Insgesamt hat die NI als risikoarme Intervention auch beim Menschen ein hohes Potenzial, zu einer gesunden Schwangerschaft und einer Reduktion der übergewichtsassoziierten Komplikationen beizutragen.

2. Einleitung

2.1. Übergewicht und Adipositas

Übergewicht stellt heutzutage vor allem in Industrieländern ein weltweites Gesundheitsproblem dar ¹. Im Folgenden gilt es, dessen mögliche Auswirkungen, insbesondere von maternalem Übergewicht, auf die Mutter, das ungeborene Kind sowie auf placentarer Ebene genauer zu verstehen.

2.1.1. Definition und Epidemiologie

Eine Klassifikation des Übergewichts ermöglicht der Body-Mass-Index, mit dessen Hilfe die World Health Organisation (WHO) Übergewicht ab einem BMI von 25 kg/m² definiert. Der Bereich von 25-30 kg/m² gilt als Präadipositas, gefolgt von Adipositas mit einem BMI über 30 kg/m² ².

Da Übergewicht weitere Erkrankungen und Krankheitskomplikationen begünstigt, stellt es das gesamte Gesundheitssystem vor Herausforderungen und gilt insgesamt als ein Indikator für das Gesundheitslevel einer Gesellschaft ². In den Jahren von 1985 bis 2002 konnte in Deutschland ein deutlicher Zuwachs der Adipositas-Prävalenz unter Frauen und Männern nachgewiesen werden ¹. Eine spätere Befragung „Gesundheit in Deutschland aktuell“ (GEDA) von dem Robert Koch Institut (RKI) aus den Jahren 2014/15 ergab, dass die Prävalenz in Deutschland im Vergleich zu den Vorjahren nahezu unverändert hoch war. Demzufolge waren insgesamt 54,0 % der über 18-Jährigen übergewichtig bzw. adipös. Näher betrachtet waren 28,8 % der Frauen und 43,3 % der Männer übergewichtig und 18,1 % beider Geschlechter adipös. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den Beobachtungen aus dem Jahr 2010 insbesondere im Alter der 18-29-Jährigen ein Zuwachs der Adipositas-Prävalenz von 5,4 % auf 8,9 % ³. Neben dem steigendem Alter wird außerdem ein niedriger sozioökonomischer Status mit einer steigenden Übergewichtsprävalenz assoziiert ².

2.1.2. Auswirkungen in der Schwangerschaft

Zufolge einer selektiven Literaturrecherche in PubMed aus dem Jahr 2017 waren etwa ein Drittel aller Frauen im gebärfähigen Alter übergewichtig bzw. adipös ⁴. Diese Frauen starten häufig mit einem geringeren Gesundheitslevel in eine Schwangerschaft als Normalgewichtige, da ihr Übergewicht chronische Erkrankungen wie beispielsweise einen arteriellen Hypertonus oder eine Hyperlipidämie begünstigt. Dies wiederum kann während einer Schwangerschaft zu Komplikationen wie einer Präeklampsie, einem Gestationsdiabetes, einem intrauterinen Fruchttod bzw. Aborten führen. Auch aufseiten des ungeborenen Kindes wird mütterliches Übergewicht mit einer Reihe an Komplikationen assoziiert, etwa mit kardiovaskulären oder kongenitalen Fehlbildungen, wie beispielsweise Spina bifida, ebenso mit intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) bzw. dem entgegengesetzten Bild einer fetalen Makrosomie.

Zudem stellt maternales Übergewicht einen Risikofaktor für fetale Frühgeburtlichkeit dar, welche eine der wichtigsten Ursachen für die neonatale Mortalität und Morbidität ist. Die Risiken auf mütterlicher und kindlicher Seite erhöhen sich dabei mit steigendem BMI der Mutter⁵.

2.2. Plazentare Dysfunktion unter maternalem Übergewicht

Eine Schlüsselrolle während der gesamten Schwangerschaft als Bindeglied zwischen Mutter und ungeborenem Kind spielt die Plazenta. Entsprechend könnte eine plazentare Dysfunktion bedingt durch maternales Übergewicht entscheidend an den Schwangerschaftskomplikationen beteiligt sein, welche bereits in dem vorherigen Abschnitt 2.1 erläutert wurden⁶⁻⁹.

2.2.1. Aufbau und Funktionen der Plazenta

Damit die möglichen Einflüsse von maternalem Übergewicht auf die Plazentafunktion genauer erforscht werden können, gilt es zunächst den allgemeinen Aufbau und die Aufgaben der Plazenta zu verstehen.

2.2.1.1. Die humane Plazenta

Während einer Schwangerschaft wird die Versorgung des ungeborenen Kindes über die Plazenta sichergestellt¹⁰. Die humane Plazenta entsteht ab dem sechsten bis siebten Tag nach der Fertilisation einer Eizelle und entwickelt sich sowohl aus embryonalem und maternalem Gewebe¹¹. Dabei unterliegt sie ab dem Zeitpunkt der Entstehung einem stetigen Wachstum und einer fortlaufenden Differenzierung¹². Zunächst findet im Anschluss an die Befruchtung einer Eizelle innerhalb von vier Tagen die Differenzierung der Eizelle zur Blastozyste statt, welche aus Tropho- und Embryoblast besteht. Es folgt die Implantation des Trophoblasten in das Uterusepithel. Dabei besitzt der Trophoblast ebenfalls zwei Anteile, einen äußeren Synzytiotrophoblasten, gebildet aus fusionierten Trophoblasten, welche Kontakt zu maternalen Zellen haben, und einen inneren Zytotrophoblasten. Im Folgenden entwickelt sich die Dezidua aus maternalen Endometriumszellen, als Reaktion auf die Implantation. Sie bildet zusammen mit einigen eingewachsenen fetalen Zellen die Basalplatte der Plazenta. Innerhalb des Synzytiotrophoblasten entsteht anschließend ein intervillöser Raum, welcher über Spiralarterien mit maternalem Blut gefüllt wird. Durch Bindegewebssepten, die von der Basalplatte ausgehen, wird dieser Raum in bis zu 20 Abschnitte, sogenannte Kotyledone, unterteilt. Zusätzlich findet die Ausbildung von Chorionzotten ausgehend von der fetalen Chorionplatte, dem Deckel der Plazenta, statt, welche embryonale Blutgefäße enthalten und in den intervillösen Raum ragen. Dabei bilden die Zotten die Form eines Baumes, bestehend aus Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten¹³. Diese Zone wird auch als fetale Plazenta bezeichnet¹⁴.

Somit besitzt die Plazenta zwei Blutkreisläufe, den fetalen und den maternalen, welche durch die Plazentabariere voneinander getrennt sind ¹². Das fetale Blut gelangt durch zwei Nabelarterien in der Nabelschnur über die Chorionplatte in ein Kapillarbett innerhalb der Chorionzotten und anschließend über eine Nabelvene, ebenfalls in der Nabelschnur, zurück zum Fetus. Dabei findet im Bereich des Kapillarbetts der fetomaternalen Gas- und Stoffaustausch über die Plazentaschranke, die fetomaternalen Transferzone, hinweg statt. Diese besteht aus Synzytiotrophoblasten, Zytotrophoblasten, Basallamina des Trophoblasten, Zottenstroma, Basallamina des Endothels und Kapillarendothel. Zu Beginn der Schwangerschaft ist die Schranke relativ dick und wird im Verlauf immer dünner, da die Zytotrophoblasten als Vorrat teilungsfähiger Zellen dienen und über die Zeit verbraucht werden. Ein Teil des Stoffaustausches geschieht dabei passiv, indem Gase und hydrophobe Moleküle durch die Barriere hindurchdiffundieren können. Hydrophile Moleküle hingegen, wie Aminosäuren und Proteine, benötigen Transporter oder Rezeptoren für den aktiven Transport über die Barriere hinweg. Der zweite Blutkreislauf, der mütterliche, befindet sich auf der anderen Seite der Plazentaschranke und wird durch den intervillösen Raum dargestellt. Dieser ermöglicht es, dass die Chorionzotten von mütterlichem Blut, kommend aus den Spiralarterien und abfließend in maternale Venen, umspült werden ¹³. Die mütterlichen Gefäße werden dabei von Trophoblasten während der Invasion dieser Zellen (endovaskuläre extravillöse Trophoblasten) erreicht und so hingehend transformiert, dass sie als Spiralarterien die Blutversorgung der Plazenta sicherstellen können ¹⁵.

Eine weitere wichtige Funktion der Plazenta, neben der Versorgung des Fetus, ist die Hormonsynthese durch die Synzytiotrophoblasten. Die Hormone, wie beispielsweise HCG oder Progesteron, spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, der Adaptation des mütterlichen Körpers an die Schwangerschaft, der folgenden Geburt und der anschließenden Stillperiode, sowie bei der Entwicklung des ungeborenen Kindes ^{13,16,17}.

2.2.1.2. Die murine Plazenta im Vergleich zur humanen Plazenta

Um die Plazenta hinsichtlich ihrer Aufgaben und insbesondere der Funktion der fetomaternalen Transferzone genauer untersuchen zu können, wird sich häufig, wie auch in diesem Promotionsprojekt, dem Mausmodell bedient. Denn das Mausmodell stellt das am besten erforschte experimentell-genetische Modellsystem für Säugetiere dar ¹⁴. Damit eine Extrapolation von der murinen auf die humane Plazenta vorgenommen werden kann, müssen sowohl die Gemeinsamkeiten als auch die Unterschiede bekannt sein.

Beim Betrachten der humanen und der murinen Plazenta fällt die ähnliche, scheibenförmige Form auf, auch diskoidal genannt. Diese Gemeinsamkeit erleichtert es, Untersuchungsergebnisse des Mausmodells auf die humane Plazenta zu transferieren ¹⁸. Die murine Plazenta ist ebenfalls ein Organ bestehend aus maternalen und fetalen Zellen und

dient wie beim Menschen der Interaktion zwischen Fetus und Mutter ¹⁴. Die Dauer einer murinen Schwangerschaft beträgt in der Regel 19 bis 20 Tage ¹⁹. Somit liegt bereits ab dem neunten Tag post conceptionem (p.c.) eine differenzierte Plazenta vor, welche aus vier verschiedenen Komponenten besteht: der Chorionplatte, dem Labyrinth, der Junktionalzone, sowie der Dezidua ^{10,20} (siehe Abbildung 1).

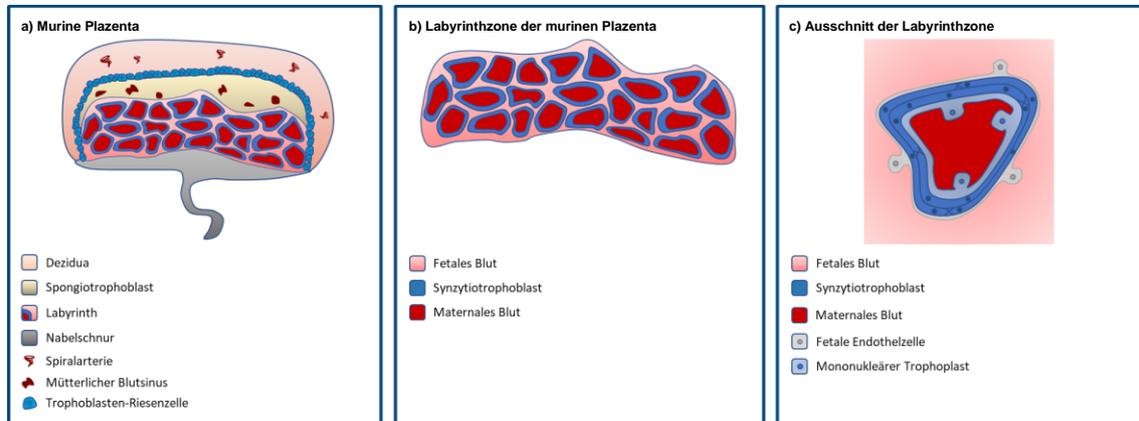


Abbildung 1: Aufbau der murinen Plazenta nach Maltepe ²¹

- a) *Die murine Plazenta im Querschnitt*
Die obere Schicht stellt die Dezidua dar, welche mit maternalem Blut gefüllte Spiralarterien beinhaltet. Daran angrenzend befinden sich Trophoblasten-Riesenzellen, gefolgt von dem Spongiotrophoblasten in dem mütterliche Blutsinusse liegen. Daran grenzt das Labyrinth, in dem sich die fetalen Gefäße befinden und welches auf fetaler Seite von der Nabelschnur begrenzt wird.
- b) *Das Labyrinth der murinen Plazenta*
Das Labyrinth stellt die fetomaternale Transferzone zwischen fetalem und maternalem Blutkreislauf dar. Die Kreisläufe sind dabei durch Synzytiotrophoblasten, mononukleäre Trophoblasten und fetalem Endothel voneinander getrennt.
- c) *Ausschnitt des Labyrinths*
Darstellung der Strukturen, die sich zwischen fetalem und maternalem Blut befinden, und somit die fetomaternale Transferzone bilden: fetale Endothelzellen, Synzytiotrophoblasten und mononukleäre Trophoblasten.

Dem Fetus zugewandt, befindet sich die Chorionplatte zusammen mit der Nabelschnur, die die direkte Verbindung zwischen Fetus und Plazenta bildet ¹⁴.

Das Labyrinth stellt die fetomaternale Transferzone dar. Die fetalen Gefäße bilden ein dichtes Gefäßnetz und befinden sich in Bindegewebssepten, welche von Trophoblasten umgeben sind und in maternalem Blut flottieren. Das maternale Blut gelangt dabei durch einen arteriellen Zufluss über die Junktionalzone in das Labyrinth und fließt über venöse Sinusse wieder ab. Wie beim Menschen werden der mütterliche und der fetale Blutkreislauf somit durch Trophoblasten voneinander getrennt ^{14,20}. Eine Gemeinsamkeit humaner und muriner Plazenten besteht also in einer hämochorialen Grenzfläche. Dies bedeutet, dass die fetalen Trophoblasten in direktem Kontakt zum maternalen Blut stehen ^{14,15,22}. Dabei besteht die Barriere bei der Maus aus drei Trophoblastzellschichten, zwei Schichten von Synzytiotrophoblasten und einer Schicht mononukleärer Trophoblasten, hämotrichorial genannt. Bei der humanen Plazenta hingegen existiert nur eine Schicht an Synzytiotrophoblasten, was hämomochorial bezeichnet wird ^{14,15,23}. Die zwei plazentaren Blutkreisläufe bei der Maus und dem Menschen befinden sich in engem Kontakt,

durchmischen sich aber nicht. Die Kreisläufe fließen im Gegenstrom zueinander, was den Nährstofftransport optimiert. Als ein weiterer Unterschied ist jedoch zu nennen, dass die humane Plazenta aufgrund der baumartigen Struktur vom villösen und die murine netzartige Plazenta vom labyrinthischen Typ ist ¹⁴.

Die anschließende Zone auf der maternalen Plazentaseite ist die Junktionalzone bzw. Spongiotrophoblastenzone, welche durch differenzierende Trophoblasten-Subtypen gebildet wird und der humanen Basalplatte entspricht ^{14,24}. Diese Zone sorgt über invasiv wachsende Trophoblasten für die Verankerung der Plazenta in die Uteruswand. Bei der Maus findet das Einwachsen bis in das Endometrium, beim Menschen hingegen bis in das Myometrium statt. Eine weitere Funktion dieser Zone beinhaltet bei der murinen, wie bei der humanen Plazenta, der Umbau der mütterlichen Spiralarterien. Diese Arterien sichern während der Schwangerschaft die Versorgung des ungeborenen Kindes ¹⁵. Die Junktionalzone befindet sich zwischen dem Labyrinth und der maternalen Dezidua und enthält neben Spongiotrophoblasten auch Glykogenzellen, welchen die Aufgabe eines Energiespeichers zugesprochen wird ¹⁵. Die humane Plazenta besitzt als möglichen Korrelat extravillöse Trophoblasten in der distalen Basalplatte, welche die Fähigkeit der Glykogenspeicherung und -metabolisierung besitzen ^{14,15}. Daran angrenzend befindet sich bei der Maus eine diskontinuierliche Schicht aus Trophoblasten-Riesenzellen, wobei bisher unklar ist, ob beim Menschen eine dazu analoge Zellschicht existiert ¹⁴. Die murinen Riesenzellen spielen eine unterstützende Rolle bei der Einnistung in das Uterusepithel ¹⁵. Eine noch zu erwähnende Funktion dieser Junktionalzone liegt in der Synthese von Hormonen, Wachstumsfaktoren und anderen Botenstoffen ^{15,25,26}.

Schließlich ist die murine Plazenta wie beim Menschen in das Uterusgewebe, die Decidua basalis, eingebettet, welche die Spiralarterien zur Versorgung der Plazenta enthält ¹⁴.

2.2.2. Fetaler Phänotyp unter maternalem Übergewicht

Neben dem Aufbau der Plazenta gilt es, die Auswirkungen von maternalem Übergewicht auf den Phänotyp der Feten zu betrachten, sowohl auf die murinen als auch auf die humanen Nachkommen.

Die Nachkommen von überernährten murinen Muttertieren präsentieren oft ein reduziertes fetales Gewicht im Gegensatz zu humanen Nachkommen adipöser Mütter, die häufig eine Makrosomie zeigen, jeweils im Vergleich zu einer normalgewichtigen Kontrollgruppe ^{27,28}. Dies ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass die Fähigkeit der Maus, Insulin in der Bauchspeicheldrüse zu produzieren, erst postnatal reift. Menschliche Feten hingegen besitzen bereits pränatal voll funktionsfähige β -Zellen, die für die Insulinproduktion verantwortlich sind. Das mütterliche Insulin kann im Gegensatz zu der Glukose bei beiden Spezies die Plazenta nicht passieren. Dadurch reagieren menschliche Feten auf mütterliche Überernährung mit insulinvermittelter Glukoseaufnahme in die Zellen und beschleunigtem Wachstum

(Makrosomie), währenddessen murine Feten ein reduziertes Wachstum zeigen (IUGR-Phänotyp) ²⁹⁻³¹. Dieser hypotrophe Phänotyp konnte ebenfalls in einem Mausmodell mit mütterlichem Übergewicht der AG Appel gezeigt werden. Die Feten übergewichtiger Muttertiere wiesen im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollmäusen an Gestationstag (G) 15.5 ein geringeres Körpergewicht auf. An G 18.5 hingegen ließ sich kein Unterschied des fetalen Gewichts unter den zwei Versuchsgruppen nachweisen. Daraus könnte auf eine anfängliche IUGR aufgrund der reduzierten Insulinproduktion, aber auch aufgrund einer potenziellen plazentaren Dysfunktion geschlossen werden, gefolgt von einem intrauterinen Aufholwachstum zum Ende der Schwangerschaft hin ³².

Ergänzend muss jedoch darauf aufmerksam gemacht werden, dass die Auswirkungen von mütterlichem Übergewicht auf das fetale Wachstum und den resultierenden Phänotyp sowohl der murinen als auch der humanen Feten nach aktuellem Forschungsstand schlecht verstanden sind. Entgegen dem obigen Erklärungsansatz werden auch hypotrophe humane und hypertrophe murine Nachkommen beobachtet. Insgesamt kann maternales Übergewicht in beiden Spezies somit in einem reduzierten als auch gesteigerten fetalen Geburtsgewicht resultieren, was die spätere Interpretation der Daten erschwert ^{33,34}. So wurde etwa in einer humanen Studie aus dem Jahr 2012 eine erhöhte fetale IUGR-Rate bei maternaler Adipositas beobachtet ³⁵ und in einer Literaturrecherche bezüglich einer fettreichen Ernährung am Nagetiermodell zeigte sich bei einer sehr hochkalorischen Diät, welche bereits im Vorfeld der murinen Schwangerschaft gefüttert wurde, eine Zunahme des murinen fetalen Geburtsgewichtes ³⁴.

2.2.3. Erklärungsansätze plazentarer Dysfunktion unter maternalem Übergewicht

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 deutlich wurde, spielt die Plazenta bei der Interaktion zwischen Mutter und ungeborenem Kind eine entscheidende Rolle. Eine Störung der Plazentafunktion kann zu einer Fehlversorgung des ungeborenen Kindes und einer Vielzahl an Komplikationen führen, siehe Abschnitt 2.1.2 ³⁶. Aktuell gibt es viele Hinweise dafür, dass maternales Übergewicht zu einer plazentaren Dysfunktion beitragen kann und somit unter anderem die plazentare Nährstofftransportfunktion, die Angiogenese der Plazenta und schließlich die fetale Entwicklung negativ beeinflusst ^{33,37}.

2.2.3.1. Plazentare Dysfunktion durch morphologische Veränderungen

Als mögliche Ursache der plazentaren Dysfunktion unter maternalem Übergewicht sollen zunächst morphologische Veränderungen der Plazenta betrachtet werden. In diesem Zusammenhang konnte in einem Mausmodell festgestellt werden, dass unter maternalem Übergewicht die durchschnittliche Anzahl der lebensfähigen plazentaren Trophoblasten signifikant reduziert war und sich eine erhöhte Zahl nekrotisierender labyrinthischer

Endothelzellen fand. Ein gleichzeitig beobachteter Trend hin zu einem reduzierten Plazentagewicht wurde auf diese zwei Pathologien zurückgeführt ²⁹. Die AG Appel beobachtete in einer Studie ebenfalls ein tendenziell geringeres Plazentagewicht bei übergewichtigen Muttertieren und untersuchte daraufhin die einzelnen Plazentazonen hinsichtlich ihrer Größe. Dabei zeigte sich eine signifikant kleinere Labyrinthzone bei den Plazenten übergewichtiger Muttertiere an G 18.5, nicht aber an G 15.5, im Vergleich zu denen der normalgewichtigen Kontrollgruppe. Dies impliziert wiederum eine beeinträchtigte Nährstoffversorgung des ungeborenen Kindes, da das Labyrinth den Ort der fetomaternalen Transferzone darstellt ³². Es muss jedoch erwähnt werden, dass sich in der Literatur unterschiedliche Beobachtungen bezüglich des placentaren Gewichts in Zusammenhang mit placentarer Dysfunktion finden lassen ³⁸. Um mithilfe des Plazentagewichts trotzdem Aussagen über die Plazentafunktion treffen zu können, stellt die Plazentaeffizienz einen möglichen Parameter dar. Diese gibt das Verhältnis vom Gewicht des Fetus und der Plazenta an. Die AG Appel konnte nachweisen, dass es zu einer signifikanten Reduktion der Plazentaeffizienz bei übergewichtigen Muttertieren an G 15.5 kam, im Vergleich zu einer normalgewichtigen Kontrollgruppe ³².

In vorangegangenen Studien wurde beobachtet, dass eine induzierte placentare Dysfunktion mit einer Verkleinerung der Junktionalzone korreliert, siehe auch Abschnitt 2.2.3.5 ^{39,40}. Unter der Annahme, dass maternales Übergewicht zu einer placentaren Dysfunktion führt, könnte diese Veränderung also auch bei den Plazenten übergewichtiger Muttertiere zu beobachten sein. In einer Arbeit der AG Appel konnte eine Verkleinerung der Junktionalzone unter mütterlichem Übergewicht jedoch bisher nicht bestätigt werden ³².

2.2.3.2. Placentare Dysfunktion durch Inflammationsprozesse

Als einen weiteren Erklärungsansatz einer placentaren Dysfunktion wird ein Inflammationsprozess des gesamten Organs diskutiert ^{41,42}. Während einer Schwangerschaft produziert die Plazenta verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 β (IL-1 β) ⁴³. Daraus wiederum ergibt sich, dass die Schwangerschaft einen Zustand erhöhter Entzündungswerte darstellt ⁴⁴. Auch mütterliches Übergewicht selbst wird mit einer Dysregulation und Steigerung von Entzündungsprozessen assoziiert ⁴¹. Die Kombination aus Übergewicht und Schwangerschaft und daraus resultierenden erhöhten Entzündungswerten könnte die Entwicklung und Funktion der Plazenta und somit die Versorgung des Fetus negativ beeinflussen.

Mögliche Folgen maternalen Übergewichts auf den fetalen Phänotyp werden gegensätzlich beschrieben, wie zuvor in Abschnitt 2.2.2 erörtert wurde. Bei der Entstehung einer fetalen Makrosomie wird den oben genannten Zytokinen in einem Review humaner Daten aus dem Jahr 2017 eine modellierende Wirkung zugesprochen, indem sie gemeinsam mit Insulin durch ein komplexes Zusammenspiel für eine vermehrte Expression von Nährstofftransportern (wie

etwa für Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren) innerhalb der Plazenta sorgen. Das in dem Review ebenfalls gesehene verminderte fetale Wachstum, IUGR, könnte durch eine Reduktion der Gefäßverzweigungen innerhalb der Plazenta bedingt sein, wie sie etwa bei hypertensiven Erkrankungen, beispielsweise der Präeklampsie zu finden sind. Insgesamt sind die zugrundeliegenden Mechanismen somit nicht abschließend geklärt und es gilt, sie zukünftig weiterzuerforschen ³³. Der Erklärungsansatz zur plazentaren Dysfunktion durch vaskuläre Veränderungen sei hier nur kurz erwähnt und soll in Abschnitt 2.2.3.5 genauer betrachtet werden.

Weitere mögliche Folgen der gesteigerten plazentaren Inflammationsprozesse bei übergewichtigen Schwangeren auf Ebene der Zell-Zell Verbindungen und der Endothelzellintegrität werden in den Abschnitten 2.2.3.3 und 2.2.3.4 erörtert.

2.2.3.3. Plazentare Dysfunktion durch eine Störung der Adherens Junctions

Einen weiteren Ansatzpunkt zur Erklärung plazentarer Dysfunktion stellt eine Destabilisierung der Adherens Junctions (AJ) durch erhöhte proinflammatorische Zytokin Level dar. AJ sind Cadherin-basierte Zell-Zell-Adhäsionsstellen, die direkt über β -Catenin mit dem Zytoskelett verbunden sind. Sie fungieren als interzelluläre Verbindungen und ermöglichen somit die Entstehung multizellulärer Organisationen wie der Plazenta. Zusätzlich wird ihnen eine Beteiligung an der intrazellulären Signalübertragung zugeschrieben ⁴⁵. Um den genauen Pathomechanismus der plazentaren Dysfunktion anhand der AJ-Funktion besser verstehen zu können, ist es hilfreich die Lokalisationen der beteiligten Proteine innerhalb der Plazenta zu kennen, da jeder Plazentazone wiederum unterschiedliche Aufgaben zugeschrieben werden (siehe Abschnitt 2.2.1).

Mittels Immunfluoreszenz wurde in einem Projekt der AG Appel die Lokalisation von β -Catenin, ein intrazelluläres Molekül, innerhalb muriner Plazenten detektiert. Dabei war es unter anderem in der Junktionalzone und in dem Labyrinth, dort sowohl in Synzythiotrophoblasten als auch in fetalen Endothelzellen, vor allem an der Zellmembrangrenze nachweisbar. In *in vitro* Studien derselben Arbeit wurde zudem gezeigt, dass bestimmte ungesättigte Fettsäuren einen Einfluss auf den β -Catenin-Spiegel haben und eine ungesunde Ernährung somit negative Auswirkungen auf die Plazentafunktion zur Folge haben könnte ⁴⁶. In einem weiteren Mausmodell der AG Appel zeigte sich außerdem, dass es zu einer Herunterregulierung der Proteinkonzentration von β -Catenin in den Plazenten übergewichtiger Mäuse kam ³².

Zu den Transmembranproteinen der AJ zählen die klassischen Cadherine: das epitheliale (E-), plazentare (P-) und vaskulär-endotheliale (VE-) Cadherin. Diese Cadherine binden über ihre intrazellulären Domänen an das oben erwähnte β -Catenin ^{47,48}. Die oben aufgeführte Studie der AG Appel beschäftigte sich auch mit der genauen Lokalisation der verschiedenen Cadherine innerhalb muriner Plazenten, welche sich bei P- und VE-Cadherin jedoch nicht eindeutig ermitteln ließ. P-Cadherin wurde dabei mittels Immunfluoreszenz sowohl vage in der

Labyrinthzone als auch in der Junktionalzone detektiert. E-Cadherin ließ sich eindeutig und ausschließlich in der Labyrinthzone nachweisen ⁴⁶.

VE-Cadherin kommt neben der Aufgabe als Komponente der AJ zusätzlich eine modulierende Funktion der vaskulären Homöostase zu und es dient somit ebenfalls als Endothelzellmarker ⁴⁹. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte IL-6 Werte die Organisation der AJ im Bereich der VE-Cadherin Domäne beeinflussen und dies zu einer Störung der Endothelfunktion beitragen könnte ⁵⁰. Diese Störung kann wiederum in einer erhöhten Endothelpermeabilität resultieren ⁵¹. Dadurch kann es schließlich zu einer veränderten placentaren Endothelfunktion und einer gestörten Endotheldurchlässigkeit innerhalb der Plazenta kommen.

Betrachtet man nun als nächste Komponente der AJ das E-Cadherin näher, zeigt sich eine Beeinflussung des E-Cadherin-Spiegels sowohl in Zusammenhang mit erhöhten Entzündungsmarkern als auch mit maternalem Übergewicht. Durch eine Erhöhung von TNF- α wurde eine Herunterregulierung von E-Cadherin induziert und dadurch die stabilisierende Wirkung des Cadherins auf die AJ reduziert ⁵². Auch an dem erwähnten Mausmodell der AG Appel konnte mittels einer Proteomik-Analyse in der Gruppe übergewichtiger Muttertiere eine Herunterregulation von E-Cadherin im Bereich des placentaren Labyrinths nachgewiesen werden, die mittels Western Blot-Analyse verifiziert wurde ⁴⁶. In der Funktion als Adhäsionsprotein könnte diese Veränderung über eine Destabilisierung der AJ zu einer Schwächung der Plazentaschranke im Labyrinth führen und folglich den placentaren Transport von Nährstoffen und Sauerstoff beeinträchtigen ⁴⁶.

2.2.3.4. Placentare Dysfunktion durch eine gestörte Endothelzellintegrität

Um die placentare Dysfunktion auf Endothelzellebene genauer zu betrachten, bedient man sich bekannter Endothelzellmarker. Diese sind neben dem genannten VE-Cadherin (siehe Abschnitt 2.2.3.3) das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (Cluster of Differentiation 31, CD31) und der von-Willebrand-Faktor (vWF) ⁵³. Dabei ist bekannt, dass eine verminderte Expression von CD31 auf eine endotheliale Dysfunktion und Vaskulopathien schließen lässt ⁵⁴. Entsprechend wurde in einer Studie der AG Appel eine Verminderung sowohl von CD31 als auch dem vWF in Plazenten übergewichtiger Mäuse nachgewiesen ⁵⁵. In einem weiteren Mausmodell mit nahrungsinduziertem Übergewicht wurde gezeigt, dass es bei einer CD31-Immunfärbung bei übergewichtigen Muttertieren, im Vergleich zu der normalgewichtigen Kontrollgruppe, zu einer verringerten Gesamtintensität der CD31-gefärbten Labyrinth-Endothelzellen in der Plazenta kam. Dies lässt schlussfolgern, dass eine fettreiche Ernährung endotheliale Zellschädigung sowie zelluläre und vaskuläre Pathologien der Plazenta induziert ²⁹. Da CD31 hauptsächlich in dem Labyrinth der murinen Plazenta exprimiert wird, könnte eine Herunterregulierung dieses Proteins den Nährstoff- und Gasaustausch zwischen Mutter und Kind ebenfalls direkt beeinflussen ⁵⁵.

Einen weiteren möglichen Pathomechanismus der gestörten Endothelzellintegrität und der daraus resultierenden Plazentainsuffizienz stellt die Zellalterung dar. In diesem Zusammenhang konnte in der plazentaren Labyrinthzone übergewichtiger Muttertiere eine erhöhte Seneszenz-Rate CD31 positiver Endothelzellen im Vergleich zu der normalgewichtigen Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Vermutet wird dabei eine Induktion der Seneszenz durch IL-6⁵⁵.

2.2.3.5. Plazentare Dysfunktion durch vaskuläre Veränderungen

Ein gestörter Blutfluss innerhalb der Plazenta wird als Hauptursache für verschiedene Schwangerschaftskomplikationen wie IUGR, Präeklampsie oder auch Aborte diskutiert. Dabei kommt es durch einen Defekt im Plazentagefäßbett zu einer Fehlversorgung des ungeborenen Kindes. Es wird davon ausgegangen, dass unter anderem eine herabgesetzte und gestörte Transformation der Spiralarterien zu den genannten Pathologien führt. In diesem Zusammenhang wird den endovaskulären extravillösen Trophoblasten die Funktion zugeschrieben, während der Trophoblasteninvasion für die Transformation der Spiralarterien hauptverantwortlich zu sein⁵⁶. In einem experimentellen Mausmodell konnte ein Mangel der Trophoblasteninvasion erzeugt werden und daraufhin stellte sich eine gestörte Spiralarterientransformation ein. Außerdem wiesen die reifen Plazenten dieser Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine kleinere Junktionalzone auf, welche aus differenzierenden Trophoblasten-Subtypen besteht^{39,40}. In umgekehrter Reihenfolge betrachtet, könnte eine kleinere Junktionalzone somit mit einer verminderten Trophoblasteninvasion und einer gestörten Transformation der Spiralarterien assoziiert sein. Kurz erwähnt sei, dass es neben dem Ansatz der Fehlregulierung der Transformation der Gefäße überdies den Ansatzpunkt der herabgesetzten maternalen Gefäßdurchmesser gibt, reguliert über den NOTCH-Signalweg^{57,58}. Es wurde nachgewiesen, dass dieser Signalweg in Plazenten gestört ist, bei denen die Feten von IUGR oder die Mütter von schwangerschaftsassoziierter Hypertonie betroffen sind⁵⁹.

Auch aufseiten der fetalen Gefäße konnten Veränderungen in dem murinen plazentaren Labyrinth von übergewichtigen Muttertieren nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine verminderte fetale Gefäßoberfläche und eine reduzierte fetale Kapillarlänge in einer stereologischen Arbeit der AG Appel⁵⁵.

2.3. Eine Nahrungsintervention zur Reduktion plazentarer Dysfunktion

Die Ansatzpunkte zur Reduktion der Schwangerschaftskomplikationen von maternalem Übergewicht sind vielfältig. Mögliche Interventionen sind dabei zum einen Lifestyle-Interventionen wie Diäten und vermehrte körperliche Aktivität sowie chirurgische bariatrische Eingriffe⁴. Die meisten therapeutischen Maßnahmen setzten bereits vor Beginn der Schwangerschaft an und raten den Frauen zu einer Änderung ihrer Lebensgewohnheiten,

meist durch eine Kombination der genannten Lifestyle-Interventionen und dem Ziel der präkonzeptionellen Gewichtsreduktion^{4,60}. Sowohl die Ovulationsrate, als auch die Lebendgeburtenrate konnte durch eine präkonzeptionelle Gewichtsreduktion mittels Lifestyle-Intervention bestehend aus Kalorienrestriktion, Medikamenten zur Gewichtsreduktion und erhöhter körperlicher Aktivität verbessert werden⁶¹.

Sind diese Maßnahmen jedoch im Vorfeld der Schwangerschaft nicht umsetzbar oder erfolgreich, sollten möglichst die mit Übergewicht assoziierten Risiken während der Schwangerschaft minimiert werden. Hierzu erforscht die AG Appel drei Interventionen getrennt voneinander am Mausmodell, ab Eintritt der Schwangerschaft: eine Sportintervention, eine medikamentöse Intervention mittels Metformingabe und im Rahmen dieses Promotionsprojektes eine Nahrungsintervention (NI). Da diese Interventionen in humanen Studien wie oben beschrieben häufig in Kombination untersucht werden, sind gezielte Aussagen über den Effekt einer einzelnen bisher nur schwierig zu treffen⁶⁰.

Am Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass eine gesunde Ernährung übergewichtiger Muttertiere während der Trächtigkeit und der Laktation eine wirksame Strategie darstellt, um negativen Folgen von mütterlichem Übergewicht hinsichtlich des fetalen Outcomes entgegenzuwirken. Es zeigten sich etwa normalgewichtige Feten in einer gesunden NI-Gruppe und die IL-6-Genexpression im Fettgewebe dieser Feten normalisierte sich. Demgegenüber war die IL-6-Genexpression bei Feten übergewichtiger Muttertiere ohne NI um das 2,5-fache erhöht⁶². Diese Normalisierung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine als positiver Effekt einer NI lässt sich gegebenenfalls auch auf plazentarer Ebene wiederfinden.

Am Modell des Makaken wurde eine gesunde NI übergewichtiger Muttertiere gegenüber der Fortführung einer fettreichen Ernährung während der Schwangerschaft hinsichtlich der Plazentaintegrität bereits untersucht. Eine fettreiche Ernährung wurde in diesem Modell mit einer Dysfunktion der Plazenta assoziiert. Resultate waren ein verringerter Blutfluss in der Plazenta (verringerte Blutflussgeschwindigkeit im intervillösen Raum, verzögerter Blutfluss-Transfer durch die mütterlichen Spiralarterien und verringerter plazentarer Gesamtblutfluss) und eine Erhöhung der Entzündungswerte. Es wurde zudem untersucht, ob eine einfache Ernährungsumstellung vor der Geburt von einer fettreichen hin zu einer gesunden Ernährung die Plazentafunktion verbessern könnte. Das Resultat war positiv, denn die Ernährungsumstellung führte zu einer verbesserten Hämodynamik der Plazenta und die genannten Dysfunktionen des Blutflusses wurden nicht mehr beobachtet⁶³.

Ergänzend soll hier eine Meta-Analyse von Beobachtungsstudien bezüglich mütterlicher Ernährungsgewohnheiten gesunder schwangerer Frauen aufgeführt werden. Darin zeigte sich, dass eine gesunde Ernährung während der Schwangerschaft mit einem reduzierten Risiko für Frühgeburtlichkeit und SGA einhergeht. Demgegenüber wurde eine ungesunde

Ernährung mit dem Trend hin zu erhöhten Frühgeburtsraten und einem niedrigeren fetalen Geburtsgewicht assoziiert ⁶⁴. Ein möglicher Erklärungsansatz dieser mit Übergewicht und ungesunder Ernährung assoziierten Schwangerschaftskomplikationen, wie der Frühgeburtlichkeit, stellt abermals der gesteigerte Inflammationsprozess dar ^{65,66}. Der Pathomechanismus wurde in Abschnitt 2.2.3.2 dargelegt. Entsprechend wird eine ungesunde Ernährung, welche reich an gesättigten Fettsäuren ist und einen hohen Zuckeranteil hat, mit Entzündungsprozessen und Frühgeburtlichkeit assoziiert ⁶⁷⁻⁶⁹. Eine gesunde Ernährung bestehend aus Lebensmitteln wie Gemüse, Obst, Hülsenfrüchte und Vollkornprodukten wird dem gegenüber eine antioxidative und entzündungshemmende Wirkung zugesprochen ^{66,70}. Bei der weiteren Literaturrecherche fiel auf, dass sich in humanen Studien übergewichtiger Schwangerer zum Teil widersprüchliche Ergebnisse zeigten. Zum einen wurde in einer klinischen Studie deutlich, dass eine Intervention mit der Kombination aus Ernährungs-, Bewegungs- und Verhaltenskomponenten zu einer signifikanten Verbesserung der Schwangerschaftsraten und Lebendgeburten übergewichtiger Frauen führte, die sich einer Fertilitätsbehandlung unterzogen ⁷¹. In einer anderen randomisierten Studie zeigten sich jedoch, dass eine Gewichtsreduktion mittels Lifestyle-Intervention bei übergewichtigen Frauen keinen Vorteil in Bezug auf eine höhere Rate vaginaler Geburten erzielen konnte ⁷². Zusätzlich wurde in dieser Studie deutlich, dass die Intervention mit einer erhöhten Abbruchrate der Probandinnen verbunden war ⁷². Ein ausbleibender Nachweis eines Effektes in humanen Studien könnte auf eine mangelnde Compliance der Probandinnen sowie eine unpräzise Definition und Überprüfbarkeit der gesunden Ernährung zurückzuführen sein ⁴. Ein Optimierungsansatz zur Reduktion der möglichen Komplikationen während der Schwangerschaft übergewichtiger Mütter ist bereits in der Schwangerschaftsvorsorge zu finden. Das Thema der gesunden Ernährung und der Körpergewichtsnormalisierung gilt als ein wichtiger Bestandteil dieser ^{60,73}. Demnach sollte auf die Qualität der Ernährung geachtet werden, also die Zusammensetzung von Kohlenhydraten, Fetten, Proteinen, Ballaststoffen sowie Vitamine und Mineralstoffe. Bei einem BMI $>25 \text{ kg/m}^2$ ist eine zusätzliche gezielte Ernährungsberatung sinnvoll ⁷³. Außerdem ist auf die Gewichtszunahme der Mütter im Verlauf der Schwangerschaft zu achten. Von einer Gewichtsreduktion genauso wie von einer übermäßigen Gewichtszunahme während der Schwangerschaft wird im Allgemeinen abgeraten ^{4,74}. Die enge und individuelle Betreuung der werdenden Mütter sei laut Institut of Medicine (IOM) eine der wichtigsten Maßnahmen im Umgang mit Übergewicht in der Schwangerschaft. Zur Orientierung hat das Institut Richtwerte für die empfohlene Gewichtszunahme während der Schwangerschaft herausgegeben ⁷⁵. Diese werden jedoch von übergewichtigen Schwangeren häufig überschritten, was unter anderem auf eine unausgewogene Ernährung zurückzuführen ist und explizit mit den Komplikationen der hypertensiven Schwangerschaftsstörungen, Makrosomie des Kindes und einer

Kaiserschnittentbindung assoziiert wird. Die Entwicklung von Strategien und Richtlinien zur Optimierung des Lifestyles übergewichtiger Schwangerer bleibt daher weiterhin eine medizinische und gesellschaftliche Herausforderung ⁷⁶.

2.4. Zielsetzung und Fragestellung

Die möglichen Komplikationen sowohl für die Mutter als auch das ungeborene Kind bei einer Schwangerschaft unter maternalem Übergewicht sind bereits gut erforscht und gelten als ein weltweites Gesundheitsproblem mit steigender Prävalenz. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind dabei Bestandteil aktueller Forschungen und es gilt der Konsens, dass die Plazenta dabei eine Schlüsselfunktion besitzt. Außerdem sind die positiven Effekte einer gesunden Ernährung auf den menschlichen Organismus bekannt und fester Bestandteil der allgemeinen Schwangerschaftsvorsorge. Die möglichen Auswirkungen einer gesunden Ernährung ab dem Zeitpunkt der Schwangerschaft bei maternalem Übergewicht auf die Mutter und das ungeborene Kind sowie auf plazentarer Ebene gilt es jedoch weiter zu erforschen. Die isolierte Betrachtung dieser Intervention ist in humanen Studien nur eingeschränkt möglich und zeigte bisher keine richtungsweisenden Ergebnisse. Daher gilt es, dies an einem Mausmodell im Hinblick auf folgende Fragestellungen genauer zu untersuchen.

1. Kommt es durch eine NI zu phänotypischen Veränderungen bei Muttertier und Fetus?
2. Wird die Integrität der Plazentamorphologie und die ihrer einzelnen Zonen durch eine NI beeinflusst?
3. Nimmt eine NI Einfluss auf die (Endothel-)Zellhomöostase in dem plazentaren Labyrinth?
4. Hat eine NI einen Einfluss auf die Genexpression bzw. Proteinmenge plazentarer AJ- und Endothelzellmarker?
5. Führt eine NI zu einer Veränderung der Gefäßmorphologie innerhalb der plazentaren Labyrinthzone?

Dabei beziehen sich die Fragen auf eine NI am Mausmodell bei maternalem Übergewicht und dem Beginn der Intervention ab dem Zeitpunkt der Schwangerschaft. Schließlich gilt es aus den gewonnenen Ergebnissen Schlüsse zu ziehen, die sich auf die humane Schwangerschaft mit maternalem Übergewicht übertragen lassen, um dadurch mögliche positive Einflüsse auf übergewichtsassoziierte Schwangerschaftskomplikationen erzielen zu können.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Chemikalien und Enzyme

Chemikalie/Enzym	Hersteller	Verwendung
Buprenorphin	Bayer, Leverkusen, Deutschland	Präparation/Tötung
CO ₂	Linde, Pullach, Deutschland	Präparation/Tötung
Roti®-Histofix 4 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Asservierung
70 % Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Asservierung
Paraplast-Paraffin	Leica, Wetzlar, Deutschland	Asservierung
Tris Pufferan®	Roth, Karlsruhe, Deutschland	DNA-Extraktion, Agarose- Gelelektrophorese, Proteinisolation und - bestimmung, SDS- PAGE, Western Blot
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland	DNA-Extraktion, SDS- PAGE, Western Blot
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	DNA-Extraktion, Agarose- Gelelektrophorese, Proteinisolation und - bestimmung
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	DNA-Extraktion, SDS- PAGE
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	DNA-Extraktion, Immunhistochemie, Proteinisolation und - bestimmung, Western Blot
Proteinase K (>600 U/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA	DNA-Extraktion
≥99,8 % Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland	DNA-Extraktion, RNA- Isolation
MilliQ-Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland	PCR, SDS-PAGE, Histologie
5x Colorless GoTaq® Reaction Buffer	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA	PCR
MgCl ₂ (25 mM)	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA	PCR
dNTP Mix (jeweils 10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA	PCR, cDNA-Synthese
5x GoTaq® DNA- Polymerase	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA	PCR

Agarosepulver	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Agarose-Gelelektrophorese
Midori Green Advance DNA-Farbstoff	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland	Agarose-Gelelektrophorese
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA	Agarose-Gelelektrophorese
TriReagent	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	RNA-Isolation
Trichlormethan /Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland	RNA-Isolation
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	RNA-Isolation, cDNA-Synthese
100 % Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	DNA-Extraktion, RNA-Isolation
RQ1 RNase free DNase	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA	cDNA-Synthese
RQ1 DNase 10x Reaction Buffer	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA	cDNA-Synthese
RQ1 DNase Stop Solution	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA	cDNA-Synthese
Randomprimer	Roche, Basel, Schweiz	cDNA-Synthese
Oligo dT-Primer (0,5 µg/µl)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland	cDNA-Synthese
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA	cDNA-Synthese
Recombinant RNasin® Ribonuklease Inhibitor	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA	cDNA-Synthese
M-MLV RT 5x Buffer	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA	cDNA-Synthese
Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX	Invitrogen, Carlsbad/Kalifornien, USA	qRT-PCR
LiChrosolv®-Wasser (HPLC)	Merck, Darmstadt, Deutschland	qRT-PCR
IGEPAL® CA-630 NP40	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Proteinisolation
Aprotinin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Proteinisolation
Pepstatin A	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Proteinisolation
Leupeptin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Proteinisolation
Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Proteinisolation
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Proteinisolation
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Proteinisolation
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteinisolation
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA	Proteinbestimmung

BSA/Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteinbestimmung, Western Blot
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland	SDS-PAGE
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland	SDS-PAGE
Glycerin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	SDS-PAGE
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland	SDS-PAGE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	SDS-PAGE
TEMED	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	SDS-PAGE
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA	SDS-PAGE
Glycin Pufferan®	Roth, Karlsruhe, Deutschland	SDS-PAGE, Western Blot, Immunfluoreszenz
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Western Blot
Vollentsalztes (VE-)Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland	Western Blot, Histologische Färbungen
>99 % Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Western Blot
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Western Blot
Tween® 20	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Western Blot, Immunfluoreszenz
ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences, Chicago/Illinois, USA	Western Blot
Neo-Clear®	Merck, Darmstadt, Deutschland	Histologische Färbungen
≥99,8 %-Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologische Färbungen
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Merck, Darmstadt, Deutschland	Immunfluoreszenz, Immunhistochemie
Dako Cytomation Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 (10x)	DAKO, Santa Clara, USA	Immunfluoreszenz, Immunhistochemie
Sea Block Blocking Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA	Immunfluoreszenz, Immunhistochemie
Antikörperdiluent	DAKO, Santa Clara, USA	Immunfluoreszenz, Immunhistochemie
DAPI	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Immunfluoreszenz
Fluoromount Aqueous Mounting Medium	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Immunfluoreszenz
Alexa Fluor™ 555 Tyramide SuperBoost™ Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA	Immunfluoreszenz

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL-Kit)	Roche, Basel, Schweiz	Immunfluoreszenz
BrdU	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland	Immunfluoreszenz
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologische Färbungen (HE, Immunhistochemie)
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologische Färbung (HE)
100 % Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologische Färbung (HE)
Neo-Mount® Wasserfreies Eindeckmittel	Merck, Darmstadt, Deutschland	Histologische Färbungen (HE, Immunhistochemie)
Harnstoff-Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Immunhistochemie
ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame/California, USA	Immunhistochemie

Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme

3.1.2. Stammlösungen und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung	Verwendung
Tail lysis Puffer (pH 8,0)	100 mM Tris/HCl 5 mM EDTA 0,2 % (m/v) SDS 200 mM NaCl	DNA-Extraktion
TAE-Puffer (50x) (pH 8,0)	2 M Tris Essigsäure (variabel, pH-abhängig) 0,05 M EDTA	Agarose-Gelelektrophorese
Modifizierter RIPA-Puffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 % (v/v) IGEPAL® NP 40 1 mM EDTA 0,25 % (v/v) Natriumdesoxycholat 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Pepstatin A 1 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM PMSF	Proteinisolierung und -bestimmung
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris/HCl	SDS-PAGE
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl	SDS-PAGE
Probenpuffer für Proteine (5x)	16,4 % (v/v) Sammelgelpuffer 2 % (v/v) SDS 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol 2,6 % (v/v) Bromphenolblau 10 % (v/v) Glycerin	SDS-PAGE
Lämmli-Puffer (10x) (pH 8,3)	240 mM Tris 1,91 M Glycin 1 % (m/v) SDS	SDS-PAGE
Towbin-Puffer (10x)	250 mM Tris	Western Blot

TBST (1x) (pH 7,5)	1,92 M Glycin	Western Blot
	1 mM Tris/HCl	
	10 mM NaCl	
	0,1 % (v/v) Tween 20	
Ponceau S-Lösung	0,2 % (m/v) Ponceau Pulver	Western Blot
	3 % (v/v) Trichloressigsäure	
PBST	9,55 g/L PBS	Immunfluoreszenz
	0,05 % (v/v) Tween® 20	

Tabelle 2: Stammlösungen und Puffer

3.1.3. Primer und Oligonukleotide

Primer/Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
ZFX-L	AACATCCTGAACACCTTGCC
ZFX-R	TAGCTTGTGGCTCTCCAGGT
(X-Chromosom)	
YMT/2b forward	CTGGAGCTCTACAGTGATGA
YMT/2b reverse	CAGTTACCAATCAACACATCA
(Y-Chromosom)	
β-Aktin forward	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT
β-Aktin reverse	GCCACCGATCCACACAGAGT
β-Aktin taq	ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC
VE-Cadherin forward	TGGCCAAAGACCCTGACAAG
VE-Cadherin reverse	TCGGAAGAATTGGCCTCTGT
VE-Cadherin taq	CTCAGCGCAGCATCGGGTACTCCAT
P-Cadherin forward	GACATGGATGGAGAGGGCTCTA
P-Cadherin reverse	CTCATACTTCTGCGGCTCAAAC
P-Cadherin taq	CCTTGATGCCAACGATAACGCTCCG
E-Cadherin forward	CAGTCATAGGGAGCTGTCTACCAA
E-Cadherin reverse	GGGTACACGCTGGGAAACAT
E-Cadherin taq	CACCACCACCGCGACCCTGC
β-Catenin forward	GGACGTTACAACCGGATTG
β-Catenin reverse	GGACCCCTGCAGCTACTCTTT
β-Catenin taq	CCATTGTTTGTGCAGTTGCTTTATTCTCCC
CD31 forward	AAAGCCAAGGCCAAACAGAA
CD31 reverse	CCAGAAACATCATCATAACCGTAATG
CD31 taq	AGATGTCCAGGCCAGCTGCTCCACTT
vWF forward	GGGAGTTTTTTGACATCCATTTG
vWF reverse	TACCCAGCCTCGCGTTCTAG
vWF taq	TGACCAAAGCATCTCCATGCCCTACG

Tabelle 3: Primer/Oligonukleotide

Die Software „Primer Express 3.0“ wurde verwendet, um die Primer und Oligonukleotide zu entwerfen. Die anschließende Synthese erfolgte durch Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland. Die TaqMan™-Sonden waren mit den Farbstoffen FAM (5' fluoreszierender Reporterfarbstoff) und TAMRA (3' fluoreszierender Quencher) gelabelt. (taq: TaqMan™-Sonde; A: Adenosin, T: Thymin, C: Cytosin, G: Guanin)

3.1.4. Erst- und Zweitantikörper

Erstantikörper	Spezies	Quelle	Verdünnung	Verwendung
Anti-β-Aktin	Maus	Cell Signaling (#3700)	1:5000 (5 % Milch/TBST)	Western Blot
Anti-VE-Cadherin	Kaninchen	Abcam (ab33168)	1:1000 (5 % BSA/TBST)	Western Blot

Anti-P-Cadherin	Kaninchen	Abcam (ab190076)	1:1000 (5 % BSA/TBST)	Western Blot
Anti-E-Cadherin	Kaninchen	Cell Signaling (#3195S)	1:1000 (5 % BSA/TBST)	Western Blot
Anti-β-Catenin	Kaninchen	Cell Signaling (#8480)	1:1000 (5 % Milch/TBST)	Western Blot
Anti-CD31	Kaninchen	Abcam (ab28364)	1:1000 (5 % Milch/TBST) 1:300 (Antikörperdiluents) 1:400 (Antikörperdiluents)	Western Blot Immunfluoreszenz Immunhistochemie
Anti-BrdU	Maus	Cell Signaling (#5292)	1:1000 (Antikörperdiluents)	Immunfluoreszenz
Anti-γH2AX	Kaninchen	Abcam (ab11174)	1:4000 (Antikörperdiluents)	Immunfluoreszenz

Tabelle 4: Erstantikörper

Zweitantikörper	Spezies	Quelle	Verdünnung	Verwendung
Anti-Maus-IgG (HRP)	Pferd	Cell Signaling (#7076)	1:2000 (5 % Milch/TBST)	Western Blot (β-Aktin)
Anti-Kaninchen-IgG (HRP)	Ziege	Cell Signaling (#7074)	1:1000 (5 % Milch/TBST) 1:2000 (5 % Milch/TBST)	Western Blot (P-Cadherin, VE-Cadherin, β-Catenin) Western Blot (E-Cadherin, CD31)
Anti-Maus-IgG (DyLight488)	Ziege	Jackson Immuno Research 115-485-003	1:500 (Antikörperdiluents)	Immunfluoreszenz (BrdU)
Anti-Kaninchen-IgG (Cy3)	Ziege	Jackson Immuno Research 111-165-003	1:500 (Antikörperdiluents)	Immunfluoreszenz (CD31)
Anti-Kaninchen-IgG (DyLight488)	Ziege	Jackson Immuno Research 111-485-003	1:500 (Antikörperdiluents)	Immunfluoreszenz (γH2AX)
Anti-Maus/Kaninchen/Ratte-ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer		Zytomed Systems, Berlin, Deutschland		Immunhistochemie

Tabelle 5: Zweitantikörper

3.1.5. Geräte

Gerät	Hersteller
Gewebeinfiltrationsautomat ASP300S (ZMMK)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffinausgießstation EG1150 H (ZMMK)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühlplatte EG1150 C (ZMMK)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Rotationsmikrotom RM2255 (ZMMK)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffin-Streckbad TFB 45 (ZMMK)	Medite, Burgdorf, Deutschland
Trockenschrank (ZMMK)	WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland
Mikroskop (Typ 020-452 008)	Leitz/Leica, Wetzlar, Deutschland
Leica SP8 Konfokalmikroskop (CECAD)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Histoscanner SCN400	Leica, Wetzlar, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Mehrkanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heiz-Thermomixer	HLC Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mini-Zentrifuge	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tischzentrifuge Rotina 420R	Hettich, Bäch, Schweiz
Vortexer	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Biometra Tone Thermocycler	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Precisa ES 320A Waage	Precisa, Dietikon, Schweiz
Mikrowelle	Severin, Sundern, Deutschland
Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
Midi Plus Elektrophorese-Kammer horizontal	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spannungsquelle peq power 300	Peqlab/VWR, Erlangen, Deutschland
BioDocAnalyse Darkhood	Biometra, Jena, Deutschland
Schwingmühle mM 400	Retsch, Haan, Deutschland
Nano Quant infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Nano Quant plate™	Tecan, Männedorf, Schweiz
7500 Real Time PCR System Thermocycler	Applied Biosystems, Waltham/Massachusetts, USA
Semi-Automatic Sheet Heat Sealer	4titude/Brooks Life Sciences, Wotton, England
Mikropistill	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sonifizierer Sonopuls®	Bandelin, Berlin, Deutschland
SkyLine DTS-4 Plattenheizgerät	Elmi, Calabasas/California, USA
Vertikales Gelelektrophorese-System	Peqlab/VWR, Erlangen, Detuschland
Semi-Dry-Blotter	Peqlab/VWR, Erlangen, Detuschland
Chemidoc™ XRS imaging system	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
Folienschweißgerät	Severin, Sundern, Deutschland
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Kreis-Schüttler GFL 3005	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Dampfgarer	Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland
Plastikküvetten	Medite Medical, Burgdorf, Deutschland
Färbegestell	Medite Medical, Burgdorf, Deutschland

Tabelle 6: Geräte

3.1.6. Arbeits-/Verbrauchsmaterialien

Arbeits-/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Gewebe-Einbettkassetten Uni-safe	AMP A/S, Stensved, Dänemark
Metallförmchen	Medite Medical, Burgdorf, Deutschland
Mikrotommesser R35	Feather, Osaka, Japan
Superfrost plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Deckgläser	VWR, Darmstadt, Deutschland
Rasierklingen	Apollo, Solingen, Deutschland
Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcons	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sereologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S.® Filter-Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Combitips advanced® Dispenser-Spitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Faltenfilter	Roth, Karlsruhe, Deutschland
96-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FrameStar® 96-Well-PCR-Platte	4titude/Brooks Life Sciences, Wotton, England
Clear heat seal sheets	4titude/Brooks Life Sciences, Wotton, England
Amersham™ Protran™ 0.45 µm nitrocellulose blotting membranes	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, England
Whatman-Papier	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, England
Gefrierbeutel	Netto, Maxhütte-Haidhof, Deutschland
Skalpell	BRAUN, Kronberg im Taunus, Deutschland
Glasware (Messzylinder, Messbecher)	DWK Life Science, Wertheim, Deutschland

Tabelle 7: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

3.1.7. Software

Software	Hersteller
BioDocAnalyze Live	Biometra, Jena, Deutschland
7500 Software v2.0.6	Applied Biosystems, Waltham/Massachusetts, USA
Primer Express 3.0	Applied Biosystems, Waltham/Massachusetts, USA
Tecan i-control 2.0	Tecan, Männedorf, Schweiz
Image Lab™ v5.2.1	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
ImageJ-Fiji 2011	National Institutes of Health, Bethesda/Maryland, USA
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, San Diego/Kalifornien, USA
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond/ Washington, USA

Tabelle 8: Software

3.2. Generierung der Versuchsgruppen

Die Tierversuche fanden mit weiblichen C57BL/6N (Janvier Labs/Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) Wildtyp-Mäusen statt, die im Alter von drei Wochen an den hiesigen Tierstall geliefert wurden.

3.2.1. Haltungsbedingungen

Die Betreuung der Versuchstiere erfolgte durch die TierpflegerInnen des Tierhaltungsnetzwerkes sowie MitarbeiterInnen der AG Appel im Tierstall des pharmakologischen Instituts der Uniklinik zu Köln. Die Unterbringung und Versorgung der Mäuse fand entsprechend der Regeln des Tierhaltungsnetzwerkes der Universität zu Köln und den Richtlinien der Bezirksregierung Köln statt. Zusätzlich wurde vorab die Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (84-02.04.2016.A046) eingeholt. Die weiblichen Mäuse befanden sich bis zur Verpaarung mit drei bis vier Tieren in je einem Käfig, getrennt von den Männchen.

Um die Haltung der Tiere unter kontrollierten Umweltbedingungen zu gewährleisten, wurden folgende Maßnahmen ergriffen: eine konstante Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 %, eine permanente Raumtemperatur von 22 °C und ein Lichtwechsel von Dunkel auf Hell um 6 Uhr sowie von Hell auf Dunkel um 18 Uhr, um einen zirkadianen Rhythmus zu generieren. Während der gesamten Versuchszeit hatten die Mäuse uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser.

3.2.2. Etablierung der Versuchsgruppen

Insgesamt wurden drei Versuchsgruppen generiert, eine Kontroll- bzw. Standard-Diät-Gruppe (SD-Gruppe), eine Hoch-Fett-Diät-Gruppe (HFD-Gruppe) und eine Nahrungsinterventionsgruppe (NI-Gruppe) (siehe Abbildung 2).

Die weiblichen Tiere der SD-Gruppe erhielt ab einem Alter von drei Wochen während der gesamten Versuchsreihe eine Standard-Diät (R/M-H, ssniff®, Soest, Deutschland) und die Haltung erfolgte mit je maximal vier Tieren pro Käfig. Parallel wurde die HFD-Gruppe generiert, indem die weiblichen Mäuse nach dem Absetzen, also im Alter von drei Wochen, mit einer hochkalorischen Diät (C1057 modifiziert, Altromin, Lage, Deutschland) ernährt wurden. Ihre Haltung erfolgte mit je maximal drei Tieren pro Käfig. Die NI-Gruppe bestand aus weiblichen HFD-Tieren, welche ab dem Zeitpunkt der Verpaarung bis zur Sectio caesarea an G 15.5 anstelle der HFD die SD erhielten. Die Umstellung von der HFD auf die SD simulierte bei dieser Intervention die Umstellung einer ungesunden Ernährung, die reich an gesättigten Fettsäuren war, auf eine gesunde Ernährung ab dem Beginn der Schwangerschaft. Eine genaue Zusammensetzung der einzelnen Diäten ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Futterzusammensetzung	SD	HFD
Unternehmen	Ssniff (Soest, Germany)	Altromin (Lage, GE)
Katalognummer	V1534 – R/M-Maintenance	C1057, modified
Metab. Energie (ME) (kcal/kg)	3225	5237
Fett (% von ME)	9	60
Proteine (% von ME)	33	16
Kohlenhydrate (% von ME)	58	24

Tabelle 9: Futterzusammensetzung der SD und HFD nach Appel, 2019 ⁷⁷

3.2.3. Verpaarung der Versuchstiere

Im Alter von 12 bis 16 Wochen wurden die weiblichen Mäuse verpaart. Für diesen Vorgang wurden Männchen, welche unter Kontrolldiät (SD) normalgewichtig waren, und Weibchen über Nacht für maximal 24 Stunden in einen gemeinsamen Käfig, der mit der Diät des Weibchens bestückt war, gesetzt. Anschließend wurden die Männchen wieder isoliert und mit der SD gefüttert. Dieser Folgetag nach der Verpaarung wurde als G 0.5 definiert. Zum Zeitpunkt der Verpaarung mussten die Weibchen der SD-Gruppe ein Gewicht <23,5 g aufweisen und die Weibchen der HFD-Gruppe waren per definitionem übergewichtig mit einem Körpergewicht $\geq 23,5$ g. Die weiblichen Tiere wurden direkt vor der Verpaarung an G 0.0 und ein paar Tage vor G 15.5 gewogen, um den Gewichtsverlauf über den Zeitraum der Schwangerschaft hinweg festzustellen. Die grafische Darstellung der Generierung der Versuchsgruppen ist in Abbildung 2 zu finden.

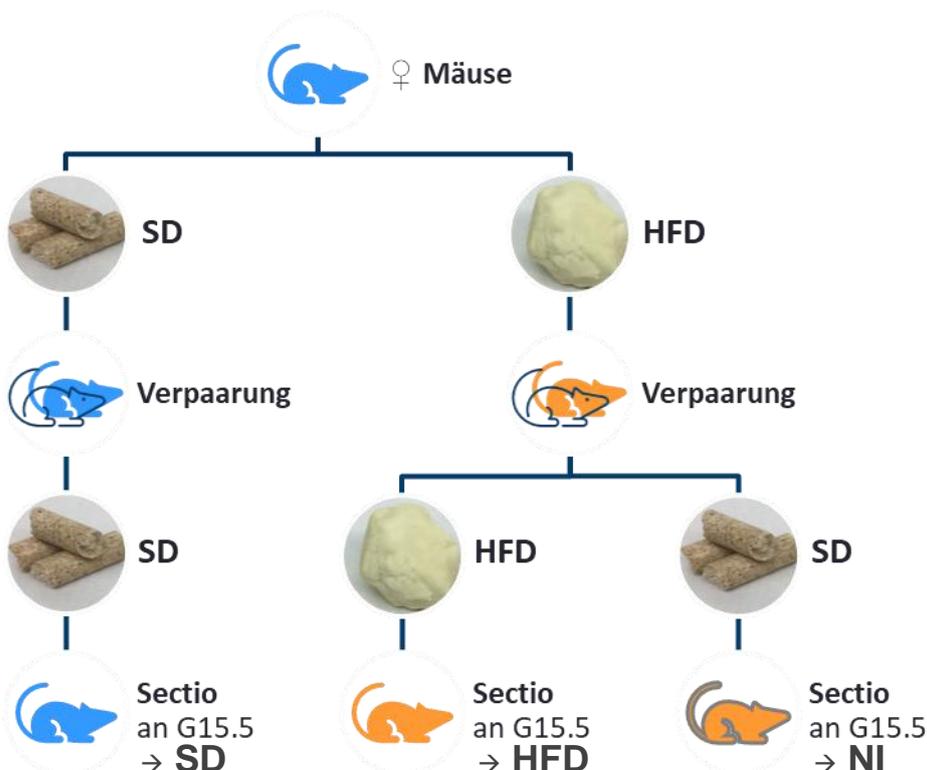


Abbildung 2: Generierung der Versuchsgruppen

In dem Alter von drei Wochen erfolgte die Zuteilung der weiblichen Mäuse in zwei Versuchsgruppen, eine Gruppe erhielt eine HFD, die andere eine SD. Die Verpaarung fand im Alter von 12-16 Wochen statt. Zu diesem Zeitpunkt

waren die HFD-Mäuse übergewichtig, mit einem Körpergewicht von $\geq 23,5$ g. Ein Teil der HFD-Tiere erhielt im Anschluss an die Verpaarung die SD anstelle der HFD, dadurch wurde als Drittes die NI-Gruppe generiert. An G 15.5 fand bei allen Versuchstieren die Sectio caesarea statt.

3.2.4. Präparation, Probenentnahme und -Asservierung

An G 15.5, somit innerhalb des letzten Schwangerschaftsdrittels der Maus, wurden die tragenden Mäuse getötet und es wurde eine Sectio caesarea vorgenommen. Eineinhalb Stunden zuvor wurde den Mäusen für die spätere Immunfluoreszenz-Untersuchung der Plazenten (siehe Abschnitt 3.3.3.1) eine 10 mg/ml Bromdesoxyuridin (BrdU)-Lösung (gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung, PBS) mit einer Dosierung von 10 μ l/g Körpergewicht (KG) intraperitoneal gespritzt. Anschließend wurde ihnen nach einer weiteren Stunde 0,1 mg/kgKG Buprenorphin gelöst in 0,9% Natriumchloridlösung zur Analgesie subkutan injiziert. 30 Minuten später erfolgte dann die Tötung mittels CO₂-Inhalation und es wurden die Daten der Körperlänge und des Körpergewichts erhoben. Im Anschluss fand die Eröffnung der Bauchhöhle statt, um die fetoplazentaren Einheiten zu entnehmen. Diese wurden von rechts nach links entnommen und der Entnahme nach durchnummeriert.

Die Feten wurden umgehend mittels Dekapitation getötet. Es wurde ihr jeweiliges Körpergewicht bestimmt, die gesamte Wurfgröße ermittelt und die Anzahl der resorbierten Feten dokumentiert. Insgesamt wurden in die späteren Analysen nur Tiere einbezogen, die mindestens fünf gesunde Feten aufwiesen, ausgenommen bei der Bestimmung der Resorptionsrate. Vom Schwanz der Feten wurden die Spitzen abgetrennt und bei -80 °C eingefroren, was für die spätere Geschlechtsbestimmung vonnöten war.

Anschließend wurden die Plazenten für die geplanten Analysen konserviert. Dafür erfolgte die Plazentaentnahme inklusive des umliegenden Gewebes. Die Plazenten Nummer 1 bis 4 wurden nicht vom Uterus, der Nabelschnur und dem Fruchtblasenansatz getrennt, um die Dezidua sowie das Labyrinth nicht zu beschädigen. Diese Plazenten wurden halbiert und anschließend wurde jeweils die Hälfte ohne Nabelschnur nach Entfernung des umliegenden Gewebes (Nabelschnur, Fruchtblase, Uterus) nativ in flüssigem Stickstoff schock- und dann bei -80 °C eingefroren. Die andere Hälfte der Plazenten Nummer 1 und 3 wurde in Roti-Histofix fixiert und die Plazenten Nummer 2 und 4 wurden in TissueTek eingebettet. Die Plazenten Nummer 5 und 6 wurden in Gänze belassen, inklusive erhaltener Nabelschnur, Fruchtblasenansatz und Uterus und in Roti-Histofix fixiert. Die Plazenten Nummer 7 und folgende wurden zuletzt aus dem Uterus entnommen, die Nabelschnur und der Fruchtblasenansatz wurden abgetrennt. Sie wurden gewogen und ebenfalls nativ bei -80 °C eingefroren.

3.3. Histologische Untersuchungen der Plazenta

Die histologischen Untersuchungen der Plazenten erfolgte mittels der Methode der Stereologie sowie Immunfluoreszenzfärbungen.

3.3.1. Anfertigung plazentarer Gewebeschnitte für histologische Untersuchungen

Für die histologischen Analysen wurde in Paraffin eingebettetes Plazenta-Gewebe genutzt. Bereits während der Präparation der Versuchstiere wurde ein Teil der Plazenten halbiert, während ein anderer Teil ganz belassen wurde. Direkt im Anschluss wurden die Plazenten für 24 Stunden in 4 % PFA fixiert und anschließend in 70 % Isopropanol gelagert. Für die spätere Einbettung der Gewebeproben in Paraffin erfolgte zunächst vollautomatisch mithilfe des Gewebeeinfiltrationsautomaten ASP300S die Entwässerung der Proben und eine Infiltration mit Paraffin. Im nächsten Schritt fand mittels einer Paraffinausgießstation (EG1150 H) die manuelle Fixierung der Plazenten in Paraffin statt. Für diesen Vorgang wurden die Gewebeproben in Einbettförmchen gegeben, wobei die halbierten Plazenten mit ihrer Schnittfläche immer in Richtung Förmchenboden ausgerichtet waren. Diese Förmchen wurden dann mit dem Paraffin befüllt und danach fand die Aushärtung der Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte statt.

Für die späteren Immunfluoreszenzanalysen wurden 3 µm dicke Schnitte der halbierten Plazenten und für die Stereologie 7 µm dicke Schnitte der vollständigen Plazenten angefertigt. Die Schnitte wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms (RM2255) hergestellt, anschließend auf ein 37 °C warmes Wasserbad (Paraffin-Streckbad TFB 45) gelegt und nachdem sie sich komplett entfaltet und geglättet hatten auf Objektträger aufgezogen. Zum Trocknen wurden sie über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C gelagert und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.3.2. Stereologie

Um die Plazenten in ihrer Gesamtheit genauer untersuchen zu können, wurde sich der Methode der Stereologie bedient.

3.3.2.1. Einführung in die Stereologie

Die Stereologie ist eine Methode, die erstmals im Jahr 1961 auf einem Kongress von ForscherInnen interdisziplinärer Fachgebiete diskutiert wurde. Im Folgejahr wurde daraufhin die Gesellschaft „International Society for Stereology & Image Analysis“ (ISS) gegründet. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, dass es ermöglicht 3D-Objekte auf der Grundlage von 2D-Schnitten zu analysieren⁷⁸. Dafür wird ein Gitter in Form von Punkten, Linien oder Flächen über 2D-Schnitte, etwa histologische Gewebeschnitte, gelegt, wodurch Maße wie Volumen, Oberflächen und Längen des ursprünglichen 3D-Objektes ermittelt werden können⁷⁹. Während der histologischen Untersuchung von mikroskopischen Schnitten wird durch die dünnen Gewebeproben nahezu ein 2D-Objekt geschaffen, mithilfe dessen die inneren Kompartimente eines 3D-Objektes untersucht werden können⁷⁹. Indem im Anschluss daran mittels der Stereologie wieder auf die 3D-Ebene hochgerechnet wird, kann das ursprüngliche

Objekt in seiner Form und der gegebenenfalls damit korrelierenden Funktion effektiv beurteilt werden ⁸⁰. Einen wichtigen Aspekt stellt die Beschaffenheit der zu untersuchenden Objekte dar, welche homogen oder auch inhomogen sein kann. Bei Geweben, wie etwa murinen Plazenten, ist bekannt, dass sie inhomogen sind und aus unterschiedlichen Kompartimenten bestehen. Demnach stellen sich in den mit einem Mikrotom angefertigten 2D-Schnitten, je nachdem auf welcher Ebene der Gewebeprobe sie sich befinden, unterschiedliche Größen- und Verhältnisverteilungen der einzelnen angeschnittenen Kompartimente dar. Zur genaueren Analyse wurde deshalb das Prinzip der designbasierten Stereologie entwickelt. Dieses ermöglicht es, inhomogenes Gewebe zu erfassen, wohingegen sich das Prinzip der modellbasierten Stereologie mit homogenen Geweben beschäftigt ⁸¹. Mithilfe der designbasierten Stereologie kann also auf Grundlage einzelner generierter Gewebeschnitte auf das gesamte 3D-Gewebe geschlossen werden und es muss nicht eine serielle Rekonstruktion aller Gewebeschnitte erfolgen ⁸².

3.3.2.2. Generierung plazentarer Gewebeschnitte für stereologische Untersuchungen

Die designbasierte stereologische Analyse basiert auf einem mehrstufigen Prozess. Zunächst werden statistische Stichprobenprinzipien zur Generierung der Gewebeschnitte genutzt. Dadurch kann die Menge der zu analysierenden Schnitte reduziert werden, bei gleichbleibender Präzision. Mithilfe des Prinzips der systematischen einheitlichen Zufallsstichprobe (systematic uniform random sampling, SURS) wird gewährleistet, dass jedes Kompartiment des Gewebes die gleiche Wahrscheinlichkeit hat, Teil der Stichprobe zu sein. Voraussetzung dafür ist, dass das Gewebe vollständig ist und in seiner ganzen Größe bearbeitet wird. Das gesamte Organ muss systematisch in gleichmäßigen Intervallen geschnitten werden, wobei der erste Schnitt zufällig in einem definierten Intervall festgelegt wird ⁸². Bezogen auf dieses Projekt bedeutete dies: Damit die Plazenten am Mikrotom (Rotationsmikrotom RM2255) in einem zufällig orientierten Winkel angeschnitten werden konnten, wurden sie in der Einbettkassette zunächst neu ausgerichtet. Dafür wurden die Paraffinblöcke mit der jeweiligen enthaltenen Plazenta von der Kassette gelöst und in einem zufällig bestimmten Winkel wieder neu befestigt. Anschließend erfolgte die Anfertigung der 7 µm dicken Gewebeschnitte am Mikrotom. Die gesamten Plazenten wurden aufgeschnitten und jeder 40., sowie 41. Gewebeschnitt wurde auf einen Objektträger aufgezogen. Der erste Schnitt wurde dabei durch vorherige Generierung einer Zufallszahl in dem Intervall zwischen eins und 40 bzw. 41 festgelegt. Für die weiteren stereologischen Analysen der Schnitte erfolgten dann bei jedem 40. Schnitt eine Färbung mit CD31 und bei jedem 41. Schnitt mit HE (Hämatoxylin-Eosin). Für das Vorgehen der Färbungen siehe Abschnitte 3.3.2.7 und 3.3.2.8.

3.3.2.3. Verwendung geometrischer Gitter

Im nächsten Schritt werden bei der Stereologie Gitter auf die gefärbten Schnitte gelegt, welche in mathematischer Beziehung zu dem ursprünglichen 3D-Gewebe stehen. Die Gitter bestehen dabei aus geometrischen Mustern wie Punkten, Linien und Flächen. Dabei ist jedes Muster einem bestimmten geometrischen Strukturmerkmal des 3D-Gewebes zugeordnet, wie Volumina, Oberflächen und Längen. Die Summe der Dimensionen des Musters und des Strukturmerkmals ergibt dabei immer drei. Diese Dimensionalitätsregel beruht auf dem geometrischen Prinzip, dass die von dem Muster nicht verwendeten Dimensionen von dem dazugehörigen Strukturmerkmal erfasst werden. Den Volumina (3D), welche aus 3 Dimensionen bestehen, sind demnach Punkte (0D) zugeordnet. Den Oberflächen (2D) sind die Linien (1D) und den Längen (1D) die Flächen (2D) zugeordnet⁸². Entsprechend dieser Dimensionalitätsregel erfolgte in diesem Promotionsprojekt mithilfe der Imaging Facility des CECAD der Universität zu Köln die randomisierte Projektion der geometrischen Gitter auf die Gewebeschnitte der Plazenten.

Im Anschluss konnten die Wechselwirkungen der einzelnen Muster und der Volumina, Oberflächen oder Längen von den zu untersuchenden Strukturen der Gewebeschnitte ermittelt werden, indem sie gezählt und addiert wurden. Mithilfe der mathematischen Beziehung zwischen Muster und Strukturmerkmal konnte die jeweilige Menge der einzelnen Strukturmerkmale im 3D-Geweberaum berechnet werden. Die berechnete Menge stellte sich schließlich als Dichte-Schätzung pro Volumeneinheit (numerische Dichte) dar. Zur weiteren Analyse musste diese in einen absoluten Wert umgerechnet und wurde dafür mit einem Referenzvolumen multipliziert⁸².

3.3.2.4. Ermittlung von Referenzvolumina

Als Referenzvolumina wurden bei den späteren Berechnungen zum einen das absolute Volumen der Plazenten und zum anderen das der Labyrinth benötigt.

Zur Ermittlung des Referenzvolumens einer Plazenta wurde das Cavalieri-Prinzip verwendet. Dabei wurde ein Punkte-Gitter auf die im Rahmen der Stereologie angefertigten und mittels HE angefärbten Gewebeschnitte gelegt. Anschließend wurden die auf die Referenzstruktur (Plazenta) fallenden Punkte addiert und ermöglichten somit eine Volumenschätzung⁸³. Für das gesamte Plazentavolumen ergab sich folgende Formel:

$$V_{\text{Ref. Plazenta}} = t \times \sum P \times a_{(p)}$$

Wobei $V_{\text{Ref. Plazenta}}$ dem Referenzvolumen einer gesamten Plazenta entsprach, t den Durchmesser der Plazenta darstellte (ermittelt durch Multiplikation der Gesamtschnittzahl der Plazenta mit der Schnittdicke (=7 μm) der Gewebeschnitte), $\sum P$ die Summe aller Punkte angab, die auf die Referenzstruktur (Plazenta) fielen und $a_{(p)}$ der von einem Punkt repräsentierten Fläche (=250000 μm^2) entsprach. Die Gesamtschnittzahl der Plazenta

beinhaltete diejenigen Gewebeschnitte, auf denen lichtmikroskopisch (Mikroskop Typ 020-452008) nachweislich Plazentagewebe sichtbar war. Schnitte, auf denen lediglich Nabelschnur-Anschnitte erkennbar waren, wurden ausgeschlossen.

Das Labyrinth diente als Referenzvolumen für die Analysen der Volumina, Oberflächen, Längen und Durchmesser von Gefäßen innerhalb dieser Zone. Zur Ermittlung eines Labyrinth-Referenzvolumens wurden alle Schnitte berücksichtigt, auf denen das Labyrinth angeschnitten war. Dieses wurde mithilfe des Programms „ImageJ-Fiji 2011“ in den CD31-gefärbten Schnitten umrandet, ausgeschnitten und anschließend konnten die Flächen der jeweiligen Schnitte automatisch berechnet werden. Im folgenden Schritt wurde der Mittelwert dieser Flächen mit dem Gesamtdurchmesser des Labyrinths multipliziert. Daraus ergab sich folgende Formel:

$$V_{\text{Ref. Labyrinth}} = t \times \bar{A}$$

Dabei stand $V_{\text{Ref. Labyrinth}}$ für das gesamte Referenzvolumen des Labyrinths, t für den Durchmesser des Labyrinths (Multiplikation der Gesamtschnittzahl des Labyrinths mit der Schnittdicke (=7 μm) der Gewebeschnitte) und \bar{A} für die gemittelten Labyrinth-Flächen.

3.3.2.5. Ermittlung von Volumina der Plazentazonen

Mittels HE-gefärbter Gewebeschnitte wurden die Volumina der einzelnen Plazentazonen, wie Labyrinth, Junktionalzone und Dezidua ermittelt. Zunächst wurde der Volumenanteil einer der drei Zonen ($V_{\text{Plazentazone}}$) innerhalb des Referenzraumes der gesamten Plazenta erfasst. Dafür wurden alle Punkte, die auf die entsprechende Zone fielen, im ersten Schritt addiert ($\sum P_{\text{Plazentazone}}$) und im zweiten Schritt durch die Gesamtzahl aller Punkte, die auf den Referenzraum fielen ($\sum P_{\text{Referenzraum Plazenta}}$), dividiert. Anschließend konnte die ermittelte Volumendichte der Zonen in eine absolute Größe umgerechnet werden, indem sie mit dem Referenzvolumen der gesamten Plazenta ($V_{\text{Ref. Plazenta}}$) multipliziert wurde⁸³.

$$V_{\text{Plazentazone}} = \frac{\sum P_{\text{Plazentazone}}}{\sum P_{\text{Referenzraum Plazenta}}} \times V_{\text{Ref. Plazenta}}$$

Wie in Abschnitt 3.3.2.4 erwähnt, wurde das Volumen des Labyrinths ebenfalls im Rahmen der Berechnung der Referenzvolumina mithilfe der CD31-gefärbten Schnitte bestimmt.

3.3.2.6. Volumina, Oberflächen, Längen und Durchmesser innerhalb des Labyrinths

Innerhalb des Labyrinths wurden drei Parameter mithilfe der CD31-gefärbten Gewebeschnitte stereologisch bestimmt: die Volumina einzelner Strukturen (fetale Gefäße, maternale Blutsinuse und Trophoblastengewebe), Oberflächen von fetalen Gefäßen und maternalen Blutsinussen, sowie Längen und Durchmesser fetaler Gefäße.

Um die Volumina (V_{Struktur}) der einzelnen Strukturen zu ermitteln, wurde die Fläche des Labyrinths der einzelnen Gewebeschnitte in 4096 x 4096 Pixel große Bilder fraktioniert

(3.96 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$). Von den entstandenen Teilbildern des Labyrinths wurde jeweils eins ausgezählt, nachdem ein Gitter aus Punkten darübergerlegt worden war. Es wurden alle Punkte addiert, die auf eine der drei entsprechenden Strukturen (fetale Gefäße, maternale Blutsinuse oder Trophoblastengewebe) fielen ($\sum P_{\text{Struktur}}$) und anschließend durch die Summe aller Punkte, die auf das Labyrinth als Referenzraum ($\sum P_{\text{Referenzraum Labyrinth}}$) fielen, geteilt. Die ermittelte Volumendichte der jeweiligen Struktur wurde zur Generierung absoluter Wert mit dem Referenzvolumen, dem bereits ermittelten Labyrinthvolumen ($V_{\text{Ref. Labyrinth}}$), multipliziert ⁸³.

$$V_{\text{Struktur}} = \frac{\sum P_{\text{Struktur}}}{\sum P_{\text{Referenzraum Labyrinth}}} \times V_{\text{Ref. Labyrinth}}$$

Zur Bestimmung der Oberflächen (S_{Struktur}) von fetalen Gefäßen und maternalen Blutsinussen innerhalb des Labyrinths wurden zusätzlich zu Punkten auch Linien über die Teilbilder gelegt und jeweils die Schnittpunkte ($\sum I_{\text{Struktur}}$) der Linien mit den fetalen Gefäßanschnitten bzw. maternalen Blutsinussen gezählt und addiert. Zusätzlich wurden die Längen der Linien ($I_{(p)}$) miteinbezogen, welche mit jedem Punkt des Teilbildes assoziiert waren. Dabei entsprach ein Punkt einer Länge von 27,9 μm und $\sum P_{\text{Labyrinth}}$ der Gesamtanzahl aller Punkte im Labyrinth. Als Referenzvolumen galt ebenfalls das Volumen des Labyrinths ($V_{\text{Ref. Labyrinth}}$) und durch die Multiplikation mit diesem wurden absolute Werte generiert ⁸³.

$$S_{\text{Struktur}} = \frac{2 \times \sum I_{\text{Struktur}}}{I_{(p)} \times \sum P_{\text{Labyrinth}}} \times V_{\text{Ref. Labyrinth}}$$

Die Erfassung der Längen und Durchmesser der fetalen Gefäße innerhalb des Labyrinths erfolgte an den Gewebeschnitten, welche das gesamte CD31-gefärbte Labyrinth abbildeten. Auf diese Schnitte wurden zweidimensionale Quadrate bzw. Zählrahmen mit einer Größe von 10000 μm^2 gelegt, welche an zwei benachbarten Seiten durch rote und an den gegenüberliegenden Seiten durch grüne Linien begrenzt waren. Anschließend wurden alle Kapillaren gezählt und addiert, welche innerhalb des Zählrahmens lagen und die roten Linien nicht berührten oder schnitten. Zusätzlich wurde die Gesamtanzahl an Zählrahmen ermittelt, die auf die Fläche des Labyrinths projiziert wurden. Es ergab sich für die absoluten Kapillarlängen ($L_{\text{Kapillaren}}$) folgende Formel ⁸³:

$$L_{\text{Kapillaren}} = 2Q_{(A)} \times V_{\text{Ref. Labyrinth}}$$

Dabei stand $Q_{(A)}$ für die Kapillardichte pro Flächeneinheit, welche sich aus der Summe der gezählten Kapillaren pro Zählrahmen, dividiert durch das Produkt der Gesamtanzahl an Zählrahmen pro Labyrinth-Gewebeschnitt errechnen ließ. Durch die Multiplikation mit 2 ergab sich die Längendichte. Zur Generierung absoluter Werte wurde das Labyrinthvolumen als Referenzvolumen ($V_{\text{Ref. Labyrinth}}$) genutzt.

Der Kapillardurchmesser ($d_{\text{Kapillaren}}$) wurde anhand der mittleren Kapillarquerschnittsfläche ($\bar{A}_{\text{Kapillarquerschnitt}}$) abgeschätzt. Dafür wurde im ersten Schritt die Kapillarquerschnittsfläche mit folgender Formel berechnet ⁸³:

$$\bar{A}_{\text{Kapillarquerschnitt}} = \frac{V_{\text{Struktur}}}{V_{\text{Ref. Labyrinth}}} \times \frac{1}{2Q_{(A)}}$$

Wobei V_{Struktur} dem Volumen der fetalen Gefäße entsprach und dividiert durch das Referenzvolumen des Labyrinths ($V_{\text{Ref. Labyrinth}}$) die Volumendichte ergab. $2Q_{(A)}$ entsprach erneut der Längendichte der Kapillaren.

Für den Kapillardurchmesser ergab sich im zweiten Schritt folgende Formel ⁸³:

$$d_{\text{Kapillaren}} = 2 \times \sqrt{\frac{\bar{A}_{\text{Kapillarquerschnitt}}}{\pi}}$$

3.3.2.7. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung dient der morphologischen Untersuchung von Gewebeschnitten und wird häufig als Übersichtsfärbung zur Identifizierung einzelner Gewebestrukturen genutzt. Dabei färbt oxidiertes Hämatoxylin Bestandteile der Zellkerne blau und Eosin basische Zellbestandteile wie Zytoplasma, Kollagen, Mitochondrien und auch Erythrozyten rot ⁸⁴. Als Übersichtsfärbung ermöglichte sie die Identifizierung der einzelnen Plazentazonen: Chorion, Labyrinth, Junktionalzone, Dezidua, Nabelschnur. Im Zuge dieses Dissertationsprojektes wurde die Färbemethode zum einen wie hier beschrieben im Rahmen der stereologischen Analysen zur Volumenbestimmung einzelner Zonen und zum anderen als Kontrollfärbung im Zusammenhang mit den Immunfluoreszenz-Assays genutzt (siehe Abschnitt 3.3.3).

Zunächst wurden die placentaren Gewebeschnitte zum Entparaffinieren dreimal für je 5 bis 10 Minuten in Neo-Clear gegeben. Anschließend erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte. Dafür wurden sie jeweils für eine Minute in eine Alkoholreihe mit absteigender Konzentration (100, 96, 80, 70 % Ethanol) gewaschen und danach für eine Minute mit vollentsalztem (VE)-Wasser umspült. Der erste Schritt der eigentlichen Färbung fand im Anschluss für 4 Minuten mit einer sauren Hämalaunlösung (nach Mayer) statt, die zuvor filtriert worden war. Nachdem die Schnitte mit rot gefärbten Zellkernen für 30 Sekunden in VE-Wasser gegeben worden waren, wurden sie für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach einem kurzen Waschgang mit VE-Wasser erfolgte der zweite Teil der Färbung mit einer zweiminütigen Umspülung der Proben mit 0,5 % Eosin G-Lösung. Diese Lösung wurde zuvor ebenfalls filtriert und zum Ansäuern mit einem Tropfen Eisessig pro 100 ml versetzt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal kurz in VE-Wasser gewaschen, zur Dehydrierung für je eine Minute in aufsteigende Alkoholkonzentrationen (70, 80, 96, 100 % Ethanol) gegeben und schließlich zweimal für je 5 Minuten mit Neo-Clear umspült. Im letzten Schritt erfolgte die Eindeckung der

Schnitte mit dem Eindeckmedium Neomount und die anschließende Lagerung bei Raumtemperatur.

Zur Digitalisierung der Gewebeschnitte wurde der Histoscanner SCN400 der Core Facility CECAD genutzt und Scans in 10-facher Vergrößerung angefertigt.

3.3.2.8. CD31-Färbung

CD31 ist ein Oberflächenprotein, welches von Endothelzellen exprimiert wird⁵⁴. Die Färbung ermöglichte eine Beurteilung der fetalen und maternalen Gefäße innerhalb des plazentaren Labyrinths, mittels Differenzierung von CD31-positiven fetalen Gefäßen und CD31-negativen maternalen Blutsinussen.

Zum Entparaffinieren wurden die eingebetteten Gewebeschnitte entsprechend den Färbeprotokollen der Immunfluoreszenz zunächst in Neo-Clear inkubiert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und schließlich zur Demaskierung der Epitope für 25 Minuten in Zitratpuffer aufgekocht, gefolgt von einer anschließenden Abkühlung bei Raumtemperatur. Für das genauere Vorgehen siehe das Protokoll des BrdU-Assays in Abschnitt 3.3.3.1. Daraufhin folgte ein zehnmütiger Peroxidase Block mit 3 % H₂O₂, um eine spätere unspezifische Hintergrundfärbung durch die in den Gewebeschnitten enthaltenen Erythrozyten zu minimieren. Nach einem kurzen Waschgang in PBS fand eine einstündige Inkubation der Schnitte mit Sea Block (Blocking Buffer) in einer feuchten Kammer statt. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem spezifischen Primärantikörper CD31 benetzt und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurden die Gewebeschnitte dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen und danach für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser Antikörper enthielt ein HRP-Polymer (Meerrettichperoxidase) und nicht gebundene, überschüssige Reste wurden im Anschluss an die Inkubationszeit durch einen dreimal fünfminütigen Waschgang mit PBS entfernt. Danach folgte die Benetzung der Schnitte mit einer 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (30 µl DAB verdünnt in 1 ml ImmPACT™ DAB Diluent) für je 2,5 Minuten. Durch die Zugabe des Substrats DAB wurde die enzymatische Reaktion der Peroxidase gestartet. Aufgrund der chromogenen Eigenschaften von DAP kam es zu einem braunen Farbniederschlag an den Stellen des Zielantigens. Mithilfe eines Lichtmikroskops konnte die Farbentwicklung beobachtet und bei ausreichender Farbintensität mit MilliQ-Wasser gestoppt werden. Im nächsten Schritt fand eine einminütige Gegenfärbung der Zellkerne mit zuvor filtriertem Hämatoxylin statt. Zum Bläuen wurden die Schnitte anschließend für 5 Minuten unter fließendes Leitungswasser gegeben. Danach wurden die Gewebeschnitte zur Dehydrierung in eine aufsteigende Alkoholreihe und anschließend in Neo-Clear gegeben. Für das genauere Vorgehen siehe das Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) im obigen Abschnitt 3.3.2.7. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit

Neomount eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie mithilfe des Histoscanners SCN400 in 40-facher Vergrößerung gescannt und digitalisiert wurden.

3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung

An den hergestellten 3 µm dicken Schnitten des Plazentagewebes wurden drei verschiedene immunhistologische Fluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dafür wurden diejenigen Schnitte verwendet, die sich im Querschnitt auf Ebene der Nabelschnur der Plazenten befanden. Zum einen war dadurch eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Schnitte gewährleistet und zum anderen war die Labyrinthzone, auf die sich die späteren Färbungen bezogen, auf dieser Höhe am größten. Um diese Ebene sicher zu identifizieren, wurde zusätzlich zu der Immunfluoreszenz-Färbung eine HE-Färbung (siehe Abschnitt 3.3.2.7) durchgeführt und die gefärbten Schnitte wurden mikroskopisch betrachtet.

Mittels der Immunfluoreszenzfärbung wurden drei Vorgänge innerhalb des Labyrinths der Plazenten genauer betrachtet, die Proliferation (BrdU-Assay), die Apoptose (TUNEL-Assay) und die Seneszenz (γ -H2AX-Assay). Zusätzlich zu der jeweiligen Immunfluoreszenzfärbung des Assays wurden bei jedem Gewebeschnitt mittels Ko-Färbung die Zellkerne aller Zellen (4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI)⁸⁵ und die Endothelzellen der fetalen Kapillaren im Labyrinth (Anti-CD31-Antikörper) angefärbt. Auf Grundlage dieser Färbungen konnte im Weiteren eine Quantifizierung der proliferierenden, apoptotischen und seneszenten Zellen stattfinden.

3.3.3.1. BrdU-Assay

Mittels eines BrdU-Immunassays kann die Quantifizierung der Zellproliferation vorgenommen werden. Beim Eintreten der Zelle aus der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase findet der Einbau von (3H-)Thymidin in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) statt, welches als Marker für die Proliferation gilt. Thymidin wurde in dem genutzten Assay von dem synthetischen Nukleosid Bromodeoxyuridin (BrdU) ersetzt. Als Analogon von Thymidin wurde es in die neu synthetisierte DNA von proliferierenden Zellen eingebaut. Im Verlauf konnte BrdU mithilfe eines Anti-BrdU-Antikörpers nachgewiesen werden, um die Zellpopulation mit aktiver DNA-Synthese zu ermitteln⁸⁶⁻⁸⁹.

Bereits vor der Präparation erhielten die Versuchstiere eine intraperitoneale Gabe von BrdU (siehe Abschnitt 3.2.4). Dies wurde daraufhin in die neu synthetisierten DNA-Stränge proliferierender Zellen eingebaut. Später erfolgte die oben beschriebene Herstellung von Gewebeschnitten der Plazenten (siehe Abschnitt 3.3.1). Zum Entparaffinieren der sich auf Objektträgern befindenden Schnitte, wurden diese zunächst dreimal für je 15 Minuten in Neo-Clear gegeben. Anschließend fand eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 80, 70 % Ethanol) für je eine Minute statt, gefolgt von einem fünfminütigen Waschgang in MilliQ-Wasser. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 35 Minuten in einen

auf 95 °C erhitzten und mit Zitratpuffer befüllten Dampfgarer gegeben. Durch das Aufkochen der Gewebeschnitte kam es zur Denaturierung der DNA und Antigendemaskierung. Daraufhin kühlten die Schnitte, weiterhin gelagert in Zitratpuffer, für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur ab. Bevor eine 30-minütige Inkubation mit 300 mM Glycin gelöst in PBS folgte, wurden die Schnitte für eine Minute in phosphatgepufferter Salzlösung mit Tween® 20 (PBST) gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen der Gewebeschnitte zu blockieren, schloss sich daran eine ein- bis zweistündige Inkubation in Sea Block Blocking Buffer an. Daraufhin wurden die Primärantikörper Anti-BrdU- und Anti-CD31-Antikörper auf die Schnitte gegeben, welche durch ihre spezifischen Bindungseigenschaften den Blocking Buffer verdrängen und entsprechend an die DNA-Zielsequenzen bzw. das Zielprotein binden konnten. Zur Inkubation wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C in eine feuchte Kammer gegeben.

Am Folgetag wurden die Gewebeschnitte dreimal für je 5 Minuten in PBST gewaschen. Von da an fanden alle folgenden Schritte bei Dunkelheit statt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde in der feuchten Kammer mit den Sekundärantikörpern (Anti-Maus DyLight488 und Anti-Kaninchen Cy3) inkubiert. Diese waren zuvor in Antikörper-Diluent verdünnt und für die spätere Fluoreszenzuntersuchung mit Fluorochromen markiert worden. Im Anschluss an die Inkubation folgten drei fünfminütige Waschgänge in PBST sowie eine 15-minütige Gegenfärbung mit DAPI (verdünnt in PBS, 1:1000), welche durch die Bindung an die DNA alle Zellkerne zur späteren Orientierung blau färbte. Daran anschließend erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschvorgang in PBST und einmalig eine Minute in VE-Wasser. Im letzten Schritt wurden die Gewebeschnitte mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquamount eingedeckt und zum Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Bis zur mikroskopischen Analyse erfolgte die Aufbewahrung bei 4 °C weiterhin unter Lichtausschluss.

3.3.3.2. TUNEL-Assay

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde ein TUNEL-Assay genutzt. Dabei steht TUNEL für TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) -mediated dUTP (deoxyuridine triphosphate) nick end labeling und die Apoptose stellt den Prozess eines genetisch programmierten Zelltods dar^{90,91}. Während der Apoptose der Zellen wird der DNA-Strang durch aktive Endonukleasen fragmentiert. Dabei werden an den Enden der Fragmente Hydroxy-Gruppen freigelegt, woran markierte Nukleotide (dUTPs) des Assays binden können. Den Katalysator für diesen Vorgang stellt das Enzym TdT dar. In einem späteren Schritt können die Nukleotide mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht und mikroskopisch beurteilt werden⁹².

Die Durchführung des Protokolls des TUNEL-Assays entsprach in den Arbeitsschritten dem Färbeprotokoll des BrdU-Assays hinsichtlich der Detektion der Endothelzellen in den fetalen Gefäßen mit dem Primärantikörper Anti-CD31-Antikörper, gefolgt von der Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-Kaninchen Cy3 (siehe Abschnitt 3.3.3.1). Daran anschließend fand

eine dreimalige fünfminütige Waschung in PBST und für eine Minute in MilliQ-Wasser statt. Währenddessen wurden die Komponenten des TUNEL-Kits (Enzyme Solution (TdT), Label Solution (fluoreszierende dUTPs)) in einem Verhältnis von 1:10 miteinander vermischt und nach Beendigung des Waschvorgangs auf die Gewebeschnitte gegeben. Anschließend wurden die Schnitte eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde eine DAPI-Gegenfärbung (für genaueres Vorgehen siehe BrdU-Assay, siehe Abschnitt 3.3.3.1) durchgeführt und die Schnitte wurden mit dem wässrigen Eindeckmedium Fluoroshield eingedeckt, bevor sie bei 4 °C lichtgeschützt gelagert wurden.

3.3.3.3. γ -H2AX-Assay

Als Drittes wurde ein Seneszenz-assoziiertes γ -H2AX-Assay durchgeführt. Die zelluläre Seneszenz stellt einen irreversiblen Zellzyklus-Stillstand dar, der zu den physiologischen Prozessen der normalen Alterung eines Organismus gehört^{93,94}. Dabei findet der Arrest meistens in der G1-Phase des Zellzyklus statt⁹⁵. Senescente Zellen behalten ihre metabolische Aktivität und können im Wesentlichen unbegrenzt lebensfähig bleiben⁹⁶. Ursächlich scheint eine Dysfunktion der Telomere oder andere Formen von genotoxischem Stress zu sein, wodurch eine DNA-Schädigung hervorgerufen wird. Es kommt zu DNA-Doppelstrangbrüchen, die wiederum charakteristische Marker besitzen, wie etwa Kernfoci von phosphoryliertem H2AX^{97,98}. Dabei ist H2AX ein Protein der Histon-Gruppe und spielt eine Rolle bei der DNA-Reparatur, Zellteilung und Zellwachstum. In Reaktion mit Doppelstrangbrüchen der DNA wird H2AX phosphoryliert und anschließend γ -H2AX genannt⁹⁹, es stellt somit einen Marker für die Seneszenz dar.

Bestandteil dieses Protokolls war unter anderem das Alexa Fluor™ 555 Tyramide SuperBoost™ Kit. Es ermöglichte die Verwendung zweier Antikörper der gleichen Wirtsspezies in einem Protokoll und die anschließende Differenzierbarkeit in der Immunfluoreszenzbetrachtung, in diesem Fall γ -H2AX und CD31. Das Grundprinzip des Kits lag in einer Signalverstärkung, normalerweise gedacht zur Detektion von wenig vorkommenden Targets. In diesem Protokoll sorgte es für eine hochdichte Markierung der CD31-positiven Endothelzellen. Dabei kombinierte das Kit die Helligkeit von AlexaFluor™-Farbstoffen mit der Signalverstärkung einer Poly-HRP-vermittelten Tyramid-Markierungsreaktion, welche mittels einer HRP katalysiert wurde. Die Reaktion fand bei Zugabe des Sekundärantikörpers statt, da dieser mit der HRP versehen war. Es entstand ein hochreaktives, radikalisiertes Tyramid, welches kovalent an Tyrosinreste in seiner nahen Umgebung band¹⁰⁰. Dank dieser starken, kovalenten Bindung blieb diese und somit auch das Fluoreszenzsignal bestehen, selbst wenn die dazugehörigen Primär- und Sekundärantikörper im Laufe des Protokolls wieder entfernt wurden.

Die ersten Schritte des γ -H2AX-Assays glichen bis einschließlich der Inkubation des Primärantikörpers (Anti-CD31-Antikörper) denen des BrdU-Assays (siehe Abschnitt 3.3.3.1).

Bis dahin war lediglich das Aufkochen in Zitratpuffer zur Antigendemaskierung auf 25 Minuten verkürzt worden. Der zweite Tag des Protokolls begann mit einer dreimaligen fünfminütigen Waschung in PBST und alle folgenden Arbeitsschritte fanden unter Ausschluss von Licht statt. Es erfolgte die einstündige Inkubation des Sekundärantikörpers HRP-Anti-Kaninchen (Bestandteil des Alexa Fluor™ 555 Tyramide SuperBoost™ Kits) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nachdem die Gewebeschnitte anschließend erneut dreimalig für je fünf Minuten in PBST gewaschen wurden, folgte die Tyramid-Reaktion mithilfe des Kits. Diese wiederum wurde nach sechs Minuten durch eine im Kit enthaltene Stop-Solution beendet. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte dreimal kurz in reinem PBS gewaschen. Danach fand erneut eine Epitop-Demaskierung der DNA im Dampfgerar für 25 Minuten statt, gefolgt von den beschriebenen Zwischenschritten (siehe BrdU-Assay, siehe Abschnitt 3.3.3.1), wie das Waschen in PBST, die Inkubation in Glycin, das Auftragung von Sea Block als Vorbereitung für den zweiten Primärantikörper, in diesem Fall Anti- γ H2AX. Der Antikörper wurde in Antibody Diluent verdünnt auf die Schnitte gegeben und das Ganze inkubierte bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Im Anschluss an einen Waschgang in PBST wurde der Sekundärantikörper Anti-Kaninchen DyLight488, gerichtet gegen γ H2AX, aufgetragen. Die nächsten Schritte, inklusive einstündiger Inkubation, Gegenfärbung mit DAPI, Eindecken mit wässrigem Aquamount und Lagerung entsprachen wieder denen des BrdU-Färbeprotokolls (siehe Abschnitt 3.3.3.1).

3.3.3.4. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Um die gefärbten Schnitte auswerten zu können, wurden zunächst Bilder mithilfe eines konfokalen Mikroskops (Leica SP8) der Imaging Facility des CECADs der Universität zu Köln angefertigt. Dies bot im Vergleich zu einem gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskop den Vorteil, dass es Streulicht minimierte, da immer nur ein Teil der Probe von einem Lichtpunkt zur Fluoreszenz angeregt wurde¹⁰¹. Die Schnitte wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung gescannt. Dabei wurden die DAPI-positiven Zellkerne mit einer Wellenlänge von 405 nm angeregt und blau dargestellt. Die CD31-positiven fetalen Gefäße, welche mit Fluorochrom Cy3 bzw. Alexa Fluor 555 gefärbt worden waren, wurden mit einer Wellenlänge von 552 nm angeregt und stellten sich rot dar. Die Assay-positiven Zellen (proliferierende, apoptotische oder senescente Zellen) fluoreszierten bei einer Wellenlänge von 488 nm grün. Dabei wurde zuvor während des Färbeprotokolls sowohl bei dem BrdU- als auch dem γ H2AX-Assay Fluorochrom DyLight488 genutzt.

Die weitere Auswertung der angefertigten Scans erfolgte mit dem Programm „ImageJ-Fiji 2011“. Im ersten Schritt wurde die Zone des Labyrinths optisch ermittelt. Diese wurden daraufhin in zehn gleich große Abschnitte gegliedert, wobei das Labyrinth längs betrachtet und von oben nach unten unterteilt wurde. Anschließend erfolgte die manuelle Auszählung von drei Abschnitten, die repräsentativ für das gesamte Labyrinth waren. Dabei wurde ein

Abschnitt der Mitte des Labyrinths, einer des Randes und einer zwischen diesen beiden Teilen gewählt. Die auszählenden Zellen bildeten dabei vier Zellgruppen: DAPI positive Zellenkerne, zugleich Assay positive und DAPI positive Trophoblasten, sowie Assay positive und DAPI positive Endothelzellkerne und DAPI positive Endothelzellkerne. Diese Gruppen wurden im Weiteren in Relation zueinander gesetzt.

3.4. Molekularbiologische Untersuchungen der plazentaren AJ- und Endothelzell-Marker

Ergänzend zu der Erhebung der phänotypischen Daten und der histologischen Untersuchungen, wie in den vorherigen Abschnitten aufgeführt (siehe Abschnitte 3.2 und 3.3), wurden die Plazenten hinsichtlich ihrer Integrität mittels molekularbiologischer Analysen untersucht.

3.4.1. Geschlechterbestimmung der Feten

Die folgenden Plazenta-Analysen, wie die Western Blots und quantitative real-time-PCR (qRT-PCRs), wurden geschlechtsspezifisch ausgewertet. Da Plazenten zum größten Teil aus fetalen Zellen bestehen, entspricht ihr Geschlecht jeweils dem des dazugehörigen Fetus. Das Geschlecht der Nachkommen ist jedoch nicht durch die visuelle Betrachtung dieser zu identifizieren, weshalb eine PCR zur Geschlechterbestimmung der jeweiligen Feten durchgeführt wurde.

3.4.1.1. Isolation der genomischen DNA

Zunächst musste aus den Gewebeproben, wozu die im Zuge der Präparation gewonnenen Schwanzspitzen der Feten dienten, die genomische DNA isoliert werden. Dazu wurde das Gewebe jeweils mit 500 µl tail lysis Puffer sowie 5 µl Proteinase K mit >600 U/ml (1:100) versetzt und anschließend über Nacht bei 55 °C und einer Schüttelfrequenz von 500 /min auf einem Heiz-Thermomixer inkubiert. Am Folgetag fand die DNA-Fällung mittels 500 µl Isopropanol statt. Nachdem das Gemisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur geruht hatte, wurde es anschließend für 15 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C mit einer Drehzahl von 16363 rcf zentrifugiert. Daraufhin konnte der Überstand von den sich gebildeten DNA-Pellets abgetrennt werden. Die isolierten Pellets wurden zum Waschen mit 500 µl 70 % Ethanol versetzt und dann erneut für 10 Minuten bei 4 °C und mit 16363 rcf zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgegossen und die Proben zum Verdampfen des restlichen Ethanols für ca. 10 Minuten in dem Heiz-Thermomixer auf 55 °C erwärmt. Zu den getrockneten DNA-Pellets wurde anschließend 50 µl MilliQ-Wasser hinzugegeben und das Ganze wurde gut miteinander vermischt. Das homogenisierte Gemisch diente als Ausgangspunkt für die anschließende PCR.

3.4.1.2. PCR zur Genotypisierung des Geschlechts

Die Genotypisierung des fetalen Geschlechts fand mittels PCR statt. Bei dieser Methode wurden Amplifikationen der gewünschten DNA-Abschnitte durchgeführt, in diesem Fall die für das X- und das Y-Chromosom detektierenden Abschnitte. Für den Vorgang wurde ein Reaktionsgemisch aus 9 µl PCR-Mastermix (vgl. Tabelle 10) und 1 µl der gelösten doppelsträngigen Schwanzspitzen-DNA hergestellt.

Reagenz	Volumen (für 9 µl Mastermix)
5x Green GoTaq Flexi Reaction Buffer	2,0 µl
25 mM MgCl ₂	1,2 µl
10 mM dNTPs	0,2 µl
10 µM Primer X-Chromosom Forward	0,4 µl
10 µM Primer X-Chromosom Reverse	0,4 µl
10 µM Primer Y-Chromosom Forward	0,4 µl
10 µM Primer Y-Chromosom Reverse	0,4 µl
5 U/µl Taq-Polymerase	0,1 µl
MilliQ-Wasser	4,9 µl

Tabelle 10: PCR-Mastermix
Reagenzien und Zusammensetzung

Durch die in dem Mastermix enthaltenen Primer, DNA-Polymerase und Nucleotide konnten die folgenden Schritte der PCR stattfinden. Zunächst erfolgte die Trennung der doppelsträngigen DNA hin zu einzelsträngigen DNA-Abschnitten (Denaturierung). Anschließend lagerten sich die Primer an die jeweiligen Zielsequenzen an (Annealing) und im dritten Schritt wurde mithilfe der DNA-Polymerase komplementäre DNA-Stränge hergestellt (Elongation). Dafür wurden für die einzelnen Reaktionsschritte jeweils eine bestimmte Temperatur benötigt, wie in Tabelle 11 dargestellt¹⁰². Dieser Zyklus wurde insgesamt 35-mal durchgeführt und somit kam es innerhalb kürzester Zeit zu einer starken Vermehrung der Zielsequenzen.

PCR-Temperaturprotokoll	Temperatur	Dauer
Initialisierung	95 °C	3 Minuten
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
Annealing	58 °C	1 Minute
Elongation	72 °C	1 Minute
Finale Elongation	72 °C	10 Minuten

35x

Tabelle 11: Temperaturprotokoll der PCR zur Geschlechterbestimmung

3.4.1.3. Agarose-Gelelektrophorese zur Auswertung der PCR

Die Auswertung der durchgeführten PCR erfolgte anschließend mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese. Zunächst wurde ein 1,5 % Agarose Gel hergestellt, indem 1,5 g Agarosepulver, sowie 6 µl des interkalierenden DNA-Farbstoffs Midori-Green (6:100.000) in 100 ml TAE-Puffer gegeben wurde. Dies wurde anschließend aufgekocht und dann in einen Gelgießstand gegossen. Das Gel wurde mit je 10 µl der amplifizierten DNA-Proben aus der

PCR beladen und zusätzlich wurden 5 µl eines 100 dp DNA-Leiters/-Markers auf das Gel geladen. Anschließend wurde eine Spannung von 80 V angeschlossen und im Verlauf auf 100 V erhöht (Spannungsquelle peq power 300). Durch die angelegte Spannung wanderten die Proben durch das Gel und trennten sich somit entsprechend ihrer Größe nach auf. Die anschließende Betrachtung fand unter UV-Licht mithilfe des Geräts „BioDocAnalyse Darkhood“ statt und im Folgenden wurde mit dem Programm „BioDocAnalyse Live“ ein Foto generiert. Mithilfe des Markers, welcher in einem Größenbereich zwischen 100 und 1000 Basenpaaren skalierte, konnten die Größen der entstandenen Banden der PCR-Proben ermittelt werden. Da die amplifizierten X-Fragmente eine Größe von 104 Basenpaaren und die Y-Fragmente eine von 344 Basenpaare aufwiesen, konnte die entsprechende Zuordnung der Banden erfolgen ¹⁰³.

3.4.2. qRT-PCR zur Bestimmung der Genexpression

Mithilfe der qRT-PCR kann das Expressionslevel verschiedener Gene bestimmt werden. So sollte die Expression von AJ- und Endothelzell-Markern auf mRNA-Ebene quantifiziert werden. Dafür wurde zunächst aus den nativ eingefrorenen Plazenten messenger RNA (mRNA) isoliert, die anschließend in stabilere complementary DNA (cDNA) umgeschrieben wurde.

3.4.2.1. RNA-Isolation

Für die Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) wurden 500 µl TRIzol (Tris Pufferan®) zu je einem Achtel der Plazenten hinzugegeben. Anschließend wurde beides zusammen mit einer sterilen Edelstahlkugel für 30 Sekunden bei 30 Hz in eine Schwingmühle (mM 400) geladen, homogenisiert und dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Probengemischen wurden 100 µl Chloroform hinzu pipettiert, miteinander vermischt und für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 4 °C mit 13680 rcf zentrifugiert. Dadurch bildeten sich drei Schichten, von der die obere, wässrige Schicht, die RNA enthielt. Diese wurde abpipettiert, zur Fällung der RNA in einem neuen Gefäß mit 250 µl Isopropanol vermischt und zum Inkubieren für 20 Minuten auf Eis gegeben. Damit sich ein sichtbares RNA-Pellet bilden konnte, erfolgte nach der Inkubation eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C mit 21380 rcf. Nachdem der Überstand abpipettiert worden war, wurden die RNA-haltigen Pellets mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen. Daran anschließend fand erneut eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C mit 21380 rcf statt. Der entstandene Überstand wurde entfernt und der gesamte Waschvorgang inklusive Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes wiederholt. Zum Trocknen wurden die Pellets für 60 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und schließlich in 20 bis 200 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gelöst.

3.4.2.2. Erfassung der Reinheit und Konzentration der RNA

Im nächsten Schritt wurde ein Mikrotiterplattenleser (Nano Quant infinite M200 Pro) mit der dazugehörigen Software „i-control“ genutzt, um die Reinheit und Konzentration der hergestellten RNA-Proben zu ermitteln. Für die spätere cDNA-Synthese sollte dadurch zunächst erfasst werden, ob die hergestellte RNA möglicherweise zu stark mit Proteinen verunreinigt war. Das Prinzip beruhte darauf, die optische Dichte (OD) der Proben spektralphotometrisch zu bestimmen. Dabei entsprach eine Wellenlänge von 260 nm dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und die von 280 nm dem Absorptionsmaximum von Proteinen ¹⁰⁴. Zunächst wurde die OD der Proben sowohl bei 260 nm als auch bei 280 nm gemessen. Die Reinheit der RNA wurde ermittelt, indem der Quotient OD_{260}/OD_{280} gebildet wurde. Dabei entsprach ein Quotient von 1,8 bis 2,0 einer ausreichend reinen RNA-Lösung, wohingegen Werte $<1,8$ auf eine Verunreinigung hindeuteten ¹⁰⁴. Außerdem konnte die RNA-Konzentration errechnet werden, da bekannt war, dass eine OD_{260} von 1 etwa 40 µg/ml einzelsträngiger RNA entsprach ¹⁰⁴.

3.4.2.3. cDNA-Synthese

Mittels einer Reversen Transkriptase ließ sich aus der zuvor gewonnenen mRNA (siehe Abschnitte 3.4.2.1 und 3.4.2.2) die komplementäre, stabilere cDNA herstellen, welche für die spätere qRT-PCR benötigt wurde.

Für diesen Vorgang wurden zunächst Ansätze von gelöster RNA hergestellt, indem jeweils pro Ansatz 1 µg RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von insgesamt 8 µl aufgefüllt wurde. Der DNase-Verdau stellte anschließend den ersten Schritt dar, in dem die RNA-Proben von möglichen Verunreinigungen genomischer DNA befreit wurden. Zu jedem Ansatz wurden je 1 µl RQ1 RNase-freie DNase I und 1 µl des 10x DNaseI-Puffers gegeben. Das Reaktionsgemisch inkubierte daraufhin für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion der DNase wurde danach durch die Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat) gestoppt, während das Gemisch wiederum für 15 Minuten bei 65 °C inkubierte. Als Nächstes erfolgte die Hinzugabe des Mastermix A (vgl. Tabelle 12) sowie die fünfminütige Erhitzung auf 70 °C. Die in dem Mastermix A enthaltenen Primer lagerten sich an die entsprechenden Stellen der RNA an und stellten für den nächsten Schritt die Ausgangspunkte der DNA-Synthese dar. Auch diese Reaktion wurde gestoppt, indem das Reaktionsgemisch für eine Minute auf Eis gelagert wurde.

Reagenz des Mastermix A	Menge
0,5 µg/µl Randomprimer	0,6 µl
0,5 µg/µl Oligo-dt-Primer	0,4 µl
DEPC-Wasser	4 µl

*Tabelle 12: PCR-Mastermix A für die cDNA-Synthese
Reagenzien und Zusammensetzung*

Nach der Zugabe des Mastermix B (vgl. Tabelle 13) fand eine Inkubation von einer Stunde bei 37 °C statt, mit erneuter Beendigung der Reaktion durch eine einminütige Kühlung auf Eis. Während der Inkubationszeit erfolgte die Synthese der cDNA, indem mithilfe der Reversen Transkriptase (MMLV-RT) und der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) ein zur RNA komplementärer Strang gebildet wurde. Damit am Ende dieses Vorgangs nur noch die gewünschte cDNA vorlag, wurde die übrige RNA von einer RNase abgebaut. Zur anschließenden Aufbewahrung wurde die hergestellte cDNA bei -20 °C gelagert.

Reagenz des Mastermix B	Menge
5x mMLV-Puffer	5 µl
10 mM dNTPs	1,25 µl
40 U/µl RNase-Inhibitor	0,5 µl
200 U/µl mMLV	1 µl
DEPC-Wasser	2,25 µl

*Tabelle 13: PCR-Mastermix B für die cDNA-Synthese
Reagenzien und Zusammensetzung*

3.4.2.4. TaqMan™-qRT-PCR

Im letzten Schritt wurden mithilfe einer qRT-PCR die Expressionslevel bestimmter Gene ermittelt. Die dafür genutzte Methode der TaqMan™-qRT-PCR beruhte auf dem Prinzip, dass sich eine für das Zielgen spezifische fluorogene Sonde bei der PCR anreicherte und somit der gesuchte DNA-Abschnitt in Echtzeit gemessen werden konnte. Generell ließ sich der PCR Vorgang in vier Phasen unterscheiden. In der ersten Phase fand die Amplifizierung der DNA-Abschnitte statt, in der noch kein Fluoreszenzsignal messbar war. Darauf folgte in der zweiten Phase die exponentielle Zunahme der PCR-Produkte, welche als Fluoreszenzsignal messbar waren. Dabei verdoppelten sich die PCR-Produkte idealerweise mit jedem Zyklus. Diese Reaktion verzögerte sich in der nächsten Phase, da es zur Akkumulation von PCR-Produkten sowie dem Verbrauch der Substrate und Enzyme kam. Die Reaktion erreichte schließlich eine Sättigung. Für die mittels qRT-PCR gewonnenen Aussagen war die zweite Phase die entscheidende. Zur Detektion der entstandenen Amplifikations-Produkte in Echtzeit wurden die TaqMan™-Sonden (Oligonukleotidsonden) während der Produktion durch die Firma MWG Eurofins mit Farbstoffen versetzt, welche an ihrem 5'-Ende einen Reporter- (Carboxyfluorescein, FAM) und am 3'-Ende einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff (Carboxytetramethylrhodamin, TAMRA) enthielten. Bei Vorliegen dieser Konfiguration unterdrückte der Quencher den Reporter in seiner fluoreszierenden Wirkung, solange er sich in räumlicher Nähe zum Reporter befand. Während eines Zyklus der PCR bewirkte die genutzte Taq-Polymerase zum einen die Elongation der komplementären DNA-Stränge und zum anderen den Abbau der Primer. Dadurch kam es zur Emission des Reporterfarbstoffes. Es konnte somit in jedem Zyklus gemessen werden, wie hoch der Emissionswert war und dieser wiederum war proportional zu den synthetisierten DNA-Fragmenten¹⁰⁵. Das Ganze wurde mit einem Schwellenwert abgeglichen, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal deutlich

über der Hintergrundfluoreszenz lag. Der PCR-Zyklus, in dem dieser Schwellenwert, welcher sich in der exponentiellen Phase der PCR befand, zum ersten Mal erreicht wurde, wurde Threshold-Zyklus (CT) genannt. Umso kleiner dieser Wert war, desto mehr der zu amplifizierenden DNA-Zielsequenzen war in dem ursprünglichen Reaktionsgemisch enthalten. Schließlich wurde das ermittelte Expressionslevel des Zielgens zur relativen Quantifizierung mit einem Referenzgen (housekeeping gene) abgeglichen. Dafür wurde die Differenz zwischen dem CT-Wert des Ziel- und des Referenzgens gebildet, was den ersten Schritt der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode darstellte. Die Ergebnisse wurden auf den Mittelwert des Referenzgens bezogen, welchen man =1 setzte. Somit konnten die relativen Veränderungen der Genexpressionen zwischen Referenz- und Zielgruppe bestimmt werden ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Für die Methode wurden 96-Well-Platten befüllt, indem in jedes Well 22,5 µl eines Reaktionsgemisches vorgelegt und anschließend 2,5 µl cDNA hinzugegeben wurde. Für das Reaktionsgemisch wurden 12,5 µl des Mastermixes Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX genutzt. Darin enthalten waren ein festgelegtes Verhältnis an Taq-Polymerasen, Desoxyribonukleosidtriphosphaten, Magnesiumchlorid und Puffersubstanzen. Außerdem wurden 8,5 µl HPLC-Wasser (LiChrosolv®-Wasser) hinzu pipettiert, gefolgt von jeweils 0,5 µl zweier Primer (jeweils 6 µM) und der TaqMan™-Sonde (2 µM) des entsprechenden Zielgens. Dabei handelte es sich um zwei gegenläufig orientierte Primer (forward und reverse), die die zu amplifizierende Zielsequenz flankierten. Nachdem die Befüllung der Platten erfolgt war, wurden sie mit Optical Adhesive Covers verschlossen und bei 20 °C für 3 Minuten mit 94 rcf zentrifugiert. Daraufhin fand schließlich die PCR in dem 7500 Real Time PCR System Thermocycler statt, unter der Verwendung des dazugehörigen Software-Programmes „7500 Software v2.0.6“. Das genutzte Temperaturprotokoll der PCR ist in Tabelle 14 abgebildet. Als Referenzgen wurde für alle Analysen β -Aktin verwendet. Die anschließende Auswertung nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode fand mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms „Microsoft Excel“ statt.

Temperaturprotokoll der TaqMan™-qRT-PCR	Temperatur	Dauer	
Uracil-DNA-Glycosylase Inkubation	50 °C	2 Minuten	
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Minuten	
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	} 40x
Elongation	60 °C	1 Minute	

Tabelle 14: Temperaturprotokoll der TaqMan™-qRT-PCR

3.4.3. Western Blot zur Bestimmung der Proteinmenge

Im nächsten Schritt sollten einige plazentare Proteine genauer untersucht werden, um dadurch gegebenenfalls die Plazentaintegrität unter den Fragestellungen dieses Promotionsprojektes besser verstehen zu können. In diesem Zusammenhang wurde sich der Methode des Western Blots bedient.

3.4.3.1. Proteinisolation

Zunächst wurden aus den nativ eingefrorenen Plazenten Proteine isoliert. Dafür wurde jeweils zu einem Viertel der Plazenten 250-400 µl modifizierter RIPA-Puffer gegeben. Dem Puffer wurden vorher Protease- und Phosphatase-Inhibitoren hinzugefügt, um die zu isolierenden Proteine vor einem möglichen Abbau durch frei werdende Proteasen und Phosphatasen zu schützen. Das Gemisch wurde gemörsert und anschließend für 20 Sekunden bei 50 % Maximalenergie über drei Zyklen in dem Sonifizierer Sonopuls® sonifiziert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde auf Eis wurden die Proben bei 4 °C für 5 Minuten mit 18407 rcf zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand, welcher die freigesetzten Proteine enthielt, wurde abgenommen und zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

3.4.3.2. Erfassung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge der zuvor hergestellten Proben (siehe Abschnitt 3.4.3.1), wurde das Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit genutzt. Mithilfe dieses Kits konnte auf Basis von Bicinchoninsäure (BCA) der kolorimetrische Nachweis und die Quantifizierung von dem gelösten Gesamtprotein erfolgen. Das violette Reaktionsprodukt des Kits war ein wasserlöslicher Komplex, welcher eine starke Absorption bei 562 nm zeigte. Diese Absorption wiederum nahm bei steigender Proteinkonzentration über einen Arbeitsbereich von 20 bis 2000 µg/mL nahezu linear zu. Die Proteinkonzentrationen wurden dabei in Bezug auf eine Standardreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt und angegeben ^{109,110}.

Im ersten Schritt wurden die Proteinproben jeweils im Verhältnis 1:15 mit dem modifizierten RIPA-Puffer verdünnt. Dafür wurden je 2 µl der Proben mit 28 µl RIPA-Puffer versetzt. Da alle Proben doppelt bestimmt werden sollten, wurden jeweils 10 µl pro Probe in zwei Wells einer 96-Well-Platte gegeben, der übrige Teil wurde verworfen. Den Nullwert stellte reiner modifizierter RIPA-Puffer dar. Als Standardprotein diente BSA, welches zum einen unverdünnt aufgetragen (2 mg/ml) und für die Standardreihe in den Verhältnissen von 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32, mit modifiziertem RIPA-Puffer verdünnt und ebenfalls auf die Platte gegeben wurde. Im nächsten Schritt wurde ein Working Reagent hergestellt. Dazu dienten die beiden Reagenzien A und B des Kits. Diese wurden in einem Verhältnis von 50:1 miteinander vermischt und anschließend wurden 200 µl des Gemischs in jedes Well gegeben. Daraufhin erfolgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei 37 °C in einem Plattenwärmegerät. Mithilfe des Nano Quant infinite M200 Pro sowie der Software „Tecan i-control 2.0“ fand schließlich die spektralphotometrische Analyse der Proben statt. Anhand einer durch die Standardreihe erstellte Kalibrierungskurve konnten die Proteinkonzentrationen jeder unbekannt Probe ermittelt werden, wobei zur Berechnung der jeweilige Mittelwert der Messergebnisse genutzt wurde.

3.4.3.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid Gelelektrophorese ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe sich die zuvor isolierten Proteine nach ihrer Masse bzw. ihrem Molekulargewicht auftrennen ließen¹¹¹. Dabei war bei der Herstellung des Gels für die Gelelektrophorese die Porengröße entscheidend. Denn je kleiner ein Protein, desto leichter konnte es die Poren durchwandern. Bezogen auf das Gel galt: Je engmaschiger ein Gel, umso besser konnten kleinere Proteine detektiert werden und umgekehrt wurde ein großmaschiges Gel zur Detektion größerer Proteine benötigt. Die Porengröße war dabei durch die Konzentration von Acrylamid beeinflussbar, da dies für die Bildung von vernetzten Polyacrylamidketten verantwortlich war.

Die zuvor gewonnenen Proteinproben (siehe Abschnitt 3.4.3.1) wurden mit einem Probenpuffer versetzt, welcher SDS enthielt. Dies sorgte dafür, dass die Proteine negativ geladen waren. Je größer ein Protein, desto mehr Bindungen zwischen den SDS und den Aminosäuren der Polypeptidketten konnten stattfinden. Die ursprüngliche Ladung eines Proteins trat dadurch in den Hintergrund und alle Proteinproben lagen mit einem nahezu gleichen Ladungs-Masse-Verhältnis vor. Diese Ladung wiederum war im Verlauf verantwortlich für die Geschwindigkeit, mit der die Proteinproben bei angelegter Spannung in der Gelmatrix wanderten. Das genutzte Gel bestand dabei aus zwei Teilen. Zunächst fand im Sammelgel eine gleichmäßige Anreicherung der Proteine am Übergang zwischen den beiden Gelzonen statt und anschließend trennten sich die Proteine im Bereich des Trenngels nach ihrer Masse in einzelne Banden auf.

Für eine bestmögliche Aufteilung der zu detektierenden Proteine wurde das Trenngel außerdem in zwei Schichten unterteilt. Es wurde ein unteres 10 % mit einem oberen 8 % oder 6 % Gel kombiniert und darauf wurde jeweils das Sammelgel geschichtet. Auf Höhe des Sammelgels wurden mithilfe eines Kammes Kammern für die Proteinproben geschaffen. Die Zusammensetzung der einzelnen Gele ist in Tabelle 15 aufgeführt. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in eine Elektrophorese-Kammer gegeben und mit 10x Lämmli-Puffer als Laufpuffer bedeckt.

Die Proben wurden für die Gelelektrophorese vorbereitet, indem 15 µg der Proteinproben mit MilliQ-Wasser insgesamt auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt wurden. Zusätzlich wurden zu jeder Probe 2,5 µl eines reduzierenden 5x Probenpuffers hinzugegeben. Neben SDS waren in diesem Puffer auch β-Mercaptoethanol zur Spaltung der Disulfidbrücken der Proteine, der Farbstoff Bromphenolblau zur Identifizierung der späteren Lauffront und Glycerin enthalten. Aufgrund der im Vergleich zu Wasser höheren Dichte des Glycerins sorgte dies dafür, dass sich die Proben später am Boden der jeweiligen Geltasche absetzen würden. Das hergestellte Gemisch wurde zur Denaturierung bei 70 °C für 10 Minuten erhitzt.

Anschließend wurde jeweils das gesamte Volumen der einzelnen Versuchsproben in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurden 7 µl Molekulargewichtsmarker, welcher angefärbte Proteine mit bekannten Molekulargewichten enthielt, in eine der Taschen gegeben. Anhand der daraus entstehenden Banden konnte später das Molekulargewicht einzelner Proteine in den Versuchsproben ermittelt werden.

Im letzten Schritt erfolgte die Elektrophorese in einer horizontalen Midi Plus Elektrophorese-Kammer. Dazu wurde anfangs eine Spannung von 80 V genutzt (Spannungsquelle peq power 300). Als die Bromphenolblau-markierte Lauffront das Trenngel erreichte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Beim Erreichen der Lauffront des unteren Gelrandes wurde die Elektrophorese beendet.

Reagenz	10 %-Trenngel	8 %-Trenngel	6 %-Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	10 %	8 %	6 %	5,1 %
Tris/HCL (Puffer)	375mM (pH 8,8)	375mM (pH 8,8)	375mM (pH 8,8)	65mM (pH 6,8)
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
APS	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,04 %	0,06 %	0,08 %	0,1 %

Tabelle 15: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.4.3.4. Western Blot

Die zuvor in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine (siehe Abschnitt 3.4.3.3) wurden im nächsten Schritt mittels eines Western Blot-Verfahrens sichtbar gemacht. Bei diesem Verfahren wurden die Proteinbanden des Gels zunächst mittels eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper detektiert ¹¹².

Als Erstes wurden vier Whatman-Papiere und eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Gels abgestimmt und für 30 Minuten bei 4 °C in einen Transfer-Puffer (Towbin-Puffer mit 10 % Methanol) gegeben. Anschließend wurde das Trenngel, von dem zuvor der Teil des Sammelgels abgeschnitten und verworfen worden war, auf zwei Whatman-Papiere gefolgt von der Nitrocellulose-Membran gelegt und von oben wiederum von zwei Whatman-Papieren bedeckt. Dieser insgesamt sechsschichtige Komplex wurde in eine Blot-Kammer (Semi-Dry-Blotter) eingespannt, in die ebenfalls der zuvor genutzte Transfer-Puffer gegeben wurde. Da der Komplex so eingespannt wurde, dass sich das Gel auf Seite der Kathode und die Membran auf Seite der Anode befand, wanderten die negativ geladenen Proteine während des Blottens vom Gel in die Membran. Es wurde insgesamt für 120 Minuten mit einem senkrecht zur Membran angelegten elektrischen Feld bei 1,3 mA/cm² geblottet.

Im Anschluss an diesen Vorgang wurde die Membran aus dem Komplex entfernt und für 2 Minuten mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Dadurch wurden alle sich auf der Membran befindenden Proteine angefärbt und somit der erfolgreiche Proteintransfer sichtbar gemacht. Danach wurde die Färbung mit VE-Wasser wieder von der Membran abgewaschen und die

Membran wurde in einem Blocking Buffer (5 % Milch(-pulver) und 2 % BSA in TBST) für ca. eine Stunde inkubiert, um auf der Membran befindliche unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren.

Schließlich erfolgte die Detektion der gesuchten Proteine mithilfe spezifischer Antikörper. Dafür wurde der primäre Antikörper entweder in 5 % BSA/TBST oder 5 % Milch/TBST verdünnt und danach gemeinsam mit der Membran in einer Tüte zur Inkubation eingeschweißt. Der erste Teil der Inkubation fand bei 4 °C über Nacht statt, gefolgt von weiteren 30 Minuten bei Raumtemperatur, jeweils gelagert auf einem Schüttler (Duomax 1030 Plattformschüttler).

Nach einem anschließenden Waschvorgang der Membran für jeweils dreimal 10 Minuten in TBST fand die einstündige Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper bei Raumtemperatur statt, ebenfalls auf einem Schüttler. Dafür wurde der Zweitantikörper, der sich jeweils gegen die Spezies des Primärantikörpers (Maus oder Kaninchen) richtete, zuvor in 5 % Milch/TBST verdünnt. Im Anschluss erfolgte ein weiteres Mal der dreimalige zehnmünütige Waschvorgang in TBST.

Die Proteinbanden wurden im letzten Schritt mittels ECL (Prime Western Blotting Detection Reagent) sichtbar gemacht. Dabei fand eine Chemolumineszenzreaktion statt, in der die Lumineszenz von oxidiertem Luminol detektiert wurde. Für diese Reaktion besaß der Sekundärantikörper eine HRP, welche das Luminol katalysierte, das wiederum in dem ECL enthalten war. Bei Belichtung der mit ECL benetzten Membran mit einer Chemilumineszenz-Lampe zeigten sich an den Stellen, an denen ein Chemilumineszenz-Signal detektiert wurde, schwarze Banden. Zur Visualisierung und Digitalisierung wurde der Chemidoc™ XRS gel imager genutzt. Von diesen Banden konnte bei optimaler Belichtungszeit mithilfe der Software „Image Lab™ v5.2.1“ eine densitometrische Semiquantifizierung der Proteinmenge erfolgen. Als Abgleichprotein diente β -Aktin und indem die ermittelten Werte der Proteinmenge von den untersuchten Proteinen mit denen von β -Aktin ins Verhältnis gesetzt wurden, konnte auf die relative Proteinmenge der einzelnen Proben geschlossen werden. Diese Ergebnisse wurden schließlich unter den drei Versuchsgruppen geschlechtsspezifisch verglichen.

3.5. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der generierten Daten wurde das Programm „GraphPad Prism 7“ genutzt. Mit dessen Hilfe wurde ein Großteil der Ergebnisse der zuvor beschriebenen Methoden zunächst durch einen Grubbs Test auf Ausreißer hin untersucht, um den Streubereich zu verringern. Dabei wurde pro Gruppe maximal ein Wert ausgeschlossen. Anschließend wurden die Daten durch den D'Agostino-Pearson Test dahingehend untersucht, ob eine Normalverteilung vorlag. Bei vorliegender Normalverteilung erfolgte zur weiteren Analyse die Durchführung eines zweiseitigen Student's T-Test. Die Daten, bei denen keine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte, wurden mit einem Mann-Whitney-Test

ausgewertet. Dabei wurden alle Gruppen untereinander verglichen. In der Auswertung wurde ein p-Wert von $<0,05$ als Signifikanzlevel festgelegt (Signifikanzniveaus: $p <0,05 = *$, $p <0,01 = **$, $p <0,001 = ***$ und $p <0,0001 = ****$). Zur besseren Übersicht wurden in den Tabellen im Folgenden weitere Symbole zur Darstellung der Signifikanzniveaus zwischen den drei Versuchsgruppen verwendet ($^{\circ}$, §). Um die Streubreite anzugeben, wurde der Standardfehler (SEM) genutzt und für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde jeweils der Mittelwert abgebildet.

4. Ergebnisse

4.1. Phänotypische Daten der Muttertiere, Feten und Plazenten

Um die Auswirkung einer HFD und einer NI im Vergleich zu der reinen Ernährung mit einer SD auf phänotypischer Ebene zu erfassen, wurden die entsprechenden Daten der Muttertiere bereits während des Tierversuches und im Rahmen der Sectio caesarea an G 15.5 erfasst. Zu dem Zeitpunkt wurden zusätzlich die phänotypischen Daten ihrer Feten und Plazenten erhoben.

4.1.1. Gewicht der Muttertiere und ihres epigonadalen weißen Fettgewebes

Zum Zeitpunkt der Verpaarung und zum Zeitpunkt der Sectio caesarea wurde das Gewicht der Muttertiere bestimmt, um die drei generierten Versuchsgruppen hinsichtlich ihrer Gewichtsentwicklung über den Verlauf der Schwangerschaft hinweg vergleichen zu können. Ergänzend wurde an G 15.5 das Gewicht des epigonadalen weißen Fettgewebes der Muttertiere erfasst.

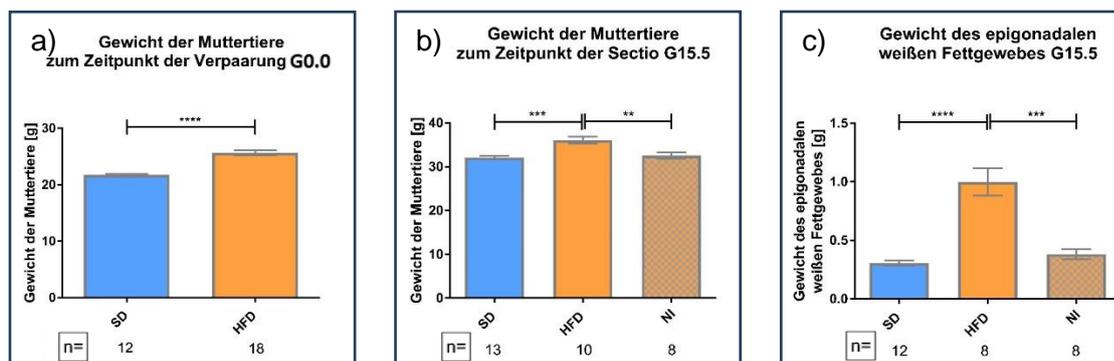


Abbildung 3: Gewicht der Muttertiere und des epigonadalen weißen Fettgewebes

a) Gewicht der Muttertiere zum Zeitpunkt der Verpaarung G 0.0.

b) Gewicht der Muttertiere zum Zeitpunkt der Sectio caesarea an G 15.5.

c) Gewicht des epigonadalen weißen Fettgewebes der Muttertiere zum Zeitpunkt der Sectio caesarea an G 15.5.

n = Anzahl der Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$, $p < 0,0001 = ****$.

Die SD-Gruppe, welche als Kontrollgruppe diente, war mit einem festgelegten Gewicht von $< 23,5$ g normalgewichtig. Die HFD-Gruppe wurde ab dem Alter von 3 Wochen mit einer hochkalorischen Diät ernährt und war zum Zeitpunkt der Verpaarung mit einem festgelegten Gewicht von $> 23,5$ g übergewichtig und somit signifikant schwerer als die SD-Tiere (siehe Abbildung 3a). Da die NI-Gruppe erst im Anschluss an die Verpaarung aus Weibchen der HFD-Tiere generiert wurde, lagen zum Zeitpunkt der Verpaarung nur zwei Versuchsgruppen vor.

In der Abbildung 3b wird deutlich, dass die Muttertiere der HFD-Gruppe zum Zeitpunkt der Sectio caesarea weiterhin signifikant schwerer waren als die der SD-Gruppe. Darüber hinaus zeigten die NI-Tiere über den Zeitraum der Schwangerschaft hinweg eine deutlich geringere

Gewichtszunahme, da diese im Vergleich zu den HFD-Tieren an G 15.5 signifikant leichter waren.

Neben dem Gewicht der Muttertiere wurde zusätzlich das epigonadale weiße Fettgewebe im Zuge der Sectio caesarea bei den schwangeren Mäusen entnommen und dessen Gewicht bestimmt. Die HFD-Gruppe zeigte ein signifikant höheres Gewicht des epigonadalen weißen Fettgewebes im Vergleich zur SD-Gruppe. Zusätzlich wurde deutlich, dass es in der NI-Gruppe zu einer signifikanten Reduktion des Fettgewebe-Gewichts im Vergleich zur HFD-Gruppe kam (siehe Abbildung 3c).

4.1.2. Plazentagewicht und Plazentaeffizienz an G 15.5

Um eine Aussage der möglichen Auswirkungen von Übergewicht und einer NI auf die Funktionalität der Plazenta treffen zu können, wurde die Effizienz der Plazenten berechnet. Dafür wurden das fetale Gewicht und das dazugehörige Plazentagewicht ins Verhältnis zueinander gesetzt.

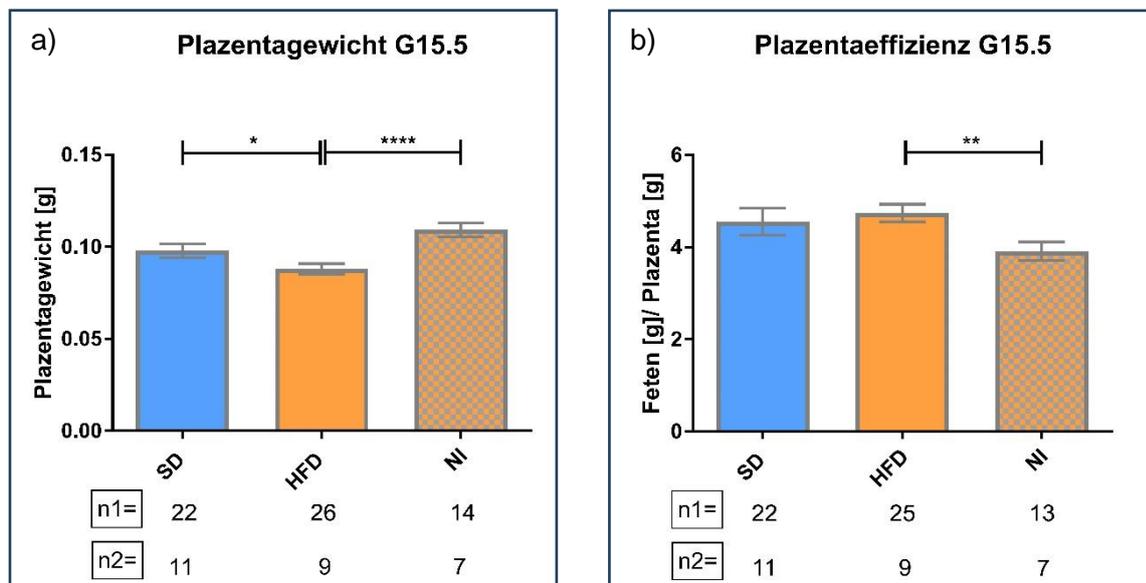


Abbildung 4: Plazentagewicht und Plazentaeffizienz

a) Darstellung des Plazentagewichts, welches im Rahmen der Sectio caesarea an G 15.5 bei einigen Nachkommen bestimmt wurde.

b) Darstellung der Plazentaeffizienz, welche durch das Verhältnis von fetalem Gewicht zu entsprechendem Plazentagewicht bestimmt wurde.

n1 = Anzahl der Feten. n2 = Anzahl der Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,0001 = ****$.

Wie aus Abbildung 4a deutlich wird, waren die Plazenten der HFD-Gruppe mit einem durchschnittlichen Gewicht von 0,088 g in Relation zu den anderen beiden Gruppen signifikant am leichtesten. Die Plazenten der SD-Gruppe zeigten dabei ein Gewicht von durchschnittlich 0,098 g und das der NI-Gruppe lag sogar bei durchschnittlich 0,109 g pro Plazenta. Dies spiegelte sich in dem Trend von $p = 0,051$ wider, der sich zwischen der SD- und NI-Gruppe zeigte.

In dem Graphen der Abbildung 4b wird die Plazentaeffizienz dargestellt. Die berechnete Plazentaeffizienz aus dem Verhältnis von fetalem Gewicht zum entsprechenden Plazentagewicht zeigte dabei keinen nachweislichen Unterschied zwischen den Plazenten der SD- und denen der HFD-Gruppe. Eine signifikante Reduktion ließ sich allerdings in der NI-Gruppe im Verhältnis zur HFD-Gruppe feststellen.

4.1.3. Gewicht, Wurfgröße und Resorptionsrate der Feten an G 15.5

Des Weiteren wurde im Rahmen der Sectio caesarea das Gewicht und die Anzahl der Nachkommen der einzelnen Muttertiere erfasst, um die jeweilige Wurfgröße zu ermitteln.

Die Nachkommen der SD-Muttertiere im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen zeigten an G 15.5 signifikant das schwerste Gewicht mit durchschnittlich 0,45 g. Die Nachkommen der HFD-Gruppe waren mit durchschnittlich 0,39 g eindeutig am leichtesten und die der NI-Gruppe mit durchschnittlich 0,41 g signifikant schwerer als die der HFD-Gruppe. Sie konnten das Gewicht der SD-Nachkommen jedoch nicht ganz erreichen und blieben im Mittel etwas leichter (vgl. Tabelle 16).

Bei der Betrachtung der Wurfgröße aller Feten fiel auf, dass deren Gesamtanzahl in der HFD-Gruppe signifikant höher war als in den anderen beiden Gruppen. Betrachtete man jedoch nur die Feten, die an G 15.5 lebendig waren, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen (vgl. Tabelle 16).

Im nächsten Schritt wurde die Resorptionsrate erfasst. Sie stellt das Verhältnis zwischen den nicht lebendigen Feten, also den resorbierten Feten und allen intrauterinen Feten, also der Gesamtzahl eines Wurfs, dar. Damit die Resorptionsrate abgebildet werden konnte, wurden in diese Berechnung auch Muttertiere mit weniger als 5 lebendigen Nachkommen mit einbezogen. Bei der Auswertung ließ sich kein signifikanter Unterschied der Resorptionsrate zwischen den drei Versuchsgruppen feststellen. Es zeigte sich jedoch ein Trend hin zu einer erhöhten Resorptionsrate in der HFD- im Vergleich zur SD-Gruppe mit $p = 0,065$ (vgl. Tabelle 16).

	SD	HFD	NI
Fetales Gewicht [g]	0,45 ± 0,01 n1 = 97, n2 = 13	0,39 ± 0,01 **** n1 = 78, n2 = 10	0,41 ± 0,005 \$\$\$, ° n1 = 55, n2 = 7
Wurfgröße	8 ± 0,53	9,9 ± 0,31 *	8,5 ± 0,53 §
alle Feten	n1 = 122, n2 = 14	n1 = 166, n2 = 10	n1 = 68, n2 = 8
Wurfgröße	7,92 ± 0,35	8,6 ± 0,48	7,5 ± 0,63
lebendige Feten	n1 = 103, n2 = 13	n1 = 86, n2 = 10	n1 = 60, n2 = 8
Resorptionsrate [%]	4,62 ± 2,14 n2 = 14	13,02 ± 4,17 n2 = 10	11,8 ± 5,46 n2 = 8

Tabelle 16: Gewicht, Wurfgröße und Resorptionsrate der Feten an G 15.5

Im Rahmen der Sectio caesarea an G 15.5 wurde das fetale Gewicht und die Anzahl aller Feten (der lebendigen sowie der resorbierten) erfasst, um die entsprechende Wurfgröße und Resorptionsrate eines Wurfs zu bestimmen. Dabei berechnete sich die Resorptionsrate aus dem Verhältnis der resorbierten Feten zu allen Feten eines Wurfs. n1 = Anzahl der Feten. n2 = Anzahl der Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte ± SEM. Im Vergleich HFD zu SD $p < 0,05 = *$, $p < 0,0001 = ****$. Im Vergleich NI zu HFD $p < 0,05 = §$, $p < 0,001 = $$$$. Im Vergleich NI zu SD $p < 0,05 = °$.

4.2. Plazenta-Integrität unter stereologischen Gesichtspunkten

Mittels stereologischer Methoden konnte ausgehend von generierten Gewebeschnitten der murinen Plazenten die Integrität des dreidimensionalen Gewebes untersucht werden. Für eine genauere Einführung in dieses Thema siehe Abschnitt 3.3.2.

4.2.1. Plazentare Volumina

Die Volumina der einzelnen Plazentazonen sowie der gesamten Plazenten wurden mittels HE-gefärbter Gewebeschnitte stereologisch ermittelt. Auf die Ergebnisse wird in den zwei folgenden Abschnitten 4.2.1.1 und 4.2.1.2 genauer eingegangen. Die drei untersuchten Zonen bildeten dabei das Labyrinth, die Junktionalzone und die Dezidua (siehe Abbildung 5).

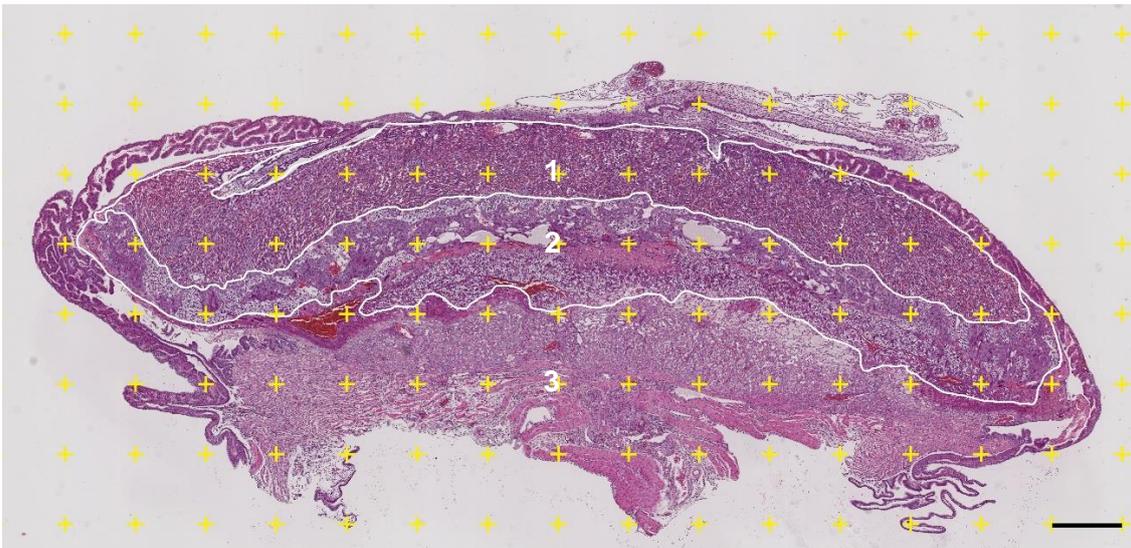


Abbildung 5: HE-gefärbter muriner Plazenta-Gewebeschnitt zur stereologischen Untersuchung der Volumina der gesamten Plazenta sowie der Plazentazonen

Die murine Plazenta wurde mit einer Schnittdicke von 7 μm vollständig aufgeschnitten und jeder 40. Schnitt wurde mit einer HE-Färbung gefärbt. Anschließend konnte mittels eines Punktegitters aus gelben Kreuzen die Größe der drei Plazentazonen stereologisch ausgewertet werden, indem die Kreuze, die auf die entsprechenden Zonen fielen, manuell gezählt wurden, gefolgt von einer stereologischen Berechnung. Die Plazentazonen sind in der Abbildung mit Nummern versehen: Die 1. Plazentazone oben im Bild ist das Labyrinth. Die 2. Zone in der Mitte ist die Junktionalzone, gefolgt von der 3. Zone unten im Bild, der Dezidua.

Ein Kreuz des Punktegitters repräsentiert eine Fläche von 250000 μm^2 . Maßstabsleiste: 500 μm .

4.2.1.1. Volumina der gesamten Plazenta und ihrer einzelnen Zonen

Zunächst wurde das Volumen der gesamten Plazenta mithilfe des Cavalieri-Prinzips erfasst und der stereologischen Methodik entsprechend eine Volumenschätzung vorgenommen. Dabei fiel auf, dass das Plazentavolumen in der SD-Gruppe im Vergleich zu den Volumina der HFD- und NI-Gruppe signifikant am geringsten war (vgl. Tabelle 17).

Die Volumina der einzelnen Plazentazonen wurden zunächst als absolute Werte stereologisch ermittelt. Bei Betrachtung der Labyrinthzonen und der Deziduen fiel auf, dass ihre Volumina jeweils signifikant am größten in der NI-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe waren. Zusätzlich zeigte sich ein Trend von $p=0,093$ bei den Labyrinthzonen und von $p=0,051$ bei den Deziduen, hin zu einem größeren Volumen in der NI- im Vergleich zur HFD-Gruppe. Die Junktionalzone zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen

Versuchsgruppen, jedoch einen Trend von $p = 0,059$ zwischen der SD- und der NI-Gruppe, sowie von $p = 0,094$ im Vergleich der SD- und HFD Gruppe mit dem jeweils kleineren Volumen in der SD-Gruppe. Anschließend wurden die relativen Werte der Volumina bestimmt, indem die einzelnen Zonen ins Verhältnis zu dem Volumen der gesamten Plazenta gesetzt wurden. Dabei traten bei den Gruppenvergleichen keine signifikanten Unterschiede auf (vgl. Tabelle 17).

	SD	HFD	NI
Volumen der Plazenta [mm³]	48,77 ± 2,53 n=8	57,06 ± 1,14 * n=6	63,97 ± 3,68 °° n=6
Volumen der Labyrinthzone [mm³]	14,91 ± 0,93 n=8	16,26 ± 0,42 n=6	17,28 ± 0,32 ° n=6
Volumen der Junktionalzone [mm³]	19,24 ± 1,12 n=8	22,09 ± 2,13 n=7	25,06 ± 2,25 n=6
Volumen der Dezidua [mm³]	14,62 ± 2,12 n=8	15,8 ± 1,31 n=7	21,64 ± 1,85 ° n=6
Volumen der Labyrinthzone/ Volumen der Plazenta [%]	30,96 ± 2,41 n=8	28,33 ± 0,61 n=7	27,5 ± 1,77 n=6
Volumen der Junktionalzone/ Volumen der Plazenta [%]	39,53 ± 1,67 n=8	41,5 ± 1,44 n=7	38,88 ± 1,55 n=6
Volumen der Dezidua/ Volumen der Plazenta [%]	33,06 ± 1,89 n=7	30,16 ± 1,53 n=7	33,62 ± 1,44 n=6

Tabelle 17: Volumina der gesamten Plazenta und der Plazentazonen in absoluten und relativen Werten
Die Volumina der gesamten Plazenta und der Plazentazonen wurde anhand HE-gefärbter Gewebeschnitte stereologisch ermittelt, woraus absolute Werte für die gesamte Plazenta, die Labyrinthzone, die Junktionalzone und die Dezidua hervorgingen. Die absoluten Werte der einzelnen Zonen wurden zur Generierung relativer Werte auf das Volumen der gesamten Plazenta bezogen.
n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte ± SEM. Im Vergleich HFD zu SD $p < 0,05 = *$. Im Vergleich NI zu SD $p < 0,05 = °$, $p < 0,01 = °°$.

4.2.1.2. Erfassung des Labyrinthvolumens durch zwei stereologische Methoden

Wie bereits in dem vorherigen Abschnitt 4.2.1.1 und Tabelle 17 aufgeführt wurde, zeigte sich bei der stereologischen Erfassung absoluter Werte des Labyrinthvolumens anhand der HE-gefärbten Plazenta-Gewebeschnitte und der Auswertung des Punktegitters eine Signifikanz zwischen der NI- und der SD-Gruppe (hier noch einmal als Grafik dargestellt in (Abbildung 6a)). Gleichzeitig erfolgte die Erfassung des Labyrinthvolumens im Rahmen einer weiteren stereologischen Analyse anhand CD31-gefärbter Gewebeschnitte. Dabei wurde die Grenzlinie der Labyrinthzone einzelner Gewebeschnitte manuell nachgezeichnet und anschließend erfolgte das digitale Ausschneiden dieser umrandeten Zone. Es folgte eine automatische Flächenberechnung und schließlich die Extrapolation auf das gesamte Labyrinthvolumen. Im Rahmen dieser Untersuchungsmethode zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen, wie aus der Grafik der Abbildung 6b hervorgeht.

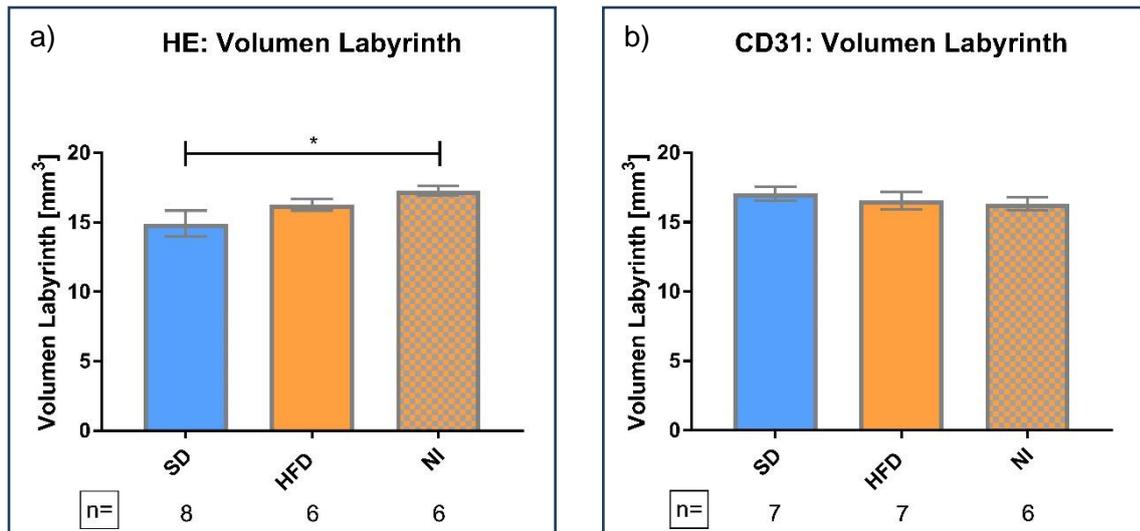


Abbildung 6: Bestimmung des Labyrinthvolumens mittels zwei verschiedener stereologischer Methoden
 Das Volumen des placentaren Labyrinths wurde mit zwei verschiedenen stereologischen Methoden erfasst. Dafür wurde jeweils an Gewebeschnitten eine Flächenbestimmung der Labyrinthzone vorgenommen und anschließend auf das gesamte Volumen hochgerechnet.

- a) Abbildung des Labyrinthvolumens, welches anhand der HE-gefärbten Gewebeschnitte ermittelt wurde. Dabei erfolgte die stereologische Auswertung mithilfe der Auszählung eines Punktegitters, welches auf die Gewebeschnitte projiziert wurde.
- b) Abbildung des Labyrinthvolumens, welches anhand der CD31-gefärbten Gewebeschnitte ermittelt wurde. Ein Ausschnitt der Labyrinthzone eines CD31 gefärbten placentaren Gewebeschnittes ist in Abbildung 7 dargestellt. Bei dieser Methode erfolgte die stereologische Auswertung durch ein digitales Ausschneiden der Labyrinthzone, welches zuvor manuell umrandet worden war, gefolgt von einer automatischen Flächenberechnung dieses Ausschnitts.

n = Anzahl der Placenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. $p < 0,05 = *$.

4.2.2. Strukturmerkmale innerhalb der Labyrinthzone

Neben der stereologischen Ermittlung der Volumina gesamter Placenten und einzelner Placentazonen wurden zusätzlich Bestandteile der fetomaternalen Transferzone genauer betrachtet. Da sich die Transferzone innerhalb des placentaren Labyrinths befindet und durch fetale und maternale Gefäße sowie Trophoblasten gebildet wird (siehe Abschnitt 2.2.1.2), erfolgte eine detaillierte stereologische Untersuchung dieser Bestandteile.

4.2.2.1. Volumina und Oberflächenmaße

Anhand CD31 gefärbter placentarer Gewebeschnitte, in denen die Endothelzellen der fetalen Gefäße sich braun präsentierten, konnten mittels eines Punktegitters die Volumina fetaler Gefäße, maternaler Blutsinusse und des umgebenden Trophoblastengewebes innerhalb der Labyrinthzone erfasst werden. Zusätzlich wurden Testlinien über diese Gewebeschnitte gelegt, um mit ihrer Hilfe die Oberflächen der fetalen Gefäße und der maternalen Blutsinusse zu ermitteln (siehe Abbildung 7).

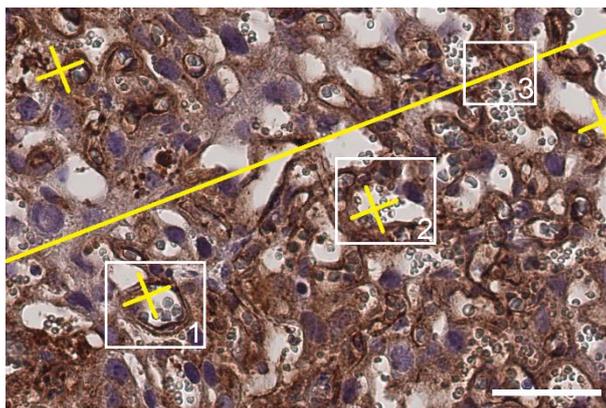


Abbildung 7: CD31 gefärbter Ausschnitt der Labyrinthzone eines murinen Plazenta-Gewebeschnittes zur stereologischen Untersuchung von Volumina und Oberflächen

An 7 μm dicken Plazenta-Gewebeschnitten konnten mithilfe zweier stereologischer Gitter sowohl Volumina als auch Oberflächenmaße ermittelt werden. Dank der CD31-Färbung stellten sich die fetalen Gefäße braun dar und die maternalen färbten sich nicht an.

Die Volumina der fetalen Gefäße, der maternalen Blutsinusse und des Trophoblastengewebes wurden durch die gelben Kreuze ermittelt, indem diejenigen gezählt wurden, die auf die entsprechenden Strukturen fielen. Beispielhaft ist in dem 1. Rechteck ein fetales Gefäß und in dem 2. Rechteck ein maternaler Blutsinusus markiert, auf welches jeweils ein gelbes Kreuz fällt. Ein Kreuz des Punktegitters repräsentiert eine Fläche von $12500 \mu\text{m}^2$.

Die Oberflächen der fetalen Gefäße und die der maternalen Blutsinusse ließen sich mithilfe der eindimensionalen gelben Testlinien ermittelt, indem die Schnittpunkte der Linien, mit denen der Grenzlinien der Gefäße gezählt wurden. Beispielhaft ist in dem 3. Rechteck rechts ein fetales Gefäß, welches mit seinen beiden Grenzlinien zweimal die gelbe Linie schneidet, sowie links davon ein maternaler Blutsinusus, der innerhalb des Rechtecks ebenfalls zweimal mit seinen Grenzlinien die gelbe Linie kreuzt, zu sehen.

Maßstableiste: 50 μm .

Dabei zeigten sich bei allen drei bestimmten Volumina (fetale Gefäße, maternale Blutsinusse, Trophoblastengewebe) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Ein Trend von $p = 0,065$ hin zur Volumenreduktion ließ sich allerdings bei den fetalen Gefäßen in der NI-Gruppe bezogen auf die SD-Gruppe erkennen. Bei Betrachtung der Oberflächengröße fetaler Gefäße fiel eine signifikante Reduktion innerhalb der NI-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe auf. Die HFD-Gruppe zeigte dabei lediglich einen geringen Trend von $p = 0,097$ hin zur Oberflächenreduktion im Verhältnis zur SD-Gruppe. Keine signifikanten Unterschiede fanden sich bei der Untersuchung der Oberflächenmaße maternaler Blutsinusse (vgl. Tabelle 18).

	SD	HFD	NI
Volumen fetaler Gefäße [mm ³]	3,78 ± 0,078 n = 7	3,82 ± 0,2 n = 7	3,32 ± 0,2 n = 6
Volumen maternaler Blutsinus [mm ³]	3,19 ± 0,29 n = 8	3,39 ± 0,37 n = 7	2,88 ± 0,14 n = 6
Volumen des Trophoblastengewebes [mm ³]	10,64 ± 0,53 n = 8	9,34 ± 0,65 n = 7	10,13 ± 0,39 n = 6
Oberfläche fetaler Gefäße [cm ²]	13,83 ± 0,47 n = 7	12,18 ± 0,72 n = 7	11,97 ± 0,37 ° n = 6
Oberfläche maternaler Blutsinus [cm ²]	10,36 ± 0,54 n = 7	11,71 ± 0,58 n = 7	11,08 ± 0,29 n = 6

Tabelle 18: Volumina und Oberflächenmaße von fetalen und maternalen Gefäßen sowie Volumina des Trophoblastengewebes

Für die stereologische Ermittlung der Volumina von fetalen Gefäßen, maternalen Blutsinussen und Trophoblastengewebe, sowie der Ermittlung der Oberflächengrößen fetaler Gefäße und maternaler Blutsinusse wurden CD31 gefärbte Plazenta-Gewebeschnitte genutzt.

n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. Im Vergleich NI zu SD $p < 0,05 = ^\circ$.

4.2.2.2. Fetale Kapillarlängen und -durchmesser

Zusätzlich wurden die Längen und die Durchmesser der fetalen Gefäße stereologisch genauer untersucht. Dafür wurden zweidimensionale Flächen auf die Labyrinthzonen von CD31 gefärbten Plazenta-Gewebeschnitten projiziert und anschließend die eindimensionalen Werte der Längen und Durchmesser ermittelt (siehe Abbildung 8).

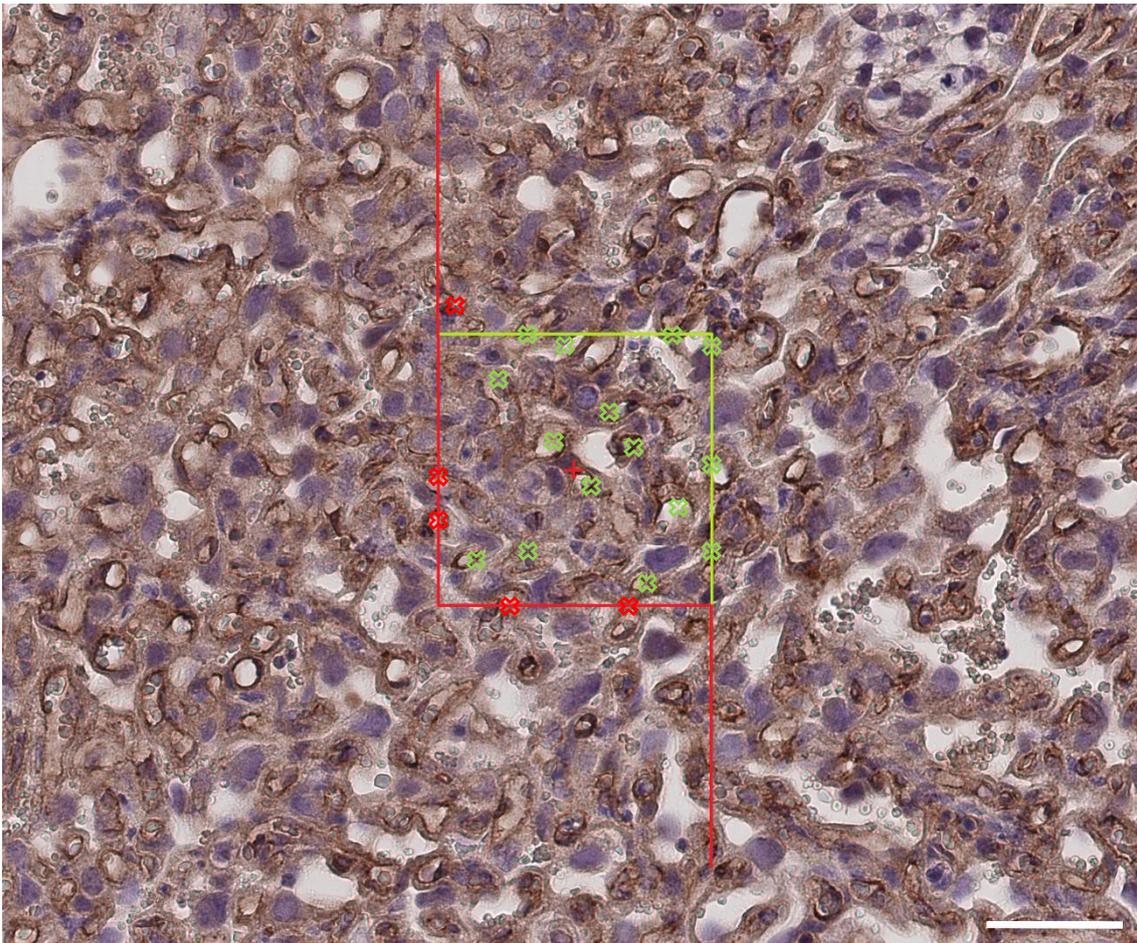


Abbildung 8: CD31 gefärbter Ausschnitt der Labyrinthzone eines murinen Plazenta-Gewebeschnittes zur stereologischen Untersuchung von fetalen Kapillarlängen und -durchmessern

Zur stereologischen Erfassung der fetalen Kapillarlängen und -durchmesser wurden zweidimensionale Quadrate auf 7 μm dicke Plazenta-Gewebeschnitte projiziert. Die fetalen Gefäße stellten sich auf den Schnitten braun dar, da sie zuvor mittels CD31 angefärbt worden waren. Die Quadrate waren durch zwei grüne und zwei rote Linien begrenzt. Es wurden alle fetalen Kapillaren gezählt, die sich innerhalb der quadratischen Felder befanden oder die grünen Linien berührten bzw. schnitten, nicht jedoch eine der roten Linien. Dies ist in der Abbildung dargestellt, indem alle zu zählenden Kapillaren mit einem grünen und alle nicht zu zählenden Kapillaren mit einem roten Kreuz markiert sind.

Ein Feld repräsentiert eine Fläche von 10000 μm^2 . Maßstableiste: 50 μm .

Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der fetalen Kapillarlängen innerhalb der HFD- und NI-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe. Die Durchmesser der fetalen Kapillaren unterschieden sich jedoch nicht signifikant zwischen den drei Gruppen. Es zeigte sich lediglich ein Trend von $p = 0,073$ hin zur Zunahme des Durchmessers in der HFD- im Vergleich zur SD-Gruppe (vgl. Tabelle 19).

	SD	HFD	NI
Kapillarlänge [m]	34,73 ± 1,28 n = 7	29,07 ± 1,75 * n = 7	27,63 ± 1,79 °° n = 6
Kapillardurchmesser [µm]	12,24 ± 0,27 n = 8	13,33 ± 0,52 n = 7	12,88 ± 0,49 n = 6

Tabelle 19: Fetale Kapillarlängen und -durchmesser

Für die stereologische Ermittlung der fetalen Kapillarlängen und -durchmesser wurden CD31 gefärbte Plazenta-Gewebeschnitte genutzt.

n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte ± SEM. Im Vergleich HFD zu SD $p < 0,05 = *$. Im Vergleich NI zu SD $p < 0,01 = °°$.

4.3. Zellintegrität innerhalb der plazentaren Labyrinthzone

Da die Labyrinthzone den Ort der fetomaternalen Transferzone darstellt und eine Veränderung der Zell- und insbesondere der Endothelzellintegrität in dieser Zone eventuell zu einer Beeinträchtigung der fetalen Versorgung führen könnte, sollten mögliche pathologische Veränderungen dieser Zone unter den drei Versuchsgruppen detektiert und verglichen werden. Dafür wurden die Proliferation, Apoptose und Seneszenz plazentarer Zellen des Labyrinths mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht.

4.3.1. Nachweis der proliferierenden Zellen

Zur Untersuchung proliferierender Zellen wurde ein BrdU-Assay verwendet, mit dessen Hilfe diese Zellen grün angefärbt wurden. Zusätzlich erfolgte eine Ko-Färbung mittels DAPI, wodurch sich alle Zellkerne blau darstellten, sowie eine antikörperbasierte Ko-Färbung von CD31, wodurch sich fetale Endothelzellen unter dem Elektronenmikroskop rot präsentierten. Die Zellen bzw. Zellkerne wurden anschließend anhand einer unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop angefertigten Aufnahme ausgezählt. Dadurch wurde die Anzahl der einzelnen Zellgruppen, also die Anzahl aller Trophoblasten und aller Endothelzellen sowie aller proliferierender Trophoblasten und aller proliferierender Endothelzellen, im Gewebeschnitt ermittelt (siehe Abbildung 9).

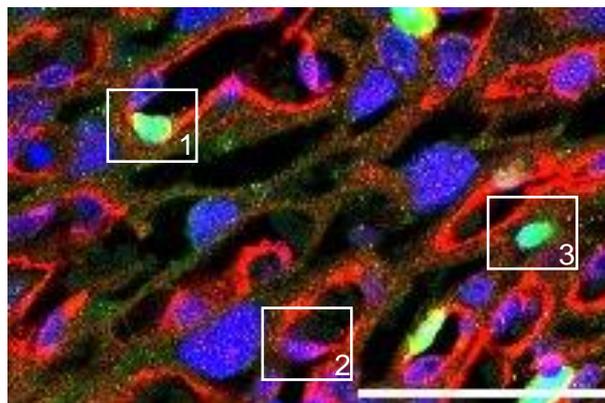


Abbildung 9: Ausschnitt der Labyrinthzone einer mittels Immunfluoreszenz gefärbten murinen Plazenta zur Detektion proliferierender Zellen

Mittels Immunfluoreszenzfärbung an 3 µm dicken murinen Plazenta-Gewebeschnitten erfolgte die Detektion einzelner Zellen in der Labyrinthzone. Die proliferierenden Zellen präsentierten sich durch den genutzten BrdU-Assay in Grün. Durch die Ko-Färbung mittels DAPI stellten sich die Zellkerne blau dar und durch eine weitere antikörperbasierte Ko-Färbung von CD31 präsentierten sich die fetalen Endothelzellen rot.

In dem 1. Rechteck ist eine BrdU-positive Endothelzelle markiert. In dem 2. Rechteck ist eine BrdU-negative, DAPI-positive Endothelzelle markiert. Im 3. Rechteck ist ein BrdU-positiver Trophoblast markiert. Maßstabsleiste: 50 µm.

Bei Betrachtung der proliferierenden Zellen innerhalb der plazentaren Labyrinthzone ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der SD, HFD und NI feststellen, weder bei der Untersuchung der proliferierenden Endothelzellkerne im Verhältnis zu allen Endothelzellkernen des Labyrinths noch bei dem Verhältnis aller Endothelzellkerne zu allen Zellkernen in der Labyrinthzone. Auch der Vergleich von proliferierenden Trophoblasten oder aller proliferierenden Zellen zu allen Zellkernen zeigte keine signifikanten Unterschiede unter den drei Versuchsgruppen (vgl. Tabelle 20).

	SD	HFD	NI
BrdU positive Endothelzellkerne/ Alle Endothelzellkerne [%]	8,42 ± 2,6 n = 7	7,86 ± 2,01 n = 6	11,3 ± 2,16 n = 7
Alle Endothelzellkerne/ DAPI positive Zellkerne [%]	6,48 ± 0,79 n = 7	7,1 ± 0,89 n = 6	5,6 ± 0,43 n = 7
BrdU positive Trophoblasten/ DAPI positive Zellkerne [%]	3,03 ± 0,54 n = 7	3,8 ± 0,81 n = 6	4,1 ± 0,41 n = 7
Alle BrdU positiven Zellen/ DAPI positive Zellkerne [%]	3,53 ± 0,69 n = 7	4,29 ± 0,91 n = 6	4,74 ± 0,52 n = 7

Tabelle 20: Nachweis proliferierender Zellen in der Labyrinthzone der murinen Plazenta

Zur Detektion proliferierender Zellen innerhalb der plazentaren Labyrinthzone wurde ein BrdU-Assay durchgeführt und mittels Ko-Färbung die Zellkerne (DAPI) und die fetalen Endothelzellen (CD31) angefärbt. Die angefärbten Zellen wurden anschließend manuell ausgezählt, nur die Zahl der DAPI-positiven Zellen wurde mittels „ImageJ-Fiji“ automatisch ermittelt. Dadurch ließen sich verschiedene Gruppen voneinander abgrenzen. Die Zellgruppen wurden anschließend in Relation zueinander gesetzt, um eine Aussage über die Proliferationsaktivität der einzelnen Gruppen treffen zu können.

n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte ± SEM.

4.3.2. Nachweis der apoptotischen Zellen

Zur Analyse der Apoptoserate innerhalb der Labyrinthzone wurde ein TUNEL-Assay verwendet, wodurch sich die apoptotischen Zellen grün darstellten. Es erfolgte ebenfalls eine Ko-Färbung mittels DAPI zur Färbung aller Zellkerne in Blau und eine weitere antikörperbasierte Ko-Färbung von CD31 mittels Anti-CD31-AK zur Detektion der fetalen Endothelzellen in Rot (siehe Abbildung 10).

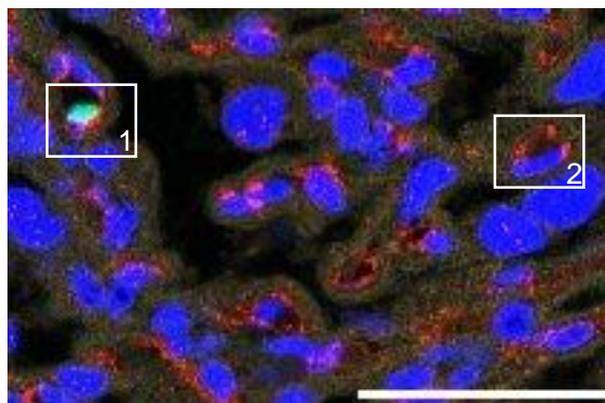


Abbildung 10: Ausschnitt der Labyrinthzone einer mittels Immunfluoreszenz gefärbten murinen Plazenta zur Detektion apoptotischer Zellen

Mittels Immunfluoreszenzfärbung an 3 µm dicken murinen Plazenta-Gewebeschnitten erfolgte die Detektion einzelner Zellen in der Labyrinthzone. Die apoptotischen Zellen präsentierten sich durch den genutzten TUNEL-Assay in Grün. Durch die Ko-Färbung mittels DAPI stellten sich die Zellkerne blau dar und durch den in der Immunfluoreszenz genutzten Anti-CD31-AK präsentierten sich die fetalen Endothelzellen rot.

In dem 1. Rechteck ist eine TUNEL-positive Endothelzelle markiert. In dem 2. Rechteck ist eine TUNEL-negative, DAPI-positive Endothelzelle markiert. Maßstableiste: 50 µm.

Bei dieser Untersuchung zeigten sich einige signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Anzahl apoptotischer Endothelzellen im Vergleich zu allen Endothelzellen war in der HFD- und NI-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur SD-Gruppe. Auch die Anzahl apoptotischer Trophoblasten innerhalb des Labyrinths im Vergleich zu allen Zellen war in den HFD- und NI-Gruppen signifikant größer als in der Kontrollgruppe, die die ganze Versuchsdauer über die SD erhalten hatte. Somit war die Gesamtzahl aller apoptotischen Zellen im Verhältnis zu allen Zellen des Labyrinths in der SD-Gruppe signifikant niedriger als in der HFD- und NI -Gruppe. Die Zahl aller Endothelzellkerne des Labyrinths im Verhältnis zu allen Zellkernen dieser Zone zeigte wie auch bei der Analyse der proliferierenden Zellen in Abschnitt 4.3.1 keine signifikanten Unterschiede unter den drei Versuchsgruppen. Es fiel lediglich ein Trend von $p = 0.051$ zwischen der HFD- und NI-Gruppe auf, mit einer gesteigerten Apoptose-Zellzahl aller Endothelzellkerne in der HFD-Gruppe (vgl. Tabelle 21).

	SD	HFD	NI
TUNEL positive Endothelzellkerne/ Alle Endothelzellkerne [%]	0,12 ± 0,074 n = 5	2,22 ± 0,72 ** n = 6	0,84 ± 0,25 ° n = 7
Alle Endothelzellkerne/ DAPI positive Zellkerne [%]	6,96 ± 0,76 n = 6	8,19 ± 0,9 n = 6	6,14 ± 0,3 n = 7
TUNEL positive Trophoblasten/ DAPI positive Zellkerne [%]	0,44 ± 0,072 n = 5	1,36 ± 0,19 ** n = 5	1,2 ± 0,25 ° n = 7
Alle TUNEL positiven Zellen/ DAPI positive Zellkerne [%]	0,45 ± 0,074 n = 5	1,52 ± 0,18 ** n = 5	1,25 ± 0,27 ° n = 7

Tabelle 21: Nachweis apoptotischer Zellen in der Labyrinthzone der murinen Plazenta
Zur Detektion apoptotischer Zellen innerhalb der plazentaren Labyrinthzone wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt und mittels Ko-Färbung die Zellkerne (DAPI) und die fetalen Endothelzellen (CD31) angefärbt. Die angefärbten Zellen wurden anschließend manuell ausgezählt, nur die Zahl der DAPI-positiven Zellen wurde mittels „ImageJ-Fiji“ automatisch ermittelt. Dadurch ließen sich verschiedene Gruppen voneinander abgrenzen. Die Zellgruppen wurden anschließend in Relation zueinander gesetzt, um eine Aussage über die Apoptose Aktivität der einzelnen Gruppen treffen zu können.

*n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte ± SEM. Im Vergleich HFD zu SD $p < 0,01 = **$. Im Vergleich NI zu SD $p < 0,05 = °$.*

4.3.3. Nachweis der seneszenten Zellen

Schließlich wurde noch die Zahl seneszenten Zellen in der plazentaren Labyrinthzone quantifiziert. Dafür wurde ein γ -H2AX-Assay verwendet, wodurch sich die seneszenten Zellen grün präsentierten. Zusätzlich erfolgte eine Ko-Färbung mit DAPI zur Darstellung aller Zellkerne in Blau sowie eine Ko-Färbung von CD31 mittels spezifischem AK zur Färbung der fetalen Endothelzellen in Rot (siehe Abbildung 11).

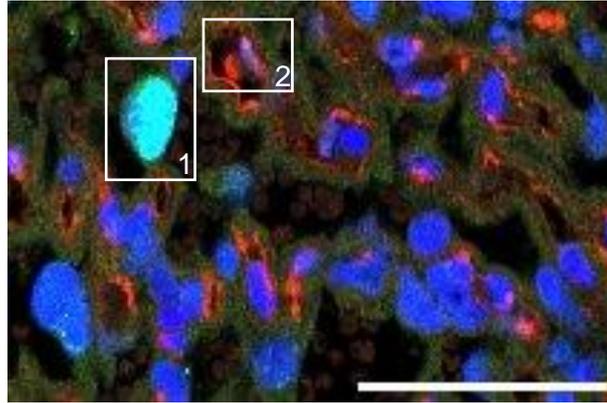


Abbildung 11: Ausschnitt der Labyrinthzone einer mittels Immunfluoreszenz gefärbten murinen Plazenta zur Detektion seneszenten Zellen

Mittels Immunfluoreszenzfärbung an 3 μm dicken murinen Plazenta-Gewebeschnitten erfolgte die Detektion einzelner Zellen in der Labyrinthzone. Die seneszenten Zellen präsentierten sich durch den genutzten $\gamma\text{-H2AX}$ -Assay in Grün. Durch die Ko-Färbung mittels DAPI stellten sich die Zellkerne blau dar und durch den für die Immunfluoreszenz genutzten Anti-CD31-AK präsentierten sich die fetalen Endothelzellen rot.

In dem 1. Rechteck ist ein $\gamma\text{-H2AX}$ -positiver Trophoblast markiert. In dem 2. Rechteck ist eine $\gamma\text{-H2AX}$ -negative, DAPI-positive Endothelzelle markiert. Maßstableiste: 50 μm .

Bei Betrachtung der Seneszenz-Rate der plazentaren Endothelzellen des Labyrinths im Vergleich zu allen Endothelzellen in dieser Zone ließen sich keine signifikanten Unterschiede unter den Versuchsgruppen feststellen. Es zeigte sich allerdings ein geringer Trend von $p = 0,097$ hin zu einer reduzierten Seneszenz in der NI- im Vergleich zur HFD-Gruppe. Auch beim Vergleich aller Endothelzellen zu allen anderen Zellen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der SD-, HFD- und NI-Gruppe, wie es sich kongruent dazu innerhalb der beiden anderen Immunfluoreszenzfärbungen der Labyrinthzone zeigte (vgl. Tabelle 20 und Tabelle 21). Es zeigte sich allerdings ein Trend von $p = 0,073$, dass eine gesteigerte Seneszenz aller Endothelzellkerne bezogen auf alle anderen Zellen in der HFD- im Verhältnis zur NI-Gruppe vorlag.

Signifikante Unterschiede zeigten sich bei der Betrachtung des Verhältnisses der seneszenten Trophoblasten bzw. aller seneszenten Zellen zu allen anderen Zellen dieser Zone. Dabei wurde eine signifikante Reduktion der Seneszenz in der Gruppe der NI im Vergleich zur HFD-Gruppe deutlich. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Seneszenz innerhalb der HFD-Gruppe im Vergleich zu der SD-Kontrollgruppe bei Berücksichtigung aller seneszenten Zellen im Verhältnis zu allen Zellen dieser Plazentazone. Innerhalb der Gruppe der Trophoblasten im Verhältnis zu allen Zellen dieser Zone zeigte sich dabei lediglich ein Trend von $p = 0,053$, bezüglich einer gesteigerten Seneszenz in der HFD- im Verhältnis zur SD-Gruppe (vgl. Tabelle 22).

	SD	HFD	NI
γ-H2AX positive Endothelzellkerne/ Alle Endothelzellkerne [%]	27,73 ± 4,23 n = 7	36,44 ± 4,68 n = 7	22,69 ± 4,23 n = 7
Alle Endothelzellkerne/ DAPI positive Zellkerne [%]	6,12 ± 0,4 n = 7	6,5 ± 0,36 n = 7	5,35 ± 0,35 n = 7
γ-H2AX positive Trophoblasten/ DAPI positive Zellkerne [%]	16,69 ± 2,14 n = 7	20,78 ± 1,78 n = 7	12,37 ± 1,11 §§ n = 7
Alle γ-H2AX positiven Zellen/ DAPI positive Zellkerne [%]	16,36 ± 1,15 n = 6	23,11 ± 1,87 * n = 7	13,58 ± 1,3 §§ n = 7

Tabelle 22: Nachweis seneszenter Zellen in der Labyrinthzone der murinen Plazenta

Zur Detektion seneszenter Zellen innerhalb der plazentaren Labyrinthzone wurde ein γ-H2AX-Assay durchgeführt und mittels Ko-Färbung die Zellkerne (DAPI) und die fetalen Endothelzellen (CD31) angefärbt. Die angefärbten Zellen wurden anschließend manuell gezählt, nur die Zahl der DAPI-positiven Zellen wurde mittels „ImageJ-Fiji“ automatisch ermittelt. Dadurch ließen sich verschiedene Gruppen voneinander abgrenzen. Die Zellgruppen wurden anschließend in Relation zueinander gesetzt, um eine Aussage über die Seneszenz-Rate der einzelnen Gruppen treffen zu können.

n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte ± SEM. Im Vergleich HFD zu SD p < 0,05 = *. Im Vergleich NI zu HFD p < 0,01 = §§.

4.4. Plazentare AJ- und Endothelzellmarker und auf Gen- und Proteinebene

Sowohl auf Genebene mittels qRT-PCR als auch auf Proteinebene mittels Western Blot wurden Marker der plazentaren Endothelzellintegrität und der plazentaren Zell-Zell-Verbindungen geschlechterspezifisch untersucht. Dafür wurden entsprechende Endothelzellmarker und AJ-Marker quantitativ beurteilt und jeweils mit dem Referenzgen bzw. -protein β-Aktin ins Verhältnis gesetzt. Zu erwähnen ist, dass für die Untersuchung der Genexpression und Proteinmenge nicht immer identisches Untersuchungsmaterial genutzt werden konnte. Die genutzten Plazenta-Gewebestücke für die zwei Analysen stammten teilweise von verschiedenen Plazenten desselben Muttertiers bzw. auch von Plazenten verschiedener Muttertiere. Außerdem wurden Plazenta-Gewebestücke in ihrer Gesamtheit analysiert, weshalb einzelne Plazentazonen nicht differenziert betrachtet werden konnten.

4.4.1. Genexpression der plazentaren AJ- und Endothelzellmarker

Es wurde die relative mRNA-Expression in Hinblick auf AJ- und Endothelzellmarker analysiert. Dabei wurde ein relevanter Unterschied unter den Versuchsgruppen so definiert, dass die relative Genexpression mindestens halbiert oder verdoppelt werden musste beim Vergleich zwischen jeweils zwei Gruppen. Es wurde sowohl die HFD-Gruppe als auch die NI-Gruppe auf die SD-Gruppe bezogen und zusätzlich die NI-Gruppe auf die HFD-Gruppe. Bei Betrachtung der unterschiedlichen Marker unter diesen definierten Grenzwerten zeigte sich bei keinem der untersuchten Gene eine relevante Abweichung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (vgl. Tabelle 23).

	HFD Vgl. zu SD	NI Vgl. zu SD	NI Vgl. zu HFD
E-Cadherin (m)	0,95 ± 0,143 n = 7	0,89 ± 0,108 n = 7	0,94 ± 0,116 n = 7
E-Cadherin (w)	0,69 ± 0,059 * n = 7	0,63 ± 0,089 ° n = 5	0,92 ± 0,129 n = 5
P-Cadherin (m)	0,85 ± 0,044 * n = 7	0,92 ± 0,049 n = 7	1,09 ± 0,057 n = 7
P-Cadherin (w)	0,86 ± 0,055 n = 7	0,9 ± 0,122 n = 4	1,04 ± 0,141 n = 4
VE-Cadherin (m)	0,89 ± 0,042 * n = 7	0,86 ± 0,077 ° n = 7	0,97 ± 0,087 n = 7
VE-Cadherin (w)	0,93 ± 0,061 n = 6	0,95 ± 0,054 n = 5	1,02 ± 0,058 n = 5
β-Catenin (m)	0,93 ± 0,069 n = 7	0,9 ± 0,063 n = 7	0,97 ± 0,07 n = 7
β-Catenin (w)	0,78 ± 0,052 ** n = 7	0,71 ± 0,015 °° n = 5	0,9 ± 0,018 n = 5
CD31 (m)	0,82 ± 0,025 *** n = 7	0,81 ± 0,074 ° n = 7	1 ± 0,091 n = 7
CD31 (w)	0,86 ± 0,043 n = 7	0,89 ± 0,062 n = 5	1,03 ± 0,072 n = 5
vWF (m)	0,77 ± 0,069 n = 7	0,77 ± 0,048 ° n = 7	1,006 ± 0,063 n = 7
vWF (w)	0,79 ± 0,055 n = 7	0,75 ± 0,038 ° n = 4	0,94 ± 0,049 n = 4

Tabelle 23: Relative Genexpression plazentarer AJ- und Endothelzellmarker

Mittels qRT-PCR wurde die relative Genexpression von plazentaren AJ- und Endothelzellmarker an G 15.5 geschlechtsspezifisch ermittelt. Dabei wurden die Werte der HFD- und NI-Gruppe in Relation zur SD-Gruppe gesetzt, sowie die NI-Gruppe in Relation zur HFD-Gruppe (relative Expression der Kontroll-/Bezugsgruppen = 1, in dieser Tabelle nicht dargestellt). Als Referenzgen wurde β-Aktin verwendet. Signifikante Ergebnisse innerhalb der HFD- und der NI-Gruppe in Relation zur SD-Gruppe wurden in dieser Tabelle fett abgebildet. In der NI- bezogen auf die HFD-Gruppe ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte ± SEM. Im Vergleich HFD zu SD $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$. Im Vergleich NI zu SD $p < 0,05 = °$, $p < 0,01 = °°$. m = männlich, w = weiblich.

4.4.2. Proteinmenge der plazentaren AJ- und Endothelzellmarker

Neben der Quantifizierung der Genexpression, siehe Abschnitt 4.4.1, wurden die gleichen AJ- und Endothelzellmarker, mit Ausnahme des vWF (welcher sich im Western Blot nicht darstellen ließ) auch auf Proteinebene analysiert. Dabei zeigten sich im Gegensatz zur Genexpression bei Betrachtung der Proteinmenge bei drei der untersuchten Marker (E-, VE-Cadherin und β-Catenin) signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

4.4.2.1. E-Cadherin

Auf Proteinebene zeigten sich für E-Cadherin bei den männlichen Plazenten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen (siehe Abbildung 12a). Bei den weiblichen Plazenten stellte sich jedoch eine signifikante Herunterregulation innerhalb der HFD- und der NI-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe dar (siehe Abbildung 12b).

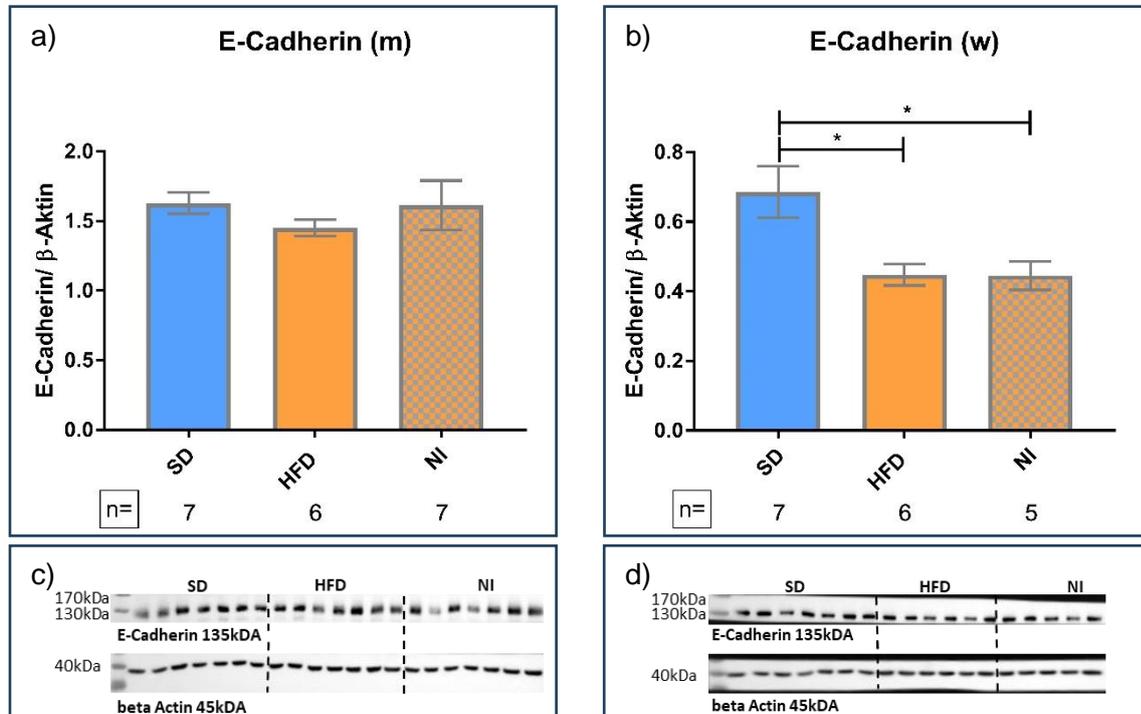


Abbildung 12: Relative Proteinmenge von E-Cadherin in der murinen Plazenta

Mittels Western Blot wurde die relative Proteinmenge von E-Cadherin (135kDa) an G 15.5 geschlechtsspezifisch ermittelt. Als Referenzprotein wurde β -Aktin (45kDa) verwendet. Darstellung der relativen Proteinmenge E-Cadherin/ β -Aktin auf der y-Achse.

- Grafische Darstellung der relativen Proteinmenge von E-Cadherin der männlichen Plazenten.
- Grafische Darstellung der relativen Proteinmenge von E-Cadherin der weiblichen Plazenten.
- Densitometrische Auswertung des Western Blots von E-Cadherin der männlichen Plazenten. Grundlage für den Graphen a) dieser Abbildung.
- Densitometrische Auswertung des Western Blots von E-Cadherin der weiblichen Plazenten. Grundlage für den Graphen b) dieser Abbildung.

n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. $p < 0,05 = *$. m = männlich, w = weiblich.

4.4.2.2. VE-Cadherin

Der Western Blot von VE-Cadherin zeigte eine Kongruenz zwischen den Ergebnissen der männlichen und denen der weiblichen Plazenten. In beiden Gruppen wurde eine signifikante Hochregulation des Proteins in der HFD-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich, welche die SD erhielten. Die NI-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von einer der beiden anderen Versuchsgruppen und lag mit ihrem Mittelwert zwischen den Mittelwerten der SD- und HFD-Gruppe (siehe Abbildung 13).

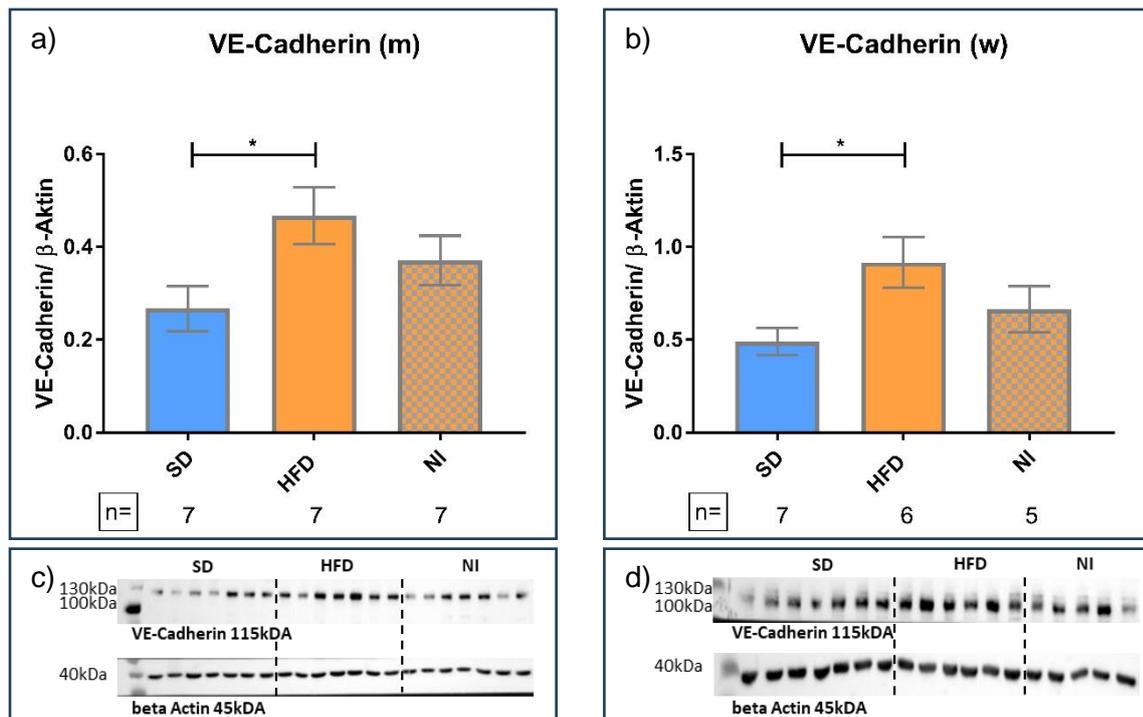


Abbildung 13: Relative Proteinmenge von VE-Cadherin in der murinen Plazenta

Mittels Western Blot wurde die relative Proteinmenge von VE-Cadherin (115kDa) an G 15.5 geschlechtsspezifisch ermittelt. Als Referenzprotein wurde β -Aktin (45kDa) verwendet. Darstellung der relativen Proteinmenge VE-Cadherin/ β -Aktin auf der y-Achse.

- Grafische Darstellung der relativen Proteinmenge von VE-Cadherin der männlichen Plazenten.
- Grafische Darstellung der relativen Proteinmenge von VE-Cadherin der weiblichen Plazenten.
- Densitometrische Auswertung des Western Blots von VE-Cadherin der männlichen Plazenten. Grundlage für den Graphen a) dieser Abbildung.
- Densitometrische Auswertung des Western Blots von VE-Cadherin der weiblichen Plazenten. Grundlage für den Graphen b) dieser Abbildung.

n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. $p < 0,05 = *$. m = männlich, w = weiblich.

4.4.2.3. β -Catenin

Im Western Blot von β -Catenin lag eine ähnliche Tendenz bei Betrachtung der männlichen und weiblichen Plazenten vor. Eine eindeutige Signifikanz zeigte sich allerdings nur in der Gruppe der männlichen Plazenten, indem es zur Hochregulation des Proteins innerhalb der NI-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit der SD kam. Zusätzlich zeigte sich ein Trend von $p = 0,073$ bezüglich der Hochregulation des Proteins innerhalb der NI- im Vergleich zur HFD-Gruppe. Daneben unterschieden sich in beiden Geschlechtern die HFD- und SD-Gruppen nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 14).

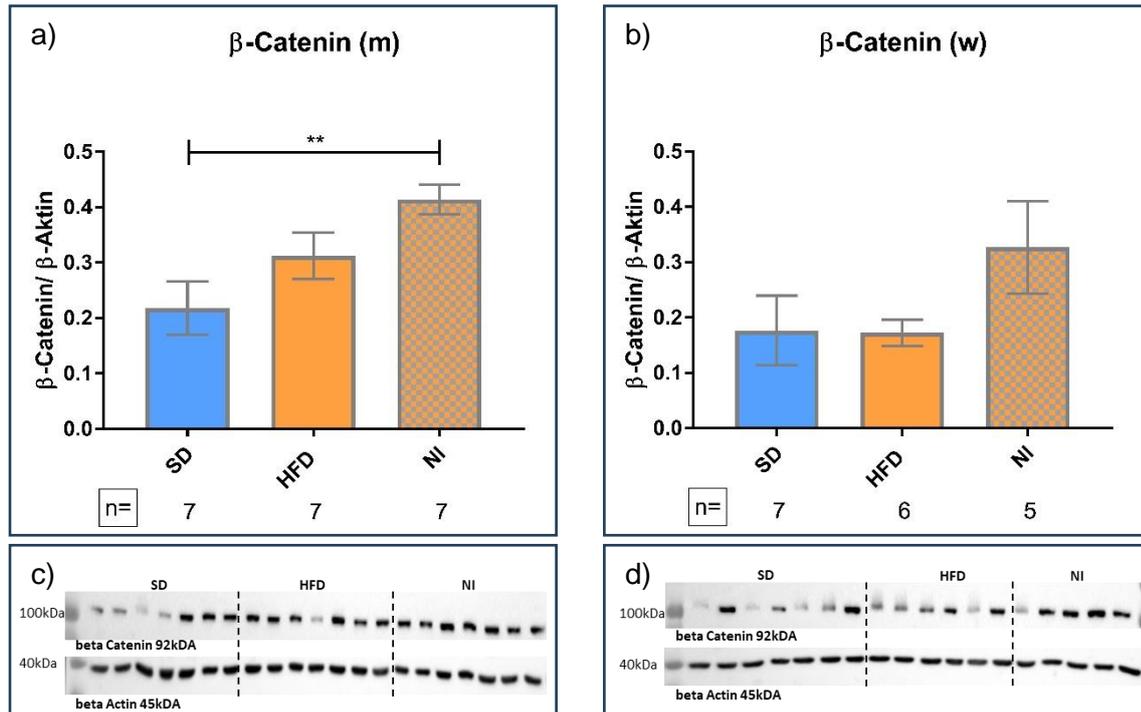


Abbildung 14: Relative Proteinmenge von β -Catenin in der murinen Plazenta

Mittels Western Blot wurde die relative Proteinmenge von β -Catenin (92kDa) an G 15.5 geschlechtsspezifisch ermittelt. Als Referenzprotein wurde β -Aktin (45kDa) verwendet. Darstellung der relativen Proteinmenge β -Catenin/ β -Aktin auf der y-Achse.

- Grafische Darstellung der relativen Proteinmenge von β -Catenin der männlichen Plazenten.
- Grafische Darstellung der relativen Proteinmenge von β -Catenin der weiblichen Plazenten.
- Densitometrische Auswertung des Western Blots von β -Catenin der männlichen Plazenten. Grundlage für den Graphen a) dieser Abbildung.
- Densitometrische Auswertung des Western Blots von β -Catenin der weiblichen Plazenten. Grundlage für den Graphen b) dieser Abbildung.

n = Anzahl der Plazenten unterschiedlicher Muttertiere. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. $p < 0,01 = **$.
 m = männlich, w = weiblich.

5. Diskussion

Im Rahmen dieses Promotionsprojektes wurde die Auswirkung einer NI bei übergewichtigen Muttertieren ab dem Zeitpunkt der Schwangerschaft auf verschiedene Aspekte hin untersucht. Insgesamt galt es zu verstehen, wie sich diese Intervention auf das ungeborene Kind und die Mutter sowie insbesondere auf die Plazenta auswirkt. Ein limitierender Faktor zur Untersuchung einer möglichen Kausalität in humangenetischen Studien stellt die Tatsache dar, dass der Mensch sowie menschliches Material für Experimente nur begrenzt zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurde sich des Mausmodells bedient, welches eine definierte Untersuchung an einem Säugetier ermöglicht ¹⁴. Bezüglich der Vergleichbarkeit der murinen und der humanen Plazenta siehe Abschnitt 2.2.1.2.

5.1. Einfluss einer NI bei maternalem Übergewicht auf phänotypische Aspekte

Zunächst galt es zu klären, ob es durch eine NI während der Schwangerschaft bei bestehendem maternalem Übergewicht zu phänotypischen Veränderungen der Muttertiere und der Feten kommt.

5.1.1. Maternale Gewichtsentwicklung

Hinsichtlich der mütterlichen Gewichtsentwicklung zeigte sich, dass diese über den Zeitraum der Schwangerschaft hinweg signifikant durch die NI beeinflusst wurde. Es kam zu einer geringeren Gewichtszunahme der Muttertiere in der Gruppe der NI im Vergleich zu den Muttertieren, die zu jedem Zeitpunkt die HFD erhalten hatten. An G 15.5, an dem Tag der Sectio caesarea, unterschieden sich das Gewicht der SD-Muttertiere und das der NI-Gruppe nicht mehr signifikant voneinander (siehe Abschnitt 4.1.1). Es zeigte sich also, dass die NI die mütterliche Gewichtsentwicklung positiv beeinflussen kann.

Dabei wird jedoch aktuell kontrovers diskutiert, welche Gewichtszunahme oder sogar -abnahme einer übergewichtigen Schwangeren als gesund bzw. ungesund gilt. Im Jahre 2009 wurde eine Empfehlung des „Institute of Medicine“ (IOM) herausgegeben, welche Angaben dazu macht, wie viel eine Frau über den Zeitraum der Schwangerschaft hinweg zunehmen sollte, in Abhängigkeit von ihrem Ausgangs-BMI. Demzufolge sollten übergewichtige Frauen 7-11,5 kg und adipöse 5-9 kg an Körpergewicht während der Schwangerschaft zunehmen ¹¹³. Ein Gewichtsverlust oder auch eine geringe Gewichtszunahme <5 kg sei hingegen mit dem Risiko von SGA für die Nachkommen assoziiert. In der entsprechenden Studie lag die SGA-Rate bei einer mütterlichen Gewichtszunahme <5 kg bei 9,6 % und bei einer Gewichtszunahme >5 kg lediglich bei 4,9 % ¹¹⁴. Diese Ergebnisse konnten in einer anderen humanen Studie übergewichtiger Schwangerer allerdings nicht bestätigt werden. Dort zeigte sich bei einer Gewichtszunahme <5 kg keine Erhöhung der fetalen IUGR-Rate, jedoch eine positive Reduktion der fetalen LGA-Rate ¹¹⁵. Eine weitere Studie untersuchte eine Gewichtsreduktion bei Schwangeren mit einem präkonzeptionellen BMI von >30 kg/m² und

kam dabei ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Makrosomie-Rate reduziert wurde und die SGA-Rate unverändert blieb. Auf mütterlicher Seite wurde zudem der schwangerschaftsinduzierte Hypertonus reduziert und auch die Anzahl an Notfallsectios verringerte sich ¹¹⁶. Es bleibt also zu erforschen, welche Gewichtsentwicklung für die Mutter während einer Schwangerschaft als sinnvoll erachtet wird und ob die IOM-Empfehlungen möglicherweise überdacht werden sollten. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die angestrebte Gewichtsentwicklung mit einer reinen NI zu erreichen wäre. In einer humanen Studie wurde bereits untersucht, inwiefern sich das mütterliche Gewicht durch eine Lifestyle-Intervention bestehend aus gesunder Ernährung und körperlicher Aktivität beeinflussen lässt. Dabei zeigte sich, dass die IOM-Empfehlungen mit den Interventionen zwar weniger häufig, aber immer noch von 35,4 % der Probandinnen überschritten wurden, im Gegensatz zu 46,6 % bei der Kontrollgruppe ohne Interventionen ¹¹⁷. Dieser Aspekt wird genauer in Abschnitt 5.5.3 erläutert.

Eine Ursache für die festgestellte positive Gewichtsreduktion in der NI-Gruppe gegenüber den Muttertieren, die weiterhin die HFD erhalten hatten, könnte die Reduktion an epigonadalem weißen Fettgewebe durch die gesündere Ernährung sein. Denn dies war bei den HFD-Tieren an G 15.5 signifikant am schwersten (siehe Abschnitt 4.1.1). Ob diese Reduktion aber allein für die deutliche Gewichtsreduktion der NI-Muttertiere verantwortlich war, lässt sich nach diesen Untersuchungen nicht abschließend klären, da nicht der gesamte Körperfettanteil der Tiere erfasst wurde, sondern explizit das den Uterus umgebene Fettgewebe.

5.1.2. Fetale Gewichtsentwicklung

In Bezug auf das fetale Outcome scheint eine gesunde Ernährung während der Schwangerschaft ebenfalls einen positiven Effekt zu haben. Die Feten der übergewichtigen Muttertiere zeigten einen IUGR-Phänotyp an G 15.5, der hier bereits im Vorfeld als mögliche Komplikation bei übergewichtigen Schwangeren beschrieben wurde (siehe Abschnitt 2.1.2). In der NI-Gruppe war das Auftreten dieses Phänotyps reduziert und die Feten waren an G 15.5 durchschnittlich schwerer als die der HFD-Gruppe. Sie blieben im Vergleich zu dem fetalen Gewicht der Nachkommen der durchgängig normokalorisch ernährten Muttertiere allerdings im Rückstand (siehe Abschnitt 4.1.3). Diese Korrelation wurde bereits in einem anderen Mausmodell mit maternalem Übergewicht der AG Appel bestätigt. Die Feten übergewichtiger Muttertiere wiesen im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollmäusen an G 15.5 ein geringeres Körpergewicht auf, was den beschriebenen IUGR-Phänotyp widerspiegelte. An G 18.5 zeigte sich jedoch eine Zunahme des fetalen Gewichts, was wiederum für ein intrauterines Aufholwachstum sprach ³². Da in diesem Promotionsprojekt jedoch nur der G 15.5 betrachtet wurde, konnten keine weiteren Erkenntnisse zu diesem Aspekt gewonnen werden. Dies könnte Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein.

Wie im Mausmodell zeigte sich auch in humanen Studien eine gestörte Gewichtsentwicklung der Nachkommen übergewichtiger Mütter. Im Gegensatz zu dem beschriebenen murinen IUGR-Phänotyp zeigte sich jedoch überwiegend ein LGA-Phänotyp bis hin zur Makrosomie^{118,119}. Diese Divergenz ist möglicherweise auf die unterschiedliche Insulin-Produktion bei murinen und humanen Nachkommen zurückzuführen (siehe Abschnitt 2.2.2). Es gibt jedoch auch humane Studien, in denen ebenfalls der fetale IUGR-Phänotyp vermehrt beobachtet wurde. Etwa in einer Studie aus dem Jahr 2012, in der die Nachkommen adipöser Schwangerer mit einem BMI >35 kg/m² betrachtet wurden. Entsprechend dieser Studie nehme mit zunehmender maternaler Fettleibigkeit sowohl die Zahl als auch der Schweregrad der Schwangerschaftskomplikationen zu³⁵.

Der positive Effekt einer NI auf die Gewichtsentwicklung der Nachkommen, wie er in diesem Projekt bei den murinen Feten gesehen wurde, konnte bei humanen Nachkommen noch nicht sicher bestätigt werden. So beeinflusste eine Lifestyle-Intervention im Rahmen einer humanen Studie den beobachteten LGA-Phänotyp nicht. Die mütterliche Gewichtszunahme konnte zwar reduziert werden, doch es zeigte sich kein positiver Effekt auf das Gewicht der Neugeborenen¹¹⁹. Es bleibt also zu klären, inwiefern der beobachtete positive Effekt der NI am Mausmodell auf den Menschen zu übertragen ist (siehe Abschnitt 5.5).

Bezogen auf die hier gesehene Korrelation der HFD-Gruppe und dem murinen fetalem IUGR-Phänotyp muss ergänzend darauf hingewiesen werden, dass dieser Zusammenhang zwar häufig beobachtet, allerdings nach wie vor schlecht verstanden ist. Aus dem Jahr 2019 gibt es eine entsprechende Übersichtsarbeit zum fetalen Wachstum bei mütterlicher Überernährung an Nagetiermodellen, die darauf aufmerksam macht, dass bereits die Dauer der Fütterung mit der HFD im Vorfeld an eine Schwangerschaft den fetalen Phänotyp beeinflussen kann, genauso wie die Variante der genutzten HFD. Beispielsweise wurde bei einer längeren HFD-Fütterungsdauer von Mäusen ein verringertes fetales Wachstum beobachtet und umgekehrt bei einer kürzeren Fütterungsdauer im Vorfeld der Schwangerschaft ein zunehmendes fetales Wachstum. Außerdem seien die bei Nagetieren am häufigsten verwendeten fettreichen Diäten nicht vergleichbar mit den westlichen Ernährungsgewohnheiten, was die spätere Übertragbarkeit auf den Menschen wiederum erschwert³⁴.

5.1.3. Anzahl der Nachkommen

Um weitere Erkenntnisse über den Verlauf der Schwangerschaft und mögliche Schwangerschaftskomplikationen gewinnen zu können, wurde in allen drei Versuchsgruppen die Wurfgröße bestimmt. Bei der Betrachtung aller angelegter Nachkommen war die Wurfgröße der HFD-Gruppe signifikant am größten. Betrachtete man hingegen nur die lebendigen Nachkommen eines Wurfs an G 15.5, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Abschnitt 4.1.3). Man kann also annehmen, dass es zu einer vermehrten Resorption der anfangs angelegten Feten innerhalb der HFD-Gruppe

kam. Die Resorptionsraten der drei Versuchsgruppen ergaben zwar keine signifikanten Unterschiede, es zeigte sich jedoch entsprechend der Annahme ein Trend hin zu einer erhöhten Resorptionsrate in der HFD- im Vergleich zur SD-Gruppe (siehe Abschnitt 4.1.3). Um das Ganze auf den Menschen zu übertragen, muss beachtet werden, dass die Resorption eines Fetus bei der Maus von einem intrauterinen Fruchttod beim Menschen zu unterscheiden ist. Beim Menschen ist die Schwangerschaft meistens ein „Ja- oder Nein-Phänomen“ und ein Fruchttod wird in der frühen Schwangerschaft entweder nicht bemerkt und gilt als okkulte Schwangerschaft oder es kommt im Verlauf zum Fruchttod und damit zum Ende der Schwangerschaft. Die Maus besitzt hingegen mehrere Einnistungsstellen für die Feten und trotz der Resorption einzelner Feten kann die Schwangerschaft weiter fortbestehen ¹²⁰. Bei dem humanen intrauterinen Fruchttod ist bekannt, dass das Risiko mit zunehmendem BMI der Mutter ansteigt ¹²¹. Zusätzlich zeigte sich in einer humanen Studie, dass es vor allem in der späten Schwangerschaft und bei Terminüberschreitung zum intrauterinen Fruchttod kommen kann ¹²². Da in diesem Projekt die Sectio caesarea an G 15.5 eingeleitet wurde, sind keine Angaben darüber möglich, ob es bei einer Terminüberschreitung zu einer Zunahme der murinen fetalen Sterberate gekommen wäre.

5.2. Einfluss einer NI bei maternalem Übergewicht auf die Plazentaintegrität und auf ihre einzelnen Zonen

Im nächsten Schritt galt es, mögliche Erklärungsansätze für den gesehenen positiven Effekt einer NI auf die maternale und fetale Gewichtsentwicklung bei maternalem Übergewicht zu finden. Daher wurde die Morphologie der gesamten Plazenta und ihrer einzelnen Zonen unter dem Einfluss einer NI genauer untersucht.

5.2.1. Morphologie der gesamten Plazenta

Um mithilfe des phänotypisch bestimmten Plazentagewichts eine Aussage über die Plazentafunktion machen zu können, wurde die Plazentaeffizienz als Verhältnis von fetalem Gewicht zu entsprechendem Plazentagewicht betrachtet (siehe Abschnitte 2.2.3.1 und 4.1.2). In einer vorangegangenen Studie der AG Appel zeigte sich bereits, dass es zu einer signifikanten Reduktion der Plazentaeffizienz bei übergewichtigen Muttertieren im Vergleich zu einer normalgewichtigen Kontrollgruppe kam ³². Dies konnte in dem vorliegenden Promotionsprojekt jedoch nicht bestätigt werden. Stattdessen unterschieden sich die SD- und HFD-Gruppe nicht signifikant voneinander. Allerdings war die Plazentaeffizienz in der NI-Gruppe gegenüber der HFD-Gruppe signifikant reduziert (siehe Abschnitt 4.1.2). Doch wie bereits beschrieben, war das Auftreten des IUGR-Phänotyps in der NI-Gruppe im Gegensatz zu der HFD-Gruppe trotzdem minimiert (siehe Abschnitt 4.1.3).

Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die Plazenten der NI-Gruppe ihre reduzierte Effizienz unter anderem durch ein erhöhtes plazentares Organwachstum ausglich, denn die

Plazenten der NI-Gruppe zeigten in der phänotypischen Auswertung durchschnittlich das schwerste Gewicht und die der HFD-Gruppe demgegenüber das leichteste (siehe Abschnitt 4.1.2). Dadurch wurde eventuell der entsprechende Nährstoffbedarf der Nachkommen gedeckt und es ließe sich somit auf eine funktionell bessere Versorgung in der NI-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe schließen, in welcher sich der fetale IUGR-Phänotyp zeigte.

Aufgrund abweichender Ergebnisse hinsichtlich der Plazentaeffizienz in diesem Promotionsprojekt und in der beschriebenen Studie der AG Appel scheint es sinnvoll, diese einmal genauer zu betrachten. Der Ursprung der divergenten Ergebnisse bezüglich der Plazentaeffizienz könnte dabei in den zugrundeliegenden Daten liegen. In der genannten Studie der AG Appel wurden mehr als doppelt so viele Gewichtsdaten pro Versuchsgruppe erfasst, was für eine höhere Verlässlichkeit der Ergebnisse sprechen könnte³². Es bleibt unklar, ob sich in diesem Projekt kongruente Ergebnisse bei einer größeren Stichprobe gefunden hätten. Ein anderer Gesichtspunkt liegt darin, dass die Plazentaeffizienz bis hierhin als Verhältnis von dem Gewicht der Feten und der Plazenten angesehen wurde, welches in diesem Projekt an G 15.5 berechnet wurde. Betrachtet man allerdings die Gewichtsentwicklung der murinen Feten über den Zeitraum der Schwangerschaft hinweg, fällt auf, dass ein exponentielles Wachstum vorliegt. Die Plazenten zeigen ein lineares und vergleichsweise langsames Wachstum und zum Schwangerschaftsende hin nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit in Relation zum fetalen Wachstum sogar annähernd linear ab¹²³⁻¹²⁵. Dazu passt auch das durch die AG Appel beschriebene Aufholwachstum, das bei den murinen Feten am Ende der Schwangerschaft beobachtet wurde (siehe Abschnitt 2.2.2). Somit liegt das Verhältnis am Anfang der Schwangerschaft auf der Seite des Plazentagewichts und verschiebt sich schließlich auf die Seite des fetalen Gewichts¹²⁶. Dementsprechend kann die Plazenta den erhöhten Nährstoffbedarf, den das fetale Wachstum mit sich bringt, nicht allein durch ein Größenwachstum decken, sondern benötigt dafür weitere Faktoren. Dazu zählen ein struktureller Umbau innerhalb der Plazenta, sowie die Reifung des Organs. Die placentare Gesamtoberfläche nimmt zu, die Diffusionsfunktion wird optimiert und auch die Blutzufuhr wird gesteigert. Des Weiteren besitzt die Plazenta eine funktionelle Reserve, mit der sie vor allem am Ende der Schwangerschaft die fetale Versorgung sichert und auch leichte Wachstumsstörungen der Plazenta ausgleichen kann¹²⁷. Es wird also deutlich, dass die Effizienz der Versorgung des ungeborenen Nachkommens nicht allein durch das Verhältnis von fetalem und placentarem Gewicht zu ermitteln ist.

Die placentare Morphologie befindet sich also über den Zeitraum der Schwangerschaft hinweg in einem beständigen Wandel und sie unterliegt einem Prozess des Wachstums und der Differenzierung¹². Ein reduziertes Plazentavolumen im ersten Trimester der Schwangerschaft gilt etwa als ein prädiktiver Wert für Präeklampsie und ein niedriges fetales

Geburtsgewicht^{128,129}. Wie bereits in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, stellen diese Erkrankungen mögliche mit Übergewicht assoziierte Schwangerschaftskomplikationen dar. Ultraschalluntersuchungen übergewichtiger Schwangerer im zweiten und dritten Trimester zeigten demgegenüber eine Assoziation mit einem größeren Plazentavolumen, sowie zusätzlich einem höheren Plazentagewicht bei der Geburt^{130,131}. In einer Studie, die sich mit einer gesunden Ernährung schwangerer Frauen befasste, wurden Hinweise auf eine verbesserte plazentare Effizienz und einen positiven Effekt auf das fetale Outcome in Zusammenhang mit gesunder Ernährung gefunden, bei gleichzeitig reduziertem Plazentavolumen im ersten Trimester¹³¹. Die Auswirkung von mütterlichem Übergewicht sowie dem Ernährungsstil der Mutter auf das Plazentavolumen sowie die möglichen Folgen eines verändertes Plazentavolumens für Mutter und Kind bleiben somit weiterhin Bestandteil aktueller Forschungen und wurden in diesem Projekt genauer untersucht. Dabei war das Plazentavolumen in der stereologischen Auswertung an G 15.5, dem letzten Schwangerschaftsdrittel der murinen Schwangerschaft entsprechend, in der SD-Gruppe im Vergleich zu der HFD- und NI-Gruppe signifikant am geringsten (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Betrachtete man jedoch das phänotypisch bestimmte Gewicht der Plazenten, auf welches bereits am Anfang dieses Abschnittes eingegangen wurde, war dieses in der HFD-Gruppe in Relation zu den anderen beiden Gruppen am leichtesten (siehe Abschnitt 4.1.2). Man würde nach den hier zuvor vorgestellten Studienergebnissen davon ausgehen, dass sich das Volumen der Plazenta gleichwertig zu ihrem Gewicht entwickelt. Dies wurde auch in anderen Studien sowohl bei schwangeren Mäusen als auch beim Menschen bereits gezeigt^{83,131}. Die Frage, warum sich in diesem Projekt nicht deckungsgleiche Ergebnisse des plazentaren Volumens und des Gewichts zeigten, lässt sich nicht abschließend klären. Eine mögliche Ursache für eine Verzerrung der Ergebnisse könnte in der stereologischen Volumenbestimmung der Plazenten liegen, da die Auswertung (Punkteauszählung) der verwendeten histologischen Gewebeschnitte eine subjektive Komponente trug (siehe Abschnitt 3.3.2.4). Um diese Verzerrung zu minimieren, wurden alle Schnittbilder von derselben Person ausgewertet. Außerdem ist anzumerken, dass die stereologische Berechnung entsprechend einer Studie von Coan et al. vorgenommen wurde. In dieser Studie erfolgte eine Untersuchung der Plazenten über mehrere Schwangerschaftszeitpunkte hinweg, um die morphologischen Veränderungen mit einbeziehen zu können. Es zeigte sich ein maximales Plazentavolumen an G 16.5 von durchschnittlich 0.067 cm^3 ⁸³. Die in diesem Projekt ermittelten Werte an G 15.5 fielen dementsprechend etwas geringer aus (vgl. Tabelle 17), waren aber mit denen von Coan et al. vergleichbar. Eine andere Ursache für die divergenten Ergebnisse des plazentaren Volumens und des Gewichts könnte in der Anzahl der Datenpunkte bezüglich des Plazentagewichts liegen. In diesem Promotionsprojekt wurden

lediglich die Plazenten Nummer 7 und folgende eines Wurfes in ihrer Gesamtheit gewogen, wodurch eine Gruppengröße von minimal 14 bis maximal 26 Plazenten/Gruppe entstand. Insgesamt erwies sich die gleichzeitige Bewertbarkeit des gemessenen plazentaren Volumens und des Gewichts als schwierig. Das Plazentagewicht oder das -volumen allein ermöglichen somit nur eine Schätzung bezüglich der Plazentaentwicklung.

5.2.2. Morphologie der Plazentazonen

Um weitere Aussagen über die Funktionalität der Plazenta treffen zu können, erfolgte im Rahmen dieses Projektes neben der Betrachtung der Morphologie der gesamten Plazenta (siehe Abschnitt 5.2.1) die genauere Untersuchung ihrer einzelnen Zonen, wie es bereits von Coan et al. als sinnvoller Schritt postuliert wurde ⁸³.

Die mittels Stereologie untersuchten Zonen der Plazenta waren das Labyrinth, die Junktionalzone und die Dezidua. Die stereologische Berechnung der Volumina der einzelnen Zonen erfolgte dabei nach den Gleichungen von Coan et al. ⁸³. Die tendenziell größte Zone bildete in diesem Promotionsprojekt in allen drei Gruppen die Junktionalzone (vgl. Tabelle 17). Pathologische Prozesse im Bereich dieser Zone werden mit Schwangerschaftskomplikationen wie IUGR assoziiert und mit einem veränderten endokrinen Milieu der Plazenta in Zusammenhang gebracht ^{15,132}. Defekte können eine Größenreduktion dieser Zone induzieren ^{39,40}, aber auch durch physiologische Prozesse kommt es gegen Ende der Schwangerschaft zu einer Größenabnahme ⁸³. Ein Erklärungsansatz ist dabei die Differenzierung der Trophoblasten-Glykogenzellen, da diese bis zu G 14.5 in der Junktionalzone gebildet werden und anschließend vermehrt in der Dezidua zu finden sind ^{14,133}. In der Studie von Coan et al. wurde im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen das Labyrinth als größte Zone der Plazenta ermittelt, welches zusätzlich über die untersuchten Gestationstage von G 12.5 bis G 18.5 hinweg an Größe zunahm. Bezüglich der Junktionalzone zeigte sich nach Coan et al. eine Verdopplung des Volumens zwischen den Messpunkten G 12.5 und G 16.5 und ein anschließender Volumenrückgang an G 18.5 ⁸³. Da Coan et al. verschiedene Messpunkte betrachtete, ist eine Vergleichbarkeit diesbezüglich erschwert, denn die Entwicklung der einzelnen Zonen kann durch das vorliegende Projekt nicht aufgezeigt werden.

Um den möglichen Einfluss der NI bei übergewichtigen Muttertieren auf die Plazenta genauer beurteilen zu können, wurden die einzelnen Plazentazonen unter den drei Versuchsgruppen verglichen. In einer vorherigen Studie der AG Appel zeigte sich in der Gruppe übergewichtigen Muttertiere im Vergleich zu der normalgewichtigen Kontrollgruppe eine signifikant kleinere Labyrinthzone an G 18.5, nicht hingegen an G 15.5 ³². In diesem Projekt zeigten die prozentualen Anteile der plazentaren Zonen an der gesamten Plazenta an G 15.5 ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Bei Betrachtung der absoluten Werte fielen jedoch Größenunterschiede auf. Die Labyrinthzone und Dezidua waren in der SD-Gruppe am

kleinsten, aufsteigend gefolgt von der HFD- und NI-Gruppe. Ebenso zeigte sich bei der Junktionalzone eine Tendenz der Größenzunahme von der SD- über die HFD- zur NI-Gruppe (vgl. Tabelle 17). Eine Erklärung für die Größenunterschiede der Zonen zwischen den drei Versuchsgruppen geht aus diesem Projekt nicht hervor. Es bleibt spekulativ, ob die NI dem IUGR-Phänotyp der Nachkommen möglicherweise über eine Steigerung der Plazentazonen-Größe entgegenwirken konnte. Eine Hypothese wäre etwa, dass versucht wurde durch ein gesteigertes Organwachstum der verschlechterten Versorgung der Feten entgegenzuwirken, wie auf phänotypischer Ebene in der HFD-Gruppe aufgrund des IUGR-Phänotyps zu beobachten war. Erst durch eine noch weiter gesteigerte Größenzunahme der Plazentazonen, die in der NI-Gruppe zu sehen war, kam es möglicherweise zu einer Kompensation der durch Übergewicht gestörten Plazentaintegrität. Dadurch wiederum würde der Nährstoffaustausch zwischen Mutter und Kind optimiert und das fetale Outcome positiv beeinflusst werden. Dies ist allerdings nur eine mögliche Erklärung, die es weiter zu erforschen gilt. Zusätzlich könnte es in Zukunft sinnvoll sein, den Einfluss der NI über mehrere zeitliche Messpunkte hinweg zu betrachten.

Bezüglich der erfolgten stereologischen Untersuchung sind zwei Punkte kritisch zu benennen. Zum einen wurde die Größe des Labyrinthvolumens in dieser Arbeit mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt und die Ergebnisse waren nicht deckungsgleich. Die Auswertung der HE-gefärbten Plazentaschnitte erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen der NI- und der SD-Gruppe, welche die Berechnung mithilfe der CD31-gefärbten Gewebeschnitte nicht bestätigte (siehe Abbildung 6). Welche von beiden Methoden die verlässlichere ist, kann nicht sicher gesagt werden. Der zweite Punkt betrifft die Bewertbarkeit des ermittelten Volumens der Dezidua. Da sie die äußere Schicht der Plazenta bildet, stellte ihre Präparation bei der initialen Probengewinnung eine mögliche Fehlerquelle dar. Es besteht die Möglichkeit, dass sie nicht in Gänze präpariert wurde und ihr Volumen somit kleiner ermittelt wurde, als es in Wahrheit vorgelegen hat.

5.2.3. Homöostase innerhalb der plazentaren Labyrinthzone

Neben den morphologischen Gesichtspunkten der Plazentaintegrität stellte sich die Frage, ob eine NI einen Einfluss sowohl auf die Trophoblasten-, sowie auf die Endothelzellhomöostase innerhalb der plazentaren Labyrinthzone nimmt. Dabei wurden drei Aspekte betrachtet: die Seneszenz, die Apoptose und die Proliferation der Zellen innerhalb des plazentaren Labyrinths (siehe Abschnitt 3.3.3). Da die Trophoblasten und Endothelzellen an denselben Gewebeschnitten und in Relation zueinander beurteilt wurden, werden die Ergebnisse im Folgenden teilweise zusammen diskutiert. In einem späteren Abschnitt (siehe Abschnitt 5.3.2) wird jedoch genauer auf die Endothelzellhomöostase eingegangen.

5.2.3.1. Seneszenz-Rate plazentarer Trophoblasten

Zur Detektion seneszenten Zellen wurde in diesem Projekt ein γ -H2AX-Assay verwendet (siehe Abschnitt 3.3.3.3). Bei Betrachtung aller γ -H2AX positiver Zellen im Vergleich zu allen Zellen innerhalb der untersuchten Gewebeschnitte zeigte sich eine erhöhte Seneszenz-Rate innerhalb der Labyrinthzone übergewichtiger Muttertiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Durch die NI konnte diese Anzahl seneszenten Zellen signifikant reduziert werden. Dieser positive Effekt der NI ließ sich insbesondere in den plazentaren Trophoblasten erkennen, wo sich die Seneszenz-Rate in der NI-Gruppe mit einer deutlichen Reduktion signifikant von der Rate innerhalb der HFD-Gruppe unterschied (siehe Abschnitt 4.3.3). Zum besseren Verständnis der Seneszenz sei eine Studie erwähnt, die sich mit dem Zusammenhang der fetalen IUGR, einer möglichen übergewichtsassoziierten Schwangerschaftskomplikation, und der Telomerase-Aktivität innerhalb humaner Plazenten beschäftigt hat. Dabei fiel in den Plazenten der Nachkommen mit der entsprechenden IUGR eine reduzierte Telomerase-Aktivität auf. Dies wiederum mündet bei einer ungebremsen Telomerverkürzung in humanen Zellen in einer Zellseneszenz^{134,135}. Dem gegenüber werden der plazentaren Seneszenz jedoch auch positive Effekte zugesprochen, da die Alterung der Plazenta über den Verlauf der Schwangerschaft hinweg einen physiologischen Prozess darstellt. Sie scheint etwa eine entscheidende Rolle beim Wachstum und der Funktion der Plazenta, sowie dem Einsetzen der Wehen zu spielen. Eine vorzeitige Seneszenz wird hingegen wie bereits erwähnt mit fetaler IUGR, aber auch mit Präeklampsie, spontanen Frühgeburten und intrauterinem Fruchttod assoziiert¹³⁶. Insgesamt ist die plazentare Seneszenz somit ein ambivalent zu betrachtendes Thema. Der alleinige Nachweis seneszenten Zellen ist daher nicht gleichzusetzen mit einem pathologischen Vorgang. Dadurch, dass in diesem Projekt jedoch zeitgleich der IUGR-Phänotyp bei den Nachkommen der HFD-Gruppe beobachtet wurde (vgl. Tabelle 16), liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die vorzeitige Zellalterung der Plazentazellen in einer Fehlversorgung der Feten resultiert haben könnte. Die NI schien dabei einen positiven Einfluss auszuüben und hat über die Reduktion der Seneszenz-Rate möglicherweise direkt zu einer verbesserten fetalen Versorgung über die Plazenta beigetragen, die wiederum dem fetalen IUGR-Phänotyp entgegenwirkte.

Dabei ist noch zu beachten, dass γ -H2AX keinen spezifischen Seneszenzmarker darstellt, sondern vielmehr ein Marker für geschädigte DNA-Regionen ist und sogar in proliferierenden Zellen erhöht sein kann^{137,138}. Somit ist die Interpretation dieses Markers teilweise irreführend und das Ergebnis wird gegebenenfalls überschätzt. Bei gleichzeitiger Verwendung eines Proliferations- oder Apoptosemarkers und einer Abwesenheit des entsprechenden Signals kann hingegen von einer vertrauenswürdigen Interpretation der ermittelten Seneszenz-Rate ausgegangen werden¹³⁹. Es könnte demzufolge in Zukunft sinnvoll sein an denselben Gewebeschnitten neben der immunhistochemischen Färbungen zur Seneszenz gleichzeitig

eine Färbung mit Proliferations- oder Apoptosemarkern durchzuführen. Positiv ist in diesem Zusammenhang zu benennen, dass in diesem Projekt zwar nicht an denselben Gewebeschnitten jedoch an entsprechenden Serienschnitten der Plazenten Färbungen mit einem Proliferationsmarker vorgenommen wurden, deren Auswertung keine signifikanten Unterschiede unter den Versuchsgruppen ergab (siehe Abschnitt 4.3.1).

5.2.3.2. Apoptoserate plazentarer Trophoblasten und Endothelzellen

Zur Detektion der apoptotischen Zellen innerhalb der Labyrinthzone wurde ein TUNEL-Assay genutzt (siehe Abschnitt 3.3.3.2). Dabei zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate sowohl der Endothelzellen als auch der Trophoblasten in der HFD- und der NI-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abschnitt 4.3.2). Die NI ab dem Zeitpunkt der Schwangerschaft konnte somit nicht zu einer Reduktion der apoptotischen Plazentazellen beitragen. Ähnlich wie die Seneszenz ist auch die Apoptose von Plazentazellen ein Geschehen, das es von mindestens zwei Blickwinkeln aus zu betrachten gilt. Zum einen stellt der Zelluntergang in der Plazenta einen physiologischen Prozess dar und ist entscheidend an der Reifung und Einnistung der Plazenta beteiligt, indem etwa die Invasion in die mütterliche Dezidua durch den Trophoblasten ermöglicht wird. Kommt es jedoch zu einer gesteigerten Apoptoserate, wird dies abermals mit Schwangerschaftskomplikationen wie der Präeklampsie oder IUGR assoziiert. Im Rahmen dieser Pathologien könnten die apoptotischen Zellen zu einem verringerten Nährstofftransport über die fetomaternale Transferzone hinweg beitragen ¹⁴⁰. Es ist bereits bekannt, dass TNF- α dabei ein wichtiger physiologischer Regulator ist und die Trophoblastenfunktion beeinflusst, indem es etwa den Apoptosevorgang induzieren kann ¹⁴¹. Schließlich ist ein erhöhter TNF- α -Spiegel während der Schwangerschaft für die Einnistung und die regelrechte Entwicklung der Plazenta von entscheidender Bedeutung. In Zusammenhang mit mütterlichem Übergewicht wurden jedoch Schwankungen des TNF- α -Spiegels beobachtet und dies wiederum könnte eine mögliche Ursache der beschriebenen übergewichtsassoziierten Schwangerschaftskomplikationen sein ³³. Diese Hypothese stützt auch eine humane Studie, in der die Plazenten von unkomplizierten Dritttrimesterschwangerschaften auf die Apoptoserate hin untersucht wurden. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Apoptoserate in den Plazentazellen von Schwangerschaften mit IUGR im Verhältnis zu den Kontroll-Dritttrimesterplazenten ¹⁴². Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieses Projektes die erhöhte Apoptoserate innerhalb des plazentaren Labyrinths bei maternalem Übergewicht am Mausmodell. Die NI ab dem Zeitpunkt der Schwangerschaft zeigte jedoch keine signifikante Reduktion der apoptotischen Zellen. Zukünftig könnte es interessant sein, neben der reinen Apoptoserate den TNF- α -Spiegel der Muttertiere mitzubestimmen.

5.2.3.3. Proliferationsrate plazentarer Trophoblasten und Endothelzellen

In einer vorangegangenen Studie am Mausmodell konnte bereits eine Reduktion proliferierender Zellen innerhalb des Labyrinths von übergewichtigen Muttertieren nachgewiesen werden ¹⁴³. Dabei wurde ein Antikörper gegen pH3 (phosphoryliertes Histon H3) genutzt, welcher Zellen in der S-Phase des Zellzyklus markierte ¹⁴⁴. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine signifikante Reduktion proliferierender Zellen sowohl an G 15.5 als auch an G 17.5 in den Plazenten übergewichtiger Muttertiere im Vergleich zu den Kontrollen ¹⁴³. In einer humanen Studie konnte ebenfalls mithilfe des Antikörpers Ki67 ein entgegengesetzter Zusammenhang zwischen der plazentaren Zottenzellproliferation und dem mütterlichen BMI festgestellt werden. Es zeigten sich demnach signifikant weniger proliferierende Zellkerne in den Plazentazotten übergewichtiger Frauen als in denen der normalgewichtigen Kontrollgruppe ¹⁴⁵. In dem vorliegenden Promotionsprojekt wurde zur Detektion proliferierender Zellen innerhalb der plazentaren Labyrinthzone ein BrdU-Assay verwendet (siehe Abschnitt 3.3.3.1). Dabei zeigten sich jedoch keine signifikanten Veränderungen zwischen den untersuchten Zellpopulationen und weder die HFD noch die NI nahmen einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferationsrate der Plazentazellen (siehe Abschnitt 4.3.1). Abschließend soll kurz darauf eingegangen werden, dass die hier diskutierten Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen teilweise divergent zu den Ergebnissen anderer bereits durchgeführter Studien waren. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass die genutzte Methode der manuellen Auszählung der gefärbten Gewebeschnitte eine subjektive Komponente trug. Diese ließ sich nicht gänzlich objektivieren, da die individuelle Auslegung der auswertenden Person bezüglich der zu zählenden Zellen in die Ergebnisse mit einfluss. Dennoch wurde durch die Tatsache, dass alle Schnittbilder von derselben Person verblindet ausgewertet wurden, für eine Minimierung der interindividuellen Verzerrung gesorgt.

5.2.4. Plazentaintegrität auf Gen- und Proteinebene

Als ein Ansatzpunkt, um weitere Aussagen über die Plazentaintegrität unter maternalem Übergewicht und den möglichen Einfluss einer NI treffen zu können, galt die geschlechtsspezifische Betrachtung von AJ-Markern auf Gen- und Proteinebene mittels molekularbiologischer Analysen (siehe Abschnitt 4.4).

Bei diesen Analysen zeigten sich auf Genebene bei keinem der verwendeten AJ-Marker relevante Unterschiede unter den drei Versuchsgruppen (siehe Abschnitt 4.4.1). Auf Proteinebene hingegen ließen sich bei drei Markern signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich feststellen (siehe Abschnitt 4.4.2). Die Ergebnisse der Genexpression und die der Proteinmenge waren also nicht kongruent zueinander. Dies lässt sich zum einen damit erklären, dass für die Bestimmung der Genexpression und der Proteinmenge unterschiedliches Untersuchungsmaterial genutzt werden musste. Die Plazentalysate für die

zwei Methoden stammten teilweise von verschiedenen Plazenten eines Muttertieres oder auch von unterschiedlichen Muttertieren. Außerdem hängt sowohl die Genexpression als auch die Proteinmenge von vielen weiteren Einflussfaktoren ab und eine Genexpression führt nicht kausal zu der entsprechenden Proteinmenge, wodurch die Inkongruenzen bedingt sein könnte ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

Im Rahmen der Untersuchung wurden die gesamten Plazenten lysiert. Somit konnte die Expression der Gene und die Menge der Proteine nicht explizit einzelnen Zonen der Plazenta zugeordnet werden. Aufgrund vorheriger Forschungsergebnisse war allerdings teilweise bekannt, in welchen Kompartimenten der Plazenta die untersuchten Marker zu erwarten waren (siehe Abschnitt 2.2.3.3 und 2.2.3.4). Dennoch könnte es in Zukunft sinnvoll sein, die gewählten Marker gezielt in der Zone des Labyrinths zu untersuchen, um explizit Rückschlüsse auf die fetomaternale Transferzone schließen zu können. Dies könnte etwa mittels einer Lasermikrodissektion erfolgen. Dieses mikroskopische Verfahren ermöglicht es, gezielt einzelne Gewebeverbände oder auch einzelne Zellen in ihrer Unversehrtheit zu isolieren und somit für spätere Analysen bereitzustellen ¹⁴⁹.

Zu der geschlechtsspezifischen Untersuchung der Genexpression und der Proteinmenge ist zu sagen, dass sie einen Vergleich mit anderen Studien, die geschlechtsunabhängig durchgeführt wurden, gegebenenfalls erschwert. Teilweise zeigten sich in der einen Geschlechtergruppe signifikante Unterschiede, die in der anderen nicht nachzuweisen waren (siehe Abschnitt 4.4.2.1 und 4.4.2.3). Möglicherweise wäre es sinnvoll, die geschlechterspezifische Untersuchung mit größeren Versuchsgruppen vorzunehmen, um eindeutige Unterschiede ermitteln zu können. Im Rahmen dieses Projekts lag die Gruppengrößen bei minimal 4 bis maximal 7 Plazenten pro Gruppe, weshalb die Aussagekraft der gesehenen Ergebnisse ggf. herabgesetzt wurde.

5.2.4.1. AJ-Marker auf Proteinebene unter einer NI

Eingangs wurde die Hypothese erläutert, dass es durch übergewichtsbedingte erhöhte proinflammatorische Zytokin-Level zu einer möglichen Destabilisierung der AJ kommen könnte, was wiederum die fetomaternale Transferzone direkt beeinflussen könnte (siehe Abschnitt 2.2.3.3). Daher galt es die Proteine, die an der Bildung der plazentaren AJ beteiligt sind, mittels spezifischer Marker genauer zu untersuchen. Dafür dienten bei den molekularbiologischen Analysen das β -Catenin und die daran bindenden Cadherine E-, P- und VE-Cadherin. Das VE-Cadherin fungierte in diesem Projekt zeitgleich als AJ- und Endothelzellmarker, weshalb im folgenden Abschnitt bereits teilweise auf die Endothelzellintegrität eingegangen wird. Genauer wird dieser Aspekt in Abschnitt 5.3.3 diskutiert.

Das E-Cadherin, welches sich nach aktuellen Forschungen der AG Appel innerhalb der murinen Plazenta ausschließlich in der Labyrinthzone detektieren ließ ⁴⁶, zeigte eine

signifikante Herunterregulation in der Gruppe der weiblichen Plazenten sowohl in der HFD- als auch der NI-Gruppe gegenüber der SD-Kontrollgruppe (siehe Abschnitt 4.4.2.1). Die NI ab dem Zeitpunkt der Schwangerschaft schien daher keinen positiven Einfluss auf die Expression des E-Cadherins nehmen zu können. In einer früheren Arbeit der AG Appel wurde in einer geschlechtsunabhängigen Analyse ebenfalls eine Reduktion des E-Cadherins in der HFD-Gruppe nachgewiesen ⁴⁶. Bei der Betrachtung der männlichen Plazenten ließen sich in dem vorliegenden Projekt jedoch keine signifikanten Unterschiede erkennen. Wodurch der geschlechtsspezifische Unterschied zu erklären ist, geht aus den Ergebnissen nicht hervor und bedarf gegebenenfalls weiterer Forschung. Die detektierte Herunterregulation bei den weiblichen Plazenten könnte zu einer Destabilisierung der AJ beitragen, da dem E-Cadherin eine stabilisierende Eigenschaft zugesprochen wird. Bedingt durch das Vorkommen in der Labyrinthzone könnte eine Herunterregulation somit in einem negativen Einfluss auf die fetomaternale Transferzone resultieren und die Nährstoffversorgung der Nachkommen nachteilig beeinflussen. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, könnte es zukünftig sinnvoll sein, parallel zu der Bestimmung der AJ-Integrität die maternofetale Clearance zu betrachten, um gezielte Rückschlüsse auf die fetale Versorgung ziehen zu können. In einem vorangegangenen Projekt der AG Appel wurde mittels ¹⁴C-Mannitol, einem nicht metabolisierbaren radioaktiven Tracer, die unidirektionale maternofetalen Clearance in vivo an Mäusen gemessen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg von ¹⁴C-Mannitol in dem fetalen Gewebe von HFD-Muttertieren. Es ist bekannt, dass das ¹⁴C-Mannitol die Plazentaschranke unabhängig von Nährstofftransportern durch passive Diffusion überwindet. Dies unterstützt die hier zuvor erläuterte Überlegung, dass die Plazenten von HFD-Muttertieren strukturell verändert sind und dadurch die passive Diffusionskapazität erhöht ist ⁴⁶. Ob diese strukturelle Veränderung wiederum auf einer gestörten AJ-Integrität, insbesondere der des E-Cadherins, beruht, kann aktuell nicht abschließend gesagt werden.

Die anfangs gestellte Hypothese, dass eine ungesunde maternale Ernährung und damit einhergehendes Übergewicht einen Einfluss auf den plazentaren β -Catenin Spiegel haben und es zu einer Herunterregulation des Proteins in Zusammenhang mit der HFD kommen könnte (siehe Abschnitt 2.2.3.3), bestätigte sich in diesem Promotionsprojekt nicht. In der Gruppe der männlichen Plazenten zeigte sich hingegen eine signifikante Hochregulation der β -Catenin Expression in der NI-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe. Auch die HFD-Gruppe zeigte einen Trend hin zur Hochregulation des Proteins. In der Gruppe der weiblichen Plazenten ließen sich demgegenüber keine signifikanten Unterschiede feststellen (siehe Abschnitt 4.4.2.3). Hält man jedoch an der Hypothese fest, dass es durch eine gestörte AJ-Integrität zu einer Fehlversorgung des Fetus kommt und daraus wiederum der hier bereits häufig erwähnte fetale IUGR-Phänotyp resultiert, bleibt zu diskutieren, wie eine Hochregulation der β -Catenin Expression zu bewerten sein könnte. Ein Ansatz zur Interpretation der gesehenen erhöhten,

aber auch unveränderten Protein-Expressionslevel besteht darin, dass in diesem Projekt lediglich die Menge der einzelnen Proteine untersucht wurde und die jeweilige Funktionalität dadurch nicht abschließend geklärt werden konnte. In einer Studie an Plazenten von Diabetes Mellitus (DM) Typ 1 positiven Müttern, wurden sowohl β -Catenin als auch VE-Cadherin hinsichtlich ihrer Funktion der Barrierebildung und der Angiogenese untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei mehr als 50 % der kleinsten Gefäße ein Verlust der Immunreaktivität der Proteine und eine Lösung aus den AJ stattfand, ohne dass es zu einem Gesamtverlust des Proteins kam. Diese Störungen wurden in der Studie dahingehend interpretiert, dass dies ursächlich für die gestörte Barriereintegrität der Plazenta sein könnte ¹⁵⁰. Es könnte daher ein wichtiger Bestandteil zukünftiger Forschungsprojekte sein, neben der Menge auch die Funktionalität der Proteine zu untersuchen. Insgesamt könnte dies auch dabei helfen, die Ergebnisse dieses Projektes besser zu verstehen und in einen klaren Zusammenhang mit den Ergebnissen der geschilderten Studien zu bringen.

Bei der Untersuchung des VE-Cadherins zeigte sich eine Hochregulation in den HFD-Gruppen beider Geschlechter gegenüber den SD-Gruppen. Die NI-Gruppen unterschieden sich hingegen nicht von den SD-Gruppen (siehe Abschnitt 4.4.2.2). Das VE-Cadherin gilt dabei als ein endothelzellspezifisches interzelluläres Adhäsionsmolekül. Es tritt unter anderem in den Synzytiotrophoblasten humaner Plazenten auf und seine Expression korreliert mit der Endothelintegrität. So konnte in humanen Plazenten von Patientinnen mit einer Schwangerschaftskomplikation, wie der Präeklampsie, eine Reduktion dieses Proteins nachgewiesen werden ¹⁵¹. Dies scheint zunächst widersprüchlich zu den Ergebnissen dieses Projektes. In einer anderen Studie zeigte sich jedoch bei der Betrachtung der späten Präeklampsie ebenfalls eine erhöhte Expression von VE-Cadherin mit simultaner Reduktion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors 2 (VEGFR2). Es wird daher spekuliert, dass die erhöhte Expression von VE-Cadherin bei spät einsetzender Präeklampsie dem VEGFR2-Mangel entgegenwirken könnte und somit versucht wird, dem stattfindenden Pathomechanismus entgegenzuwirken. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass dem VE-Cadherin die Fähigkeit zugesprochen wird, den Überlebensweg der Synzytiotrophoblasten zu verstärken, welche im Rahmen der Präeklampsie ansonsten vermehrt untergehen würden ¹⁵². Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die hier nachgewiesenen erhöhten Expressionslevel von VE-Cadherin in der HFD-Gruppe beider Geschlechter. Ob eine NI in diesem Zusammenhang einen positiven Effekt ausgeübt hat, lässt sich nicht sicher sagen. Dass es in der NI-Gruppe zu keiner erhöhten VE-Cadherin Expression kam, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Plazenten dieser Gruppe weniger geschädigt waren und der mögliche Kompensationsmechanismus nicht angeregt wurde. Um diese These weiter zu untersuchen, könnte es sinnvoll sein, in Zukunft parallel die Expression des VEGFR2 zu untersuchen.

Die Untersuchungen der P-Cadherin-Expression, welches in der plazentaren Labyrinth- und Junktionalzone lokalisiert ist ⁴⁶, zeigten keine signifikanten Veränderungen unter den drei Versuchsgruppen.

Schließlich konnte die Plazentaintegrität mithilfe der untersuchten AJ-Marker zwar genauer erforscht, dennoch nicht umfassend verstanden werden. Es wurde nicht abschließend geklärt, welche Rolle die untersuchten Gene und Proteine bei der Entstehung einer plazentaren Dysfunktion einnehmen und dieses Promotionsprojekt konnte nur einen Teil zur Klärung beitragen. Ob die NI ab dem Zeitpunkt der Schwangerschaft einen positiven Einfluss auf die untersuchten Gene und Proteine nehmen kann, bleibt aktuell ebenfalls unklar. Lediglich bei der Expression des VE-Cadherins zeigte sich eine Veränderung in der HFD-Gruppe gegenüber der SD-Gruppe, welche in der NI-Gruppe nicht mehr nachzuweisen war. Weiterführende Untersuchungen sind daher in Zukunft nötig. Ein möglicher Ansatz wäre dabei die Analyse an verschiedenen Gestationstagen. Es ist bekannt, dass die Plazenta einem stetigen Wandel unterliegt und so wäre es denkbar, dass über den Zeitverlauf der Schwangerschaft hinweg unterschiedliche Proteinmengen vorliegen und physiologisch sind. Ein weiterer Ansatz wäre die parallele Bestimmung der maternofetalen Clearance von ¹⁴C-Mannitol, um weitere Rückschlüsse über die Integrität der fetomaternalen Transferzone gewinnen zu können.

5.3. Einfluss einer NI bei maternalem Übergewicht auf die plazentaren Gefäße

Das plazentare Labyrinth stellt den Ort des Nährstoff- und Gasaustausches zwischen Mutter und Kind und somit die fetomaternale Transferzone dar. Die Beschaffenheit dieser Transferzone galt es genauer zu verstehen, um daraus wiederum Schlüsse auf die fetale Versorgung und das fetale Outcome ziehen zu können ⁸³.

5.3.1. Morphologie der fetalen Gefäße und der maternalen Blutsinuse

Ein weiterer Erklärungsansatz bezüglich der plazentaren Dysfunktion unter maternalem Übergewicht ist auf der Ebene der plazentaren Gefäße zu finden, wobei ein gestörter Blutfluss als Hauptursache für verschiedene Schwangerschaftskomplikationen wie IUGR, Präeklampsie oder auch Aborte diskutiert wird (siehe Abschnitt 2.2.3.5). Die Gefäße der plazentaren Labyrinthzone wurden daher an G 15.5 stereologisch erfasst und es wurde untersucht, ob es unter einer NI zu einer veränderten Gefäßstruktur bzw. -morphologie kam (siehe Abschnitt 4.2.2).

Die plazentare Gefäßmorphologie wurde in diesem Zusammenhang bereits in anderen Projekten genauer beleuchtet. In einer vorangegangenen Studie wurden beispielsweise mit einer HFD gefütterte Ratten untersucht. Diese zeigten neben einer geringeren neonatalen Überlebensrate einen deutlichen Anstieg der fetalen Todesfälle. Als Erklärungsansatz galt eine veränderte plazentare Gefäßentwicklung, entsprechend einer erhöhten Gefäßdichte jedoch

verminderter Gefäßreife, mit resultierender erhöhter Hypoxie in der Labyrinthzone ¹⁵³. In einer humanen Studie wurde außerdem die Angiogenese fetaler Gefäße in den Plazenten von DM Typ 1 positiven Müttern stereologisch untersucht. Dabei wurde eine vierfache Zunahme der endothelialen Proliferation beobachtet, mit einer Zunahme der kapillaren Gesamtlänge ohne Veränderung des Durchmessers. Eine mögliche Erklärung wurde in einer gestörten fetomaternalen Barriere aufgrund von Veränderungen der AJ-Proteine gesehen, wodurch wiederum ein Mechanismus stimuliert wurde, welcher die Proliferation und das Längenwachstum der fetalen Kapillaren förderte ¹⁵⁰.

Bezüglich der fetalen Gefäße der Plazenta ist bekannt, dass sie bis zum Ende der Schwangerschaft an Volumen und Länge zunehmen, um die Versorgung des Fetus zu sichern ⁸³. Eine Beeinträchtigung durch die HFD oder ein Einfluss durch die NI auf das Volumen der fetalen Gefäße wurde in diesem Projekt nicht nachgewiesen (siehe Abschnitt 4.2.2.1). Bei Betrachtung der fetalen Oberflächengröße fiel jedoch eine signifikante Reduktion innerhalb der NI-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe auf (vgl. Tabelle 18). Untersuchungen von Coan et al. haben ergeben, dass fetale Gefäße nahezu eine lineare Volumenzunahme von G 14.5 bis G 18.5 zeigten und auch das Oberflächenwachstum kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der Schwangerschaft hinweg vom ersten Messzeitpunkt der Studie an G 12.5 bis zum letzten an G 18.5 verlief ⁸³. Weshalb es bei der Fütterung übergewichtiger Muttertiere mit einer NI zu einer Oberflächenreduktion der fetalen Gefäße im Vergleich zu der Kontrollgruppe kam, das Gefäßvolumen jedoch unverändert blieb, bleibt aktuell ungeklärt.

Die Oberflächen- und Volumengröße der maternalen Blutsinuse zeigten in derselben Studie von Coan et al. in der murinen Plazenta eine deutliche Größenzunahme in der Zeitspanne von G 14.5 bis G 16.5 und damit war die maximale Größe bereits vor Ende der Schwangerschaft erreicht ⁸³. Weder die HFD noch die NI nahmen in diesem Projekt einen Einfluss auf die Entwicklung der maternalen Blutsinuse hinsichtlich ihrer Volumina und Oberflächenmaße (vgl. Tabelle 18).

Die AG Appel konnte bereits Veränderungen in der plazentaren Labyrinthzone übergewichtiger Muttertiere stereologisch nachweisen. Es fand sich eine reduzierte fetale Kapillarlänge bei den übergewichtigen Muttertieren ⁵⁵. Dabei konnte auf Grundlage der gemessenen Kapillarlänge allerdings nicht sicher unterschieden werden, ob es sich um eine geringere Verlängerung oder Verzweigung des Kapillarnetzes handelte ⁸³. Diese Reduktion der fetalen Kapillarlängen innerhalb der HFD-Gruppe bestätigte sich in diesem Projekt. Die NI konnte hinsichtlich dieses Aspektes bis zu G 15.5 keinen positiven Einfluss auf die plazentare Entwicklung nehmen, da sich in dieser Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe ebenfalls eine signifikante Reduktion der Kapillarlängen feststellen ließ (vgl. Tabelle 19). In der Studie von Coan et al. zeigte sich bezüglich der Gesamtlänge der Kapillaren eine deutliche

Größenzunahme zwischen G 16.5 und G 18.5, mit schließlich fast 154 m Gesamtlänge⁸³. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die NI im Verlauf der Schwangerschaft noch einen positiven Einfluss auf die Kapillarlängenentwicklung nehmen könnte. Bezüglich der Durchmesser fetaler Kapillaren zeigte sich in dem vorliegenden Projekt kein Einfluss durch das Füttern eine HFD oder einer NI (vgl. Tabelle 19). Dabei wurden die Werte entsprechend der Gleichung von Coan et al. aus der Oberfläche und dem Volumen bestimmt und die Annahme vertreten, dass Gefäße in Form von gleichmäßigen Zylindern vorlagen. Nach Coan et al. blieb der mittlere Kapillardurchmesser zwischen den Zeitpunkten von G 12.5 bis G 14.5 zunächst konstant bei durchschnittlich 14 μm . Von G 14.5 bis G 16.5 kam es durch den Umbau der Kapillaren allerdings zu einer Verringerung des Durchmessers mit anschließend durchschnittlich 11 μm ⁸³. Dabei decken sich die Werte ungefähr mit den hier ermittelten Ergebnissen (vgl. Tabelle 19).

In Zukunft könnte es von Interesse sein, neben den fetalen auch die maternalen Kapillardurchmesser, sowie -längen zu untersuchen. In der Literatur findet man Hinweise darauf, dass eine Signal-Fehlregulation zur Reduktion maternalen Gefäßdurchmesser beitragen kann^{57,58}. Wie eingangs erwähnt wurde zudem nachgewiesen, dass dieser Signalweg (der NOTCH-Signalweg) in Plazenten von Schwangeren gestört war, deren Feten einen IUGR-Phänotyp präsentierten⁵⁹ (siehe Abschnitt 2.2.3.5). Somit könnte auch dieser Signalweg in folgenden Projekten genauer betrachtet werden.

5.3.2. Homöostase der Endothelzellen

Um weitere Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob eine NI einen Einfluss auf die Endothelzellintegrität innerhalb der plazentaren Labyrinthzone nimmt, wurde die Zellhomöostase hin Hinblick auf die Seneszenz, die Apoptose und die Proliferation der plazentaren Labyrinthzellen untersucht (siehe Abschnitt 3.3.3). Diesbezüglich wurde die Homöostase der Trophoblasten und teilweise auch der Endothelzellen bereits in Abschnitt 5.2.3 genauer erläutert, weshalb hier lediglich kurz auf die Effekte einer NI auf Ebene der Endothelzellenintegrität eingegangen werden soll.

Wie in der Einleitung dieses Projektes erwähnt, zeigte sich in einer vorausgegangenen Studie am Mausmodell in der plazentaren Labyrinthzone übergewichtiger Muttertiere eine erhöhte Seneszenz-Rate von Endothelzellen im Vergleich zu der normalgewichtigen Kontrollgruppe⁵⁵ (siehe Abschnitt 2.2.3.4). Auch in diesem Projekt ließ sich eine erhöhte Seneszenz-Rate innerhalb der plazentaren Labyrinthzone übergewichtiger Muttertiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe nachweisen, welche zudem durch die NI signifikant reduziert wurde. Bei alleiniger Betrachtung der seneszenten Endothelzellen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen (siehe Abschnitt 4.3.3).

Hinsichtlich der Apoptoserate zeigte sich ein Anstieg in der HFD- und in der NI-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl in der Population der Endothelzellen als auch in der

Population der Trophoblasten, ohne dass die NI einen positiven Einfluss darauf ausüben konnte (siehe Abschnitt 4.3.2).

Bezogen auf die Zellproliferationsrate zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den untersuchten Zellpopulationen und unter den Versuchsgruppen.

Für die genauere Einordnung und Diskussion dieser Ergebnisse siehe Abschnitt 5.2.3.

5.3.3. Endothelzellintegrität auf Gen- und Proteinebene

Um zu erforschen, ob zugrundeliegende Pathologien der beschriebenen übergewichtsassoziierten Schwangerschaftskomplikationen (siehe Abschnitt 2.1.2) auf Gen- und Proteinebene zu finden sind, wurden in diesem Projekt sowohl Marker für die AJ als auch für die Endothelzellintegrität der Plazenta geschlechtsspezifisch untersucht. Als Endothelzellmarker fungierten dabei auf Proteinebene das VE-Cadherin und der Marker CD31, sowie auf Genebene zusätzlich der vWF (siehe Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3). Die zu diskutierenden Aspekte der genutzten molekularbiologischen Methoden sowie die Ergebnisse des Markers VE-Cadherin, der sowohl als AJ- als auch als Endothelzellmarker diente, wurden in Abschnitt 5.2.4 genauer erläutert.

Auf Genebene zeigten sich weder bei dem Marker CD31 noch bei dem vWF relevante Unterschiede unter den drei Versuchsgruppen (siehe Abschnitt 4.4.1) und auch die Auswertung des Endothelzellmarkers CD31 auf Proteinebene blieb ohne wegweisende Resultate (siehe Abschnitt 4.4.2). Im Gegensatz zu einer nachgewiesenen Herunterregulation der beiden Marker bezüglich ihrer Genexpression in einer vorangegangenen Studie der AG Appel bei übergewichtigen Muttertieren ⁵⁵, zeigten sich in diesem Projekte keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich. Möglicherweise wäre es daher in der Zukunft sinnvoll, diese Untersuchungen mit einer größeren Gruppengröße zu wiederholen und die geschlechterspezifische Auftrennung der Gruppen zunächst außen vorzulassen, wie in dem hier genannten Projekt der AG Appel erfolgt.

5.4. Effekt der NI bei maternalem Übergewicht im Rahmen dieses Projektes

Wie eingangs erwähnt sind die aktuell diskutierten Erklärungsansätze und zugrundeliegenden Zusammenhänge zwischen mütterlichem Übergewicht und Schwangerschaftskomplikationen, wie beispielsweise Gestationsdiabetes oder Präeklampsie sowie auf fetaler Seite IUGR aber auch Makrosomie bis hin zu einer gesteigerten Frühgeburtlichkeitsrate und vermehrten Aborten, vielfältig. Ursächlich scheint unter anderem ein übergewichtsassoziiertes Inflammationsprozess zu sein, mit daraus resultierenden morphologischen Veränderungen der Plazenta. Zudem werden vaskuläre Veränderungen angeführt, mit dem Nachweis einer gestörten plazentaren Endothelzellhomöostase. Schließlich können diese Pathologien in einer beeinträchtigen fetalen Versorgung resultieren (siehe Abschnitt 2).

In dem vorliegenden Projekt erfolgte in diesem Zusammenhang die isolierte Betrachtung einer NI bei maternalem Übergewicht ab dem Zeitpunkt der Schwangerschaft am Mausmodell. Es galt die möglichen Effekte der gesunden Ernährung bei maternalem Übergewicht für das ungeborene Kind, die Mutter und auf plazentarer Ebene zu verstehen sowie die zugrundeliegenden Pathomechanismen weiterzuerforschen (siehe Abschnitt 2.4).

Es zeigte sich, dass die NI einen positiven Effekt auf die fetale Gewichtsentwicklung ausübte, indem sie dem IUGR-Phänotyp, der bei maternalem Übergewicht beobachtet wurde, entgegenwirkte. Auch bei den Muttertieren fiel unter der NI eine geringere Gewichtszunahme über den Zeitraum der Schwangerschaft hinweg auf, bei zeitgleicher Reduktion des maternalen epigonadalen weißen Fettgewebes (siehe Abschnitt 4.1).

Um eine mögliche Ursache für das verbesserte fetale Outcome durch die NI auf Ebene der Plazentamorphologie zu finden, wurde zunächst die Plazentaeffizienz betrachtet. Diese war jedoch in der NI-Gruppe gegenüber der HFD-Gruppe signifikant reduziert. Da die NI dem fetalen IUGR-Phänotyp trotz der herabgesetzten Plazentaeffizienz entgegenwirken konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die NI diese reduzierte Effizienz unter anderem durch ein erhöhtes plazentares Organwachstum ausgleichen könnte. Übereinstimmend mit dieser Hypothese waren die Plazenten der NI-Gruppe durchschnittlich am schwersten und die der HFD-Gruppe zeigten demgegenüber das leichteste Gewicht. Neben der Betrachtung des plazentaren Gewichts erfolgte zusätzlich die des plazentaren Volumens. Dabei zeigte sich allerdings eine Erhöhung des Plazentavolumens sowohl durch die HFD als auch durch die NI im Vergleich zur SD. Dieses erhöhte Volumen spiegelte sich in den absoluten Volumenwerten der Plazentazonen, bestehend aus Labyrinth, Junktionalzone und Dezidua, wider, nicht hingegen in den relativen Werten, bei denen das Volumen der einzelnen Zonen jeweils auf das Volumen der gesamten Plazenta bezogen wurde. Widersprüchliche Ergebnisse zeigten sich außerdem bei der Bestimmung des Labyrinthvolumens. Insgesamt erwies sich die gleichzeitige Bewertbarkeit des plazentaren Gewichts und des Volumens somit als schwierig (siehe Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2).

Ergänzend galt es, den Einfluss einer NI auf die Zellhomöostase der fetomaternalen Transferzone, der plazentaren Labyrinthzone, besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang wurde die Homöostase der Trophoblasten und auch der Endothelzellen in der Zone des Labyrinths mittels immunhistochemischer Färbungen genauer untersucht. Dabei zeigte sich eine Herunterregulation der plazentaren Seneszenz durch die NI, vor allem in der Zellpopulation der Trophoblasten. Dies wiederum könnte über eine verbesserte Zellhomöostase im Labyrinth eine wichtige Ursache für das verbesserte fetale Outcome unter einer NI sein. Bezogen auf die Apoptoserate der plazentaren Trophoblasten, welche sich vermehrt in der HFD- und NI-Gruppe nachweisen ließ, nahm die NI somit keinen positiven

Einfluss und hinsichtlich der Proliferations-Rate zeigten sich keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen (siehe Abschnitt 5.2.3).

Ein nächster Ansatzpunkt, um die Effekte einer NI bei maternalem Übergewicht zu erforschen, lag in der geschlechtsspezifischen Untersuchung der Plazentaintegrität mithilfe plazentarer AJ- und auch Endothelzellmarker auf Gen- und Proteinebene. Dabei waren die Ergebnisse der Genexpression und die der entsprechenden Proteinmenge nicht kongruent zueinander. Die Untersuchung der Genexpression blieb zudem ohne wegweisende Erkenntnisse. Hinsichtlich der plazentaren Proteinmengen konnte jedoch ein möglicher positiver Effekt der NI bezogen auf das VE-Cadherin gezeigt werden. Die Untersuchung dieses Adhäsionsmoleküls, das sowohl als AJ- als auch Endothelzellmarker fungiert, zeigte eine Hochregulation der Proteinmenge in der HFD-Gruppe beider Geschlechter. Die Gruppe der NI unterschied sich demgegenüber weder von der SD- noch der HFD-Gruppe signifikant. Es könnte also sein, dass die NI über den Zeitraum der Schwangerschaft bereits einen milden Effekt auf die Menge des Proteins ausgeübt hat. Bezogen auf das β -Catenin, das als Bestandteil der AJ für die direkte Verbindung zum Zytoskelett sorgt, zeigte sich eine Hochregulation des Proteinspiegels durch die NI bei den männlichen Plazenten, sowie ein entsprechender Trend durch die HFD. Auf die Expression des E-Cadherins konnte die NI keinen positiven Einfluss nehmen. Stattdessen wurde eine Herunterregulation bei den weiblichen Plazenten sowohl in der HFD- als auch in der NI-Gruppe detektiert, was wiederum zu einer Destabilisierung der AJ beitragen könnte. Dabei ist zu beachten, dass ausschließlich die Menge der Proteine und nicht ihre jeweilige Funktionalität im Rahmen dieses Projektes ermittelt wurde. Auch ihre jeweilige Lokalisation in der Plazenta wurde nicht genauer erfasst (siehe Abschnitt 5.2.4).

Abschließend sollte die Frage geklärt werden, ob die NI zu einer Veränderung der Gefäßstruktur und -morphologie innerhalb der plazentaren Labyrinthzone beitragen kann. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der fetalen Gefäßoberfläche und Kapillarlänge unter den Versuchsgruppen. Erstere wurde durch die NI im Vergleich zur SD reduziert, zweitere sowohl durch die NI als auch die HFD im Vergleich zur SD. Weshalb es bei der Fütterung übergewichtiger Muttertiere mit einer NI zu einer Oberflächenreduktion der fetalen Gefäße im Vergleich zu der Kontrollgruppe kam, das Gefäßvolumen jedoch unverändert blieb, bleibt dabei aktuell ungeklärt. Einen positiven Effekt der NI auf die plazentare Gefäßstruktur an G 15.5 konnte somit nicht nachgewiesen werden. Zukünftig könnte es daher sinnvoll sein, die betrachteten Aspekte über mehrere Zeitpunkte hinweg zu untersuchen. Hinsichtlich der mittels immunhistochemischer Färbung ermittelten Apoptoserate der plazentaren Endothelzellen in der Labyrinthzone zeigte sich ein Anstieg in der HFD- und in der NI-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Betrachtung der Endothelzellintegrität

auf Gen- und Proteinebene mittels der Marker CD31 und vWF ergab keine relevanten Unterschiede unter den drei Versuchsgruppen (siehe Abschnitt 5.3).

5.5. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane Schwangerschaft

Der positive Effekt einer gesunden Ernährung während der Schwangerschaft wurde bereits vielseitig untersucht und belegt. Beispielsweise wird eine gesunde Ernährung mit der Reduktion von fetaler Frühgeburtlichkeit und SGA assoziiert. Auf der anderen Seite wird eine ungesunde Ernährung mit erhöhten Frühgeburtsraten und einem niedrigeren fetalen Geburtsgewicht oder auch fetaler Makrosomie in Verbindung gebracht ^{64,154}.

5.5.1. Verständnis einer gesunden Ernährung

Es gilt zunächst zu klären, was als gesunde bzw. als ungesunde Ernährung verstanden wird. In diesem Projekt wurde den Mäusen eine SD verfüttert, die aufgrund ihrer Zusammensetzung die gesunde Ernährung repräsentierte. Die ungesunde Ernährung bildete die HFD, welche im Verhältnis zu der SD einen höheren Anteil ungesättigter und gesättigter Fettsäuren besaß und kalorienreicher sowie protein- und kohlenhydratärmer war (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Ernährungsgewohnheiten der Menschen sind jedoch vielzählig und es gibt verschiedene Ansichten und auch Möglichkeiten der gesunden Ernährung. Als gesund werden etwa Lebensmittel wie Gemüse, Obst, Hülsenfrüchte und Vollkornprodukten eingestuft und ihnen wird eine antioxidative und entzündungshemmende Wirkung zugesprochen ^{66,70}. Die ungesunde Ernährung bilden Produkte, die reich an gesättigten Fettsäuren sind und einen hohen Zuckeranteil haben. Sie werden mit Entzündungsprozessen und im Rahmen der Schwangerschaft entsprechend mit Frühgeburtlichkeit assoziiert ⁶⁷⁻⁶⁹. Eine Studie, die sich mit einer kalorienreduzierten Diät bei übergewichtigen Erwachsenen befasst hat, zeigte, dass es bei den Probandinnen zu einer klinisch bedeutsamen Gewichtsabnahme kam, unabhängig davon, welche Makronährstoffe entsprechend Proteine, Fette oder Kohlenhydrate im Vordergrund der Diät standen ¹⁵⁵. Die verwendeten Nahrungen in diesem Projekt lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzungen und Kalorienzahlen demnach auf die Ernährung in einem humanen Setting übertragen.

5.5.2. Transfer von Ergebnissen an murinen Plazenten auf humane Plazenten

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, stellt das Mausmodell ein gut erforschtes Säugetier Modell dar, von dem aus gewonnene Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können ¹⁴. In Bezug auf dieses Projekt sei jedoch angemerkt, dass die unterschiedliche Schwangerschaftsdauer von knapp drei Wochen bei der Maus ¹⁹ gegenüber ca. 38 Wochen beim Menschen ¹⁵⁶ die Vergleichbarkeit gegebenenfalls erschwert. Zwar können die Ergebnisse schneller in dem murinen Modell gewonnen werden, doch die Zeit, in der die Intervention wirken kann, ist dementsprechend verkürzt. Dem entgegensetzen ist das

Argument, dass die gewünschte Intervention beim Mausmodell direkt mit Beginn der Schwangerschaft umgesetzt werden kann. Beim Menschen wird eine solche Intervention meist erst am Ende des ersten Trimenon begonnen, was ggf. zu einer verhältnismäßig zu kurzen Wirkdauer der Intervention führen könnte. Dabei wird aktuell diskutiert, dass die mütterliche Stoffwechsellage vor der Geburt und in der frühen Schwangerschaft die spätere Funktion der Plazenta und ihre Genexpression bereits programmiert ¹⁵⁴.

Einen weiteren wichtigen Aspekt bei der Übertragung der Ergebnisse bildet die Plazentamorphologie. Hinsichtlich ihrer Form sind sowohl die murine als auch die humane Plazenta ein annähernd scheibenförmiges Organ, was den Transfer der Resultate vor allem im Bereich der stereologischen Ergebnisse ermöglicht ¹⁸. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Struktur des murinen Labyrinths in der menschlichen Plazenta durch eine Zottenstruktur gebildet wird ^{13,14}. In beiden Spezies ist dies der Bereich der fetomaternalen Transferzone, deren Untersuchung einen wichtigen Aspekt dieser Arbeit ausmachte. Trotz des unterschiedlichen Aufbaus dieser Transferzone ist ein Vergleich zwischen Maus und Mensch gut möglich, da die entscheidenden Zelltypen dieses Bereichs, wie Endothelzellen und Trophoblasten, bei beiden Spezies die gleichen sind ^{14,15,23}.

5.5.3. Bewertung einer NI im klinischen Alltag

In humanen Studien wird häufig die Kombination verschiedener Lifestyle-Interventionen gleichzeitig untersucht. Daher sind gezielte Aussagen über den Effekt einer einzelnen Intervention schwierig ⁶⁰. Das Mausmodell bietet eine gute Möglichkeit, Fragestellungen isoliert voneinander zu betrachten, wie in diesem Fall die NI, während andere Projekte der AG Appel beispielsweise auf eine Sport- bzw. Medikamentenintervention eingingen. Es stellt sich im nächsten Schritt jedoch die Frage, wie eine Umstellung der Ernährungsgewohnheiten von den schwangeren Frauen umgesetzt und im Alltag toleriert werden würde. Eine Studie, die sich mit einer Lifestyle-Intervention bestehend aus einer Ernährungsumstellung, körperlicher Aktivität und Beratungsgesprächen bei übergewichtigen Frauen vor der Schwangerschaft befasste, zeigte eine erhöhte Abbruchrate von Probandinnen, die sich in einer Interventionsgruppe befanden ⁷². Dieses Problem ergibt sich im Mausmodell aufgrund der besseren Kontrollierbarkeit nicht, muss bei dem Transfer der gewonnenen Ergebnisse in die Klinik aber berücksichtigt werden. Eine andere Studie konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine Ernährungsumstellung besser toleriert und umgesetzt wurde als eine erhöhte körperliche Aktivität ⁵. Insgesamt ist zu berücksichtigen, dass die Compliance der Probandinnen sowie eine präzise Definition der gesunden Ernährung entscheidend sind, wenn es um die Umsetzung in einem humanen Setting geht ⁴.

Wie bereits erwähnt, beschäftigte sich die AG Appel parallel mit zwei anderen Interventionen bei übergewichtigen Muttertieren, einer Sport- und einer medikamentösen (Metformin-) Intervention. In Zukunft könnte es interessant sein, die Kombination der drei Interventionen

gemeinsam am Mausmodell zu betrachten, da auch die Lifestyle-Interventionen in humanen Studien häufig in Kombination stattfinden. Ob sich die Effekte auf plazentarer Ebene dadurch ggf. sogar potenzieren, bleibt abzuwarten. Zudem könnte der Einfluss einer NI während der Schwangerschaft auch auf andere Organsysteme hin getestet werden. Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, kommt es durch eine NI zu einer Reduktion des epigonadalen Fettgewebes. Dies könnte wiederum eine entscheidende Rolle in der Vermittlung inflammatorischer Prozesse spielen, denen eine wichtige Aufgabe bei den übergewichtsassoziierten Schwangerschaftskomplikationen zugeschrieben wird (siehe Abschnitt 2.2.3.2). Die AG Appel konnte beispielsweise bereits zeigen, dass das proinflammatorische Zytokin IL-6 im Serum übergewichtiger schwangerer Mäuse erhöht war. Der Ursprung dafür sei am ehesten in dem epigonadalen weißen Fettgewebe zu finden⁵⁵. Außerdem gilt die Hormonsynthese durch die Synzytiotrophoblasten als eine wichtige Funktion der Plazenta^{13,16,17}. Es könnte lohnend sein, den möglichen Einfluss einer NI in diesem Zusammenhang genauer zu untersuchen. Schließlich ist eine weitere Stellschraube der Zeitpunkt des Interventionsbeginns. Es scheint entscheidend, dass der Beginn der Intervention vor bzw. parallel zur Plazentaentwicklung stattfindet, um negative irreversible metabolische Auswirkungen zu verhindern^{4,154}. Daher könnte in Zukunft ein weiterer Fokus darauf liegen, verschiedene Startpunkte der Intervention untereinander zu vergleichen.

Als ein kleiner Ausblick in die Klinik sei folgender Aspekt hier nur kurz erwähnt: In humanen Studien wurde eine Vielzahl an Einflussfaktoren ermittelt, die mit Übergewicht bei Schwangeren im gebärfähigen Alter in Verbindung stehen. Hier werden daher nur ein paar Beispiele genannt, wie ein steigendes Alter der Mütter oder ein niedriger sozioökonomischer Status². Das Mausmodell bietet den Vorteil, diese Einflussfaktoren zunächst unberücksichtigt zu lassen. Doch um die Ergebnisse im Anschluss in der Praxis nutzen zu können, ist es entscheidend, diese Faktoren wieder einzubeziehen. Ein Ansatz findet sich dafür in der Schwangerschaftsvorsorge. Dieser Rahmen bietet die Möglichkeit, die werdenden Mütter aktiv zu betreuen und aufzuklären, etwa zu dem Thema der gesunden Ernährung^{60,73}. Eine zusätzliche Strategie wird in der Konfrontation der werdenden Mütter mit den übergewichtsbedingten Risikofaktoren gesehen, um dadurch eventuell die Motivation zur Umsetzung einer Lifestyle-Intervention zu erhöhen⁵. Dabei kommt unter anderem diese Arbeit ins Spiel, die durch neue Erkenntnisse zu einer besseren Aufklärung beitragen kann. Insgesamt scheint die Schwangerschaft ein Zeitpunkt zu sein, in dem Frauen im gebärfähigen Alter durchschnittlich so gut ärztlich angebunden sind wie zu keinem anderen bisherigen Zeitpunkt im Erwachsenenalter, da engmaschige ärztliche Kontrollen und Gespräche über den gesamten Zeitraum der Schwangerschaft hinweg stattfinden¹⁵⁷. Diese Tatsache wurde bereits von einigen erkannt und sollte weiter genutzt werden, um das Bewusstsein bezüglich der eigenen Gesundheit und der des Kindes zu stärken. Von der kanadischen Taskforce wurde

beispielsweise eine Empfehlung für das gezielte Management von übergewichtigen Schwangeren herausgegeben, um die Gesundheitsvorsorge zu verbessern ¹⁵⁸. Eine risikoarme NI für Mutter und Kind könnte in diesem Setting eine ideale Option darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Helmert U, Strube H. Die Entwicklung der Adipositas in Deutschland im Zeitraum von 1985 bis 2002. *Das Gesundheitswesen* 2004; **66**(07): 409-15.
2. Mensink GB, Schienkiewitz A, Haftenberger M, Lampert T, Ziese T, Scheidt-Nave C. Übergewicht und adipositas in deutschland. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 2013; **56**(5-6): 786-94.
3. Schienkiewitz A, Mensink G, Kuhnert R, Lange C. Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung; 2017.
4. Stubert J, Reister F, Hartmann S, Janni W. Risiken bei Adipositas in der Schwangerschaft. *Dtsch Arztebl Int* 2018; **115**(16): 276-83.
5. Schäfer-Graf U. Adipositas und Schwangerschaft. *Der Diabetologe* 2016; **12**(1): 6-12.
6. Kidron D, Bernheim J, Aviram R. Placental findings contributing to fetal death, a study of 120 stillbirths between 23 and 40 weeks gestation. *Placenta* 2009; **30**(8): 700-4.
7. Amir H, Weintraub A, Aricha-Tamir B, Apel-Sarid L, Holcberg G, Sheiner E. A piece in the puzzle of intrauterine fetal death: pathological findings in placentas from term and preterm intrauterine fetal death pregnancies. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine* 2009; **22**(9): 759-64.
8. Roberts DJ, Post MD. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Journal of clinical pathology* 2008; **61**(12): 1254-60.
9. Salafia CM, Vogel CA, Bantham KF, Vintzileos AM, Pezzullo J, Silberman L. Preterm delivery: correlations of fetal growth and placental pathology. *American journal of perinatology* 1992; **9**(03): 190-3.
10. Maltepe E, Fisher SJ. Placenta: the forgotten organ. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2015; **31**: 523-52.
11. Huppertz B, Schleußner E. Die Plazenta: Grundlagen und klinische Bedeutung. 1 ed: Springer Berlin, Heidelberg; 2018.
12. Kaufmann P. Plazenta. Anatomie: Springer; 2010: 577-86.
13. Lüllmann-Rauch R. Histologie. 4 ed: Thieme; 2012.
14. Georgiades P, Ferguson-Smith A, Burton G. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002; **23**(1): 3-19.
15. Woods L, Perez-Garcia V, Hemberger M. Regulation of placental development and its impact on fetal growth—new insights from mouse models. *Frontiers in endocrinology* 2018; **9**: 570.
16. Schleußner E. Endokrinologie der Plazenta. Die Plazenta: Springer; 2018: 89-102.
17. Behre HMB, M.; Hadji, P.; Karck, U.; Keck, Ch.; Neulen, J.; Schuth, W.; Stickeler, E. Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie. 2 ed: Thieme; 2002.

18. Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *Journal of toxicologic pathology* 2014; **27**(1): 11-8.
19. Malassiné A, Frenzo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human reproduction update* 2003; **9**(6): 531-9.
20. Müntener M, Hsu Y-C. Development of trophoblast and placenta of the mouse. *Cells Tissues Organs* 1977; **98**(3): 241-52.
21. Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *The Journal of Clinical Investigation* 2010; **120**(4): 1016-25.
22. Kirby D, Bradbury S. The hemo-chorial mouse placenta. *The Anatomical Record* 1965; **152**(3): 279-81.
23. Enders AC. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. *American Journal of Anatomy* 1965; **116**(1): 29-67.
24. Cross J. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice—a review. *Placenta* 2005; **26**: S3-S9.
25. Ain R, Canham LN, Soares MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Developmental biology* 2003; **260**(1): 176-90.
26. Soares MJ. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004; **2**(1): 1-15.
27. Gaudet L, Ferraro ZM, Wen SW, Walker M. Maternal obesity and occurrence of fetal macrosomia: a systematic review and meta-analysis. *BioMed research international* 2014; **2014**.
28. Sanches APV, de Oliveira JL, Ferreira MS, et al. Obesity phenotype induced by high-fat diet leads to maternal-fetal constraint, placental inefficiency, and fetal growth restriction in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2022; **104**: 108977.
29. Liang C, DeCourcy K, Prater MR. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism* 2010; **59**(7): 943-50.
30. Liang C, Oest ME, Jones JC, Prater MR. Gestational high saturated fat diet alters C57BL/6 mouse perinatal skeletal formation. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 2009; **86**(5): 362-9.
31. Prasad K, Daume E, Preuett B, et al. Glucagon is required for early insulin-positive differentiation in the developing mouse pancreas. *Diabetes* 2002; **51**(11): 3229-36.
32. Appel S, Grothe J, Storck S, et al. A Potential Role for GSK3 β in Glucose-Driven Intrauterine Catch-Up Growth in Maternal Obesity. *Endocrinology* 2019; **160**(2): 377-86.

33. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction (Cambridge, England)* 2017; **153**(3): R97.
34. Christians JK, Lennie KI, Wild LK, Garcha R. Effects of high-fat diets on fetal growth in rodents: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 2019; **17**(1): 39.
35. Radulescu L, Munteanu O, Popa F, Cirstoiu M. The implications and consequences of maternal obesity on fetal intrauterine growth restriction. *J Med Life* 2013; **6**(3): 292-8.
36. Longtine MS, Nelson DM. Placental dysfunction and fetal programming: the importance of placental size, shape, histopathology, and molecular composition. *Seminars in reproductive medicine*; 2011: Thieme Medical Publishers; 2011. p. 187-96.
37. Maloyan A. Obesity and placental function. *Semin Reprod Med* 2016; **34**: 42-9.
38. Schneider H. Placental dysfunction as a key element in the pathogenesis of preeclampsia. *Dev Period Med* 2017; **21**(4): 309-16.
39. Hu D, Cross JC. Ablation of Tpbpa-positive trophoblast precursors leads to defects in maternal spiral artery remodeling in the mouse placenta. *Developmental biology* 2011; **358**(1): 231-9.
40. Hasan MZ, Ikawati M, Tocharus J, Kawaichi M, Oka C. Abnormal development of placenta in HtrA1-deficient mice. *Developmental biology* 2015; **397**(1): 89-102.
41. Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace AM, Greer IA, Sattar N. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; **87**(9): 4231-7.
42. Challier J, Basu S, Bintein T, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* 2008; **29**(3): 274-81.
43. Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta* 2006; **27**(8): 794-8.
44. Stewart FM, Freeman DJ, Ramsay JE, Greer IA, Caslake M, Ferrell WR. Longitudinal assessment of maternal endothelial function and markers of inflammation and placental function throughout pregnancy in lean and obese mothers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; **92**(3): 969-75.
45. Nagafuchi A. Molecular architecture of adherens junctions. *Current opinion in cell biology* 2001; **13**(5): 600-3.
46. Kretschmer T, Turnwald E-M, Janoschek R, et al. Maternal high fat diet-induced obesity affects trophoblast differentiation and placental function in mice. *Biology of reproduction* 2020; **103**(6): 1260-74.
47. Näthke IS, Hinck L, Swedlow JR, Papkoff J, Nelson WJ. Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *The Journal of cell biology* 1994; **125**(6): 1341-52.

48. Kümper S, Ridley AJ. p120ctn and P-cadherin but not E-cadherin regulate cell motility and invasion of DU145 prostate cancer cells. *PLoS one* 2010; **5**(7): e11801.
49. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Developmental cell* 2013; **26**(5): 441-54.
50. Lo C-W, Chen M-W, Hsiao M, et al. IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer. *Cancer research* 2011; **71**(2): 424-34.
51. Wylezinski LS, Hawiger J. Interleukin 2 activates brain microvascular endothelial cells resulting in destabilization of adherens junctions. *Journal of Biological Chemistry* 2016; **291**(44): 22913-23.
52. Hardyman MA, Wilkinson E, Martin E, et al. TNF- α -mediated bronchial barrier disruption and regulation by src-family kinase activation. *Journal of allergy and clinical immunology* 2013; **132**(3): 665-75. e8.
53. Miettinen M, Lindenmayer AE, Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H-and Y-antigens--evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 1994; **7**(1): 82-90.
54. Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Developmental cell* 2005; **8**(3): 377-87.
55. Kretschmer T, Schulze-Edinghausen M, Turnwald E-M, et al. Effect of maternal obesity in mice on IL-6 levels and placental endothelial cell homeostasis. *Nutrients* 2020; **12**(2): 296.
56. Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyse L, Romero R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *American journal of obstetrics and gynecology* 2011; **204**(3): 193-201.
57. Hamada Y, Hiroe T, Suzuki Y, et al. Notch2 is required for formation of the placental circulatory system, but not for cell-type specification in the developing mouse placenta. *Differentiation* 2007; **75**(3): 268-78.
58. Hunkapiller NM, Gasperowicz M, Kapidzic M, et al. A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Development* 2011; **138**(14): 2987-98.
59. Sahin Z, Acar N, Ozbey O, Ustunel I, Demir R. Distribution of Notch family proteins in intrauterine growth restriction and hypertension complicated human term placentas. *Acta histochemica* 2011; **113**(3): 270-6.
60. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG); Österreichische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (OEGGG); Schweizerische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (SGGG). S3-Leitlinie Adipositas und Schwangerschaft.

- 2019.https://register.awmf.org/assets/guidelines/015-081I_S3_Adipositas-Schwangerschaft_2020_06.pdf (Zuletzt abgerufen am 03.06.2024).
61. Legro RS, Dodson WC, Kris-Etherton PM, et al. Randomized controlled trial of preconception interventions in infertile women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2015; **100**(11): 4048-58.
 62. Janoschek R, Bae-Gartz I, Vohlen C, et al. Dietary intervention in obese dams protects male offspring from WAT induction of TRPV4, adiposity, and hyperinsulinemia. *Obesity (Silver Spring)* 2016; **24**(6): 1266-73.
 63. Salati JA, Roberts VHJ, Schabel MC, et al. Maternal high-fat diet reversal improves placental hemodynamics in a nonhuman primate model of diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 2019; **43**(4): 906-16.
 64. Chia AR, Chen LW, Lai JS, et al. Maternal Dietary Patterns and Birth Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr* 2019; **10**(4): 685-95.
 65. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *The lancet* 2008; **371**(9606): 75-84.
 66. Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J. Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. *The Journal of nutrition* 2003; **133**(5): 1668S-73S.
 67. Ley SH, Sun Q, Willett WC, et al. Associations between red meat intake and biomarkers of inflammation and glucose metabolism in women. *The American journal of clinical nutrition* 2014; **99**(2): 352-60.
 68. Santos S, Oliveira A, Lopes C. Systematic review of saturated fatty acids on inflammation and circulating levels of adipokines. *Nutrition research* 2013; **33**(9): 687-95.
 69. Englund-Ögge L, Brantsæter AL, Haugen M, et al. Association between intake of artificially sweetened and sugar-sweetened beverages and preterm delivery: a large prospective cohort study. *The American journal of clinical nutrition* 2012; **96**(3): 552-9.
 70. Casanueva E, Ripoll C, Tolentino M, et al. Vitamin C supplementation to prevent premature rupture of the chorioamniotic membranes: a randomized trial. *The American journal of clinical nutrition* 2005; **81**(4): 859-63.
 71. Sim K, Dezarnaulds G, Denyer G, Skilton M, Caterson I. Weight loss improves reproductive outcomes in obese women undergoing fertility treatment: a randomized controlled trial. *Clinical obesity* 2014; **4**(2): 61-8.
 72. Mutsaerts MA, Van Oers AM, Groen H, et al. Randomized trial of a lifestyle program in obese infertile women. *N Engl J Med* 2016; **374**: 1942-53.
 73. Kirschner W. Ernährung als Thema in der Schwangerenvorsorge. *Der Gynäkologe* 2013; **46**(5): 313-9.

74. Kapadia MZ, Park CK, Beyene J, Giglia L, Maxwell C, McDonald SD. Weight loss instead of weight gain within the guidelines in obese women during pregnancy: a systematic review and meta-analyses of maternal and infant outcomes. *PloS one* 2015; **10**(7): e0132650.
75. Rasmussen KM, Abrams B, Bodnar LM, Butte NF, Catalano PM, Siega-Riz AM. Recommendations for weight gain during pregnancy in the context of the obesity epidemic. *Obstetrics and gynecology* 2010; **116**(5): 1191.
76. Guelinckx I, Devlieger R, Beckers K, Vansant G. Maternal obesity: pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition. *Obesity reviews* 2008; **9**(2): 140-50.
77. Schmitz K, Turnwald E-M, Kretschmer T, et al. Metformin Prevents Key Mechanisms of Obesity-Related Complications in Visceral White Adipose Tissue of Obese Pregnant Mice. *Nutrients* 2022; **14**(11): 2288.
78. Mouton PR. History of modern stereology. *IBRO History Neurosci* 2005.
79. Howard V, Reed M. Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy: Garland Science; 2004.
80. Mayhew T. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Experimental Physiology: Translation and Integration* 1991; **76**(5): 639-65.
81. Baddeley A, Jensen EBV. Stereology for statisticians: Chapman and Hall/CRC; 2004.
82. Boyce RW, Dorph-Petersen K-A, Lyck L, Gundersen HJG. Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicologic pathology* 2010; **38**(7): 1011-25.
83. Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biology of reproduction* 2004; **70**(6): 1806-13.
84. Schrödel A. Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E). *Biologie in unserer Zeit* 2012; **42**(3): 153-.
85. Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992; **31**(12): 3103-12.
86. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc*; 2011; 2011. p. 4.
87. Raza A, Spiridonidis C, Ucar K, Mayers G, Bankert R, Preisler HD. Double labeling of S-phase murine cells with bromodeoxyuridine and a second DNA-specific probe. *Cancer research* 1985; **45**(5): 2283-7.
88. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in hematology*; 2001: Elsevier; 2001. p. 179-93.

89. Ruthmann A, Hauser M. Zellzyklus. *Praktikum der Cytologie*: Springer; 1979: 85-104.
90. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**(4): 239-57.
91. Lee JM, Park JH, Kim BY, Kim I-H. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay to characterize histopathologic changes following thermal injury. *Annals of dermatology* 2018; **30**(1): 41-6.
92. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of cell Biology* 1992; **119**(3): 493-501.
93. Jeyapalan JC, Sedivy JM. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**(7-8): 467-74.
94. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 1961; **25**(3): 585-621.
95. Pignolo RJ, Martin BG, Horton JH, Kalbach AN, Cristofalo VJ. The pathway of cell senescence: WI-38 cells arrest in late G1 and are unable to traverse the cell cycle from a true G0 state. *Exp Gerontol* 1998; **33**(1-2): 67-80.
96. Matsumura T, Zerrudo Z, Hayflick L. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J Gerontol* 1979; **34**(3): 328-34.
97. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; **426**(6963): 194-8.
98. Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 2004; **14**(4): 501-13.
99. Turinetto V, Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**(5): 2489-98.
100. Wasielewski Rv, Mengel M, Gignac S, Wilkens L, Werner M, Georgii A. Tyramine amplification technique in routine immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1997; **45**(11): 1455-9.
101. Wilson T. Confocal microscopy: Academic press London; 1990.
102. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990; **48**(8): 579-82.
103. Nüsken E, Turnwald EM, Fink G, et al. Maternal High Fat Diet and in-Utero Metformin Exposure Significantly Impact upon the Fetal Renal Proteome of Male Mice. *J Clin Med* 2019; **8**(5).
104. Hauk A. Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit* 2013; **43**(5): 278-.

105. Livak KJ, Flood S, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research* 1995; **4**(6): 357-62.
106. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004; **1**(04): 92-5.
107. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit* 2007; **37**(2): 120-6.
108. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods* 2001; **25**(4): 402-8.
109. ThermoFisherScientific. User Guide: Pierce™ BCA Protein Assay Kit. 2024. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf (Zuletzt abgerufen am 03.06.2024).
110. Smith Pe, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 1985; **150**(1): 76-85.
111. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel Jr JV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications* 1967; **28**(5): 815-20.
112. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1979; **76**(9): 4350-4.
113. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG); Arbeitsgemeinschaft Geburtshilfe und Pränatalmedizin (AGG). S3-Leitlinie Adipositas und Schwangerschaft. 2019. https://register.awmf.org/assets/guidelines/015-081p_S3_Adipositas-Schwangerschaft_2020_02.pdf (Zuletzt abgerufen am 03.06.2024).
114. Catalano PM, Mele L, Landon MB, et al. Inadequate weight gain in overweight and obese pregnant women: what is the effect on fetal growth? *American journal of obstetrics and gynecology* 2014; **211**(2): 137. e1-. e7.
115. Ásbjörnsdóttir B, Rasmussen SS, Kelstrup L, Damm P, Mathiesen ER. Impact of restricted maternal weight gain on fetal growth and perinatal morbidity in obese women with type 2 diabetes. *Diabetes care* 2013; **36**(5): 1102-6.
116. Bogaerts A, Ameye L, Martens E, Devlieger R. Weight loss in obese pregnant women and risk for adverse perinatal outcomes. *Obstetrics & Gynecology* 2015; **125**(3): 566-75.
117. Vinter CA, Jensen DM, Ovesen P, Beck-Nielsen H, Jørgensen JS. The LiP (Lifestyle in Pregnancy) study: a randomized controlled trial of lifestyle intervention in 360 obese pregnant women. *Diabetes care* 2011; **34**(12): 2502-7.

118. Yu Z, Han S, Zhu J, Sun X, Ji C, Guo X. Pre-pregnancy body mass index in relation to infant birth weight and offspring overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis. *PLoS one* 2013; **8**(4): e61627.
119. Poston L, Bell R, Croker H, et al. Effect of a behavioural intervention in obese pregnant women (the UPBEAT study): a multicentre, randomised controlled trial. *The lancet Diabetes & endocrinology* 2015; **3**(10): 767-77.
120. Chaouat G, Clark DA. Are animal models useful or confusing in understanding the human fetomaternal relationship? A debate. *Journal of reproductive immunology* 2015; **108**: 56-64.
121. 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.
122. Nohr EA, Bech BH, Davies MJ, Frydenberg M, Henriksen TB, Olsen J. Prepregnancy obesity and fetal death: a study within the Danish National Birth Cohort. *Obstetrics & Gynecology* 2005; **106**(2): 250-9.
123. Owens J, Robinson J. The effect of experimental manipulation of placental growth and development. *Fetal and neonatal growth Chichester: Wiley* 1988: 49-77.
124. Langhoff L, Grønbeck L, von Huth S, et al. Placental Growth during Normal Pregnancy - A Magnetic Resonance Imaging Study. *Gynecol Obstet Invest* 2017; **82**(5): 462-7.
125. Kozłowski P, Terinde R, Schmidt H. Bestimmung des Plazentawachstums aus Ultraschallschnittbildern. *Ultraschall in der Medizin* 1980; **1**(02): 116-32.
126. Bonds DR, Gabbe SG, Kumar S, Taylor T. Fetal weight/placental weight ratio and perinatal outcome. *American journal of obstetrics and gynecology* 1984; **149**(2): 195-200.
127. Schneider H, Groß W. Wachstum und Entwicklung der Plazenta als Versorgungsorgan des Feten. *Geburtshilfe—Geburtsmedizin: Springer*; 1995: 152-60.
128. Arakaki T, Hasegawa J, Nakamura M, et al. Prediction of early- and late-onset pregnancy-induced hypertension using placental volume on three-dimensional ultrasound and uterine artery Doppler. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2015; **45**(5): 539-43.
129. González-González NL, González-Dávila E, Marrero LG, Padrón E, Castro-Conde JR, Plasencia W. Value of placental volume and vascular flow indices as predictors of intrauterine growth retardation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2017; **212**: 13-9.
130. Wills AK, Chinchwadkar MC, Joglekar CV, et al. Maternal and paternal height and BMI and patterns of fetal growth: the Pune Maternal Nutrition Study. *Early human development* 2010; **86**(9): 535-40.

131. Parisi F, Savasi VM, di Bartolo I, Mandia L, Cetin I. Associations between First Trimester Maternal Nutritional Score, early markers of placental function, and pregnancy outcome. *Nutrients* 2020; **12**(6): 1799.
132. Fowden A, Moore T. Maternal-fetal resource allocation: co-operation and conflict. *Placenta* 2012; **33**: e11-e5.
133. Georgiades P, Watkins M, Surani MA, Ferguson-Smith AC. Parental origin-specific developmental defects in mice with uniparental disomy for chromosome 12. *Development* 2000; **127**(21): 4719-28.
134. Davy P, Nagata M, Bullard P, Fogelson N, Allsopp R. Fetal growth restriction is associated with accelerated telomere shortening and increased expression of cell senescence markers in the placenta. *Placenta* 2009; **30**(6): 539-42.
135. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *science* 1998; **279**(5349): 349-52.
136. Sultana Z, Maiti K, Dedman L, Smith R. Is there a role for placental senescence in the genesis of obstetric complications and fetal growth restriction? *American journal of obstetrics and gynecology* 2018; **218**(2): S762-S73.
137. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *Journal of Cell Biology* 1999; **146**(5): 905-16.
138. Ichijima Y, Sakasai R, Okita N, Asahina K, Mizutani S, Teraoka H. Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochemical and biophysical research communications* 2005; **336**(3): 807-12.
139. Lawless C, Wang C, Jurk D, Merz A, von Zglinicki T, Passos JF. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Experimental gerontology* 2010; **45**(10): 772-8.
140. Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP, Mor G. Placental apoptosis in health and disease. *American journal of reproductive immunology* 2010; **64**(3): 159-69.
141. Knöfler M, Mösl B, Bauer S, Griesinger G, Husslein P. TNF- α /TNFR1 in primary and immortalized first trimester cytotrophoblasts. *Placenta* 2000; **21**(5-6): 525-35.
142. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *American journal of obstetrics and gynecology* 1997; **177**(6): 1395-401.
143. Kim DW, Young SL, Grattan DR, Jasoni CL. Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biology of reproduction* 2014; **90**(6): 130, 1-11.
144. Hans F, Dimitrov S. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* 2001; **20**(24): 3021-7.

145. Higgins L, Mills TA, Greenwood SL, Cowley EJ, Sibley CP, Jones RL. Maternal obesity and its effect on placental cell turnover. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2013; **26**(8): 783-8.
146. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews genetics* 2012; **13**(4): 227-32.
147. Barbosa C, Peixeiro I, Romão L. Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS genetics* 2013; **9**(8): e1003529.
148. Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell* 2017; **169**(7): 1187-200.
149. Espina V, Wulfkühle JD, Calvert VS, et al. Laser-capture microdissection. *Nature protocols* 2006; **1**(2): 586-603.
150. Leach L, Gray C, Staton S, et al. Vascular endothelial cadherin and β -catenin in human fetoplacental vessels of pregnancies complicated by Type 1 diabetes: associations with angiogenesis and perturbed barrier function. *Diabetologia* 2004; **47**(4): 695-709.
151. Groten T, Kirschenhofer N, Kreienberg R, Reister F. Das endotheliale Zell-Zell-Adhäsionsmolekül VE-Cadherin wird in der humanen Plazenta im Synzytiotrophoblasten exprimiert. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 2006; **66**(S 01): PO_G_02_3.
152. Groten T, Gebhard N, Kreienberg R, Schleussner E, Reister F, Huppertz B. Differential expression of VE-cadherin and VEGFR2 in placental syncytiotrophoblast during preeclampsia—New perspectives to explain the pathophysiology. *Placenta* 2010; **31**(4): 339-43.
153. Hayes EK, Lechowicz A, Petrik JJ, et al. Adverse fetal and neonatal outcomes associated with a life-long high fat diet: role of altered development of the placental vasculature. *PloS one* 2012; **7**(3): e33370.
154. Catalano P, deMouzon SH. Maternal obesity and metabolic risk to the offspring: why lifestyle interventions may have not achieved the desired outcomes. *Int J Obes (Lond)* 2015; **39**(4): 642-9.
155. Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, et al. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *New England Journal of Medicine* 2009; **360**(9): 859-73.
156. Jukic AM, Baird DD, Weinberg CR, McConaughy DR, Wilcox AJ. Length of human pregnancy and contributors to its natural variation. *Human reproduction* 2013; **28**(10): 2848-55.
157. Gemeinsamer Bundesausschuss. Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Geburt (Mutterschafts-Richtlinie/Mu-RL). 2023. https://www.g-ba.de/downloads/62-492-3335/Mu-RL_2023-09-28_iK-2023-12-19.pdf (Zuletzt abgerufen am 03.06.2024).

158. Davies G, Maxwell C, McLeod L, et al. SOGC Clinical Practice Guidelines: Obesity in pregnancy. No. 239, February 2010. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2010; **110**(2): 167-73.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der murinen Plazenta nach Maltepe ²¹	18
Abbildung 2: Generierung der Versuchsgruppen	37
Abbildung 3: Gewicht der Muttertiere und des epigonadalen weißen Fettgewebes	61
Abbildung 4: Plazentagewicht und Plazentaeffizienz	62
Abbildung 5: HE-gefärbter muriner Plazenta-Gewebeschnitt zur stereologischen Untersuchung der Volumina der gesamten Plazenta sowie der Plazentazonen.....	64
Abbildung 6: Bestimmung des Labyrinthvolumens mittels zwei verschiedener stereologischer Methoden	66
Abbildung 7: CD31 gefärbter Ausschnitt der Labyrinthzone eines murinen Plazenta-Gewebeschnittes zur stereologischen Untersuchung von Volumina und Oberflächen.....	67
Abbildung 8: CD31 gefärbter Ausschnitt der Labyrinthzone eines murinen Plazenta-Gewebeschnittes zur stereologischen Untersuchung von fetalen Kapillarlängen und -durchmessern	68
Abbildung 9: Ausschnitt der Labyrinthzone einer mittels Immunfluoreszenz gefärbten murinen Plazenta zur Detektion proliferierender Zellen	69
Abbildung 10: Ausschnitt der Labyrinthzone einer mittels Immunfluoreszenz gefärbten murinen Plazenta zur Detektion apoptotischer Zellen.....	70
Abbildung 11: Ausschnitt der Labyrinthzone einer mittels Immunfluoreszenz gefärbten murinen Plazenta zur Detektion seneszenten Zellen.....	72
Abbildung 12: Relative Proteinmenge von E-Cadherin in der murinen Plazenta.....	75
Abbildung 13: Relative Proteinmenge von VE-Cadherin in der murinen Plazenta.....	76
Abbildung 14: Relative Proteinmenge von β -Catenin in der murinen Plazenta	77

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme	31
Tabelle 2: Stammlösungen und Puffer.....	32
Tabelle 3: Primer/Oligonukleotide.....	32
Tabelle 4: Erstantikörper	33
Tabelle 5: Zweitantikörper	33
Tabelle 6: Geräte.....	34
Tabelle 7: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	35
Tabelle 8: Software	35
Tabelle 9: Futterzusammensetzung der SD und HFD nach Appel, 2019 ⁷⁷	37
Tabelle 10: PCR-Mastermix.....	51

Tabelle 11: Temperaturprotokoll der PCR zur Geschlechterbestimmung.....	51
Tabelle 12: PCR-Mastermix A für die cDNA-Synthese	53
Tabelle 13: PCR-Mastermix B für die cDNA-Synthese	54
Tabelle 14: Temperaturprotokoll der TaqMan™-qRT-PCR.....	55
Tabelle 15: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
Tabelle 16: Gewicht, Wurfgröße und Resorptionsrate der Feten an G 15.5	63
Tabelle 17: Volumina der gesamten Plazenta und der Plazentazonen in absoluten und relativen Werten	65
Tabelle 18: Volumina und Oberflächenmaße von fetalen und maternalen Gefäßen sowie Volumina des Trophoblastengewebes	67
Tabelle 19: Fetale Kapillarlängen und -durchmesser.....	69
Tabelle 20: Nachweis proliferierender Zellen in der Labyrinthzone der murinen Plazenta	70
Tabelle 21: Nachweis apoptotischer Zellen in der Labyrinthzone der murinen Plazenta	71
Tabelle 22: Nachweis seneszenten Zellen in der Labyrinthzone der murinen Plazenta.....	73
Tabelle 23: Relative Genexpression plazentarer AJ- und Endothelzellmarker	74