

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

Plazentare Dysfunktion bei maternaler Adipositas:
Auswirkungen auf die fetale und plazentare Entwicklung

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

vorgelegt von
Jon-Frederic Grothe
aus Reichshof

promoviert am 19. August 2020

Die Versorgung aller in dieser Arbeit erwähnten Versuchstiere erfolgte im Stall des Gebäudes der Pharmakologie der Universität zu Köln durch das Team der dezentralen Versuchstierhaltung sowie durch Frau Marion Handwerk und Frau Dr. rer. nat. Sarah Appel.

Die Sektion der Muttertiere und die damit verbundene Gewinnung der Proben wurde von Frau Dr. rer. nat. Sarah Appel, Frau Marion Handwerk und Frau Dr. rer. nat. Ruth Janoschek durchgeführt.

Zur Umsetzung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde ich von meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. S. Appel und der biologisch-technischen Assistentin des Labors der Kinderklinik der Universitätsklinik zu Köln M. Wohlfahrt angeleitet. Alle Versuche sowie sämtliche laborchemischen Analysen wurden selbstständig und ausschließlich von mir durchgeführt. Lediglich in Bezug auf die in dieser Arbeit untersuchten proliferationsrelevanten Rezeptoren und Faktoren wurde auf bereits vorhandene Western Blots für eine geschlechtsspezifische Auswertung zurückgegriffen. Diese wurden zuvor im Rahmen anderer wissenschaftlicher Arbeiten (Storck, S., 2014; Appel et al., 2019) angefertigt.

Die Auswertung und Interpretation der gewonnenen Ergebnisse, sowie die Anfertigung aller Tabellen und Diagramme erfolgte ausschließlich durch meine Person.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss bringen konnte.

Zuallererst möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. J. Dötsch für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas und die freundliche Betreuung während der gesamten Promotionszeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Sarah Appel, die mich hervorragend betreut hat und in jeglicher Angelegenheit für mich da war. Sie hatte immer ein offenes Ohr für mich und wusste stets, wie sie mir weiterhelfen konnte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Maria Wohlfarth, die mich vorbildlich in die Experimente eingeführt hat und auf deren Unterstützung bei Fragen im experimentellen Teil der Arbeit stets Verlass war.

Ein großer Dank geht auch an alle Mitarbeitenden und Mitdoktoranden des Forschungslabors, die mir immer hilfsbereit und unterstützend zur Seite standen und für eine überaus angenehme Arbeitsatmosphäre während der Dissertationszeit gesorgt haben.

Außerdem danke ich der CECAD imaging facility für die Bereitstellung des Slide Scanners zur Digitalisierung der histologischen Schnitte.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die in allen Lebenslagen für mich da ist und mir den Weg bis zum heutigen Tage ermöglicht hat.

Von ganzem Herzen möchte ich mich auch bei meiner Partnerin Gabriele Schrödter bedanken, die mich jederzeit motivierend unterstützt hat und niemals den Glauben an mich verloren hat.

Abschließend möchte ich mich bei allen weiteren Menschen bedanken, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und nicht namentlich erwähnt wurden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Adipositas	9
1.1.1 Definition und Epidemiologie der Adipositas	9
1.1.2 Folgen der Adipositas	10
1.1.3 Adipositas während der Schwangerschaft	10
1.2 Die Plazenta.....	11
1.2.1 Aufbau und Entwicklung der humanen Plazenta.....	12
1.2.2 Aufbau und Unterschiede der murinen Plazenta.....	13
1.3 Glykogen in der fetoplazentaren Einheit.....	14
1.4 Wachstumsfaktoren und deren Signalkaskade.....	15
1.5 Arbeitshypothese und Fragestellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	19
2.2 Materialien und Geräte.....	21
2.2.1 Geräte	21
2.2.2 Chemikalien und Reagenzien	21
2.2.3 Puffer und Stammlösungen	23
2.2.4 Primer.....	23
2.3 Molekulargenetische Methoden.....	23
2.3.1 DNA-Isolierung	23
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	25
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	27
2.4 Histochemie	28
2.4.1 Vorbereitungen für die Färbung der Plazentaprobe	28
2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
2.4.3 PAS-Färbung.....	29
2.4.4 Immunhistologische Färbung von PCNA	30
2.5 Statistik	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Die Gewichte von Feten und Plazenten	32
3.1.1 Gewichte aller Feten und Plazenten	33
3.1.2 Gewichte männlicher und weiblicher Feten und Plazenten	34
3.1.3 Plazentaeffizienz, Geschlechterverteilung, Wurfgröße und Resorptionsquote	36

3.2	Proliferation und Wachstum in der Plazenta.....	38
3.2.1	Proliferation im Labyrinth und Spongiotrophoblast.....	39
3.2.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede bei proliferationsrelevanten Rezeptoren und Faktoren der angesteuerten Signalkaskade.....	41
3.3	Die Größe der Flächen der Plazentaschichten	44
3.4	Glykogenzellen in der Plazenta	47
4	Diskussion	50
4.1	Maternales Übergewicht führt zu einer temporären intrauterinen Wachstumsrestriktion der Feten.....	51
4.2	Kontroverse Ergebnisse bei der plazentaren Proliferationsrate nach PCNA Untersuchungen.....	53
4.3	Verringertes Proteinlevel der Wachstumsfaktor-Rezeptoren beeinflusst nicht die nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Akt und ERK1/2.....	54
4.4	Maternale Adipositas führt zu einer verkleinerten Fläche des Labyrinths an G19.....	56
4.5	Erhöhter Abbau an Glykogenzellen in HFD Plazenten zum Ende der Schwangerschaft.....	56
4.6	Eigene Untersuchungen zeigen keine ersichtlichen Geschlechtsunterschiede bezüglich der durchgeführten Analysen	58
4.7	Ausblick	61
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis.....	66
7	Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	76
8	Anhang	77
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	77
8.2	Tabellenverzeichnis	77
8.3	Weitere Abbildungen.....	78
8.4	Weitere Tabellen.....	81
8.5	Copyright Genehmigung	82
9	Lebenslauf.....	83

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	Beziehungsweise
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
FTO	Fat mass and obesity associated Protein
g	Gramm
G16/19	Gestationstag 16/19
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GLUT	Glukose Transporter
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFD	Hoch Fett Diät
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IGF	Insulin-like Growth Factor
Ins	Insulin
IR	Insulin-Rezeptor
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
kg	Kilogramm
LGA	large for gestational age
m	Meter
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
ME	Metabolisierbare Energie

mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M6P	Mannose 6-Phosphat
n	Anzahl
ns/n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
P1	Tag nach der Geburt
p.c.	Post conceptionem
PAS-Reaktion	periodic acid-Schiff reaction
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Potential hydrogenii
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PK	Proteinkinase
qPCR	quantitative Echtzeit- Polymerase-Kettenreaktion
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
SGA	small for gestational age
s.o.	siehe oben
SD	Standard Diät
SEM	Standard error of the mean
STB	Spongiotrophoblast
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TRS	Target Retrieval Solution
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/μl	Units pro Mikroliter
UV	Ultraviolet
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Adipositas

1.1.1 Definition und Epidemiologie der Adipositas

Adipositas leitet sich von dem lateinischen Wort Adeps (Fett) ab und wird als eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung an Körperfett bezeichnet. Zur exakten Bestimmung des Körperfettanteils und dessen Verteilung wären aufwändige radiologische Untersuchungen (Computertomographie) notwendig. Da diese mit einem hohen Kostenaufwand und einer erheblichen Strahlenbelastung verbunden sind, ist dieses Vorgehen in der Regel nicht indiziert. Alternativ wird der relativ leicht zu ermittelnde BMI (Body-Mass-Index) herangezogen. Der BMI ist als Quotient des Körpergewichts in Kilogramm dividiert durch das Quadrat der Körpergröße in Metern (WHO, 2018) definiert. Er kann unter anderem zur Einordnung des Risikos von Gesundheitsproblemen in Relation zum Körpergewicht genutzt werden (WHO, 2018). Tabelle 1 ist für europäische Männer und Frauen ab dem 20. Lebensjahr gültig. Die idealen BMI-Werte von Menschen anderer (ethnischer) Herkunft weichen bei gleichem Geschlecht, Alter und Körperfettanteil zum Teil ab (Deurenberg et al., 1998). Gleiches gilt für besonders muskulöse oder große Menschen (Caterson & Gill, 2002). Zur Einstufung des Körperfettanteils bei Kindern werden sogenannte Perzentilenkurven angewendet, die getrennt für Mädchen und Jungen eine Relation zwischen Alter und BMI darstellen. Zur präziseren Bestimmung des Körperfettanteils empfiehlt sich außerdem die Messung des Taillenumfangs, der in etwa ein Maß für die Menge des intraabdominalen Fettgehaltes ist (Herpertz et al., 2015, p.358; WHO, 2018).

BMI (kg/m²)	Definition
unter 18.5	Untergewicht
18.5–24.9	Normalgewicht
25.0–29.9	Übergewicht (Präadipositas)
30.0–34.9	Adipositas Klasse I
35.0–39.9	Adipositas Klasse II
über 40	Adipositas Klasse III

Tabelle 1: Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen anhand des BMI (nach WHO, Stand 2018)

Der BMI wird definiert als Quotient des Körpergewichts in Kilogramm dividiert durch das Quadrat der Körpergröße in Metern.

Die Prävalenz der Adipositas hat weltweit in den vergangenen Jahrzehnten stetig zugenommen und stellt heutzutage eines der größten globalen Gesundheitsprobleme neben Mangelernährung und Infektionskrankheiten dar (WHO, 2000; Caterson & Gill, 2002; Popkin, 2011). Insbesondere die Zunahme an übergewichtigen Kindern im 21. Jahrhundert ist alarmierend (WHO, 2016). Von 1980 bis 2017 hat sich die Anzahl fettleibiger Menschen mehr als verdoppelt. Rund 5 % aller Kinder und 12 % der Erwachsenen sind weltweit betroffen (Gregg & Shaw, 2017). In Deutschland beträgt der Anteil erwachsener adipöser Menschen sogar fast ein Viertel (Mensink et al., 2013).

Die Ursache für die rasche Zunahme an Fettleibigkeit liegt in den Veränderungen von Umwelt und Gesellschaft, die mit zunehmend geringer körperlicher Aktivität und Lebensmitteln mit großer Energiedichte durch einen hohen Fett- und Zuckeranteil einhergehen. Von diesem Phänomen sind große Teile der Weltbevölkerung betroffen. (Caterson & Gill, 2002; James, 2008; WHO, 2016). Hinzu kommen genetische Dispositionen wie das FTO (fat mass and obesity associated) Gen (Frayling et al., 2007), die das Ausmaß der Adipositas verstärken können (Maes et al., 1997).

1.1.2 Folgen der Adipositas

Es sind verschiedene Erkrankungen bekannt, die durch eine bestehende Adipositas ausgelöst oder verstärkt werden können. Die bedeutsamsten sind Herz-Kreislauferkrankungen, Typ II Diabetes und verschiedene Krebsarten. Weitere Komplikationen können Asthma, Osteoarthritis, chronisches Rückenleiden, Gicht, Erkrankungen der Gallenblase oder Fettstoffwechselstörungen sein (Farah & Salome, 2012; WHO, 2000; De Pergola & Silvestris, 2013; Guh et al., 2009). Dabei steigt das Risiko dieser Begleiterkrankungen proportional mit der Höhe des BMI (James, 2004). Das Risiko für Typ II Diabetes kann bis zu zwölfmal und das von koronaren Herzerkrankungen bis zu dreifach erhöht sein (Guh et al., 2009). Bei einer stark ausgeprägten Adipositas (Klasse III) ist außerdem die Lebenserwartung um bis zu zehn Jahre herabgesetzt (Prospective Studies Collaboration et al., 2009).

1.1.3 Adipositas während der Schwangerschaft

Neben den allgemeinen Gefährdungen einer Adipositas stellt sie insbesondere auch ein Risiko für übergewichtige schwangere Frauen und ihre ungeborenen Kinder dar. Die Mütter selbst leiden häufiger an Gestationsdiabetes oder der präeklampsischen

Erkrankung, die eine Hypertonie und Proteinurie mit sich bringt (Arendas et al., 2008; Bodnar et al., 2005; Kabiru & Raynor, 2004). Für die Feten steigt mit zunehmendem BMI der Mutter das Risiko für eine Totgeburt, anormales Wachstum mit einhergehender Makrosomie (Geburtsgewicht oberhalb der 90. Perzentile (Haram et al., 2002)) oder vermindertem Wachstum, fetale Asphyxie (Sauerstoffmangelversorgung) oder Spontanabort. Außerdem sind häufiger Frühgeburten und Entbindungen per Kaiserschnitt zu beobachten (Mission et al., 2015; Frias et al., 2011; Marshall & Spong, 2012; Lim & Mahmood, 2015; Baeten et al., 2001; Marchi et al., 2015; Kabiru & Raynor, 2004; Ye et al., 2017; Akyol et al., 2009). Aber auch nach der Geburt sind Kinder durch die Adipositas der Mutter geprägt. So ist das Risiko für Übergewicht bei zwei- bis vierjährigen Kindern bis zu doppelt so hoch wie bei Kindern von normalgewichtigen Müttern (Whitaker, 2004), und auch die kognitiven Fähigkeiten können eingeschränkt sein (Heikura et al., 2008; Neggers et al., 2003). Außerdem leiden betroffene Kinder im späteren Leben häufiger an Stoffwechselstörungen und Herz-Kreislaufkrankungen (Myatt & Maloyan, 2016).

Bislang fehlt noch immer ein tieferes Verständnis für den Zusammenhang von mütterlichem Übergewicht und den aufgeführten Risiken für die Nachkommen. Als Schnittstelle von maternalem und fetalem Gewebe liegt jedoch eine anormale Entwicklung der Plazenta als Ursache nahe (Pinar et al., 2014; Hasan et al., 2015; Su et al., 2016; Salafia et al., 1992; Kidron et al., 2009). Dabei können letztlich verschiedene placentare Parameter eine Rolle spielen. Ein besonderer Stellenwert könnte den Wachstumsfaktoren (Insulin, IGF-1 und IGF-2) zukommen, die eine regulierende Funktion für das Zellwachstum und die Zellproliferation der Plazenta haben. Außerdem könnten Abweichungen bei den placentaren Glykogenspeichern Folgen für den Fetus haben. In einer Studie wurde beispielsweise ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von verschiedenen Komplikationen während der Schwangerschaft (Präeklampsie, fetale Wachstumsrestriktion und Diabetes) und Veränderungen in den placentaren Glykogenspeichern festgestellt (Akison et al., 2017). Aber auch eine reduzierte Blutzirkulation in Plazenten übergewichtiger Frauen mit einer einhergehenden verminderten Versorgung des Feten mit Nährstoffen scheint eine Rolle zu spielen (Howell & Powell, 2017).

1.2 Die Plazenta

Das Wort Plazenta stammt aus dem lateinischen und bedeutet flacher Kuchen. Als Verbindung von Mutter und Fetus stellt sie während der Schwangerschaft ein

essentielles Organ dar. In die Schleimhaut des Uterus integriert ist sie für den Austausch von Gasen, Nährstoffen, Hormonen und Stoffwechselprodukten verantwortlich und ermöglicht so das Wachstum und das Überleben des Kindes. Kommt es zu placentaren Normabweichungen, so spiegelt sich dies in der Entwicklung des Fetus wider. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Gewicht der Plazenta und dem Wachstum bzw. dem Geburtsgewicht konnte dargelegt werden (Haeussner et al., 2013; Roland et al., 2012).

1.2.1 Aufbau und Entwicklung der humanen Plazenta

Etwa 6-7 Tage nach der Befruchtung findet die Insertion der Blastozyste in das Endometrium des Uterus statt. Während der Implantation kommt es zu einer starken Proliferation der Trophoblasten, die den Embryoblast hüllenartig umgeben. Dabei fusionieren die äußeren Trophoblastenzellen, sodass der vielkernige Synzytiotrophoblast entsteht. Der Synzytiotrophoblast wächst fingerförmig in das Endometrium ein und vergrößert sich durch eine weitere Verschmelzung mit den proliferierenden, jetzt Zytotrophoblasten genannten Zellen. Innerhalb des Synzytiotrophoblasten entstehen anschließend Vakuolen, die sich zu Lakunen vereinen. Durch diesen "intervillösen Raum" fließt später das maternale Blut. Ab dem 13. Tag p.c. (post conceptionem) bilden sich Primärzotten, indem die Zytotrophoblasten in den Synzytiotrophoblasten einwachsen. Mesenchymale Zellen der Embryoblaste folgen dem Wachstum und kleiden die Zotten (Villi) von innen aus, ehe aus diesen Sekundärzotten durch Vaskulogenese innerhalb des Mesenchyms am 18.-20. Tag p.c. die Tertiärzotten (Abbildung 2c) entstanden sind (Huppertz & Schleißner, 2018). Die Angiogenese der Plazenta verläuft vollkommen unabhängig von der des Feten und erst um den 35. Tag p.c. entsteht über die Nabelschnur eine Verbindung der beiden Gefäßsysteme (Benirschke et al., 2012).

Die Plazenta ist nun in ihrer Funktion ausgereift und kann mittels Diffusion, erleichterter Diffusion, Pinozytose oder über Rezeptoren vermittelt den Fetus versorgen, ohne dass dabei ein Blutaustausch zwischen Mutter und Kind über die Plazentaschranke stattfindet. Als Barriere dienen sechs Schichten ausgehend von den mit maternalen Blut gefüllten Vakuolen: Synzytiotrophoblast, einreihige Zytotrophoblasten, Basalmembran der Zytotrophoblasten, mesenchymales Zottenstroma, Basalmembran der Endothelzellen und letztlich die Gefäßendothelzellen selbst (Huppertz & Schleißner, 2018). Zur mütterlichen Seite ist die Plazenta durch die Dezidua abgegrenzt, die aus der Uterusschleimhaut und den verbindenden Synzytiotrophoblasten und Zytotrophoblasten des Embryos besteht. Auf der

gegenüberliegenden Seite grenzt die Chorionplatte an den intervillösen Raum mit seinen Zottenbäumen, die sich ebenfalls in eine Zyto- und Synzytiotrophoblastenschicht, eine breite Bindegewebsschicht und außen das Amnionepithel gliedert. Die Nabelschnur setzt in der Mitte der Chorionplatte an.

1.2.2 Aufbau und Unterschiede der murinen Plazenta

Diese Studie wurde anhand eines "Mausmodells" durchgeführt, da die Plazenten von Mensch und Maus in ihrem anatomischen Aufbau sehr ähnlich sind. Strukturelle Unterschiede gibt es lediglich in der zwischen Dezidua und Chorionplatte gelegenen Schicht des Stoffaustauschs, die bei der murinen Plazenta in zwei weitere Bereiche unterteilt werden kann. Ohne eine klare Zottenstruktur aufzuweisen, findet man das zur Chorionplatte gelegene Labyrinth mit seiner Plazentaschranke und auf der Seite der Dezidua die zusätzliche Schicht des Spongiotrophoblasten (STB), auch "junctional Zone" genannt. Der STB wird durch randständige trophoblastische Riesenzellen in der Uterusschleimhaut verankert (Abbildung 1). Außerdem wird ihm eine endokrine Funktion zugeordnet und es wird angenommen, dass er das Einwachsen maternaler Endothelzellen in die Plazenta beschränkend reguliert (Coan et al., 2006; Lescisin et al., 1988; Wiemers et al., 2003). Nicht zuletzt befinden sich hier überwiegend die zur bedarfsweisen Energiefreisetzung eingelagerten Glykogen-Zellnester (siehe 1.3).

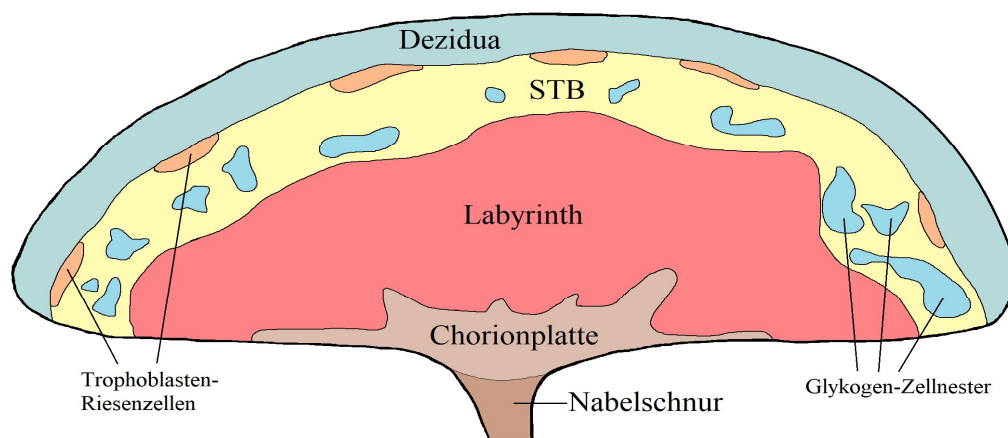


Abbildung 1: Übersicht einer murinen Plazenta (eigene Darstellung)

Schematische Darstellung mit den verschiedenen Zonen der Maus-Plazenta. Auf der fetalen Seite inseriert die Nabelschnur in die Chorionplatte. Daran grenzt das Labyrinth, das die Plazentaschranke beinhaltet und in der der Stoffaustausch zwischen maternalem und fetalem Blut stattfindet. In der Schicht des Spongiotrophoblasten (STB) befindet sich ein Großteil der Glykogen-Zellnester und man findet die Trophoblasten-Riesenzellen, die zur Verankerung an der mütterlichen Dezidua dienen.

Sowohl die humane als auch die murine Plazenta wird dem hämochorialen Plazentatyp zugeordnet. Das bedeutet, dass das mütterliche Blut in direktem Kontakt zum fetalen Gewebe steht, ohne durch ein Kapillarendothel von diesem getrennt zu sein (Maltepe et al., 2010). Bei Betrachtung der Plazentaschranke zeigt sich in der murinen Plazenta eine zusätzliche Synzytiotrophoblasten-Schicht (Abbildung 2). Während die Schwangerschaft beim Menschen in der Regel mit nur einer Plazenta bzw. Fetus verbunden ist, hatten die Mäuse des verwendeten Mausstamms durchschnittlich 7-8 Plazenten bei einer Tragezeit von etwa 19,5 Tagen (Mensch ca. 280 Tage).

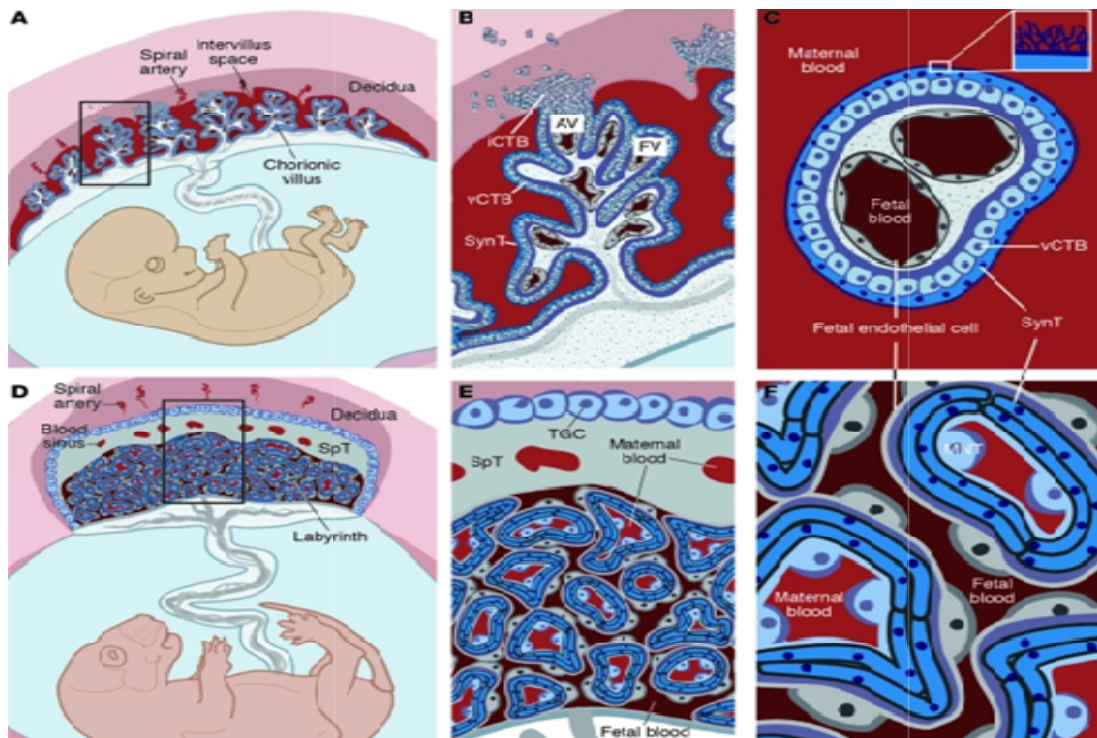


Abbildung 2: Vergleich von humaner und muriner Plazenta (Maltepe et al., 2010)

Die Ausschnitte A-C zeigen eine schematische Darstellung mit zunehmender Vergrößerung einer menschlichen Plazenta mit Zottenstruktur. Analog dazu stehen die Ausschnitte D-F für die Plazenta der Maus mit Labyrinth. iCTB=interstitieller Zytotrophoblast, vCTB=villöser Zytotrophoblast, SynT=Synzytiotrophoblast, AV=anchoring villus, FV=floating villus, SpT=Spongiotrophoblast, TGC=Trophoblast giant cell, MNT=Mononuclear trophoblasts. Copyright Genehmigung im Anhang.

1.3 Glykogen in der feto-plazentaren Einheit

Bei einem erhöhten Angebot des Energieträgers Glukose kann der Fetus dieses in Form von Glykogen speichern und im Bedarfsfall durch Glykogenolyse wieder freisetzen (Coan et al., 2006). Notwendig wird dieser Vorgang bei einer länger anhaltenden Hypoglykämie oder einer fetalen Hypoxie (Walker et al., 2003). Im

Regelfall wird der plazentare und fetale Bedarf an Glukose jedoch über den mütterlichen Blutkreislauf gedeckt. Dabei passiert die Glukose die Plazentaschranke mittels erleichterter Diffusion über Glukose Transporter (GLUT), die in die Membran des Synzytiotrophoblasten eingelagert sind (Baumann et al., 2002). Dem GLUT-1 Transporter scheint in diesem Zusammenhang die größte Bedeutung zuzukommen (Barros et al., 1995).

Dass auch in der Plazenta Glykogen gespeichert wird, konnte schon 1859 durch Claude Bernard nachgewiesen werden. Neben dem plazentaren Eigenbedarf an Glukose könnte das hier eingelagerte Glykogen auch für den Fetus als Energiequelle essentiell sein. So konnte beispielsweise ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen einer Verringerung der plazentaren Glykogenzellen und einer gestörten Entwicklung des Feten in Form einer Wachstumsretardierung im letzten Schwangerschaftsdrittel beobachtet werden (Tunster et al., 2010).

In der murinen Plazenta wird das Glykogen in speziellen Glykogentrophoblasten gespeichert. Zwischen dem 10,5 und 12,5 Tag p.c beginnen die Glykogentrophoblasten das Glykogen einzulagern und sogenannte Glykogenzellnester um die Spiralarterien herum zu bilden (Croy et al., 2000; Coan et al., 2006). Sie sind hauptsächlich in der Spongiotrophoblasten-Zone (STB) zu finden und durchlaufen bis zum Tag 16,5 p.c. eine bemerkenswerte 80-fache Vermehrung ihrer selbst. In den anschließenden zwei Tagen kann dann eine Halbierung der Glykogenzellen im STB beobachtet werden, die unter anderem durch einen Glukagon induzierten Abbau des Glykogens und einer Lyse/Apoptose der Glykogenzellen sowie einer Auswanderung der Glykogenzellen in die Dezidua erklärt werden kann (Coan et al., 2006; Adamson et al., 2002; Bouillot et al., 2006). Vereinzelt siedeln sich auch im Labyrinth Glykogenzellen an. Ihre Funktion an dieser Stelle ist jedoch nach wie vor ungeklärt.

1.4 Wachstumsfaktoren und deren Signalkaskade

Induziert durch extrazelluläre Botenstoffe werden über membranständige Rezeptoren oder Transporter Signalkaskaden im Zytoplasma einer Zelle ausgelöst. Diese beinhalten in der Regel eine Verkettung verschiedener Faktoren, die das "Signal" schließlich bis zum Zellkern transportieren und hier die Transkription bestimmter Gensequenzen zur Bildung von Proteinen bzw. Hormonen herbeiführen. Infolgedessen können weitere bedeutende zelluläre Prozesse gesteuert werden.

In dieser Studie ist vor allem die Insulin Rezeptor Familie von Interesse, da sie einen wichtigen Bestandteil in der Regulierung von Zellwachstum, Zellproliferation und Zelldifferenzierung darstellt. Ihr gehören die Insulin-Rezeptoren (IR), der Typ 1 Insulin-like growth factor Rezeptor (IGF-1R) sowie der Mannose-6-phosphate (M6P) Rezeptor (IGF-2R) an. Wie in der vereinfachten Darstellung (Abbildung 3) zu sehen ist, können alle drei Wachstumsfaktoren/Liganden (Insulin, IGF-1 und IGF-2) mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren IR und IGF-1R binden (Hawkes & Levitt Katz, 2017). Primär wird daraufhin die Signaltransduktion über die PI3K (Phosphoinositide-3-kinase) und den anschließenden Proteinkinasen (PK) in Gang gesetzt (X Chen & Sharon, 2013). Zu den Proteinkinasen gehört unter anderem das hier untersuchte Akt (PKB), das zusätzlich an der Steuerung des Glukose-Stoffwechsels beteiligt ist und die Synthese von Glykogen fördert (Saltiel & Kahn, 2001). Einen anderen Weg der Signaltransduktion stellen die MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinasen) dar, denen am Ende der Siganalkaskade das ebenfalls in dieser Studie evaluierte ERK1/2 angehört (McCain, 2013). Beide Signalkaskaden haben eine wachstumsfördernde und proliferationsanregende Eigenschaft und funktionieren durch Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung der jeweils folgenden Kinasen.

Der IGF-2 Rezeptor hat eine antagonistische Funktion zu den Insulin Rezeptoren und dem IGF-1 Rezeptor. Er hat keine signalleitende Funktion, sondern dient eher als "Auffangbecken" von überschüssigem IGF-2. Neben IGF-2 kann aber auch IGF-1 mit einer geringeren Affinität an den IGF-2 Rezeptor binden (Bowman et al., 2010). Die Folge ist eine Lyse des Agonisten, sodass er seine wachstumsfördernde Funktion an den anderen beiden Rezeptoren nicht mehr ausüben kann (X Chen & Sharon, 2013; Forbes & Westwood, 2008). Durch eine Reduktion des IGF-2 Rezeptors kann erwiesenermaßen die Apoptose verringert und die Zellproliferation erhöht werden (Lau et al., 1994; O'Gorman et al., 2002; Harris et al., 2011).

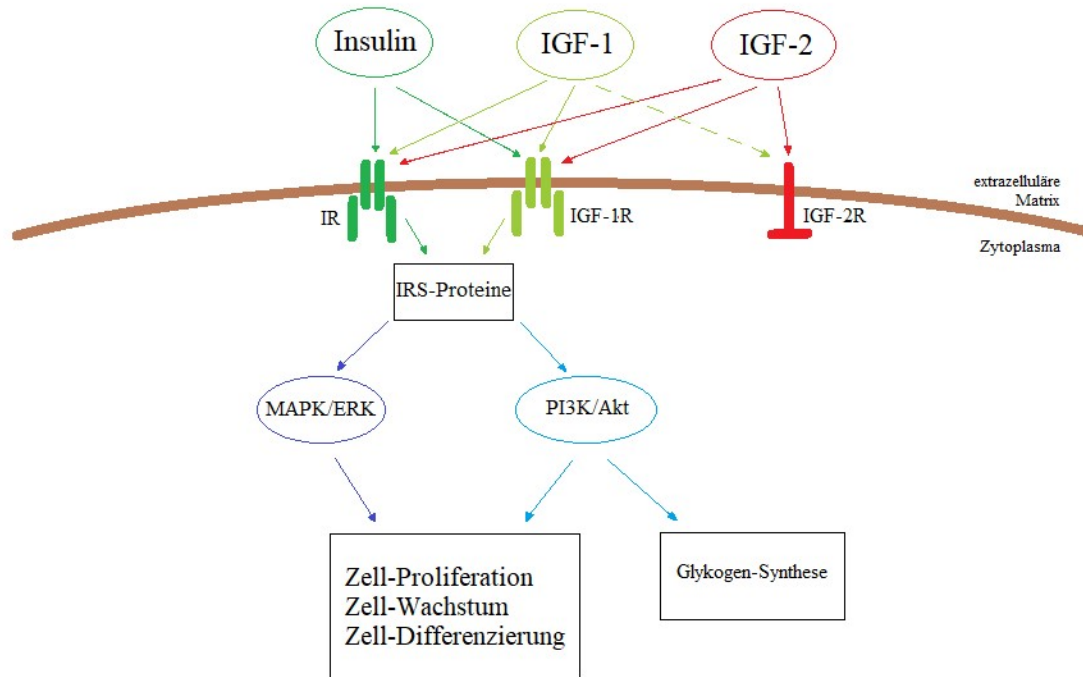


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Wachstumsfaktor-Signalkaskade (eigene Darstellung in Anlehnung an (Chen & Sharon, 2013; Saltiel & Kahn, 2001; Pasello et al., 2013))

Insulin, IGF-1 und IGF-2 initiieren an den Insulin und IGF-1 Rezeptoren die Signaltransduktion. Über die MAP-Kinasen bzw. die PI3-Kinasen werden dann Proliferation, Wachstum und Differenzierung der Zelle reguliert. IGF-2 bindet außerdem an den IGF-2 Rezeptor und wird in der Folge lysiert, sodass seine Funktion an den anderen Rezeptoren letztlich gehemmt wird. Akt fördert außerdem auch die Synthese von Glykogen. IRS = Insulin-Rezeptor-Substrat

Veränderungen in den fein abgestimmten Abläufen der plazentaren Wachstumsfaktor Signalwegen können letztlich eine gestörte Funktionalität der Plazenta und damit eine intrauterine Wachstumsrestriktion des Feten bewirken. Ein knockout von IGF-2 hat beispielsweise gezeigt, dass hierdurch sowohl das plazentare als auch das fetale Wachstum gehemmt werden (Constância et al., 2002). Die Ursache ist dabei vor allem in einer reduzierten Entwicklung der feto-maternalen Transferzone (Labyrinth) zu suchen, die zu einem verminderten Stoffaustausch zwischen maternalem und fetalem Blut führt (Sibley et al., 2004). Auch eine Eliminierung von Akt1 hat gezeigt, dass die Folge eine Reduzierung des Gewichts von Plazenta und Fetus hervorruft (Kent et al., 2012; Cho et al., 2001; Chen et al., 2001).

Einen direkten Einfluss auf die Menge an Glykogen scheint IGF-2 zu haben. Ein Knockout von IGF-2 hat beispielsweise zu einer gravierenden Reduzierung bei der Bildung von Glykogenzellen geführt (Lopez et al., 1996).

1.5 Arbeitshypothese und Fragestellung

In dieser Studie sollte anhand des Mausmodells ein Zusammenhang zwischen maternaler Adipositas - induziert durch Fütterung einer Hochfettdiät - und einer gestörten Plazentafunktion mit Auswirkung auf die Entwicklung des Feten nachgewiesen werden. Eine zentrale Frage war es, ob das Geschlecht der Nachkommen eine bedeutende Rolle bei der Ausprägung der plazentaren Fehlfunktion spielt. Schließlich wird die Plazenta überwiegend von Zellen der Blastozyste, also fetalen Zellen gebildet. In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits ein solcher Zusammenhang bestätigt werden (Reynolds et al., 2015; Kim et al., 2014). Einzelne mögliche Aspekte, die in Verbindung mit der oben genannten Hypothese stehen könnten, wurden in dieser Arbeit mittels folgenden Fragestellungen intensiv erforscht:

1. Liegen die in Vorarbeiten ermittelten reduzierten Körpergewichte der Nachkommen an Tag P1 (Tag nach der Geburt) bereits in utero an den Gestationstagen G16 und G19 vor und spiegeln sie sich in den Gewichten der Plazenten wieder?

2. Welche plazentaren Zonen sind von der zuvor mittels Western Blot ermittelten verminderten Proliferationsrate (erniedrigte PCNA-Proteinlevel) betroffen?

→ Spielen dabei die Proteinlevel der Rezeptoren der Insulin Familie eine Rolle?

3. Wie wirkt sich die maternale Adipositas auf die Größe der plazentaren Zonen aus?

4. Ist eine potentielle fetale Wachstumsrestriktion auch durch Veränderungen in den Glykogenspeichern der Plazenta zu erklären?

Eine Aufarbeitung dieser Fragen mit entsprechenden Ergebnissen der Untersuchungen sollte dabei helfen, die plazentaren Vorgänge und Zusammenhänge besser zu verstehen, um Ansätze für Therapiemöglichkeiten bei mütterlichem Übergewicht mit gesünderen Bedingungen für die Nachkommen zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die in dieser Studie untersuchten Tiere stammen aus dem Mausstamm C57BL/6N. Dem angewandten Mausmodell entsprechend wurden weibliche Mäuse in zwei Ernährungsgruppen unterteilt (Abbildung 4). Während die Kontrollgruppe ab der 3. Lebenswoche eine ausgewogene Standard-Diät (SD) erhielt, wurde die Testgruppe mit einer hochkalorischen Hochfett-Diät (HFD) ernährt (Tabelle 2). Beide Gruppen wurden unter sonst identischen Bedingungen in Tierkäfigen der Universität zu Köln bei 22° Celsius und einem Tag-/Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden gehalten (Appel et al., 2019). Die Verpaarung der Tiere fand zwischen der 12. und 26. Lebenswoche statt. Zu diesem Zeitpunkt betrug das Gewicht der adipösen HFD-Tiere mindestens 24,0 Gramm, das der SD-Tiere max. 23,5 Gramm.

	SD	HFD
Anbieter	ssniff®, Soest, Germany	Altromin, Lage, Germany
Produktnummer	R/M-H	C1057 modifiziert
Metabolisierbare Energie (ME) [kcal/kg]	3225	5297
Fett [% von ME]	9	60
Proteine [% von ME]	33	16
Kohlenhydrate [% von ME]	58	24

Tabelle 2: Zusammensetzung des SD und HFD Futters

In der Tabelle sind die Bestandteile der beiden Futter aufgelistet, die im Rahmen dieser Studie bei der Testgruppe (HFD) und der Kontrollgruppe (SD) eingesetzt wurden. Fett, Proteine und Kohlenhydrate sind in Prozent der umsetzbaren/metabolisierbaren Energie (ME) dargestellt.

An den beiden Gestationstagen 16/17 und 18/19 fand schließlich die Sektion der Muttertiere statt. Dazu wurden die Feten und Plazenten nach Tötung der Muttertiere mittels Sectio caesarea entnommen und sowohl Anzahl als auch Gewicht bestimmt. Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden die Plazenten dann nach folgendem Schema präpariert: Die Plazenten 1-4 wurden halbiert und eine Hälfte nach Schockfrierung auf Trockeneis nativ bei -80°C eingelagert. Sie dienten späteren DNA-, RNA- und Proteinisolierungen. Die zweite Hälfte wurde entweder für geplante Kryostatschnitte nativ in TissueTek® eingebettet (Plazenta 2,4) oder es fand eine Fixierung für histologische Untersuchungen statt (Plazenta 1,3). Dazu wurden die Plazentahälften über Nacht in 4%ige phosphatgepufferte Formaldehydlösung eingelegt

und anschließend für mindestens 24 Stunden in 70% Isopropanol gelagert, ehe die Einbettung in Paraffin folgte. Alle weiteren Plazenten blieben im Ganzen erhalten. Während die Plazenten 5-6 fixiert wurden, wurden die folgenden Plazenten schockgefroren und eingelagert. Waren Plazenten resorbiert, so musste von diesem Schema abgewichen werden.

Die tierexperimentellen Untersuchungen unterlagen jederzeit den Richtlinien der Bezirksregierung Köln.

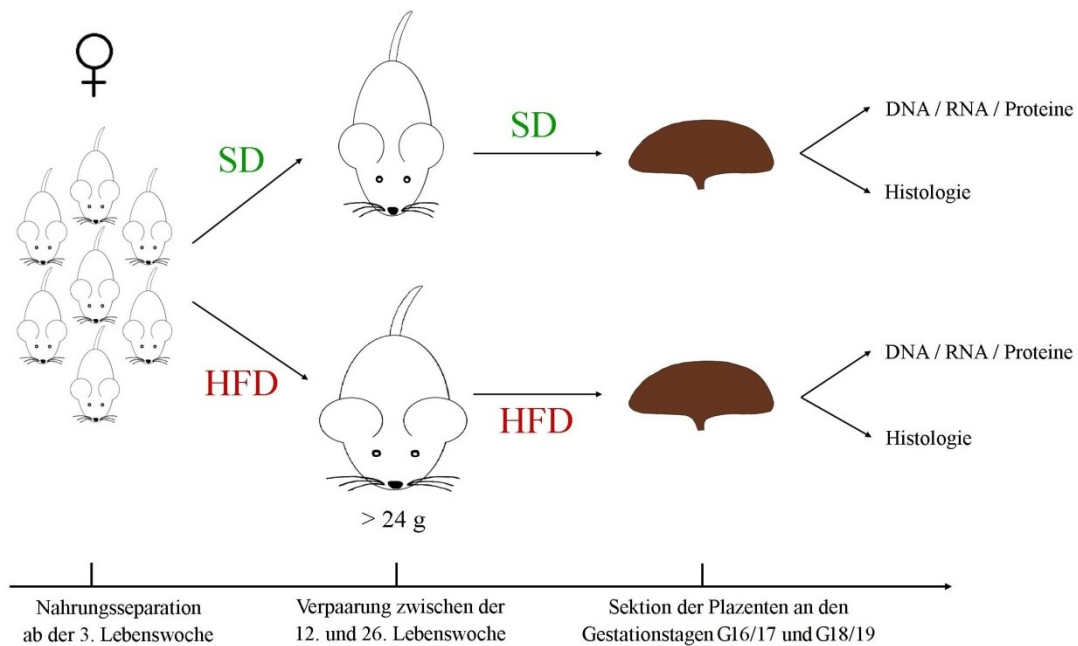


Abbildung 4: Aufbau des Mausmodells

Nach Separation der Mäuse durch eine unterschiedliche Ernährung ab einem Alter von 3 Wochen wurden die weiblichen SD und HFD Tiere zwischen der 12. und 26. Lebenswoche verpaart. An den Gestationstagen G16/17 und G18/19 fand dann die Entnahme der Plazenten und Feten für die verschiedenen Untersuchungen statt. SD: R/M-H, ssniff®-Diät. HFD: Altromin Hochfett-Diät Nr. C 1057 mod.

2.2 Materialien und Geräte

2.2.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller, Sitz
BioRad Gel Doc imaging device	Biometra/Analytic Jena, Jena, Deutschland
Cooling Plate COP 30	Medite, Burgdorf, Deutschland
Dampfgarer 3 216	Braun, Kronenberg/Taunus, Deutschland
Digital monochrome Printer P93DW	Mitsubishi Electric, Senai, Malaysia
Einkanalpipetten Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gelgießstand 40-0911	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat ASP300	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Heizplatte ND-H500	Bartscher, Salzkotten, Deutschland
Laborwaage Sac 51	Scaltec, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer IKA-Combimag Reo	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Mikroskop Dialux 20 EB	Leitz, Stuttgart, Deutschland
Mikrotom Jung Biocut 2035	Leica Instruments, Nussloch, Deutschland
PCR Thermozykler CG1-96	Corbett Research, Sydney, Australien
Pipettierhilfe (Easypet Pipettierhilfe)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Supply PeqPower 300	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Slide Scanner SCN 400	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Thermo Mixer MHR 23	HLC Biotech, Bovenden, Deutschland
Tissue Flotation Bath TFB 55	Medite, Burgdorf, Deutschland
Vortex-Genie 2 G560E	Scientific Industries, Bohemia/New York, USA
Wärmeofen UM 100	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5415 R bzw. 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller, Sitz
5x GoTaq Flexi Puffer M891A	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
AEC Permanent (Kit) ZUC054-200	Zytomed Sytems, Berlin, Deutschland
Agarose-Pulver A9539-500G	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
dNTP Mix 10 mM each R0193	Fermentas/Thermo Fischer Scientific Waltham/Massachusetts, USA

EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Eosin G 0,5 % wässrig X883.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure Rotipuran 100% 3738.4	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol vergällt ≥99,8% K928.4	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung, phosphatgepuffert, Roti-Histofix 4%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gene Ruler 100 bp 0,1 µg/µl SM0243	Fermentas/Thermo Fischer Scientific Waltham/Massachusetts, USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer T865.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff-Wasserstoffperoxid A7641.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid) 25 mM A351H	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
Midori Green Advance MG04	Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Neoclear HX 74276143	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neomount HX 67590961	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)-Pulver L182-50	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
PCNA-Antikörper Mouse monoclonal M0879	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Perjodsäure ≥99% 3257.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K (~600-1000 u/ml, 14-22 mg/ml) # EO 0491	Fermentas/Thermo Fischer Scientific Waltham/Massachusetts, USA
QIAamp DNA FFPE Tissue Ki 56404 - Proteinase K - Buffer ATL (Tissue Lysis Buffer) - Buffer AL (Lysis Buffer AL) - Buffer AW1 (Wash Buffer 1) - Buffer AW2 (Wash Buffer 2)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Salzsäure (HCl) 1N	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schiffs-Reagenz X900.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq Polymerase	Invitrogen, Carlsbad/Kalifornien, USA
Tris Pufferan ≥99,9%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRS (Target Retrieval Solution) -Puffer pH 6 S2369	Dako/Agilent Technologies, Santa Clara/Kalifornien, USA
Tween 20 P1379-500ML	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Xylol Rotipuran ≥99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer anti- Mouse/Rabbit/Rat	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

2.2.3 Puffer und Stammlösungen

Tabelle 5: Puffer und Stammlösungen

Puffer und Stammlösungen	Zusammensetzung
50x TAE Puffer 1000 ml	- 2 M Tris - 1 M Essigsäure - 0,05 M EDTA → mit Essigsäure pH 8,0 einstellen Ad 1000 ml destilliertes Wasser
PBS-Tween20-Lösung 1000 ml	- 9,55 g PBS - 1 ml / 0,1 % Tween20 - 999 ml destilliertes Wasser
Tail Lysis Puffer	- 100 mM Tris - 5 mM EDTA - 200mM NaCl - 0,2 % SDS →pH 8.0 mit HCl einstellen

2.2.4 Primer

Tabelle 6: Primer für die Genotypisierung des Geschlechts (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)

Primer	Sequenz (5'-3')
YMT2/B_for	CTGGAGCTCTACAGTGATGA
YMT2/B_rev	CAGTTACCAATCAACACATCA
ZFX-L	AACATCCTGAACACCTTGCC
ZFX-R	TAGCTTGTGGCTCTCCAGGT

2.3 Molekulargenetische Methoden

2.3.1 DNA-Isolierung

Zur Bestimmung des Geschlechts der Feten wurde im ersten Schritt DNA aus Gewebeproben der knapp 400 zu untersuchenden Plazenten isoliert. Im Folgenden wurden dann geschlechtsspezifische Sequenzen per PCR (Polymerase-Kettenreaktion) vervielfältigt, um diese abschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese zu detektieren. Die Isolierung der DNA aus placentaren Zellen zur Bestimmung des fetalen Geschlechts ist möglich, da die Plazenta überwiegend aus Zellen der Blastozyste gebildet wird. Es war dementsprechend essentiell, dass die

Gewebeteile nicht nur aus der Dezidua, also dem mütterlichen Teil der Plazenta, stammten. Die Isolierung der DNA erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen:

a) Isolierung aus schockgefrorenem Gewebe

Es wurden kleine Stücke der bei -80°C gelagerten Plazenten mit dem Skalpell abgeschnitten und in einer aus $500\ \mu\text{l}$ Tail-Lysis-buffer und $5\ \mu\text{l}$ Proteinkinase K bestehenden Lösung dissoziiert. Die Inkubation fand über Nacht bei 55°C im Heizblock mit leichten Schüttelbewegungen statt. Am Folgetag wurde die gDNA (genomische Deyoxyribonukleinsäure) durch Zugabe von $500\ \mu\text{l}$ Isopropanol gefällt. Anschließend konnte sie durch 15-minütiges Zentrifugieren bei $13.000\ \text{U}/\text{min}$ und 4°C von der restlichen Lösung getrennt werden. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, sodass nur das DNA-Pellet im Eppendorf-Reagenzgefäß verblieb. Durch Zugabe von $500\ \mu\text{l}$ Ethanol (70%, -20°C kalt) wurden die Proben gewaschen und dann erneut zentrifugiert, um die Pellets beim Abpipettieren des Überstands zu erhalten. Die Proben wurden nun mindestens 10 Minuten luftgetrocknet, bis jegliche Flüssigkeit vollständig verdunstet war. Um wieder eine homogene Lösung zu erhalten, wurde den gewonnenen DNA-Proben jeweils $50\ \mu\text{l}$ Wasser (MilliQ) zugefügt und sie wurden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert, bevor sie dann weiter verarbeitet oder bei -20°C eingefroren wurden.

b) Isolierung mittels QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

Da diese Variante sehr aufwändig und teuer ist, kam sie nur in Ausnahmesituationen zum Einsatz. Dies war beispielsweise gegeben, wenn einzelne Proben aufgrund von vorherigen Untersuchungen nicht mehr verfügbar waren, die Bestimmung des Geschlechts der entsprechenden Plazenten aber wichtig für eine sinnvolle Auswertung mit einer adäquaten Probenmenge war.

Anstelle der schockgefrorenen Gewebeproben kamen bei diesem Vorgehen die in Paraffin eingebetteten Plazentahälften zum Einsatz, die sonst für histologische Untersuchungen bestimmt waren. Von den auf -20°C gekühlten Probenblöcken wurden mithilfe des Mikrotoms $5\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte erstellt. Da die Oberfläche zuvor der Luft ausgesetzt war, wurden die äußeren drei Schnitte verworfen und erst die folgenden 8 Schnitte für die Untersuchung herangezogen. Diesen wurde unverzüglich $1\ \text{ml}$ Xylol zugesetzt und es fand eine gründliche Vermischung mittels Vortexen für mindestens 10 Sekunden statt. Durch diesen Arbeitsschritt wurde das Paraffin von den Gewebeproben gelöst. Durch anschließendes Zentrifugieren bei einer Geschwindigkeit von $14.000\ \text{U}/\text{min}$ für 2 Minuten bei 20°C setzte sich das Gewebe am Boden der Röhren ab und der Überschuss konnte vorsichtig abpipettiert werden. Damit alle

Xylolreste von den Proben entfernt wurden, fand eine Waschung mit 1 ml 96% Ethanol durch erneutes Vortexen und anschließendes Zentrifugieren statt. Der Überstand wurde durch Abpipettieren verworfen und verbliebene Ethanolanteile konnten sich durch Lufttrocknung für mindestens 10 Minuten verflüchtigen. Den Proben wurde nun eine Lösung aus 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K zugefügt, um die gDNA aus dem Gewebe zu lösen. Die Inkubationszeit betrug dabei zunächst 60 Minuten bei einer Temperatur von 56°C und dann weitere 60 Minuten bei 90°C. In der zweiten Stunde sorgte der ATL Puffer für die teilweise Rückbildung von Formaldehyd modifizierten Nukleinsäuren. Durch anschließendes Zentrifugieren wurde gewährleistet, dass sich keine Tropfen mehr im Deckel befanden. Den Proben wurde nun eine Lösung aus 200 µl AL Puffer und 200 µl 96% Ethanol zugefügt. Mittels unmittelbarem Vortexen konnte eine homogene Lösung der DNA gewährleistet werden. Um möglicherweise zerstreute Lösungsanteile zu vereinen, wurden die Röhrchen erneut zentrifugiert. Behutsam wurden die gesamten Lösungen in die QIAamp MinElute Säulen übertragen, die wiederum in Sammelröhrchen integriert waren. Zentrifugieren bei 8000 U/min für eine Minute half in diesem Fall, dass der Überschuss durch die Filtermembran der QIAamp MinElute Säule in das zweite Röhrchen gepresst wurde und die DNA frei von Flüssigkeit erhalten blieb. In der Folge wurden die Säulen in saubere Sammelröhrchen eingesetzt, der DNA in zwei separaten Durchläufen erst der AW1- und dann der AW2-Puffer zugesetzt und schließlich der Überstand jeweils durch Zentrifugieren bei 8.000 U/min für eine Minute im Sammelröhrchen aufgefangen und verworfen. Diese Vorgänge dienten dem Waschen der DNA. Um möglicherweise verbliebene flüssige Ethanolreste zu entfernen, die Probleme bei späteren Abläufen hervorrufen könnten, wurden die Säulen mit der enthaltenden DNA abermals bei 14.000 U/min für drei Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde die DNA durch Zugabe von jeweils 60 µl ATE Puffer fünf Minuten lang gelöst, bevor sie durch Zentrifugieren bei 14.000 U/min für eine Minute durch die Filtermembran hindurch im Sammelröhrchen aufgefangen werden konnte. Entweder erfolgte die sofortige Weiterverarbeitung der gewonnen DNA Proben oder sie wurden bei -20°C eingelagert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Im zweiten Versuchsteil zur Bestimmung des Geschlechts der Feten wurden gezielte Gensequenzen der isolierten gDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Das Prinzip beruht auf einer exponentiellen Vermehrung der Sequenzen durch eine zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte mit einer jeweiligen Verdoppelung der Sequenzen. Für den Ablauf werden zwei Primer, eine DNA-Polymerase,

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Mg^{2+} -Ionen und eine Polymerase-spezifische Pufferlösung benötigt. Durch Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf $95^{\circ}C$ zerfallen die Wasserstoffbrückenbindungen und es entstehen Einzelstränge (Denaturierung). Nach Abkühlung auf $58^{\circ}C$ können die 5'-Primer nun an bestimmten Stellen an diese Einzelstränge binden und den Startpunkt für die Polymerase markieren (Annealing). Da die DNA-Stränge in entgegengesetzter Richtung abgelesen werden, wird für jeden Strang ein spezifischer Primer benötigt. Sie definieren somit indirekt den zu vervielfältigenden Bereich und damit die Länge der DNA-Sequenz. Bei einer erneuten Erhöhung der Temperatur auf $72^{\circ}C$ kann die Polymerase optimal die dNTPs - bei den Primern beginnend - an die Einzelstränge anknüpfen und somit wieder eine Doppelhelix erstellen (Elongation). Ab dem dritten Zyklus der PCR werden dann erstmalig DNA-Sequenzen in der gewünschten Länge gebildet, obgleich auch die ursprüngliche DNA weiter als Vorlage für die folgenden Zyklen dient. Bei der abschließenden "finalen Elongation" bei $72^{\circ}C$ werden noch unfertige Sequenzen vervollständigt. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Proben auf $4^{\circ}C$ gekühlt.

Damit Männchen und Weibchen voneinander unterschieden werden konnten, wurde zum einen eine Sequenz gewählt, die auf dem Y-Chromosom liegt und somit nur bei den männlichen Feten vorkommt, und zum anderen kam zur Kontrolle eine auf dem X-Chromosom liegende Sequenz zum Einsatz, die in der DNA beider Geschlechter zu finden ist. Für die Y-Gensequenz wurden die Primer YMT/2b_for und YMT/2b_rev verwendet, die ein PCR-Fragment mit der Länge von 344 Basenpaaren (bp) generierten. Die Primer ZFX-L und ZFX-R erzeugten die 104 bp lange X-Gensequenz. Für die anstehende PCR wurde nun eine Lösung erstellt, die die notwendigen Reagenzien enthielt: $2\ \mu l$ des 5x GoTaq Flexi Reaction Puffers, $1,2\ \mu l$ $MgCl_2$ (25 mM), $0,2\ \mu l$ dNTPs (10 mM pro dNTP), jeweils $0,4\ \mu l$ der vier Primer (alle 10 μM) und $0,1\ \mu l$ Taq Polymerase (5 U/ μl). Der Ansatz wurde mit MilliQ Wasser und $1\ \mu l$ DNA auf ein Volumen von $10\ \mu l$ aufgefüllt. Zur Durchführung der PCR wurden die verschiedenen Proben-Lösungen in den Thermozykler eingesetzt und bei der Initialphase auf $95^{\circ}C$ für 3 min. erhitzt. In den anschließenden 35 Zyklen wurde die DNA mit den folgenden Einzelschritten vervielfältigt: Denaturierung bei $95^{\circ}C$ für 30 sec., Annealing bei $58^{\circ}C$ für 1 min. und Elongation bei $72^{\circ}C$ für ebenfalls 1 min. Abschließend wurde die finale Elongation bei $72^{\circ}C$ für 10 min. durchgeführt, ehe die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei $4^{\circ}C$ gelagert wurden.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Nach erfolgter PCR fand die Auswertung der Proben statt. Dazu mussten die generierten PCR-Fragmente die Agarose-Gelelektrophorese durchlaufen. Hierbei wird ein elektrisches Feld erzeugt, das einen Ionenstrom durch das Agarose-Gel-Bad bewirkt und damit die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle in Richtung des Pluspols durch die Gelporen hindurch wandern lässt. Dabei gelangen kleinere Nukleinsäure-Moleküle mit weniger Basenpaaren schneller durch das Gel als größere, sodass eine Auftrennung nach Fragmentgröße stattfindet. Während der Elektrophorese werden die Proben durch einen DNA-bindenden Farbstoff im Gel eingefärbt, der später unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden kann.

In dieser Studie wurden 1,5 %-ige Agarose-Gele für die Elektrophorese verwendet. Dazu wurden 1,5 g Agarose mit 100 ml 1x TAE-Puffer vermischt und für 3 Minuten in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, damit sich die Agarose komplett löste. Zur Abkühlung und weiteren Durchmischung kam die Lösung für 3-5 Minuten auf einen Magnetrührer und es wurden 10 µl Ethidiumbromid (1 %-ige Stocklösung) hinzugefügt, welches in die DNA interkaliert und zur späteren Detektion der PCR-Fragmente dient. Im Verlauf der Studie wurde das Ethidiumbromid - nach ausgiebiger Testung auf Gleichwertigkeit - durch das weniger giftige Midori green advance ersetzt. Zur 30-minütigen Polymerisation des Gels wurde die Lösung in den Gelgießstand gegeben. Dieser wurde zuvor mit sogenannten "Kämmen" bestückt, die entsprechend der Probenanzahl gewählt wurden. Das polymerisierte Gel wurde in das Elektrophorese-Laufbad überführt und so viel 1x TAE-Puffer hinzugegeben, bis das Gel leicht bedeckt war und sich auch die durch die Kämmen gebildeten Gel-Taschen (Slots) mit Puffer gefüllt hatten. In den ersten Slot wurde 7-10 µl (je nach Taschengröße) des 100 bp Markers pipettiert, der als Abgleich für die zu erwartenden Banden diente. In die weiteren Slots wurden ebenfalls 7-10 µl der DNA-Proben pipettiert, bevor für die Gelelektrophorese eine Spannung von 100 V für 40 Minuten angelegt wurde. Anschließend konnten die entstandenen Banden unter UV-Licht mit einem BioRad-System visualisiert werden. Bei männlichen Plazenten zeigten sich durch die DNA-Fragmente des X- (104 bp) und des Y-Chromosoms (344 bp) zwei Banden innerhalb einer Laufbahn. Aufgrund des nicht vorhandenen Y-Chromosoms wurde bei weiblichen Proben nur eine Bande mit Fragmenten des X-Chromosoms generiert (siehe Abschnitt 3.1.2, Abbildung 6). Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurde der Vorgang wiederholt, beginnend mit einer Repetition der PCR oder teilweise sogar mit einer erneuten Isolierung von plazentarer DNA.

2.4 Histochemie

2.4.1 Vorbereitungen für die Färbung der Plazentaprobe

Nach der Sektion der Muttertiere wurden die Plazenten für die histologischen Untersuchungen konserviert. Zur Fixierung wurden sie zunächst über Nacht in 4%iger phosphatgepufferter Formaldehydlösung eingelegt und anschließend für mindestens 24 Stunden in 70% Isopropanol gelagert. Durch die Denaturierung der Proteine werden dabei die Gewebestrukturen stabilisiert und enzymatische Prozesse gestoppt. Mithilfe des Gewebefiltrationsgeräts wurde den Proben anschließend das Wasser entzogen. Bei der Einbettung der Präparate in Einbettformen konnte dann flüssiges Paraffin in das Gewebe eindringen und es vollständig infiltrieren. Durch langsame Abkühlung auf einer Kühlplatte erstarrte das Paraffin schließlich. Die fertigen Probenblöcke wurden in das Mikrotom eingespannt und es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem Warmwasserbad bei ca. 37°C gestreckt und schließlich auf Objektträger gezogen. Über Nacht fand die Trocknung bei 37°C im Wärmeofen statt. Bis zur Färbung der Schnitte wurden sie bei Raumtemperatur in Objektträgerkästen aufbewahrt.

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung ist eine der am häufigsten angewendeten Färbungen in der Histologie. Dabei färben die Hämalaune - erzeugt durch Oxidation des natürlichen Hämatoxyllins mit anschließender Chelatbildung durch Bindung von Metallionen - saure Strukturen zunächst rötlich-braun, nach Neutralisierung des pH-Wertes durch Spülen mit Leitungswasser dann blau ein. Davon betroffen ist vor allem die DNA in den Zellkernen, die so deutlich sichtbar gemacht wird. Der saure Farbstoff Eosin färbt basische Strukturen wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum oder Kollagen rötlich ein. So entsteht ein guter Kontrast zwischen Cytoplasma und Zellkern. Anwendung fand die HE-Färbung in Verbindung mit der Ausmessung der plazentaren Zonen sowie der Bestimmung der Menge an Glykogenzellen mithilfe der Software Aperio ImageScope (Version v12.3.0.5056).

Zu Beginn einer jeden Färbung mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden sie dreimal für 5 Minuten in Küvetten mit Neoclear gestellt. Bei der anschließenden absteigenden Alkoholreihe mit den Konzentrationen 100%, 96%, 80%,

und 70% mit jeweils 1-minütiger Wirkdauer wurden die Präparate von der fettlöslichen in die wässrige Phase überführt. Abschließend wurden Alkoholreste durch Waschen für eine weitere Minute in destilliertem Wasser entfernt. Für den ersten Teil der Färbung wurden die Präparate für 4-7 Minuten in die Hämalaunlösung sauer nach Mayer eingetaucht, ehe sie unter fließendem Leitungswasser (5 Minuten) "gebläut" wurden. Im zweiten Teil fand die Färbung mit Eosin für mindestens 2 Minuten in einer 0,5-prozentigen Lösung statt. Beide Farbstoffe wurden vor ihrer Anwendung filtriert. Die Schnitte wurden nun durch zweimaliges kurzes Waschen in destilliertem Wasser von überschüssigen Farbstoffen befreit und mithilfe der aufsteigenden Alkoholreihe (Konzentrationen und Dauer wie zu Beginn) entwässert. Vor dem abschließenden Eindeckeln mit NeoMount wurden die Schnitte erneut zweimal für jeweils 5 Minuten mit Neoclear behandelt.

2.4.3 PAS-Färbung

Mit der PAS-Reaktion (periodic acid-Schiff reaction) können Kohlenhydrate wie Glykogen, Cellulose oder Glykoproteine sichtbar gemacht werden. Durch die Perjodsäure werden freie Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen oxidiert, sodass im Folgenden die fuchsin-schwefelige Säure aus dem Schiffs-Reagenz daran binden kann und die Moleküle histologisch magenta-rot erscheinen.

Das primäre Entparaffinieren und Wässern sowie das abschließende Entwässern und Eindeckeln der Präparate erfolgte entsprechend dem Protokoll für die HE-Färbung (s.o.). Die Färbung selbst begann mit einer Bearbeitung der Präparate mit 1%iger Perjodsäure für mindestens 10 Minuten. Es folgte eine Waschung mit Leitungswasser für zweimal 5 Minuten und destilliertem Wasser - ebenfalls zweimal für 2 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für mindestens 10 Minuten in das Schiffs-Reagenz eingetaucht, ehe sie für weitere 5 Minuten zur Inkubation in warmes Leitungswasser in den 42°C warmen Trockenschrank gestellt wurden. Zur Darstellung der Zellkerne fand eine Färbung mit der Hämalaunlösung nach Mayer (wie zuvor beschrieben) statt.

Ursprünglich sollte die PAS-Färbung in Zusammenhang mit der Auswertung der Menge an Glykogenzellen genutzt werden. Allerdings zeigte sich im direkten Vergleich (siehe Anhang, Abbildung A 1), dass die Glykogenzellnester mit der HE-Färbung ebenso gut zu detektieren waren. Folglich fand die PAS-Färbung keine weitere Anwendung und es wurden die bereits vorliegenden HE-gefärbten Schnitte genutzt.

2.4.4 Immunhistologische Färbung von PCNA

Das Prinzip dieser Färbung beruht darauf, dass nur Zellkerne eingefärbt werden, die sich aktiv im Zyklus der Zellteilung befinden. Während der Replikation wird das Protein PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) mit einem Maximum in der S-Phase exprimiert (Morris & Mathews, 1989). Es dient als wichtiger Cofaktor bei der DNA-Synthese und verhindert durch seine Ringklemmstruktur die Dissoziation der DNA-Polymerase vom Leitstrang und erhöht so deren Prozessivität (Strzalka & Ziemienowicz, 2011; Kelman & O'Donnell, 1995). Bei der Färbung bindet ein primärer Antikörper an PCNA, an den wiederum ein sekundärer Antikörper bindet. Dieser ist mit einem Enzym gekoppelt, sodass eine Enzym-Substrat-Reaktion ausgelöst werden kann und ein sichtbarer Farbstoff entsteht.

Zur Vorbereitung wurden die Schnitte dreimal für je 10 Minuten mit Neoclear entparaffiniert und durch die folgende absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% - jeweils eine Minute) gewässert. Es folgte eine 1-minütige Waschung mit destilliertem Wasser. Zur leichteren, präziseren Bindung des primären Antikörpers wurden die Präparate in einfachem TRS-Puffer mit pH-Wert 6 für 25 Minuten im Dampfgarer gekocht und anschließend etwa 30 Minuten langsam abgekühlt. Anschließend wurden die Gewebeproben mit dem PapPen Fettstift umrandet und für 10 Minuten mit einer 3 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung bearbeitet. Dieser als "Peroxidase-Block" bezeichnete Schritt verhindert eine unspezifische Färbung von Erythrozyten. Die Schnitte wurden kurz mit einer Lösung aus 1x PBS und 0,1 % Tween20 gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (DakoCytomation, M0878 - Verdünnung 1:1000 mit PBS+Tween20) in der Feuchtekammer inkubiert. Zur Negativkontrolle wurde eine Probe mit reiner PBS-Tween20-Lösung ohne Primär-Antikörper beträufelt. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal für 5 Minuten mit der PBS-Tween20-Lösung gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper (CytoChem Plus HRP One-Step Polymer) auf die Schnitte aufgetragen wurde und für 30 Minuten in der Feuchtekammer inkubiert. Eine erneute Waschung mit der PBS-Tween20-Lösung für dreimal 5 Minuten war obligatorisch. Nun wurde die Enzym-Substrat-Reaktion zur rot-bräunlichen Färbung des PCNA-Proteins durch Auftragen der AEC Permanent Lösung hervorgerufen. Von großer Bedeutung war es dabei, dass die Inkubationszeit (5 Minuten) bei jeder Gewebeprobe möglichst identisch war, damit eine vergleichbare Färbeintensität der Schnitte resultierte. Die Reaktion wurde durch kurzes Waschen in destilliertem Wasser gestoppt. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils proliferierender Zellen wurden alle weiteren Zellkerne mit der Hämatoxylin-Färbung (s.o.) kenntlich gemacht. Beim Entwässern mit der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte nur jeweils kurz in

den verschiedenen Konzentration gewaschen, damit es nicht zu einer Entfärbung kam. Lediglich mit 100% Ethanol wurde 90 Sekunden lang gewaschen. Vor dem finalen Eindeckeln mit Neomount wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten in Küvetten mit Neoclear gestellt. Zur Auswertung wurden die Schnitte via dem Leica Slide Scanner in 40-facher Vergrößerung digitalisiert und die Zellkerne in drei zufällig gewählten Bereichen (Mitte, Rand, Zwischenbereich der Plazenta) mittels Aperio ImageScope detektiert und ausgezählt.

2.5 Statistik

Vor der Auswertung der gewonnenen Datenreihen wurde der Grubbs-Test angewendet, um signifikante Ausreißer zu detektieren und zu eliminieren. Dadurch konnte eine homogenere und damit verbesserte Datengrundlage erzielt werden. Als Werkzeug wurde der online verfügbare Grubbs-Test von Graphpad mit dem standardmäßigen Signifikanzlevel $\alpha=0,05$ verwendet (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>).

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Software Graphpad Prism 7 eingesetzt. Lag nach D'Agostino und Pearson eine Normalverteilung der Daten vor, wurde zur Auswertung der Students t-Test herangezogen. War die Normalverteilung nicht gegeben oder war die Datenmenge für den Test nach D'Agostino und Pearson zu gering ($n < 8$), kam der Mann-Whitney Test zum Einsatz. Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen wurden durch den p-Wert ermittelt, dessen Signifikanzniveau mit $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$ und $p \leq 0,0001 = ****$ festgelegt wurde. Bei allen Auswertungen sind die Ergebnisse als Mittelwert (mean) + Standardfehler (SEM) angegeben. Ob sie sich auf die gesamte Probenzahl einer Untersuchungsgruppe oder auf den Mittelwert pro Wurf beziehen, wird in den jeweiligen Versuchsreihen vermerkt.

3 Ergebnisse

Als Grundlage für die in dieser Arbeit getätigten Untersuchungen diente eine frühere Dissertationsschrift (Storck, S., 2014). Dabei wurden bereits verschiedene plazentare Aspekte bei Vorliegen einer maternalen Adipositas anhand des Mausmodells an dem Gestationstag G18/19 untersucht. Die für diese Studie relevanten Ergebnisse zeigten bei geringerer Probenmenge ein verringertes Plazentengewicht. Als mögliche Ursache wurde ein mittels Western Blot detektiertes erniedrigtes PCNA-Proteinlevel und somit eine verminderte Proliferation diskutiert. Außerdem wurden bereits Untersuchungen bezüglich der Faktoren Akt und ERK1/2 getätigt, die Bedeutung für Wachstum und Proliferation haben. Allerdings zeigten diese keine signifikanten Abweichungen.

Für die gesamte Auswertung dieser Studie gilt zu beachten, dass die Sektion der meisten Muttertiere an den Gestationstagen G16 und G19 stattfand. Einzelne Tiere wurden allerdings an den Tagen G17 oder G18 sezirt und den angrenzenden Gestationstagen zugeordnet. Zur leichteren Verständlichkeit bzw. zur besseren Übersichtlichkeit ist die Rede alleinig von „G16“ und „G19“.

3.1 Die Gewichte von Feten und Plazenten

Als mögliche Ursache für eine intrauterine Wachstumsrestriktion wird eine plazentare Dysfunktion bei adipösen Müttern diskutiert. Neben einem anormalen Wachstum der Feten könnte demnach auch das Gewicht der Plazenten verändert sein.

Aufbauend auf vorangegangenen Experimenten im Rahmen des Mausmodells sollte gezeigt werden, dass sich das beschriebene geringere Gewicht männlicher Feten von HFD Müttern am Tag nach der Geburt (postnataler Tag P1) bereits in utero an den Gestationstagen G16 und G19 widerspiegelt (Janoschek u. a. 2016). Die anfänglich erhobenen Daten mit weniger Versuchstieren (G16: SD=32, HFD=58; G19: SD=36, HFD=41; jeweils 5 Muttertiere) aus demselben Tierstamm (C57BL/6N) zeigten, dass die Nachkommen übergewichtiger Mütter im Durchschnitt tatsächlich leichter waren, als die der Kontrollgruppe. Dieser Effekt war an Tag G19 stärker ausgeprägt (p-Wert ***) als an Tag G16 (p-Wert **). Parallel zum Fetengewicht wurde auch das Gewicht der Plazenten untersucht, welches lediglich an G19 bei den adipösen Muttertieren signifikant reduziert war (p-Wert *).

Die Mauskohorte wurde erweitert und es erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine erneute Auswertung der Daten. Dabei sollten die zuvor ermittelten Ergebnisse bestätigt und geschlechtsspezifische Unterschiede herausgestellt werden. Zur Auswertung wurden nur Würfe herangezogen, deren Größe mindestens fünf lebensfähige Nachkommen betrug.

3.1.1 Gewichte aller Fetten und Plazenten

Die Auswertung der neu gewonnenen Datenmenge konnte die früheren Ergebnisse nicht bestätigen. An Tag G16 war das Gewicht der HFD Fetten zwar signifikant geringer (p-Wert ****) als das der SD Fetten, allerdings konnte dieser Unterschied an G19 nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegenteil, die Gewichte beider Gruppen hatten sich nahezu angeglichen (Abbildung 5a).

Bei dem Gewicht der Plazenten war an beiden Gestationstagen kein signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe aufzufinden. Allerdings war für beide Gruppen eine signifikante Reduktion (p-Wert ****) des Plazentengewichts zwischen G16 und G19 zu beobachten (Abbildung 5b).

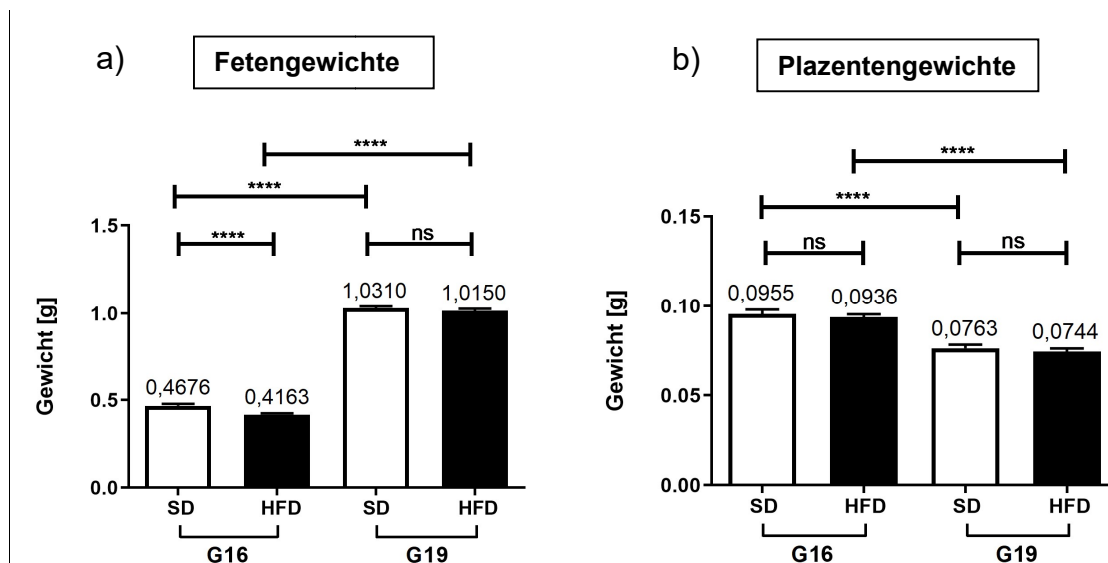


Abbildung 5: Gewichte aller Fetten und Plazenten

Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert der Gewichte (Gesamtgewicht/Anzahl der Proben) von SD und HFD Fetten (a) bzw. Plazenten (b) an den Gestationstagen G16 und G19 in Gramm [g]. a): Anzahl der Fetten (Mütter): SD G16 n=110 (15); HFD G16 n=165 (22); SD G19 n=99 (12); HFD G19 n=101 (13). b): Anzahl der Plazenten (Mütter): SD G16 n=66 (13); HFD G16 n=110 (21); SD G19 n=67 (12); HFD G19 n=67 (12). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Students t-Tests bzw. des Mann-Whitney Tests ermittelt. p-Wert* ≤ 0,05; p-Wert** ≤ 0,01; p-Wert*** ≤ 0,001; p-Wert**** ≤ 0,0001; ns = nicht signifikant. SD = normalgewichtige Mütter; HFD = übergewichtige Mütter. Da bei einigen Fetten nicht das Gewicht der entsprechenden Plazenten bestimmt wurde, ist die Probenmenge bei den Plazentengewichten deutlich geringer.

3.1.2 Gewichte männlicher und weiblicher Feten und Plazenten

Zunächst wurde für alle vorliegenden Plazentagewebe-Proben mittels DNA-Isolierung, anschließender PCR von geschlechtsspezifischen DNA-Sequenzen und abschließender Agarose-Gelelektrophorese das Geschlecht bestimmt. Die Daten konnten dann erneut für Männchen und Weibchen getrennt ausgewertet werden. Ein repräsentatives Agarosegel wird in Abbildung 6 dargestellt.

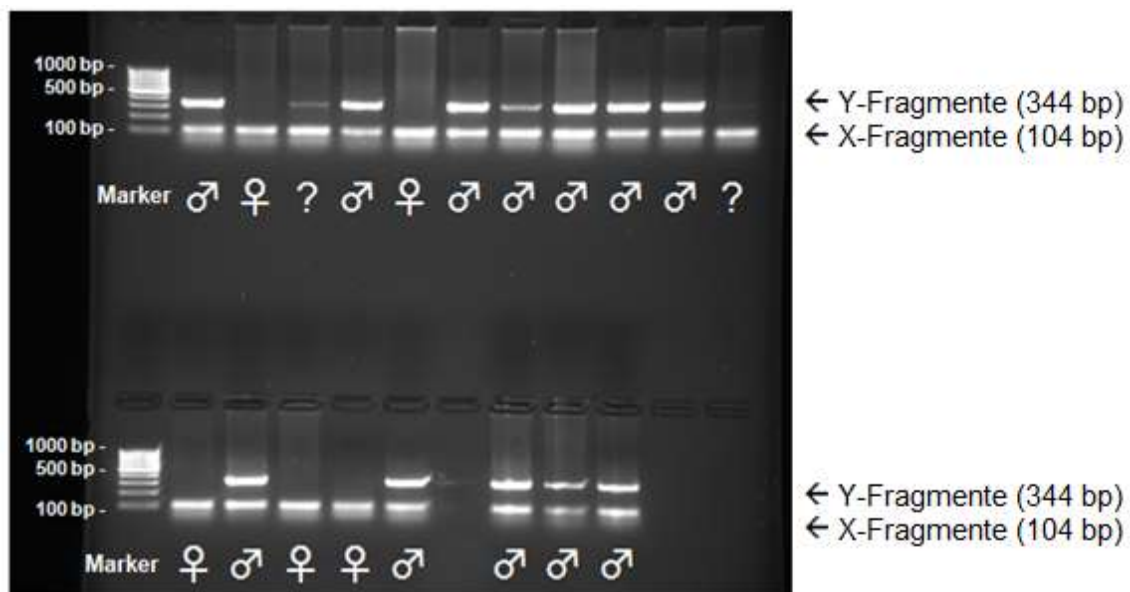


Abbildung 6: Agarose-Gelelektrophorese zur placentaren Geschlechtsbestimmung

Abgebildet sind zwei Lauffronten. Jeweils im linken Slot sind im Abstand von 100 Basenpaaren die Banden des Markers zu erkennen. Slots mit 2 sichtbaren Banden stehen für männliche Plazenten (344 bp = Fragment des Y-Chromosoms, 104 bp = Fragment des X-Chromosoms), Slots mit einer Bande stehen für weibliche Plazenten (104 bp = Fragment des X-Chromosoms). Proben mit nicht eindeutigen Banden sind mit einem Fragezeichen markiert.

Bei der isolierten Betrachtung von Männchen und Weibchen zeigte sich, dass das bereits für alle Feten nachgewiesene niedrigere Gewicht der HFD Feten an G16 bei den Weibchen stärker ausgeprägt ist (p-Wert ***) als bei den Männchen (p-Wert *; Abbildung 7a+b). An G19 konnten für beide Geschlechter keine signifikanten Unterschiede zwischen SD und HFD nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

Die Ergebnisse für die Gewichte der Plazenten waren bei beiden Geschlechtern identisch zu den zuvor ermittelten Ergebnissen für alle Plazenten (ohne Abbildung).

Bei dem anschließenden direkten Vergleich von männlichen und weiblichen Fetengewichten ergab sich der einzige signifikante Unterschied an Gestationstag G19 (Abbildung 7c), an dem die Weibchen beider Versuchsgruppen leichter als die Männchen waren (SD p-Wert **; HFD p-Wert ***). An G16 konnten keine Unterschiede

zwischen männlichen und weiblichen Fetten festgestellt werden. Das galt ebenfalls für die Plazentengewichte an G16 und G19, die nahezu identisch waren (ohne Abbildung).

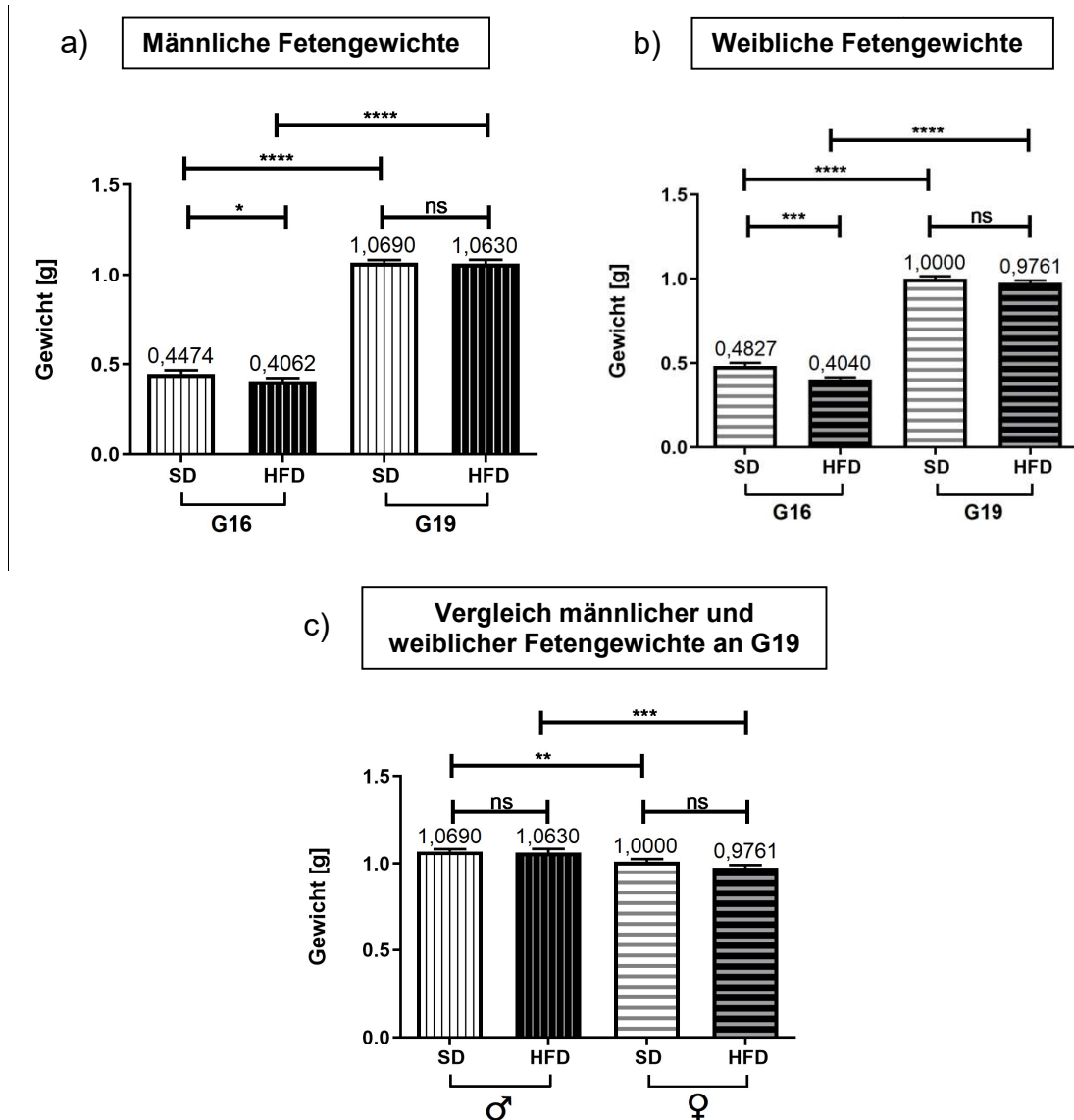


Abbildung 7: Vergleich männlicher und weiblicher Fetengewichte

Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert der Gewichte (Gesamtgewicht/Anzahl der Proben) in Gramm [g]. Abb. a) "männliche Fetten" und b) "weibliche Fetten" zeigen einen für jedes Geschlecht isolierten Vergleich zwischen SD und HFD Fetten an den Gestationstagen G16 und G19. Abb. c) zeigt den direkten Vergleich zwischen männlichen und weiblichen SD und HFD Fetten an G19. Längsstreifung = männliche Fetten; Querstreifung = weibliche Fetten. a): Anzahl der männlichen Fetten (Mütter): SD G16 n=40 (12); HFD G16 n=45 (17); SD G19 n=47 (11); HFD G19 n=35 (13). b): Anzahl der weiblichen Fetten (Mütter): SD G16 n=38 (11); HFD G16 n=84 (18); SD G19 n=41 (10); HFD G19 n=59 (12). c): Die Anzahl der Fetten und Mütter entspricht den Angaben von Abb. a+b) an G19. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Students t-Tests bzw. des Mann-Whitney Tests ermittelt. p-Wert* $\leq 0,05$; p-Wert** $\leq 0,01$; p-Wert*** $\leq 0,001$; p-Wert**** $\leq 0,0001$; ns = nicht signifikant. SD = normalgewichtige Mütter; HFD = übergewichtige Mütter.

Vier HFD Würfe an G16, bei denen keine Proben für die DNA-Isolierung vorlagen (=keine Geschlechtsbestimmung), wiesen auffällig hohe Gewichtswerte auf. Deshalb ist das Durchschnittsgewicht aller HFD Fetten an G16 (s.o.) höher als das der männlichen und weiblichen HFD Fetten an G16 und stellt nicht wie erwartet einen Mittelwert dar.

3.1.3 Plazentaeffizienz, Geschlechterverteilung, Wurfgröße und Resorptionsquote

Anhand der vorliegenden Daten wurden weitere Untersuchungen getätigt, die Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe hinsichtlich Plazentaeffizienz, Geschlechterverteilung, Wurfgröße und Resorptionsquote darlegen sollten (siehe Tabelle 7). Bezüglich der Plazentaeffizienz wurden auch hier ausschließlich die Würfe einbezogen, bei denen die Anzahl an lebensfähigen Nachkommen mindestens fünf betrug.

a)

		G16		
		SD	HFD	p-Wert
Plazentaeffizienz (Fetus [g] / Plazenta [g])	gesamt	5,264 ± 0,265 n=65	4,569 ± 0,125 n=103	* 0,0433
	männlich	5,181 ± 0,536 n=23	4,471 ± 0,225 n=29	n.s. 0,7562
	weiblich	5,487 ± 0,652 n=16	4,680 ± 0,181 n=52	n.s. 0,4177
Männliche Geburtenrate		0,408 ± 0,108 n=6	0,363 ± 0,060 n=7	n.s. >0,9999
Wurfgröße		7,368 ± 0,618 n=19	8,417 ± 0,340 n=24	n.s. 0,1245
Resorptionsquote		0,041 ± 0,017 n=18	0,064 ± 0,025 n=23	n.s. 0,8831

b)

		G19		
		SD	HFD	p-Wert
Plazentaeffizienz (Fetus [g] / Plazenta [g])	gesamt	14,170 ± 0,401 n=67	14,160 ± 0,477 n=67	n.s. 0,5492
	männlich	14,300 ± 0,517 n=36	13,600 ± 0,819 n=22	n.s. 0,2346
	weiblich	14,180 ± 0,665 n=29	13,730 ± 0,568 n=39	n.s. 0,3612
Männliche Geburtenrate		0,493 ± 0,105 n=8	0,390 ± 0,106 n=4	n.s. 0,6101
Wurfgröße		7,929 ± 0,691 n=14	7,412 ± 0,613 n=17	n.s. 0,5792
Resorptionsquote		0,042 ± 0,025 n=13	0,095 ± 0,038 n=16	n.s. 0,2627

Tabelle 7: Plazentaeffizienz, Geschlechterverteilung, Wurfgröße und Resorptionsquote
Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler an den Gestationstagen G16 (a) und G19 (b). Während sich die Angaben zur Plazentaeffizienz auf die Mittelwerte aller Plazenten beziehen, stellen die Daten zur männlichen Geburtenrate und zur Resorptionsquote einen Mittelwert pro Wurf dar. n = Anzahl der Plazenten (Plazentaeffizienz) bzw. Würfe (männliche Geburtenrate, Wurfgröße, Resorptionsquote). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Students t-Tests bzw. des Mann-Whitney Tests ermittelt. p-Wert* ≤ 0,05; p-Wert** ≤ 0,01; p-Wert*** ≤ 0,001; p-Wert**** ≤ 0,0001; n.s. = nicht signifikant. SD = normalgewichtige Mütter; HFD = übergewichtige Mütter.

Plazentaeffizienz

Bei der Plazentaeffizienz wurde das Gewicht der Feten in Relation zum jeweiligen Plazentagewicht gesetzt. Je größer der Wert ist, desto höher ist die Effizienz der Plazenta. Bei der geschlechtsunabhängigen Auswertung konnte zwar an G16 eine signifikant höhere Effizienz bei der SD-Gruppe festgestellt werden, an G19 war diese Divergenz allerdings nicht mehr existent und die Werte annähernd identisch (Tabelle 7).

Die anschließende Aufteilung nach Männchen und Weibchen konnte lediglich eine Tendenz an beiden Gestationstagen nachweisen, dass die jeweiligen SD-Plazenten effizienter waren als die HFD-Plazenten. Allerdings war die Probenmenge hier relativ gering, da zum einen nicht alle Feten- und Plazentengewichte vorlagen und zum anderen nicht alle Geschlechter bestimmt werden konnten. Folglich sind die Ergebnisse wenig aussagekräftig.

Geschlechterverteilung der Feten

Die Fragestellung bei dieser Untersuchung lautete, ob es eine Andersverteilung von männlichen und weiblichen Nachkommen gibt, wenn die Mütter übergewichtig sind. Bei der Auswertung wurde dafür die Quote männlicher Nachkommen pro Wurf bestimmt und anschließend ein Mittelwert aller Würfe gebildet. Da ausschließlich Würfe herangezogen wurden, bei denen alle Geschlechter bestimmt werden konnten und keine Resorptionen vorlagen, war die verbleibende Probenmenge sehr gering. Letztendlich war an keinem der beiden Gestationstage ein signifikanter Unterschied festzustellen (Tabelle 7). An G16 waren männliche Nachkommen mit einem Anteil von 40,8 % (SD) bzw. 36,3 % (HFD) generell geringer vertreten als weibliche Nachkommen. An G19 war eine Tendenz dahingehend zu erkennen, dass der Anteil männlicher Nachkommen bei den HFD Tieren mit nur 39 % deutlich geringer war, als der der SD Tiere mit etwa ausgeglichenem Geschlechterverhältnis (49,3 %). Durch eine große Varianz der Verteilung innerhalb der einzelnen Würfe in Verbindung mit der geringen Probenmenge ist die Bedeutung dieses Ergebnisses in Frage zu stellen.

Eine weitere Auswertung, bei der auch die Würfe einbezogen wurden, bei denen nicht alle Geschlechter bestimmt werden konnten oder Resorptionen vorlagen, zeigte durch eine Erhöhung der Probenmenge eine deutliche Verschiebung der Ergebnisse bezüglich männlicher Nachkommen (G16: SD=48,6% (n=14), HFD=33,6% (n=18); G19: SD=49,2% (n=13), HFD=37,1% (n=13) - ohne Tabelle). Nicht bestimmbare oder resorbierte Nachkommen wurden dabei so behandelt, als wären sie nicht existent.

Auch wenn dieses Vorgehen nicht regulär ist, so weist das Ergebnis doch darauf hin, dass letztlich eine deutlich höhere Probenmenge für eine sinnvolle Auswertung erforderlich wäre.

Wurfgröße

Weder an G16 noch an G19 waren relevante Unterschiede in der Wurfgröße zwischen SD und HFD Müttern festzustellen (Tabelle 7). Die Anzahl an Nachkommen (resorbierte Feten eingeschlossen) lag an G16 bei durchschnittlich 7,4 (SD) bzw. 8,4 (HFD) und an G19 bei 7,9 (SD) bzw. 7,4 (HFD). Da die Standardabweichung relativ hoch und die Probenmenge zudem gering war, wurde auf eine separate Auswertung von Männchen und Weibchen verzichtet.

Resorptionsquote

Zunächst wurde die Resorptionsquote pro Wurf bestimmt, um daraus anschließend einen Mittelwert für die gesamte Versuchsgruppe zu bilden. Ähnlich wie bei der Wurfgröße lagen die Ergebnisse von Test- und Kontrollgruppe bei der Resorptionsquote an beiden Gestationstagen aufgrund einer hohen Standardabweichung und einer geringen Probenmenge zu nah beieinander, als dass signifikante Unterschiede festzustellen wären (Tabelle 7). Während die Werte bei den SD Tieren zu beiden Untersuchungszeitpunkten in ähnlichem Maße niedriger ausfielen (G16=4,1%, G19=4,2%), war bei den HFD Müttern an G16 tendenziell eine höhere Resorptionsquote zu beobachten, die an G19 sogar noch einmal anstieg (G16=6,4%, G19=9,5%). Aufgrund der beschriebenen Datenlage wurde auch hier keine geschlechtsspezifische Untersuchung vorgenommen.

3.2 Proliferation und Wachstum in der Plazenta

Die Proliferationsrate der plazentaren Zellen hat maßgeblichen Einfluss auf das Wachstum und damit die Größe der Plazenta. Da zu Beginn der Studie angenommen wurde, dass die Plazentafunktion und -größe durch ein Übergewicht der Mutter negativ beeinflusst wird (siehe 1.1.3), sollte neben dem Gewicht der Plazenta (siehe 3.1) auch die Proliferationsrate mittels histologischer Analyse (immunohistochemische PCNA-Färbung) untersucht und geschlechtsspezifische Unterschiede bei den Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Insulin-, IGF-1- und IGF-2-Rezeptoren) sowie deren Faktoren der nachgeschalteten Signalkaskade (Akt und ERK1/2) dargestellt werden.

Die Rezeptoren und ihre untergeordneten Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation und damit dem Wachstum der Plazenta sowie bei der Energiespeicherung durch Umsetzung von Glukose zu Glykogen (Hill et al., 1998; Hiden et al., 2009). Das Vorkommen von Glykogen in der Plazenta ist Gegenstand dieser Studie in Abschnitt 3.4.

3.2.1 Proliferation im Labyrinth und Spongiotrophoblast

Eine frühere Untersuchung (Storck, S., 2014) hatte ergeben, dass die Proliferation in den Plazenten von übergewichtigen Müttern an G19 signifikant vermindert ist. Dazu wurde eine Proteinlysate der gesamten Plazenta erstellt und nach erfolgtem Western Blot eine densitometrische Bestimmung der Proteinmenge des Proliferationsmarkers PCNA im Vergleich zu HPRT vorgenommen. Mit weiteren Untersuchungen sollte dieses Ergebnis zum einen verifiziert und zum anderen eine mögliche Abweichung auch an G16 herausgestellt werden. Außerdem war von Interesse, in welchen plazentaren Arealen die Proliferation vermindert ist. Für diese Fragestellungen wurde eine immunhistologische Färbung von PCNA vorgenommen. PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) ist ein Protein, das während der Zellteilung im Zellkern exprimiert wird und sein Maximum während der S-Phase der Replikation erreicht (Morris & Mathews, 1989). Durch die Färbung von PCNA werden also Zellen kenntlich gemacht, die sich im Stadium der Teilung befinden (positive Zellkerne). Als Gegenfärbung diente Hämatoxilin zur Detektion der restlichen Zellkerne (negative Zellkerne).

Nach der Digitalisierung der Präparate via dem Leica Slide Scanner wurden jeweils drei Bereiche im Labyrinth und im Spongiotrophoblast zufällig ausgewählt, die sich im Präparat in etwa mittig, im Randbereich und dazwischen befanden. In den Arealen wurden sowohl positiv als auch negativ gefärbte Zellen mit Hilfe der Software Aperio ImageScope manuell detektiert und ausgezählt (Abbildung 8 a). Da sich die Dezidua bei der Präparation der Plazenten häufig teilweise oder ganz abgelöst hatte, wurden nur die vollständig dargestellten Schichten von Labyrinth und Spongiotrophoblast analysiert.

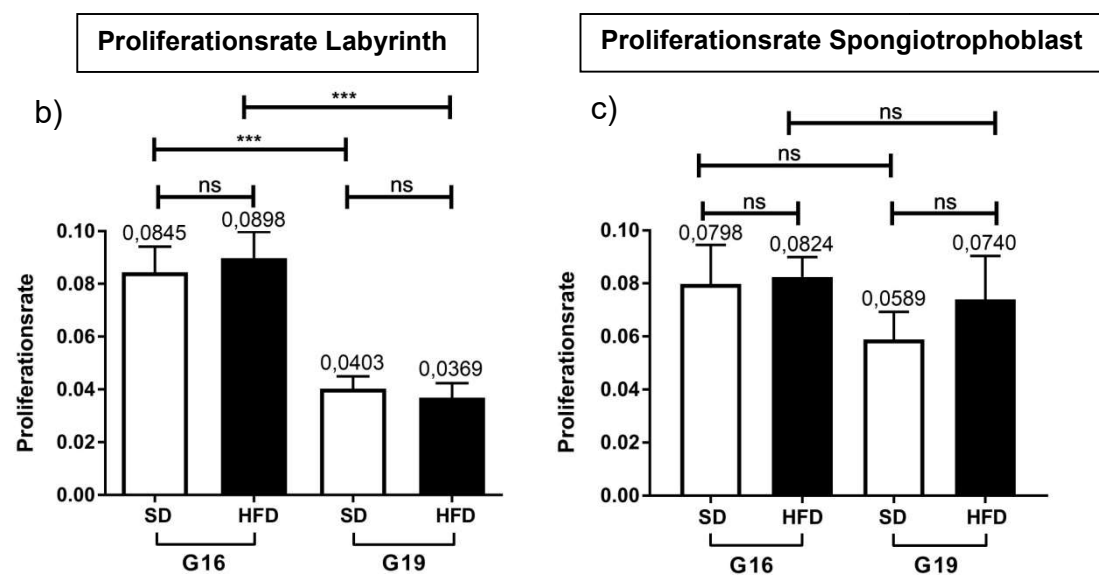
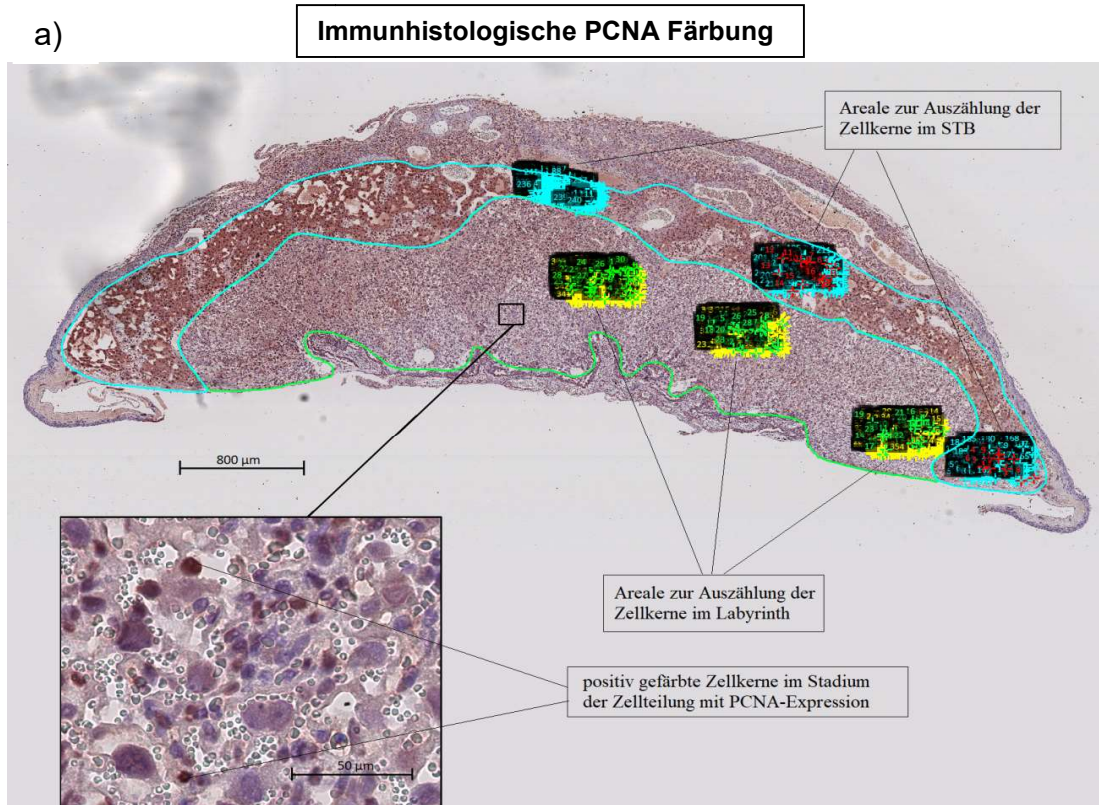


Abbildung 8: Bestimmung der Proliferationsrate in Labyrinth und Spongiotrophoblast

a): Übersicht einer Plazenta auf Nabelschnurebene mit jeweils drei Auszählungsarealen in Labyrinth und Spongiotrophoblast nach PCNA Färbung. In der Ausschnittsvergrößerung unten links sind exemplarisch zwei positiv gefärbte Zellkerne dargestellt.

b+c): Dargestellt ist die durchschnittliche Proliferationsrate (PCNA pos/Gesamtkerne) in Labyrinth (b) und Spongiotrophoblast (c) an den Gestationstagen G16 und G19 von SD und HFD Plazenten. Dazu wurde zunächst der Mittelwert der 3 Auszählungsareale pro Plazenta bestimmt. Anschließend wurde daraus ein Mittelwert für alle Plazenten errechnet. Anzahl der Plazenten (Mütter) für b+c): SD G16 n=10 (10), HFD G16 n=9 (9), SD G19 n=10 (8), HFD G19 n=10 (10). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Students t-Tests bzw. des Mann-Whitney Tests ermittelt. p-Wert* ≤ 0,05; p-Wert** ≤ 0,01; p-Wert*** ≤ 0,001; p-Wert**** ≤ 0,0001; ns = nicht signifikant. SD = normalgewichtige Mütter; HFD = übergewichtige Mütter.

Die histologische Auswertung konnte die durch Western Blot ermittelten Ergebnisse mit einer verminderten Proliferationsrate bei HFD Plazenten an G19 (Storck, S., 2014) nicht bestätigen. Tendenziell war sie sogar leicht erhöht. An beiden Gestationstagen wiesen weder Labyrinth noch Spongiotrophoblast signifikante Unterschiede zwischen SD und HFD Plazenten auf. Bemerkenswert ist allerdings die deutliche Abnahme an proliferierenden Zellen um circa 50 Prozent innerhalb des Labyrinths zwischen G16 und G19 bei beiden Gruppen (Abbildung 8 b+c).

Die geringe Probenmenge und ein ungünstiges Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Plazenten ließ eine geschlechtsspezifische Auswertung nicht zu.

Eine Analyse der verschiedenen Areale innerhalb der beiden Plazentaschichten sollte zeigen, ob Unterschiede bezüglich der Quote proliferierender Zellen und ihrer Orientierung in der jeweiligen Zone (randständig bis zentral) vorzufinden sind. Wie Tabelle 8 zeigt, ist dahingehend kein Muster zu erkennen.

	Labyrinth			Spongiotrophoblast		
	Zentrum	Zwischenbereich	Rand	Zentrum	Zwischenbereich	Rand
SD G16	9,2%	8,2%	8,0%	10,1%	6,7%	6,2%
HFD G16	10,6%	8,4%	8,0%	7,5%	7,8%	9,5%
SD G19	3,7%	3,8%	4,5%	4,9%	3,6%	8,4%
HFD G19	2,8%	4,2%	3,8%	6,8%	6,2%	9,2%

Tabelle 8: Proliferationsrate in den verschiedenen Arealen der Plazenten

3.2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei proliferationsrelevanten Rezeptoren und Faktoren der angesteuerten Signalkaskade

Neben PCNA als Proliferationsmarker sollten außerdem die Wachstumsfaktor-Rezeptoren von Insulin, IGF-1 und IGF-2 sowie die Aktivität der nachgeschalteten Proteinkinasen Akt und ERK1/2 (p44/p42) der folgenden Signaltransduktion (siehe 1.4) hinsichtlich geschlechtsspezifischer Parameter untersucht werden. Die bereits erstellten Western Blots von PCNA sowie der Ins-R, IGF-1R und IGF-2R hatten bereits unabhängig vom Geschlecht der Nachkommen ein niedrigeres Proteinlevel und eine mutmaßlich damit einhergehende verminderte Proliferation bei HFD Plazenten an G19 detektiert. Und auch an G16 war zumindest das Proteinlevel des Ins-R bei den HFD Plazenten vermindert (Appel et al., 2019). Bezüglich der beiden Faktoren Akt und ERK1/2 konnten bei einer Vorstudie (Storck, S., 2014) hingegen keine signifikanten Veränderungen bei der Testgruppe an G19 detektiert werden. Eine Abweichung, die nur ein Geschlecht betrifft wäre dennoch möglich und sollte daher evaluiert werden.

Für die Auswertung wurden die vorliegenden Western Blots - wie in Abbildung 9 am Beispiel von PCNA an G19 dargestellt - nach Männchen und Weibchen separiert und einzeln neu bewertet. Dazu wurden die Ergebnisse von der Geschlechtsbestimmung der Plazenten genutzt, die durch das in 2.3.1 - 2.3.3 geschilderte Verfahren gewonnenen wurden.

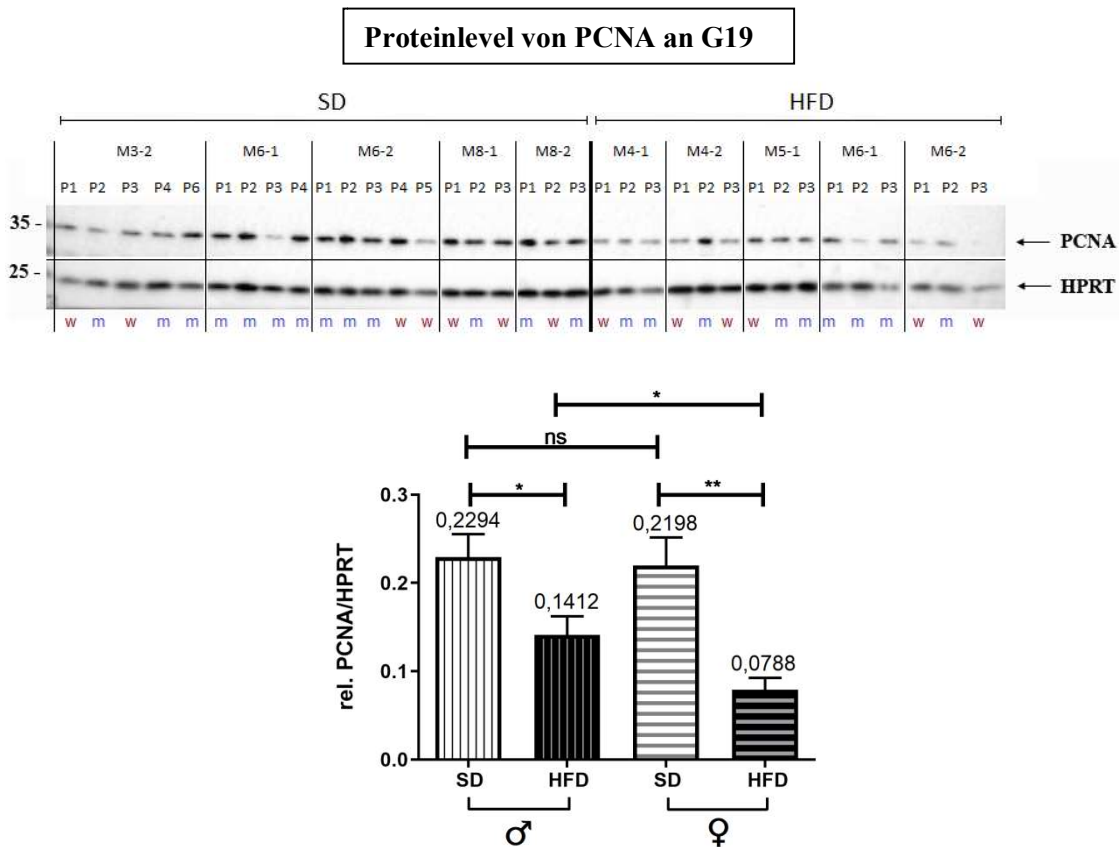


Abbildung 9: Geschlechtsspezifische relative Proteinlevel von PCNA an G19

Die Plazenten von SD und HFD Müttern wurden an G19 entnommen. **Oben:** Die relative Proteinmenge von PCNA wurde mittels Western Blot im Verhältnis zu HPRT als Abgleichgen ermittelt und die Intensität der Proteinbanden densitometrisch bestimmt (Appel et al., 2019). Anschließend wurde den Plazenten (P) das im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Geschlecht (m/w) zugeordnet und die verschiedenen Muttertiere (M) durch vertikale Linien abgegrenzt. **Unten:** Die statistische Auswertung der Ergebnisse mittels GraphPad wurde für beide Geschlechter in einem Säulendiagramm graphisch mit Mittelwerten dargestellt. Längsstreifung = männliche Feten; Querstreifung = weibliche Feten. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Students t-Tests bzw. des Mann-Whitney Tests ermittelt. p-Wert* $\leq 0,05$; p-Wert** $\leq 0,01$; p-Wert*** $\leq 0,001$; p-Wert**** $\leq 0,0001$; ns = nicht signifikant. SD = normalgewichtige Mütter; HFD = übergewichtige Mütter.

Die Ergebnisse der Western Blot Analyse sind unterteilt nach Geschlecht und Test- bzw. Kontrollgruppe in den unten folgenden Tabellen getrennt für beide Gestationstage (Tabelle 9 a+b) aufgeführt. Eine geringe Probenmenge kombiniert mit einer zumeist großen Varianz der Ergebnisse und einem zum Teil hohen Standardfehler führen zu

kaum signifikanten Unterschieden zwischen den Geschlechtern. So fällt es sogar schwer von Tendenzen zu sprechen. Wenn doch Abweichungen vorlagen, dann stets nur an einem der beiden Gestationstage und auch nur in einem Fall (PCNA G19) die HFD Gruppe betreffend. Ansonsten konnten für beide Geschlechter die zuvor beschriebenen Ergebnisse hinsichtlich der Test- und Kontrollgruppe in abgeschwächter Weise bestätigt werden. Eine Ausnahme bildet dabei die aktive Form von ERK1 (p-p44/p44) an G19 mit einem signifikant reduzierten Proteinlevel in den Plazenten der SD Männchen.

a)		G16		
		männlich	weiblich	p-Wert
PCNA (PCNA/HPRT)	SD	0,8520 ± 0,1231 n=8	0,7290 ± 0,2100 n=5	n.s. 0,5237
	HFD	0,7306 ± 0,1367 n=7	1,006 ± 0,1871 n=9	n.s. 0,3510
	p-Wert	n.s. 0,4634	n.s. 0,4376	
Ins-R (Ins-R/HPRT)	SD	0,5182 ± 0,0345 n=8	0,4509 ± 0,0907 n=5	n.s. 0,9433
	HFD	0,3096 ± 0,0600 n=7	0,2138 ± 0,0561 n=10	n.s. 0,1613
	p-Wert	* 0,0140	* 0,0280	
IGF-1R (IGF-1R/HPRT)	SD	1,1960 ± 0,1489 n=8	0,7161 ± 0,1276 n=5	* 0,0451
	HFD	0,9116 ± 0,1204 n=7	0,7811 ± 0,1539 n=10	n.s. 0,2698
	p-Wert	n.s. 0,2319	n.s. 0,9530	
IGF-2R (IGF-2R/HPRT)	SD	1,3460 ± 0,1401 n=7	0,9094 ± 0,2387 n=8	n.s. 0,0721
	HFD	1,5860 ± 0,3874 n=5	1,4030 ± 0,2047 n=9	n.s. 0,6993
	p-Wert	n.s. 0,8763	n.s. 0,0927	
Akt (pAkt/Akt)	SD	0,2544 ± 0,0494 n=8	0,3309 ± 0,0996 n=5	n.s. 0,8329
	HFD	0,2941 ± 0,0476 n=7	0,6502 ± 0,2629 n=10	n.s. 0,6009
	p-Wert	n.s. 0,3357	n.s. 0,6787	
ERK1 (p-p44/p44)	SD	0,5547 ± 0,1547 n=8	1,3380 ± 0,5750 n=5	n.s. 0,2844
	HFD	0,8125 ± 0,1493 n=7	0,8491 ± 0,2144 n=10	n.s. 0,6691
	p-Wert	n.s. 0,1893	n.s. 0,6787	
ERK2 (p-p42/p42)	SD	0,6792 ± 0,1523 n=8	2,1550 ± 0,9245 n=5	n.s. 0,1709
	HFD	1,0140 ± 0,1300 n=7	0,8487 ± 0,2150 n=10	n.s. 0,3148
	p-Wert	n.s. 0,1893	n.s. 0,3097	

b)		G19		
		männlich	weiblich	p-Wert
PCNA (PCNA/HPRT)	SD	0,2294 ± 0,0261 n=13	0,2198 ± 0,0319 n=7	n.s. 0,8773
	HFD	0,1412 ± 0,2110 n=9	0,0788 ± 0,0138 n=6	* 0,0360
	p-Wert	* 0,0239	** 0,0012	
Ins-R (Ins-R/HPRT)	SD	1,4110 ± 0,0909 n=13	1,2290 ± 0,1008 n=7	n.s. 0,3507
	HFD	1,0230 ± 0,1037 n=8	1,0890 ± 0,0969 n=6	n.s. 0,6620
	p-Wert	* 0,0133	n.s. 0,3660	
IGF-1R (IGF-1R/HPRT)	SD	2,3800 ± 0,1494 n=13	2,4990 ± 0,1437 n=7	n.s. 0,9385
	HFD	1,2220 ± 0,2245 n=8	1,1980 ± 0,1612 n=6	n.s. 0,8518
	p-Wert	*** 0,0003	** 0,0012	
IGF-2R (IGF-2R/HPRT)	SD	3,8980 ± 0,2471 n=13	3,9880 ± 0,4297 n=7	n.s. >0,9999
	HFD	3,1680 ± 0,2393 n=8	3,2520 ± 0,3933 n=6	n.s. 0,9497
	p-Wert	n.s. 0,0618	n.s. 0,2343	
Akt (pAkt/Akt)	SD	0,4426 ± 0,0701 n=13	0,2582 ± 0,0358 n=7	n.s. 0,1827
	HFD	0,3397 ± 0,0810 n=9	0,3179 ± 0,0632 n=6	n.s. 0,8639
	p-Wert	n.s. 0,3518	n.s. 0,4452	
ERK1 (p-p44/p44)	SD	0,1226 ± 0,0163 n=13	0,2002 ± 0,0268 n=7	* 0,0186
	HFD	0,2435 ± 0,0394 n=9	0,2801 ± 0,0853 n=6	n.s. 0,9546
	p-Wert	** 0,0046	n.s. 0,9452	
ERK2 (p-p42/p42)	SD	0,2314 ± 0,0362 n=13	0,2064 ± 0,0733 n=7	n.s. 0,3929
	HFD	0,2547 ± 0,0454 n=9	0,3592 ± 0,0660 n=6	n.s. 0,1810
	p-Wert	n.s. 0,6907	n.s. 0,1375	

Tabelle 9: geschlechtsspezifische Auswertung proliferationsrelevanter Parameter

Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler der relativen Proteinlevel nach Western Blot Analyse von männlichen und weiblichen SD und HFD Plazenten an den Gestationstagen G16 (a) und G19 (b). Die entsprechenden Abbildungen der Western Blots befinden sich im Anhang (Abbildung A 2). Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Students t-Tests bzw. des Mann-Whitney Tests ermittelt. p-Wert* ≤ 0,05; p-Wert** ≤ 0,01; p-Wert*** ≤ 0,001; p-Wert**** ≤ 0,0001; n.s. = nicht signifikant. SD = normalgewichtige Mütter; HFD = übergewichtige Mütter; n = Anzahl der Plazenten.

3.3 Die Größe der Flächen der Plazentaschichten

Unabhängig vom Gewicht (3.1) und der Proliferationsrate (3.2) als Indikatoren für den restriktiven Effekt mütterlichen Übergewichts auf die Funktion der Plazenta sollte durch das Vermessen der Flächen der verschiedenen Zonen mögliche Unterschiede zwischen den Plazenten von übergewichtigen und normalgewichtigen Müttern festgestellt werden. Dabei war die primäre Fragestellung, ob die Zone des fetomaternalen Stoffaustauschs (Labyrinth) oder die Zone der Hormon- und Wachstumsfaktorproduktion (Spongiotrophoblast) verändert ist. Die Dezidua konnte nicht in die Analyse einbezogen werden, da sie bei der Sektion der Plazenten meistens nicht vollständig erhalten werden konnte und eine Flächenbestimmung somit wertlos gewesen wäre.

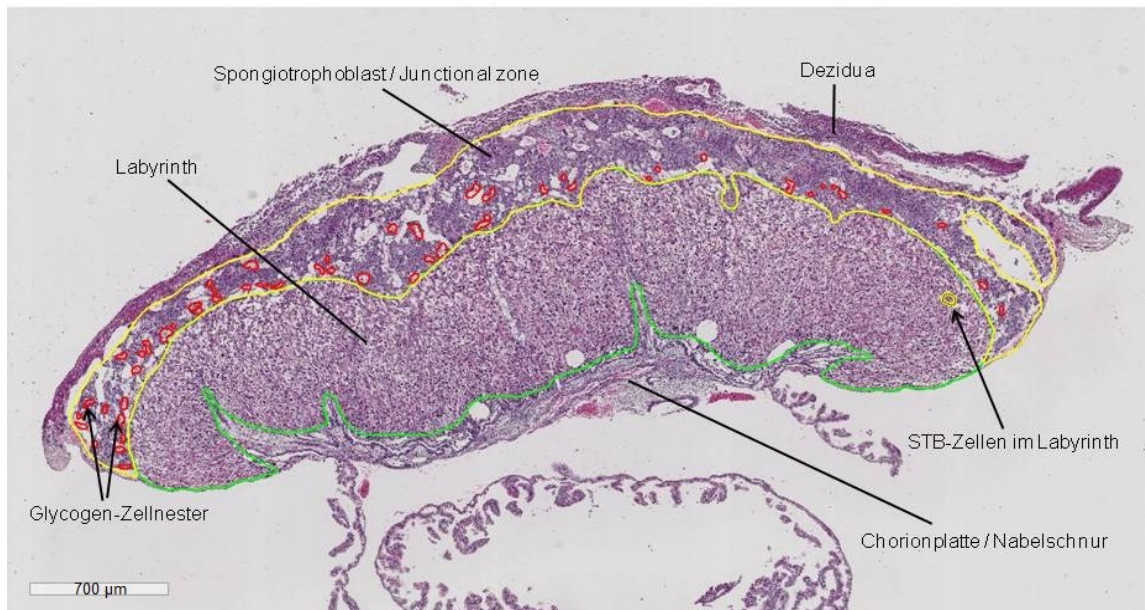
Im Rahmen eines wissenschaftlichen Projekts der Universität zu Köln wurde im Vorfeld durch Hugai Kassisada eine tendenzielle Vergrößerung von Labyrinth und

Spongiotrophoblast bei HFD Plazenten an G19 festgestellt. Signifikante Unterschiede waren allerdings nicht festzustellen. Da die Untersuchung nur jeweils 5 Plazenten pro Untersuchungsgruppe beinhaltete und die Schnittebene nicht berücksichtigt wurde, waren die Ergebnisse wenig repräsentativ und es wurde eine neue Studie eingeleitet. Damit eine Untersuchung mit identischen Voraussetzungen gegeben war, wurden stets nur Schnitte in die Auswertung einbezogen, die auf Ebene der Nabelschnur lagen (Plazentamittig). Des Weiteren wurde die Probenmenge auf 10-13 Plazenten pro Untersuchungsgruppe und Gestationstag erhöht.

Die Plazentaschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, digitalisiert und die Flächen mit der Software Aperio ImageScope vermessen (Abbildung 10 a). Einzelne "Inseln" von Spongiotrophoblast-Zellen lagen innerhalb des Labyrinths. Dieser Anteil von maximal einem Prozent (siehe Anhang, Tabelle A 1) wurde der Fläche des Spongiotrophoblasts zugerechnet.

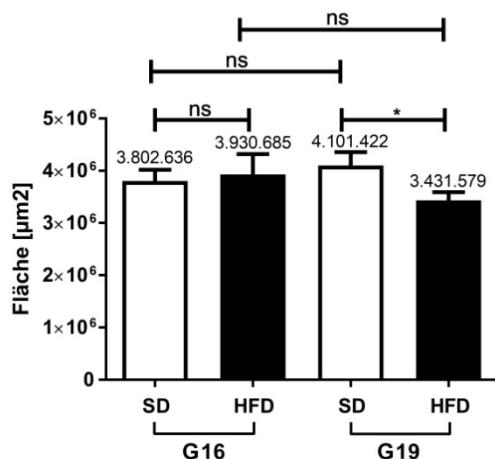
a)

Übersicht einer HE-gefärbten Plazenta auf Nabelschnurebene



b)

Fläche Labyrinth



c)

Fläche Spongiotrophoblast

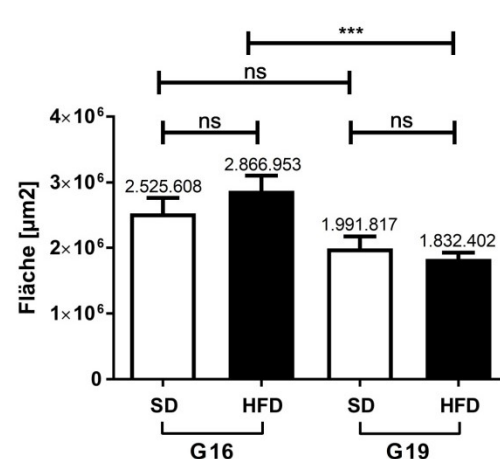


Abbildung 10: Vermessung der Flächen von Labyrinth und Spongiotrophoblast

a) Dargestellt ist der Querschnitt einer murinen Plazenta mit den zur Flächenbestimmung umrandeten Zonen Labyrinth (grün) und Spongiotrophoblast (STB, gelb) sowie die enthaltenden Glykogen-Zellnester (rot). Der abgebildete Anteil an Nabelschnur-Zellen stellt sicher, dass es sich um einen plazentamittigen Ausschnitt handelt.

b+c) Die Graphen zeigen die Mittelwerte der Größe der Flächen von Labyrinth (b) und Spongiotrophoblast (c) an den Gestationstagen G16 und G19 in Quadratmikrometer [µm²]. Dabei wurden SD und HFD Plazenten verglichen. Anzahl der Plazenten für Labyrinth und STB (Mütter): SD G16 n=12 (10); HFD G16 n=11 (9); SD G19 n=10 (7); HFD G19 n=13 (11). Mittelwerte in Abb. b): SD G16 = 3.802.636; HFD G16 = 3.930.685; SD G19 = 4.101.422; HFD G19 = 3.431.579. Mittelwerte in Abb. c): SD G16 = 2.525.608; HFD G16 = 2.866.953; SD G19 = 1.991.817; HFD G19 = 1.832.402. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Students t-Tests bzw. des Mann-Whitney Tests ermittelt. p-Wert* ≤ 0,05; p-Wert** ≤ 0,01; p-Wert*** ≤ 0,001; p-Wert**** ≤ 0,0001; ns = nicht signifikant. SD = normalgewichtige Mütter; HFD = übergewichtige Mütter.

Während die Labyrinth-Fläche der SD Plazenten von G16 nach G19 tendenziell zunahm (+7,9%), wurde sie bei den HFD Plazenten eher geringer (-12,7%). Folglich war die Fläche des Labyrinths an G19 bei den HFD Plazenten signifikant kleiner als bei den SD Plazenten.

Obwohl sich an beiden Gestationstagen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte, so verringerte sich doch die Fläche des Spongiotrophoblasten sowohl bei den SD als auch bei den HFD Plazenten zwischen den beiden Gestationstagen. Diese Reduktion der Flächengröße war letztlich bei den HFD Plazenten deutlicher und somit signifikant darstellbar (SD=-21,1%, HFD=-36,1%). Verantwortlich hierfür dürfte unter anderem die stärkere Abnahme an Glykogenzellen in dieser Schicht bei den HFD Plazenten sein (siehe Abschnitt 3.4).

Da auch in diesem Untersuchungsabschnitt eine unglückliche Geschlechterverteilung bzw. teilweise auch unklare Ergebnisse bezüglich des Geschlechts der Proben vorlagen, wurde auf eine separate geschlechtsspezifische Untersuchung verzichtet.

3.4 Glykogenzellen in der Plazenta

Glykogenzellen haben in der Plazenta als Energiespeicher einen besonderen Stellenwert. In Zeiten von mangelnder Nährstoffdarbietung durch die Mutter oder bei erhöhtem Energiebedarf des Feten kann Glukose aus Glykogen freigesetzt werden (Coan et al., 2006; Jones, 1991). Es könnte also sein, dass eine Veränderung der Glykogenmenge die Funktion der Plazenta von adipösen Müttern beeinträchtigt und ein vermindertes Vorkommen an Glykogen eine gestörte Entwicklung des Feten verursacht.

Im Zuge der Ausmessung von Labyrinth und Spongiotrophoblast wurde auch die Fläche an Glykogen (Glykogenzellnestern) in diesen beiden Plazentazonen bestimmt. Interessanterweise konnten Glykogenzellen in den HFD Plazenten ausschließlich im Spongiotrophoblast detektiert werden, während in SD Plazenten auch geringe Mengen (1,8 % an G16 bzw. 1,7 % an G19) im Labyrinth gefunden werden konnten (Tabelle 10).

	SD G16		HFD G16		SD G19		HFD G19	
	n Nester Ø	%	n Nester Ø	%	n Nester Ø	%	n Nester Ø	%
Glykogenzellen im STB	66,00	98,32	63,70	100	73,40	98,20	62,50	100
Glykogenzellen im Labyrinth	1,25	1,68			0,10	1,80		

Tabelle 10: Anteil an Glykogenzellen in Labyrinth und Spongiotrophoblast

Dargestellt ist die durchschnittliche Menge an Glykogenzellnestern sowie der prozentuale Anteil an Glykogenzellen [%] bezogen auf die gesamte gemessene Glykogenzell-Fläche im Labyrinth und Spongiotrophoblast von SD und HFD Plazenten an den Gestationstagen G16 und G19. n = Anzahl der Nester. Anzahl der Plazenten: SD G16 n=12; HFD G16 n=11; SD G19 n=10; HFD G19 n=13

Bei der Auswertung der Daten zeigten beide Untersuchungsgruppen eine signifikante Abnahme der gemessenen Fläche an Glykogenzellen zwischen den Gestationstagen G16 und G19 (Abbildung 11). Ausgehend von einem tendenziell höheren Ausgangswert an G16 war dieser Effekt bei den HFD Plazenten deutlich stärker ausgeprägt (Abbildung 11 a). Dabei verringerte sich die Menge an Glykogenzellen an G19 - ähnlich wie schon durch Coan u.a. 2006 beschrieben - bei den SD Plazenten auf etwa die Hälfte (52,1 %) und bei den HFD Plazenten sogar auf knapp unter ein Viertel (23,9 %) im Vergleich zu den an G16 gemessenen Flächen. Dies kommt einer in etwa doppelt so starken Abnahme an placentaren Glykogenzellen bei HFD Muttertieren zwischen G16 und G19 gleich (Abbildung 11 b).

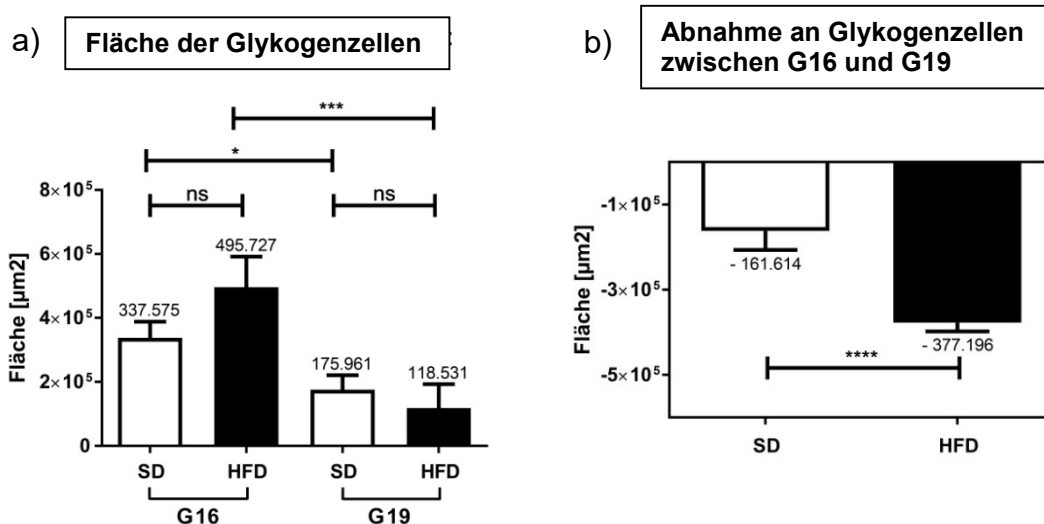


Abbildung 11: Fläche der Glykogenzellen und ihre Reduktion zwischen G16 und G19

a): Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert der Größe der Gesamtflächen aller Glykogenzellen von SD und HFD Plazenten an den Gestationsstagen G16 und G19 in Quadratmikrometer [µm²].
 b): Die mehr als doppelt so starke Abnahme der gemessenen Fläche an Glykogenzellen bei HFD Plazenten wird durch das Signifikanzniveau mit einem p-Wert=**** unterstrichen. Anzahl der Plazenten / Mittelwerte in a): SD G16 n=12 / 337.575; HFD G16 n=11 / 495.727; SD G19 n=10 / 175.961; HFD G19 n=13 / 118.531. Mittelwerte in Abb. c): SD = -161.614; HFD = -377.196. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Students t-Tests bzw. des Mann-Whitney Tests ermittelt. p-Wert* ≤ 0,05; p-Wert** ≤ 0,01; p-Wert*** ≤ 0,001; p-Wert**** ≤ 0,0001; ns = nicht signifikant. SD = normalgewichtige Mütter; HFD = übergewichtige Mütter.

4 Diskussion

Adipositas zählt zu den größten globalen Gesundheitsproblemen und führt zahlreiche Risiken mit sich. Gerade während der Schwangerschaft können verschiedene Komplikationen bei Mutter und Kind durch maternale Adipositas hervorgerufen werden (Mission et al., 2015; Frias et al., 2011; Marshall & Spong, 2012; Lim & Mahmood, 2015; Baeten et al., 2001; Kabiru & Raynor, 2004; Farah & Salome, 2012; De Pergola & Silvestris, 2013). Da die Plazenta das Verbindungsorgan zwischen Mutter und Kind darstellt, liegt ein Zusammenhang zwischen den fetalen Risiken und einer gestörten Entwicklung bzw. Funktion der Plazenta nahe (Pinar et al., 2014; Hasan et al., 2015; Su et al., 2016; Salafia et al., 1992; Kidron et al., 2009). Eine mögliche Ursache für eine intrauterine Wachstumsrestriktion des Fetus ist beispielsweise eine verringerte Gefäßdichte in den Plazenten von übergewichtigen Müttern (Stuart et al., 2018). Die verminderte Fläche des Stoffaustauschs könnte zum einen den Fetus vor einem Nährstoffüberangebot der Mutter schützen, auf der anderen Seite führt diese plazentare Veränderung aber auch zu einer Verlangsamung des fetalen Wachstums (Ma et al., 2010). Hintergrund dieses Phänomens könnte eine Herabsetzung der Wachstumsfaktoren sein (Zhu et al., 2009).

Auch das Geschlecht des Fetus hat Einfluss auf die Ausprägung von plazentaren Veränderungen induziert durch maternale Adipositas (Mao et al., 2010; Reynolds et al., 2015; Binder et al., 2015; Brown et al., 2014; Lehavi et al., 2005). Dabei scheinen die postnatalen Folgen für männliche Nachkommen eine größere Rolle zu spielen, da sie beispielsweise häufiger an Herz-Kreislaufproblemen oder neurologischen Fehlfunktionen leiden (Thornburg et al., 2010; Hsiao & Patterson, 2012).

Die Untersuchungen in dieser Studie wurden an murinen Plazenten durchgeführt, da diese einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau wie humane Plazenten haben und auch auf molekularer Ebene eine hohe Übereinstimmung zeigen (Cox et al., 2009). Beide gehören dem hämochorialen Typ an, was bedeutet, dass im Bereich des Stoffaustauschs das mütterliche Blut in direktem Kontakt zu dem fetalen Gewebe steht (Maltepe et al., 2010). Um ein besseres Verständnis von potentiellen Fehlfunktionen und Komplikationen der menschlichen Plazenta zu erlangen, haben bereits zahlreiche andere Studien die Gleichartigkeit beider Plazenten genutzt und ebenfalls Untersuchungen an murinen Plazenten vorgenommen.

Für die verschiedenen Versuche in dieser Studie wurden zunächst zwei Gruppen generiert. Dabei wurde der Testgruppe eine hochkalorische Diät verabreicht, um eine

übergewichtige Mauskohorte zu schaffen. Nach einer erfolgreichen Verpaarung wurden die Plazenten dann an den Gestationstagen G16 und G19 per Sectio entnommen.

Aufbauend auf vorherigen Untersuchungen (Storck, S., 2014) und angeregt durch verschiedene Gedankenansätze sowie Literaturrecherchen waren die folgenden Aspekte Teil der plazentaren Untersuchungen, bei denen auch immer der Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Feten im Fokus stehen sollte: Gewichte von Plazenten und Feten, Proliferation und Wachstum der verschiedenen plazentaren Zonen sowie deren Flächengröße und die Bedeutung bzw. das Vorkommen von Glykogenzellen. Letztendlich sollten die dabei eingebrachten Ergebnisse helfen, ein tieferes Verständnis für die plazentaren Zusammenhänge bei maternaler Adipositas zu erlangen, um somit eine bessere Prävention mit gesteigerter Gesundheit der Nachkommen während und nach der Schwangerschaft zu ermöglichen.

4.1 Maternales Übergewicht führt zu einer temporären intrauterinen Wachstumsrestriktion der Feten

Kinder, die mit einem veränderten Gewicht zur Welt kommen, haben im weiteren Lebensverlauf ein erhöhtes Risiko für verschiedene Erkrankungen. So werden SGA (small for gestational age) Kinder häufiger übergewichtig und entwickeln gesundheitliche Probleme wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Bluthochdruck, Glukoseintoleranz oder Typ 2 Diabetes (Hong & Chung, 2018; Barker et al., 1993; Lithell et al., 1996). Aber auch LGA (large for gestational age) Kinder werden häufiger übergewichtig und leiden dann an den damit einhergehenden Erkrankungen (Hong & Chung, 2018).

Es liegen bereits einige Studien vor, die sich mit dem Zusammenhang zwischen mütterlicher Adipositas und den Auswirkungen auf das Gewicht der Nachkommen beschäftigen. Dabei variieren die Ergebnisse jedoch zum Teil stark. Auf der einen Seite wird beschrieben, dass mütterliches Übergewicht ein erhöhtes Risiko für SGA Kinder durch eine intrauterine Wachstumsrestriktion darstellt (Rode et al., 2005; Hulsey et al., 2005; Akyol et al., 2009; Ye et al., 2017), auf der anderen Seite gibt es Studien die zum gegenteiligen Ergebnis mit vermehrten LGA Kindern kommen (Ben-Haroush et al., 2009; Rasmussen et al., 2014) oder auch gar keinen Effekt auf das Geburtsgewicht detektieren konnten (Mitanchéz et al., 2017). Eine Studie spricht sogar von einem Risiko für eine Gewichtsveränderung in beide Richtungen (Leung et al., 2008).

Die anfänglich erhobenen Daten in unserem Mausmodell hatten auf ein verringertes Fetengewicht an den Gestationstagen G16 und G19 bei maternaler Adipositas hingedeutet (Storck, S., 2014). Die finale Auswertung mit einer deutlich höheren Probenanzahl bestätigte zwar die intrauterine Wachstumsrestriktion an G16, jedoch hatten sich die Gewichte der HFD Feten an G19 wieder denen der Kontrolltiere angeglichen. Zu demselben Ergebnis kam auch eine Studie von Sferruzzi-Perri (Sferruzzi-Perri et al., 2013), bei der die Untersuchungen an den gleichen Gestationstagen stattfand. Die Angleichung der Gewichte an G19, die auch bei der isolierten Betrachtung von männlichen und weiblichen Gewichten festzustellen war, steht jedoch letztlich in Diskrepanz mit den Ergebnissen einer früheren Studie mit leichteren männlichen murinen Nachkommen am Tag nach der Geburt (Janoschek et al., 2016). Dass die Plazentaeffizienz lediglich an G16 bei den HFD Tieren signifikant vermindert war, war entsprechend der gemessenen Fetengewichte bei gleichzeitig unveränderten Plazentengewichten naheliegend.

Letztendlich offenbaren die neu gewonnenen Ergebnisse einen enormen Wachstumsschub der HFD Feten zwischen den Gestationstagen G16 und G19, also kurz vor Ende der Tragezeit. Gleichzeitig wurde bei den HFD Plazenten ein deutlich stärkerer Abbau an Glykogenzellen beobachtet, der durch eine Freisetzung von Glukose als Energieträger diesen Wachstumsschub ermöglicht haben könnte. Bemerkenswert ist, dass sich die Reduktion an Glykogenzellen nicht in einem verringerten Gewicht der HFD Plazenten an G19 widerspiegelt. Sowohl an G16 als auch an G19 waren die Gewichte der SD und HFD Plazenten nahezu identisch. Es wäre möglich, dass der eher geringe Anteil an Glykogenzellen, bezogen auf die Gesamtgröße einer Plazenta, ursächlich für den nicht detektierbaren Gewichtsunterschied zwischen SD und HFD Plazenten ist.

Prinzipiell muss der Zeitpunkt der Sektion der Muttertiere bei dieser Untersuchung kritisch beäugt werden, da der Gestationstag dabei nicht immer identisch war. Einige wenige Tiere wurden statt an G16 an G17 oder an G18 statt an G19 sezirt. Diese - wenn auch kurze - Zeitdiskrepanz könnte einen Einfluss auf die Gewichte der Feten und Plazenten gehabt haben. Die Anzahl der Proben mit abweichenden Sektionstagen war allerdings bei allen untersuchten Gruppen in etwa in gleicher Menge vertreten, sodass es höchstens zu vernachlässigbaren Abweichungen der Datenlage gekommen sein kann. Aufgrund der sehr konträren Aussagen von anderen Studien müssen die Ergebnisse dieser Untersuchung mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden und können lediglich einen weiteren Beitrag zur Einordnung der Auswirkungen von maternaler Adipositas auf das fetale Gewicht während der Schwangerschaft geben. Aufgrund der großen Datengrundlage und einer geringen Varianz der gemessenen

Gewichte können die Ergebnisse bezüglich dieser Untersuchung dennoch als durchaus glaubwürdig angesehen werden, sodass die zwischenzeitliche intrauterine Wachstumsrestriktion an G16 mit einem anschließend beschleunigten Wachstum der HFD Feten letztendlich großes Potential besitzt, um weitere Untersuchungen zum Verständnis der Ursachen und Zusammenhänge anzustreben.

4.2 Kontroverse Ergebnisse bei der placentaren Proliferationsrate nach PCNA Untersuchungen

Zuvor wurde durch Western Blots von PCNA eine reduzierte Proliferation in Plazenten an G19 bei HFD Tieren detektiert (Storck, S., 2014). In dieser Studie sollte unter anderem untersucht werden, in welchen Plazentazonen sich diese manifestiert. Dazu wurden Plazentaschnitte angefertigt und das bei der Zellteilung exprimierte Protein PCNA in den Zellkernen durch eine immunhistologische Färbung kenntlich gemacht. Jedoch konnten beide untersuchten Zonen (Labyrinth und Spongiotrophoblast) nicht die vorher ermittelten Unterschiede zwischen SD und HFD Plazenten an G19 bestätigen. Im Spongiotrophoblast war die Proliferation bei den HFD Plazenten an G19 sogar tendenziell erhöht. Dies könnte unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen wurden bei der histologischen Analyse nicht die gesamten Plazenten untersucht, sodass die verminderte Proliferation möglicherweise hauptsächlich in anderen Schichten (Dezidua, Chorionplatte) zum Tragen kommt. Zum anderen könnten die Ergebnisse durch das Vorgehen bei der Färbung und der Auswertung beeinflusst worden sein, wenngleich auch alle Schnitte vor der Auszählung verblindet wurden. Bei den zwei Färbevorgängen wurde zwar penibel darauf geachtet, dass die Bedingungen durch identische Reaktionszeiten einheitlich waren, es könnte aber dennoch zu geringen Unterschieden bei der Färbeintensität gekommen sein. In Einzelfällen wurden tatsächlich leichte Unterschiede in der Ausprägung der Färbung innerhalb eines Präparats festgestellt, was auf die Schwierigkeit bei der Umsetzung der Färbung hindeutet. Bei der Auszählung der positiv (braun) und negativ (blau) gefärbten Zellkerne stellte sich eine weitere Herausforderung dar. Viele Zellkerne zeigten keine eindeutige Färbung und konnten dementsprechend schwerlich zugeordnet werden. Der Grund dafür dürfte darin liegen, dass die Zellen nicht während des gesamten Proliferationszyklus PCNA exprimieren, sondern überwiegend in der S-Phase (Morris & Mathews, 1989) und letztlich keine einheitliche Quantität des Proteins und damit auch keine eindeutige Färbung gegeben war. Außerdem könnten die verschiedenen Zelltypen von anderen Strukturen innerhalb der Schichten auch unterschiedliche Proliferationsmuster aufweisen und je nach Vorkommen ebenfalls Einfluss genommen

haben. Dazu gehören unter anderem Glykogenzellen, Endothelzellen von Gefäßen, Ausläufer der Nabelschnur oder STB-Inseln im Labyrinth. All die genannten Faktoren müssen bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, die daher mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden sollten.

Ein weiteres Ergebnis der histologischen PCNA Auswertung ist eine deutliche Verringerung der Proliferation im Labyrinth kurz vor Gestationsende (G19) bei beiden Untersuchungsgruppen. Demzufolge könnte es zu einer generellen Stagnation des Wachstums oder durch Apoptoseprozesse sogar zur Verringerung der Größe der fetomaternalen Transferzone kommen. Um dahingehend eine valide Aussage machen zu können, wären allerdings weitere Untersuchungen - beispielsweise mittels TUNEL-Färbung zur Detektion der Apoptoserate - notwendig gewesen. Das verringerte Gewicht von SD und HFD Plazenten an G19 gegenüber G16 unterstützt jedoch diese Annahme. Nimmt man allerdings die von den histologischen Untersuchungen abweichenden Western Blot Ergebnisse von PCNA als Grundlage, so ist hier ein Zusammenhang mit der signifikant verkleinerten Fläche des Labyrinths ausschließlich bei den HFD Plazenten an G19 erkennbar und spiegelt sich auch in einer stärkeren Verringerung der Fläche des Spongiotrophoblasten von HFD Plazenten wider. Eine Untersuchung an Plazenten adipöser Mäuse unterstützt annähernd diese Ergebnisse (Kim et al., 2014). Dabei wurde eine verminderte Proliferation von Labyrinthzellen zu mittleren und späten Gestationszeitpunkten festgestellt. Und auch eine Studie mit menschlichen Plazenten zeigte eine mit steigendem BMI der Mutter verbundene Reduktion der Proliferation von Zellen des Zottenstromas (Higgins et al., 2013).

Da die histologischen Resultate letztlich eine fragliche Glaubhaftigkeit aufweisen, sollten sie durch weitere Untersuchungen mit anderen Proliferationsmarkern überprüft werden. Dazu wurde im Anschluss an diese Arbeit bereits eine entsprechende Untersuchung mit BrdU (Bromdesoxyuridin) als Marker eingeleitet.

4.3 Verringertes Proteinlevel der Wachstumsfaktor-Rezeptoren beeinflusst nicht die nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren Akt und ERK1/2

Die bereits vorliegenden Western Blot Analysen hatten gezeigt, dass bei den HFD Plazenten die Insulin- (an G16 und G19) und IGF1-Rezeptoren (an G19) reduziert waren (Appel et al., 2019). Erstaunlicherweise zeigten die in der anschließenden Signaltransduktion angesteuerten Faktoren Akt und ERK1/2 in ihrer Aktivität an G19

keine Veränderung (Storck, S., 2014). Auch nach der Separation von Männchen und Weibchen konnte weder an G16 noch an G19 eine signifikant reduzierte Aktivität von Akt und ERK1/2 bei einem der Geschlechter mit HFD Müttern nachgewiesen werden. Im Gegenteil, die Aktivität von ERK1 war bei den SD Männchen an G19 signifikant niedriger. Betrachtet man diese Ergebnisse isoliert für sich, muss davon ausgegangen werden, dass die verminderten Proteinlevel von Insulin- und IGF1-Rezeptoren letztlich die nachgeschalteten Faktoren Akt und ERK1/2 und damit auch das plazentare Wachstum nicht negativ beeinflussen. Allerdings sollte man bedenken, dass bei der Untersuchung die Liganden der Rezeptoren nicht berücksichtigt wurden. Eine erhöhte Insulinkonzentration im Blut von übergewichtigen Muttertieren, die sich auch bei den Feten widerspiegelt (Janoschek et al., 2016), könnte demnach die herunter regulierten Rezeptoren ausgleichen. Andersherum betrachtet könnte das reduzierte Rezeptorenlevel eine Schutzreaktion gegen ein übermäßiges Wachstum durch die erhöhten Insulinkonzentrationen darstellen. Außerdem ist die rezeptorvermittelte Signaltransduktion ein sehr komplexes Geflecht und es spielen auch weitere Hormone und Zytokine eine Rolle. So beeinflussen beispielsweise auch Leptin, Interleukin-6 und TNF-alpha den Akt- und ERK1/2-Signalweg (Song et al., 2005).

Des Weiteren sollte die Funktion des IGF2-Rezeptors in diesem Zusammenhang betrachtet werden. Er hatte an G19 ebenfalls ein verringertes Proteinlevel aufgewiesen (Appel et al., 2019). Wie in der Einleitung beschrieben wurde, wird angenommen, dass er antagonistische Eigenschaften zu den Insulin- und IGF-1 Rezeptoren besitzt. Durch die Bindung und Lyse von IGF-2 (in geringerem Maße auch IGF-1) wird so die wachstumsfördernde Funktion des Agonisten an den anderen Rezeptoren inhibiert (X Chen & Sharon, 2013). Folglich führt eine Reduktion der IGF-2 Rezeptoren zu einem vermehrten Wachstum durch Zellproliferation und zu einer verringerten Apoptose (Lau et al., 1994; O’Gorman et al., 2002; Harris et al., 2011). Die Verringerung der IGF2-R an G19 wirkt also letztlich der reduzierten Level an IR und IGF1-R entgegen. Neben der lytischen Funktion scheint der IGF-2 Rezeptor allerdings auch eine signalleitende Funktion zu haben. Bei einem Einsatz von Leu²⁷IGF2, das eine reine Affinität zum IGF-2 Rezeptor hat, konnte eine verminderte Apoptose und eine Stimulation der Proliferation festgestellt werden, was bei einem anschließenden knockout des IGF-2 Rezeptors ausblieb (Harris et al., 2011). Dieser Fakt zeigt, dass die Funktion des IGF-2 Rezeptors nicht endgültig geklärt ist und weitere Untersuchungen sinnvoll sind.

Letzendlich konnte die geschlechtsspezifische Auswertung der proliferationsrelevanten Rezeptoren und Faktoren in dieser Studie aber keine weiteren Erkenntnisse durch aussagekräftige Ergebnisse mit richtungsweisenden Tendenzen zwischen den Geschlechtern liefern.

4.4 Maternale Adipositas führt zu einer verkleinerten Fläche des Labyrinths an G19

Ausgehend von einem ähnlichen Größenniveau an G16 wurde die Fläche des Labyrinths der SD Plazenten an G19 tendenziell größer und die der HFD Plazenten eher geringer. Folglich ergab sich an G19 ein signifikanter Unterschied mit einem verkleinerten Labyrinth bei den HFD Plazenten. Damit korrelieren die Ergebnisse mit denen des PCNA Western Blots (Storck, S., 2014). Die Proliferation der HFD Plazenten war dabei an G19 vermindert, sodass man von einem gehemmten Wachstum ausgehen kann, das sich letztlich auch in einer Verkleinerung der Labyrinthfläche widerspiegeln könnte.

Bislang gibt es wenig Literatur und kaum Untersuchungen, die sich ebenfalls mit der Größe des Labyrinths in Zusammenhang mit maternaler Adipositas befasst haben. Eine Studie an Mäusen aus dem Jahr 2014 zeigte an den beiden untersuchten Gestationstagen G15,5 und G17,5 eine dünnere Labyrinthschicht bei übergewichtigen Tieren (Kim et al., 2014). Dabei wurde ebenfalls eine entsprechende reduzierte Proliferation im Labyrinth festgestellt. Die Verlässlichkeit der histologischen PCNA Untersuchung aus dieser Studie wird also erneut in Frage gestellt. Und auch eine Studie aus dem Jahr 2017 bestätigt das Phänomen, dass das Labyrinth bei Plazenten von in diesem Fall übergewichtigen Ratten an G19 verkleinert ist (Song et al., 2017). Der erforderliche Stoffaustausch zwischen Mutter und Fetus könnte also im späteren Gestationsverlauf durch eine verkleinerte fetomaternale Transferzone vermindert sein, was letztlich für eine unzureichende Versorgung des Nachkommen spricht. Diese Schlussfolgerung würde jedoch eher eine andauernde oder gar gesteigerte Wachstumsrestriktion des Feten vermuten lassen und steht dem zuvor geschilderten Wachstumsschub zwischen G16 und G19 entgegen. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Datenlage sollten angestrebt werden, um die eingeholten Ergebnisse zu bekräftigen.

4.5 Erhöhter Abbau an Glykogenzellen in HFD Plazenten zum Ende der Schwangerschaft

Veränderungen in den plazentaren Glykogenspeichern konnten in einen Zusammenhang mit verschiedenen Komplikationen während der Schwangerschaft gebracht werden. Dazu gehören Präeklampsie, fetale Wachstumsrestriktion und Diabetes (Akison et al., 2017). In dieser Studie wurde untersucht, in wie fern

mütterliche Adipositas Einfluss auf die plazentaren Glykogenspeicher hat. Es zeigte sich, dass sich die Fläche der fast ausschließlich im Spongiotrophoblast vorkommenden Glykogenzellen bei den SD Plazenten von G16 auf G19 in etwa halbierte und bei den HFD Plazenten sogar auf ein Viertel reduzierte. Große Ähnlichkeit zeigten die Daten des Spongiotrophoblasten (STB), bei dem beide Untersuchungsgruppen eine Verkleinerung der Fläche zwischen G16 und G19 aufwiesen. Diese war allerdings nur bei den HFD Plazenten signifikant darstellbar. Die deutlichere Verkleinerung der Fläche des STB bei HFD Plazenten kann demnach unter anderem auch durch den massiveren Abbau von Glykogenzellen erklärt werden. Außerdem könnte die dadurch vermehrt freigesetzte Glukose die zuvor angenommene Minderversorgung des Feten durch ein verkleinertes Labyrinth an G19 bei adipösen Müttern ausgleichen und somit auch den erheblichen Wachstumsschub der HFD Feten zwischen G16 und G19 erklären.

Die getätigten Vermutungen stützen sich auf der Annahme, dass die Verringerung der Glykogenzellen eine erhöhte Glukosefreisetzung mit sich bringt. Es wurde allerdings nicht untersucht, ob die Reduktion der Glykogenzellen tatsächlich durch einen Abbau ihrer selbst zustande kommt, oder ob möglicherweise auch eine Translokation der Glykogenzellen in die benachbarte Dezidua stattfand. Eine später getätigte biomechanische Messung der Glykogenmenge der gesamten Plazenta konnte letztlich einen stärkeren Glykogenabbau zum Ende der Schwangerschaft bei HFD Plazenten (47,7%) gegenüber SD Plazenten (31,4%) bestätigen (Appel et al., 2019). Neben der Menge der freigesetzten Glukose ist aber auch die Funktion der Glykogenzellen in der Plazenta umstritten. Fraglich ist, in wie fern das plazentare Glykogen als Energiereservoir für den Feten dient, da eine Studie von Schlossmann zu dem Ergebnis kam, dass in Zeiten des höchsten fetalen Glukosebedarfs kaum noch Glykogen in der Plazenta vorhanden ist (Schlossmann, 2013). Des Weiteren scheint der plazentare Glukoseverbrauch im letzten Fünftel der Schwangerschaft 3-4 mal höher als der des Feten zu sein (Meschia et al., 1980). Demnach würde die Plazenta das Glykogen hauptsächlich für den Eigenbedarf einlagern und nur teilweise für den Feten als Energiequelle freisetzen. Auf der anderen Seite konnte ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen einer Veränderung der plazentaren Glykogenzellen und einer gestörten Entwicklung des Feten in Form einer Wachstumsretardierung im letzten Schwangerschaftsdrittel beobachtet werden (Tunster et al., 2010), sodass das eingelagerte Glykogen offensichtlich doch eine bedeutende Rolle für die Entwicklung des Feten spielt.

Um die Bedeutung des Glykogenabbaus und die Funktion der Glukose besser verstehen zu können, wurde im Anschluss an diese Arbeit eine Untersuchung der

Glukosetransporter in der Plazenta vorgenommen. Eine wichtige Rolle spielt dabei vor allem GLUT-1 (Barros et al., 1995; Das et al., 1998). Kongruent zu der Abnahme an Glykogenzellen zeigte die Western Blot Analyse des GLUT-1 Proteins bei HFD Plazenten an G19 tatsächlich eine signifikante Erhöhung, die an G16 nicht vorzufinden war (Appel et al., 2019). Einen erhöhten Wert an Glukosetransportern bei übergewichtigen Mäusen nach Western Blot Analyse zeigte auch eine weitere Studie (Rosario et al., 2015). Allerdings ist das erhöhte Proteinlevel an GLUT-1 nicht unbedingt gleichbedeutend mit einem vermehrten Glukosetransport, da die Transporter nicht nur aktiv in der Zellmembran vorzufinden sind, sondern auch inaktiv im Zellinneren vorliegen können (Hahn et al., 2000). Die Menge an GLUT-1 alleine sagt also noch nichts über die tatsächliche Menge des Glukosetransports aus.

Eine Studie mit adipösen Mäusemüttern, die eine 5fache Zunahme des GLUT-1 Proteins detektierte, stellte jedoch tatsächlich auch einen ebenso erhöhten Transport von Glukose fest. Gleichzeitig wurde ein übermäßiges fetales Wachstum um 43 % beobachtet (Jones et al., 2009), das sich aber nicht - wie in dieser Studie dargestellt - nur als temporäres Phänomen äußerte. Allerdings könnte der erhöhte Transport möglicherweise auch durch ein erhöhtes Angebot an Glukose durch die Mutter bedingt sein. Von dieser Seite betrachtet könnten die höheren Glykogenspeicher an G16 als Schutz der HFD Feten gegen eine übermäßige Glukoseversorgung aufgebaut worden sein - ähnlich wie es in einer vorliegenden Studie beschrieben wurde (Desoye et al., 2002). Gestützt wird diese Annahme durch weitere Untersuchungen, bei denen eine mütterliche Diabetes zu vergrößerten Glykogenspeichern führte (Shafrir & Barash, 1991; Gabbe et al., 1972). Die Wege der Glukose und die Funktion der Glykogenzellen bleiben bis hierhin weitestgehend ungewiss, sodass weitere Studien abgestrebt werden sollten, um die Verteilung der Glukose in der fetoplazentaren Einheit besser zu verstehen. Dazu sind insbesondere in vivo Tests erforderlich. Mittels Injektion radioaktiv markierter Glukose könnte man beispielsweise den Transport und die Verteilung der Glukose über die Plazenta besser nachvollziehen.

4.6 Eigene Untersuchungen zeigen keine ersichtlichen Geschlechtsunterschiede bezüglich der durchgeführten Analysen

Wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, kann eine plazentare Fehlentwicklung ein erhöhtes Risiko für den Nachkommen bedeuten, im späteren Leben verschiedene Erkrankungen zu erfahren. Sie können unter anderem das Herz-Kreislauf- oder das neurologische

System betreffen und haben in Verbindung mit einer maternalen Adipositas eine geschlechtsabhängige Ausprägung gezeigt, die für Männer eine größere Gefährdung darstellte (Thornburg et al., 2010; Hsiao & Patterson, 2012). Aber auch die Entwicklung und Funktion der Plazenta selbst ist für männliche und weibliche Nachkommen unterschiedlich. Verschiedene Studien an Mensch und Tier haben geschlechtsabhängige Veränderungen bei der Expression bestimmter Gene in der Plazenta identifiziert (Lehavi et al., 2005; Kimura et al., 2004; Larson et al., 2001; Brown et al., 2014; O'Connell et al., 2013; Steier et al., 2004). Bei Vorliegen eines mütterlichen Übergewichts haben Untersuchungen an Mäusen und Ratten zusätzlich einen Einfluss des Geschlechts auf die morphologischen Muster (Mao et al., 2010; Reynolds et al., 2015) und den oxidativen Stress (Evans & Myatt, 2017) in der Plazenta gezeigt. Und dass sogar väterliches Übergewicht eine geschlechtsabhängige Relevanz für die Plazenta in Form einer Veränderung der DNA-Methylierung und der Gen-Expression haben kann, beschreibt eine Publikation aus dem Jahr 2015 (Binder et al., 2015).

Angeregt durch die vorliegende Literatur sollte der Aspekt "Geschlechtsunterschiede" auch in diese Arbeit Einzug finden. Jedoch war eine sinnvolle Auswertung aufgrund einer teilweise zu geringen Datenmenge bei einigen Untersuchungen nicht gegeben. Das betraf die histologischen PCNA Untersuchungen und die Flächenbestimmungen der Plazentazonen inklusive der Glykogenspeicheranalyse. Eine vorliegende Studie mit SD und HFD Mäusen konnte allerdings ohnehin keinen Geschlechtsunterschied bezüglich der Zellproliferation und der Dicke der Plazentaschichten ausmachen (Kim et al., 2014). Die geringe Menge an Daten lag unter anderem an Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Geschlechts der Plazenten. Trotz teilweise erneuter DNA-Isolierung entstanden bei der Gelelektrophorese gelegentlich unklare bzw. verlaufene Banden, sodass letztlich nicht alle vorliegenden Proben bestimmt werden konnten. Aber auch die vielen Vergleiche (SD/HFD, G16/G19, ♂/♀) mit insgesamt acht Untersuchungsgruppen und eine sich dabei ungünstig gestaltende Verteilung der Geschlechter erschwerten eine geeignete Auswertung.

Schlussendlich hatten die Ergebnisse mit ausreichend Proben meist eine eingeschränkte Aussagekraft, da sie keine richtungsweisenden Tendenzen aufwiesen. Beispielsweise zeigte die Auswertung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren und der dadurch angesteuerten Faktoren teilweise signifikante Unterschiede entweder für beide Nahrungsgruppen (SD und HFD) oder sie betrafen nur einen der beiden Gestationstage. Die willkürlich erscheinenden Resultate zeigten dabei keine logische Beziehung zu den anderen Ergebnissen. Bei der Auswertung der Gewichte offenbarte sich dann doch ein nennenswertes Resultat. An G19 waren die weiblichen Feten

signifikant leichter als die männlichen, wobei dieser Effekt bei der HFD Gruppe noch stärker ausgeprägt war. Allerdings wird diese Erkenntnis durch eine Studie am Menschen relativiert, bei der das Geburtsgewicht weder bei normalgewichtigen noch bei adipösen Müttern geschlechtsspezifisch beeinflusst wurde (Mitanchez et al., 2017). Letztlich fand der Geschlechtervergleich in dieser Studie nicht die im Vorfeld angedachte Umsetzung und kann damit nur geringfügig als Grundlage für weitere Forschungen dienen.

4.7 Ausblick

Die in dieser Studie getätigten Untersuchungen sollten dabei helfen, ein besseres Verständnis für die Zusammenhänge von placentaren Dysfunktionen bei Vorliegen einer mütterlichen Adipositas zu erlangen, die letztendlich die Entwicklung des Fetus beeinträchtigen können. Verschiedene Aspekte lieferten dabei einen Erklärungsansatz für das Phänomen einer temporären Wachstumsrestriktion der Feten an Gestationstag G16 mit einem Angleich der Gewichte kurz vor Ende der Schwangerschaft, können dieses aber nicht in Gänze erklären. So stand die deutliche Reduzierung an Glykogenzellen mit einer mutmaßlich vermehrten Freisetzung von Glukose zwischen den beiden untersuchten Gestationstagen in Einklang mit einer signifikanten Verkleinerung des Spongiotrophoblasten und dem enormen Wachstumsschub der Feten bei der HFD Gruppe. Dem steht das Vorliegen einer verkleinerten feto-maternalen Transferzone an G19 bei den HFD Plazenten gegenüber, die eher für eine verminderte Versorgung des Feten gegen Ende der Schwangerschaft spricht und wiederum in Konsens mit der durch die Western Blot Analyse detektierten verminderten Proliferation steht. Dabei ist allerdings ungewiss, ob die Verkleinerung des Labyrinths durch eine fehlerhafte Entwicklung bedingt wurde oder ob sie eine Reaktion der Plazenta auf eine mögliche Überversorgung des Fetus ist. Auch wenn die Zusammenhänge in der Plazenta noch immer wenig erforscht und sehr komplex sind, sodass es schwierig ist von einzelnen Untersuchungsparametern auf die gesamte Entwicklung der Plazenta und des Fetus zu schließen, so liefert diese Studie doch einige interessante Grundlagen und Ansätze für weitere Forschungen.

Dass bei den Plazenten übergewichtiger Mütter zwischen G16 und G19 in etwa doppelt so viel Glykogen abgebaut und damit Glukose freigesetzt wurde wie bei der Kontrollgruppe, war neben dem Wachstumsschub der Feten zwischen G16 und G19 sicherlich eines der wichtigsten Resultate dieser Studie. Eine im Anschluss bereits erfolgte biochemische Messung der Glykogenmenge der gesamten Plazenta konnte diesen Befund bestätigen (Appel et al., 2019). Ähnlich wie in einer Untersuchung an der Niere (Blodgett et al., 2011) könnte bei einer folgenden Studie fluoreszenzmarkierte Glukose eingesetzt werden, um die Verteilung der Glukose in der Plazenta und im Fetus präzise darzustellen. Alternativ würde sich auch eine Injektion radioaktivmarkierter Glukose anbieten. Außerdem sollten neben der Glukose, auf die der Fokus in dieser Studie lag, auch andere Nährstoffquellen beleuchtet werden, die ebenfalls einen Einfluss auf das fetale Wachstum haben. Dazu gehören Aminosäuren und Fettsäuren. Vorliegende Studien haben gezeigt, dass in HFD Plazenten die Menge an Aminosäuretransportern erhöht war (Rosario et al., 2015) und ein 10facher

Transport von neutralen Aminosäuren in Plazenten von übergewichtigen Müttern vorlag (Jones et al., 2009). Und auch die detektierte Konzentration an plazentaren Fettsäuren war signifikant erhöht (Cetin et al., 2012). Es wäre interessant, in zukünftigen Studien einen Zusammenhang zwischen diesen verschiedenen Formen der Energieversorgung herzustellen. Eine Untersuchung der Fettsäure-Transporter wurde bereits eingeleitet.

Zur Bestimmung der plazentaren Proliferation wurde in dieser Studie PCNA als Marker in der Immunhistochemie eingesetzt. Zur Reevaluierung der histologischen Ergebnisse sollten Untersuchungen mit anderen Markern folgen. Sehr ähnlich und damit gut vergleichbarer wäre BrdU (Bromdesoxyuridin), das sich in der S-Phase der Replikation anstelle von Thymidin in den neu synthetisierten DNA-Strang einlagert und später detektiert werden kann. Eine Untersuchung diesbezüglich wurde im Anschluss an diese Arbeit bereits eingeleitet. Ein möglicherweise noch qualifizierterer Marker wäre das Protein Ki-67, das während des gesamten Proliferationsprozesses exprimiert wird und die meisten Vorteile aber keine Nachteile von BrdU mit sich bringt (Kee et al., 2002). Leider hatten Testfärbungen vor Beginn dieser Studie nicht adäquat funktioniert, sodass letztlich PCNA als Marker verwendet wurde. Bei einer Studie zur Untersuchung von Ameloblastomen zeigte Ki-67 im Vergleich zu PCNA als Proliferationsmarker eine höher Spezifität (Bologna-Molina et al., 2013), was gleichzeitig seine höhere Aussagekraft bestätigt.

Da in dieser Studie bezüglich der durch die Ins-R und IGF1-R angesteuerten Signalkaskade keine Veränderungen bei Plazenten adipöser Muttertiere festgestellt werden konnte, wurde anschließend der an der Proliferationssteuerung beteiligte Wnt-Signalweg untersucht und dabei eine reduzierte Aktivität des Faktors GSK3 β und des nachgeschalteten Signalmoleküls beta-Catenin bei den HFD Plazenten an G19 festgestellt (Appel et al., 2019). Dieser Befund weist also auf eine verminderte Proliferation und damit ein verringertes Wachstum der Plazenta hin. Als Gegendarstellung zur Proliferation der Zellen wären letztlich auch Untersuchungen zu ihrer Seneszenz und Apoptose interessant.

Bei der Analyse der Plazentazonen wurde eine verringerte Fläche des Labyrinths bei HFD Tieren an G19 detektiert. Eine Bestätigung dieses Phänomens sollte ebenfalls durch weitere Untersuchungen erfolgen. Dazu können spezielle Labyrinthmarker anhand von Western Blot oder qPCR Analysen bestimmt werden. Außerdem sollen anhand einer neuen Mauskoorte die Flächen der Plazentazonen mittels Stereologie neu bestimmt werden. Durch eine Auswertung mehrerer Schnitte pro Plazenta kann

dann eine Volumenschätzung vorgenommen werden, die wesentlich genauerer Ergebnisse als die reine Flächenmessung liefert.

Generell ist bei weiteren Studien mit ähnlichem Aufbau darauf zu achten, dass eine ausreichende Probenmenge für eine sinnvolle Auswertung vorliegt. Gerade bei dem Geschlechtervergleich war dies nicht bei allen Untersuchungen gegeben. Außerdem könnten weitere Gestationstage in spätere Studien mit integriert werden, um klarere Entwicklungen der verschiedenen Untersuchungsparameter während des Verlaufs der Schwangerschaft feststellen zu können.

Da hinter den getätigten Untersuchungen das Interesse am Menschen steht, bleibt abschließend trotz der Ähnlichkeiten von murinen und humanen Plazenten generell zu beweisen, dass die gewonnenen Resultate und Schlussfolgerungen aus Studien an Mausplazenten auch tatsächlich auf den Menschen übertragen werden können.

5 Zusammenfassung

Adipositas zählt mit zunehmender Prävalenz zu den größten globalen Gesundheitsproblemen und führt zahlreiche Risiken für Folgeerkrankungen mit sich. Während der Schwangerschaft kann mütterliches Übergewicht außerdem verschiedene Komplikationen hervorrufen. Während die Mütter selbst häufiger an Gestationsdiabetes oder Präeklampsie leiden, bedeutet die Adipositas für die Feten ein erhöhtes Risiko für eine Totgeburt, anormales Wachstum, fetale Asphyxie oder Spontanabort. Als Verbindungsorgan zwischen Mutter und Fetus liegt ein Zusammenhang zwischen diesen Komplikationen und einer gestörten Plazentaentwicklung nahe. Anhand eines Mausmodells sollten verschiedene plazentare Aspekte in Verbindung mit maternaler Adipositas an den Gestationstagen G16 und G19 herausgearbeitet werden. Dazu wurden die Mäuse in SD (Standard Diät, normalgewichtig) und HFD (Hoch Fett Diät, übergewichtig) unterteilt. Unter Berücksichtigung des durch die Feten bestimmten Geschlechts der Plazenten wurden dann Untersuchungen bezüglich des Gewichts der Feten und Plazenten, zur Proliferationsrate in Labyrinth und Spongiotrophoblast mittels histochemischer PCNA Färbung, zur Größe der Fläche der Plazentazonen und zum Vorkommen an Glykogenspeichern vorgenommen.

Die Gewichtsbestimmung zeigte bei den Plazenten von übergewichtigen Müttern zwar keine Abweichungen, bei den HFD Feten wurde jedoch ein reduziertes Gewicht an G16 festgestellt. Da sich die Gewichte an G19 wieder angeglichen hatten, muss von einem enormen Wachstumsschub der HFD Feten innerhalb dieser drei Tage ausgegangen werden. Passend dazu wurde ein doppelt so starker Abbau an Glykogenzellen bei HFD Feten im selben Zeitraum festgestellt, der durch eine vermehrte Freisetzung von Glukose zu einer erhöhten Nährstoffversorgung der Feten geführt haben könnte. Gleichzeitig wurde eine Verkleinerung der Fläche des Spongiotrophoblasten bei den HFD Plazenten zwischen G16 und G19 detektiert. Da die Glykogenzellen fast ausschließlich hier gefunden wurden, verlaufen diese beiden Befunde ebenfalls kongruent. Dem gegenüber steht das Auffinden einer verkleinerten Labyrinth-Fläche bei den HFD Plazenten an G19, die als fetomaternale Transferzone eher eine schlechtere Versorgung des Feten bedeuten würde.

Bezüglich der untersuchten Proliferationsrate konnte weder im Labyrinth noch im Spongiotrophoblast die im Vorfeld an G19 ermittelte verringerte Zellteilung bestätigt werden. Und auch die Faktoren Akt und ERK1/2, die durch die Rezeptoren der Insulin-Familie angesteuert werden, zeigten keine bedeutenden Abweichungen. Abschließend

konnten auch bei geschlechtsspezifischen plazentaren Untersuchungen keine klaren Unterschiede detektiert werden.

Es zeigt sich, dass einige richtungsweisende Ergebnisse generiert wurden, die einen Einfluss maternaler Adipositas auf die Plazenta und den Fetus belegen. Anhand weiterer Untersuchungen (die teilweise schon getätigt wurden), sollten diese Ergebnisse noch verifiziert werden. Die Forschungsarbeit an der Plazenta, gerade in Bezug auf mütterliches Übergewicht, ist noch lange nicht abgeschlossen und bietet reichlich Potential zur Aufklärung unbekannter Zusammenhänge.

6 Literaturverzeichnis

- Adamson, S.L., Lu, Y., Whiteley, K.J., Holmyard, D., Hemberger, M., Pfarrer, C. & Cross, J.C. (2002) Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Developmental Biology*. 250 (2), 358–373.
- Akison, L.K., Nitert, M.D., Clifton, V.L., Moritz, K.M. & Simmons, D.G. (2017) Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. *Placenta*. 5452–58.
- Akyol, A., Langley-Evans, S.C. & McMullen, S. (2009) Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. *The British Journal of Nutrition*. 102 (11), 1601–1610.
- Appel, S., Grothe, J., Storck, S., Janoschek, R., Bae-Gartz, I., Wohlfarth, M., Handwerk, M., Hucklenbruch-Rother, E., Gellhaus, A. & Dötsch, J. (2019) A Potential Role for GSK3 β in Glucose-Driven Intrauterine Catch-Up Growth in Maternal Obesity. *Endocrinology*. 160 (2), 377–386.
- Arendas, K., Qiu, Q. & Gruslin, A. (2008) Obesity in pregnancy: pre-conceptual to postpartum consequences. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada: JOGC*. 30 (6), 477–488.
- Baeten, J.M., Bukusi, E.A. & Lambe, M. (2001) Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women. *American Journal of Public Health*. 91 (3), 436–440.
- Barker, D.J., Osmond, C., Simmonds, S.J. & Wield, G.A. (1993) The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ: British Medical Journal*. 306 (6875), 422–426.
- Barros, L.F., Yudilevich, D.L., Jarvis, S.M., Beaumont, N. & Baldwin, S.A. (1995) Quantitation and immunolocalization of glucose transporters in the human placenta. *Placenta*. 16 (7), 623–633.
- Baumann, M.U., Deborde, S. & Illsley, N.P. (2002) Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine*. 19 (1), 13–22.
- Ben-Haroush, A., Hadar, E., Chen, R., Hod, M. & Yogev, Y. (2009) Maternal obesity is a major risk factor for large-for-gestational-infants in pregnancies complicated by gestational diabetes. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 279 (4), 539–543.
- Benirschke, K., Burton, G.J. & Baergen, R.N. (2012) Google-Books-ID: NxvikswRnOIC. *Pathology of the Human Placenta*. Springer Science & Business Media.
- Binder, N.K., Beard, S.A., Kaitu'u-Lino, T.J., Tong, S., Hannan, N.J. & Gardner, D.K. (2015) Paternal obesity in a rodent model affects placental gene expression in a sex-specific manner. *Reproduction (Cambridge, England)*. 149 (5), 435–444.

- Blodgett, A.B., Kothinti, R.K., Kamyshko, I., Petering, D.H., Kumar, S. & Tabatabai, N.M. (2011) A Fluorescence Method for Measurement of Glucose Transport in Kidney Cells. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 13 (7), 743–751.
- Bodnar, L.M., Ness, R.B., Markovic, N. & Roberts, J.M. (2005) The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index. *Annals of Epidemiology*. 15 (7), 475–482.
- Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Mori-Estevez, A.D. & Sánchez-Acuña, G. (2013) Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumor. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 18 (2), e174–e179.
- Bouillot, S., Rampon, C., Tillet, E. & Huber, P. (2006) Tracing the glycogen cells with protocadherin 12 during mouse placenta development. *Placenta*. 27 (8), 882–888.
- Bowman, C.J., Streck, R.D. & Chapin, R.E. (2010) Maternal-placental insulin-like growth factor (IGF) signaling and its importance to normal embryo-fetal development. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 89 (4), 339–349.
- Brown, Z.A., Schalekamp-Timmermans, S., Tiemeier, H.W., Hofman, A., Jaddoe, V.W.V. & Steegers, E. a. P. (2014) Fetal sex specific differences in human placentation: a prospective cohort study. *Placenta*. 35 (6), 359–364.
- Caterson, I.D. & Gill, T.P. (2002) Obesity: epidemiology and possible prevention. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*. 16 (4), 595–610.
- Cetin, I., Parisi, F., Berti, C., Mandò, C. & Desoye, G. (2012) Placental fatty acid transport in maternal obesity. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 3 (6), 409–414.
- Chen, H.X. & Sharon, E. (2013) IGF-1R as an anti-cancer target--trials and tribulations. *Chinese Journal of Cancer*. 32 (5), 242–252.
- Chen, W.S., Xu, P.-Z., Gottlob, K., Chen, M.-L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T. & Hay, N. (2001) Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes & Development*. 15 (17), 2203–2208.
- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F. & Birnbaum, M.J. (2001) Akt1/PKB α Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (42), 38349–38352.
- Coan, P.M., Conroy, N., Burton, G.J. & Ferguson-Smith, A.C. (2006) Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 235 (12), 3280–3294.
- Constância, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Stewart, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C. & Reik, W. (2002) Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. 417 (6892), 945–948.

- Cox, B., Kotlyar, M., Evangelou, A.I., Ignatchenko, V., Ignatchenko, A., Whiteley, K., Jurisica, I., Adamson, S.L., Rossant, J. & Kislinger, T. (2009) Comparative systems biology of human and mouse as a tool to guide the modeling of human placental pathology. *Molecular Systems Biology*. 5279.
- Croy, B.A., Ashkar, A.A., Minhas, K. & Greenwood, J.D. (2000) Can murine uterine natural killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia? *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 7 (1), 12–20.
- Das, U.G., Sadiq, H.F., Soares, M.J., Hay, W.W. & Devaskar, S.U. (1998) Time-dependent physiological regulation of rodent and ovine placental glucose transporter (GLUT-1) protein. *The American Journal of Physiology*. 274 (2 Pt 2), R339-347.
- De Pergola, G. & Silvestris, F. (2013) Obesity as a major risk factor for cancer. *Journal of Obesity*. 2013291546.
- Desoye, G., Korgun, E.T., Ghaffari-Tabrizi, N. & Hahn, T. (2002) Is fetal macrosomia in adequately controlled diabetic women the result of a placental defect?—a hypothesis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*. 11 (4), 258–261.
- Deurenberg, P., Yap, M. & van Staveren, W.A. (1998) Body mass index and percent body fat: a meta analysis among different ethnic groups. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*. 22 (12), 1164–1171.
- Evans, L. & Myatt, L. (2017) Sexual dimorphism in the effect of maternal obesity on antioxidant defense mechanisms in the human placenta. *Placenta*. 5164–69.
- Farah, C.S. & Salome, C.M. (2012) Asthma and obesity: a known association but unknown mechanism. *Respirology (Carlton, Vic.)*. 17 (3), 412–421.
- Forbes, K. & Westwood, M. (2008) The IGF Axis and Placental Function. *Hormone Research in Paediatrics*. 69 (3), 129–137.
- Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R.B., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., Shields, B., Harries, L.W., Barrett, J.C., Ellard, S., Groves, C.J., Knight, B., Patch, A.-M., Ness, A.R., Ebrahim, S., et al. (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science (New York, N.Y.)*. 316 (5826), 889–894.
- Frias, A.E., Morgan, T.K., Evans, A.E., Rasanen, J., Oh, K.Y., Thornburg, K.L. & Grove, K.L. (2011) Maternal High-Fat Diet Disturbs Uteroplacental Hemodynamics and Increases the Frequency of Stillbirth in a Nonhuman Primate Model of Excess Nutrition. *Endocrinology*. 152 (6), 2456–2464.
- Gabbe, S.G., Demers, L.M., Greep, R.O. & Vilee, C.A. (1972) Placental glycogen metabolism in diabetes mellitus. *Diabetes*. 21 (12), 1185–1191.

- Gregg, E.W. & Shaw, J.E. (2017) *Global Health Effects of Overweight and Obesity*. [Online] [online]. Available from: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMe1706095?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov (Accessed 14 May 2018).
- Guh, D.P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C.L. & Anis, A.H. (2009) The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*. 988.
- Haeussner, E., Schmitz, C., von Koch, F. & Frank, H.-G. (2013) Birth weight correlates with size but not shape of the normal human placenta. *Placenta*. 34 (7), 574–582.
- Hahn, T., Hahn, D., Blaschitz, A., Korgun, E.T., Desoye, G. & Dohr, G. (2000) Hyperglycaemia-induced subcellular redistribution of GLUT1 glucose transporters in cultured human term placental trophoblast cells. *Diabetologia*. 43 (2), 173–180.
- Haram, K., Pirhonen, J. & Bergsjø, P. (2002) Suspected big baby: a difficult clinical problem in obstetrics. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*. 81 (3), 185–194.
- Harris, L.K., Crocker, I.P., Baker, P.N., Aplin, J.D. & Westwood, M. (2011) IGF2 Actions on Trophoblast in Human Placenta Are Regulated by the Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor, Which Can Function as Both a Signaling and Clearance Receptor. *Biology of Reproduction*. 84 (3), 440–446.
- Hasan, M.Z., Ikawati, M., Tocharus, J., Kawaichi, M. & Oka, C. (2015) Abnormal development of placenta in HtrA1-deficient mice. *Developmental Biology*. 397 (1), 89–102.
- Hawkes, C.P. & Levitt Katz, L.E. (2017) '143 - Growth Factor Regulation of Fetal Growth', in Richard A. Polin, Steven H. Abman, David H. Rowitch, William E. Benitz, & William W. Fox (eds.) *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*. [Online]. Elsevier. pp. 1461-1470.e4.
- Heikura, U., Taanila, A., Hartikainen, A.-L., Olsen, P., Linna, S.-L., von Wendt, L. & Järvelin, M.-R. (2008) Variations in prenatal sociodemographic factors associated with intellectual disability: a study of the 20-year interval between two birth cohorts in northern Finland. *American Journal of Epidemiology*. 167 (2), 169–177.
- Herpertz, S., Zwaan, M. de & Zipfel, S. (2015) Google-Books-ID: 4n1gCgAAQBAJ. *Handbuch Essstörungen und Adipositas*. Springer-Verlag.
- Hiden, U., Glitzner, E., Hartmann, M. & Desoye, G. (2009) Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *Journal of Anatomy*. 215 (1), 60–68.
- Higgins, L., Mills, T.A., Greenwood, S.L., Cowley, E.J., Sibley, C.P. & Jones, R.L. (2013) Maternal obesity and its effect on placental cell turnover. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*. 26 (8), 783–788.

- Hill, D.J., Petrik, J. & Arany, E. (1998) Growth factors and the regulation of fetal growth. *Diabetes Care*. 21 Suppl 2B60-69.
- Hong, Y.H. & Chung, S. (2018) Small for gestational age and obesity related comorbidities. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*. 23 (1), 4–8.
- Howell, K.R. & Powell, T.L. (2017) Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction*. 153 (3), R97–R108.
- Hsiao, E.Y. & Patterson, P.H. (2012) Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development. *Developmental Neurobiology*. 72 (10), 1317–1326.
- Hulsey, T.C., Neal, D., Bondo, S.C., Hulsey, T. & Newman, R. (2005) Maternal prepregnant body mass index and weight gain related to low birth weight in South Carolina. *Southern Medical Journal*. 98 (4), 411–415.
- Huppertz, B. & Schleußner, E. (2018) Google-Books-ID: okBWDwAAQBAJ. *Die Plazenta: Grundlagen und klinische Bedeutung*. Springer-Verlag.
- James, P.T. (2004) Obesity: the worldwide epidemic. *Clinics in Dermatology*. 22 (4), 276–280.
- James, W.P.T. (2008) The epidemiology of obesity: the size of the problem. *Journal of Internal Medicine*. 263 (4), 336–352.
- Janoschek, R., Bae-Gartz, I., Vohlen, C., Alcázar, M.A.A., Dinger, K., Appel, S., Dötsch, J. & Hucklenbruch-Rother, E. (2016) Dietary intervention in obese dams protects male offspring from WAT induction of TRPV4, adiposity, and hyperinsulinemia. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 24 (6), 1266–1273.
- Jones, C.T. (1991) Control of glucose metabolism in the perinatal period. *Journal of Developmental Physiology*. 15 (2), 81–89.
- Jones, H.N., Woollett, L.A., Barbour, N., Prasad, P.D., Powell, T.L. & Jansson, T. (2009) High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 23 (1), 271–278.
- Kabiru, W. & Raynor, B.D. (2004) Obstetric outcomes associated with increase in BMI category during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 191 (3), 928–932.
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R. & Wojtowicz, J.M. (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Methods*. 115 (1), 97–105.
- Kelman, Z. & O'Donnell, M. (1995) Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Research*. 23 (18), 3613–3620.
- Kent, L.N., Ohboshi, S. & Soares, M.J. (2012) Akt1 and insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulate placentation and fetal/postnatal development. *International Journal of Developmental Biology*. 56 (4), 255–261.

- Kidron, D., Bernheim, J. & Aviram, R. (2009) Placental findings contributing to fetal death, a study of 120 stillbirths between 23 and 40 weeks gestation. *Placenta*. 30 (8), 700–704.
- Kim, D.W., Young, S.L., Grattan, D.R. & Jasoni, C.L. (2014) Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biology of Reproduction*. 90 (6), 130.
- Kimura, K., Spate, L.D., Green, M.P., Murphy, C.N., Seidel, G.E. & Roberts, R.M. (2004) Sexual dimorphism in interferon-tau production by in vivo-derived bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 67 (2), 193–199.
- Larson, M.A., Kimura, K., Kubisch, H.M. & Roberts, R.M. (2001) Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (17), 9677–9682.
- Lau, M.M., Stewart, C.E., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P. & Stewart, C.L. (1994) Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes & Development*. 8 (24), 2953–2963.
- Lehavi, O., Aizenstein, O., Evans, M.I. & Yaron, Y. (2005) 2nd-trimester maternal serum human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein levels in male and female fetuses with Down syndrome. *Fetal Diagnosis and Therapy*. 20 (3), 235–238.
- Lescisin, K.R., Varmuza, S. & Rossant, J. (1988) Isolation and characterization of a novel trophoblast-specific cDNA in the mouse. *Genes & Development*. 2 (12A), 1639–1646.
- Leung, T.Y., Leung, T.N., Sahota, D.S., Chan, O.K., Chan, L.W., Fung, T.Y. & Lau, T.K. (2008) Trends in maternal obesity and associated risks of adverse pregnancy outcomes in a population of Chinese women. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*. 115 (12), 1529–1537.
- Lim, C.C. & Mahmood, T. (2015) Obesity in pregnancy. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 29 (3), 309–319.
- Lithell, H.O., McKeigue, P.M., Berglund, L., Mohsen, R., Lithell, U.B. & Leon, D.A. (1996) Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50–60 years. *BMJ (Clinical research ed.)*. 312 (7028), 406–410.
- Lopez, M.F., Dikkes, P., Zurakowski, D. & Villa-Komaroff, L. (1996) Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cells in the murine placenta. *Endocrinology*. 137 (5), 2100–2108.
- Ma, Y., Zhu, M.J., Zhang, L., Hein, S.M., Nathanielsz, P.W. & Ford, S.P. (2010) Maternal obesity and overnutrition alter fetal growth rate and cotyledonary vascularity and angiogenic factor expression in the ewe. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 299 (1), R249–258.

- Maes, H.H., Neale, M.C. & Eaves, L.J. (1997) Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behavior Genetics*. 27 (4), 325–351.
- Maltepe, E., Bakardjiev, A.I. & Fisher, S.J. (2010) The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *The Journal of Clinical Investigation*. 120 (4), 1016–1025.
- Mao, J., Zhang, X., Sieli, P.T., Falduto, M.T., Torres, K.E. & Rosenfeld, C.S. (2010) Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107 (12), 5557–5562.
- Marchi, J., Berg, M., Dencker, A., Olander, E.K. & Begley, C. (2015) Risks associated with obesity in pregnancy, for the mother and baby: a systematic review of reviews. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*. 16 (8), 621–638.
- Marshall, N.E. & Spong, C.Y. (2012) Obesity, Pregnancy Complications, and Birth Outcomes. *Seminars in Reproductive Medicine*. 30 (6), 465–471.
- McCain, J. (2013) The MAPK (ERK) Pathway. *Pharmacy and Therapeutics*. 38 (2), 96–108.
- Mensink, G.B.M., Schienkiewitz, A., Haftenberger, M., Lampert, T., Ziese, T. & Scheidt-Nave, C. (2013) [Overweight and obesity in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 56 (5–6), 786–794.
- Meschia, G., Battaglia, F.C., Hay, W.W. & Sparks, J.W. (1980) Utilization of substrates by the ovine placenta in vivo. *Federation Proceedings*. 39 (2), 245–249.
- Mission, J.F., Marshall, N.E. & Caughey, A.B. (2015) Pregnancy risks associated with obesity. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 42 (2), 335–353.
- Mitanchez, D., Jacqueminet, S., Nizard, J., Tanguy, M.-L., Ciangura, C., Lacorte, J.-M., De Carne, C., Foix L'Hélias, L., Chavatte-Palmer, P., Charles, M.-A. & Dommergues, M. (2017) Effect of maternal obesity on birthweight and neonatal fat mass: A prospective clinical trial. *PLoS ONE*. 12 (7), .
- Morris, G.F. & Mathews, M.B. (1989) Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*. 264 (23), 13856–13864.
- Myatt, L. & Maloyan, A. (2016) Obesity and Placental Function. *Seminars in Reproductive Medicine*. 34 (1), 42–49.
- Neggens, Y.H., Goldenberg, R.L., Ramey, S.L. & Cliver, S.P. (2003) Maternal prepregnancy body mass index and psychomotor development in children. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*. 82 (3), 235–240.
- O'Connell, B.A., Moritz, K.M., Walker, D.W. & Dickinson, H. (2013) Sexually dimorphic placental development throughout gestation in the spiny mouse (*Acomys cahirinus*). *Placenta*. 34 (2), 119–126.

- O’Gorman, D.B., Weiss, J., Hettiaratchi, A., Firth, S.M. & Scott, C.D. (2002) Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor overexpression reduces growth of choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 143 (11), 4287–4294.
- Pasello, G., Urso, L., Conte, P. & Favaretto, A. (2013) *Effects of Sulfonylureas on Tumor Growth: A Review of the Literature*. Vol. 18.
- Pinar, H., Goldenberg, R.L., Koch, M.A., Heim-Hall, J., Hawkins, H.K., Shehata, B., Abramowsky, C., Parker, C.B., Dudley, D.J., Silver, R.M., Stoll, B., Carpenter, M., Saade, G., Moore, J., Conway, D., Varner, M.W., Hogue, C.J.R., Coustan, D.R., Sbrana, E., et al. (2014) Placental findings in singleton stillbirths. *Obstetrics and Gynecology*. 123 (2 Pt 1), 325–336.
- Popkin, B.M. (2011) Does global obesity represent a global public health challenge? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 93 (2), 232–233.
- Prospective Studies Collaboration, Whitlock, G., Lewington, S., Sherliker, P., Clarke, R., Emberson, J., Halsey, J., Qizilbash, N., Collins, R. & Peto, R. (2009) Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet (London, England)*. 373 (9669), 1083–1096.
- Rasmussen, S., Irgens, L.M. & Espinoza, J. (2014) Maternal obesity and excess of fetal growth in pre-eclampsia. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*. 121 (11), 1351–1357.
- Reynolds, C.M., Vickers, M.H., Harrison, C.J., Segovia, S.A. & Gray, C. (2015) Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. *Physiological Reports*. 3 (5), .
- Rode, L., Nilas, L., Wøjedemann, K. & Tabor, A. (2005) Obesity-related complications in Danish single cephalic term pregnancies. *Obstetrics and Gynecology*. 105 (3), 537–542.
- Roland, M.C.P., Friis, C.M., Voldner, N., Godang, K., Bollerslev, J., Haugen, G. & Henriksen, T. (2012) Fetal Growth versus Birthweight: The Role of Placenta versus Other Determinants. *PLoS ONE*. 7 (6), .
- Rosario, F.J., Kanai, Y., Powell, T.L. & Jansson, T. (2015) Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 23 (8), 1663–1670.
- Salafia, C.M., Vogel, C.A., Bantham, K.F., Vintzileos, A.M., Pezzullo, J. & Silberman, L. (1992) Preterm delivery: correlations of fetal growth and placental pathology. *American Journal of Perinatology*. 9 (3), 190–193.
- Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414 (6865), 799–806.
- Schlossmann, H. (2013) Google-Books-ID: 9oeebwAAQBAJ. *Der Stoffaustausch Zwischen Mutter und Frucht Durch die Placenta*. Springer-Verlag.

- Sferruzzi-Perri, A.N., Vaughan, O.R., Haro, M., Cooper, W.N., Musial, B., Charalambous, M., Pestana, D., Ayyar, S., Ferguson-Smith, A.C., Burton, G.J., Constancia, M. & Fowden, A.L. (2013) An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 27 (10), 3928–3937.
- Shafir, E. & Barash, V. (1991) Placental glycogen metabolism in diabetic pregnancy. *Israel Journal of Medical Sciences*. 27 (8–9), 449–461.
- Sibley, C.P., Coan, P.M., Ferguson-Smith, A.C., Dean, W., Hughes, J., Smith, P., Reik, W., Burton, G.J., Fowden, A.L. & Constância, M. (2004) Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (21), 8204–8208.
- Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 9 (1), 59–71.
- Song, L., Sun, B., Boersma, G.J., Corder, Z.A., Yan, J., Moran, T.H. & Tamashiro, K.L.K. (2017) Prenatal high-fat diet alters placental morphology, nutrient transporter expression, and mtorc1 signaling in rat. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 25 (5), 909–919.
- Steier, J.A., Bergsjø, P.B., Thorsen, T. & Myking, O.L. (2004) Human chorionic gonadotropin in maternal serum in relation to fetal gender and utero-placental blood flow. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*. 83 (2), 170–174.
- Storck, S. (2014) Der Einfluss maternaler Adipositas auf die Plazenta -ein Mausmodell. *Dissertation*.
- Strzalka, W. & Ziemienowicz, A. (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*. 107 (7), 1127–1140.
- Stuart, T.J., O'Neill, K., Condon, D., Sasson, I., Sen, P., Xia, Y. & Simmons, R.A. (2018) Diet-induced obesity alters the maternal metabolome and early placenta transcriptome and decreases placenta vascularity in the mouse. *Biology of Reproduction*. 98 (6), 795–809.
- Su, R., Wang, C., Feng, H., Lin, L., Liu, X., Wei, Y. & Yang, H. (2016) Alteration in Expression and Methylation of IGF2/H19 in Placenta and Umbilical Cord Blood Are Associated with Macrosomia Exposed to Intrauterine Hyperglycemia. *PLoS One*. 11 (2), e0148399.
- Thornburg, K.L., O'Tierney, P.F. & Louey, S. (2010) Review: The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. *Placenta*. 31 SupplS54-59.
- Tunster, S.J., Tycko, B. & John, R.M. (2010) The Imprinted Phlda2 Gene Regulates Extraembryonic Energy Stores. *Molecular and Cellular Biology*. 30 (1), 295–306.
- Walker, W.A., Duggan, C. & Watkins, J.B. (2003) Google-Books-ID: ZRXIZuoLuUC. *Nutrition in Pediatrics: Basic Science and Clinical Application*. PMPH-USA.
- Whitaker, R.C. (2004) Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics*. 114 (1), e29-36.

- WHO (2018) *Body mass index - BMI*. [Online] [online]. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi> (Accessed 15 February 2018).
- WHO (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organization Technical Report Series*. 894i–xii, 1–253.
- WHO (2016) *WHO | Childhood overweight and obesity*. [Online] [online]. Available from: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/> (Accessed 17 May 2018).
- Wiemers, D.O., Shao, L.-J., Ain, R., Dai, G. & Soares, M.J. (2003) The mouse prolactin gene family locus. *Endocrinology*. 144 (1), 313–325.
- X Chen, H. & Sharon, E. (2013) *IGF-1R as an anti-cancer target-trials and tribulation*. Vol. 32.
- Ye, K., Li, L., Zhang, D., Li, Y., Wang, H.Q., Lai, H.L. & Hu, C.L. (2017) Effect of Maternal Obesity on Fetal Growth and Expression of Placental Fatty Acid Transporters. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 9 (4), 300–307.
- Zhu, M.J., Du, M., Nijland, M.J., Nathanielsz, P.W., Hess, B.W., Moss, G.E. & Ford, S.P. (2009) Down-regulation of growth signaling pathways linked to a reduced cotyledonary vascularity in placentomes of over-nourished, obese pregnant ewes. *Placenta*. 30 (5), 405–410.

7 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Appel, S., Grothe, J., Storck, S., Janoschek, R., Bae-Gartz, I., Wohlfarth, M., Handwerk, M., Hucklenbruch-Rother, E., Gellhaus, A. & Dötsch, J. (2019) A Potential Role for GSK3 β in Glucose-Driven Intrauterine Catch-Up Growth in Maternal Obesity. *Endocrinology*. 160 (2), 377–386.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht einer murinen Plazenta (eigene Darstellung).....	13
Abbildung 2: Vergleich von humaner und muriner Plazenta (Maltepe et al., 2010).....	14
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Wachstumsfaktor-Signalkaskade (eigene Darstellung in Anlehnung an (Chen & Sharon, 2013; Saltiel & Kahn, 2001; Pasello et al., 2013).....	17
Abbildung 4: Aufbau des Mausmodells	20
Abbildung 5: Gewichte aller Feten und Plazenten.....	33
Abbildung 6: Agarose-Gelelektrophorese zur plazentaren Geschlechtsbestimmung...	34
Abbildung 7: Vergleich männlicher und weiblicher Fetengewichte	35
Abbildung 8: Bestimmung der Proliferationsrate in Labyrinth und Spongiotrophoblast	40
Abbildung 9: Geschlechtsspezifische relative Proteinlevel von PCNA an G19	42
Abbildung 10: Vermessung der Flächen von Labyrinth und Spongiotrophoblast.....	46
Abbildung 11: Fläche der Glykogenzellen und ihre Reduktion zwischen G16 und G19	49

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen anhand des BMI (nach WHO, Stand 2018).....	9
Tabelle 2: Zusammensetzung des SD und HFD Futters	19
Tabelle 3: Geräte	21
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.....	21
Tabelle 5: Puffer und Stammlösungen	23
Tabelle 6: Primer für die Genotypisierung des Geschlechts (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)	23
Tabelle 7: Plazentaeffizienz, Geschlechterverteilung, Wurfgröße und Resorptionsquote	36
Tabelle 8: Proliferationsrate in den verschiedenen Arealen der Plazenten.....	41
Tabelle 9: geschlechtsspezifische Auswertung proliferationsrelevanter Parameter.....	44
Tabelle 10: Anteil an Glykogenzellen in Labyrinth und Spongiotrophoblast.....	48

8.3 Weitere Abbildungen

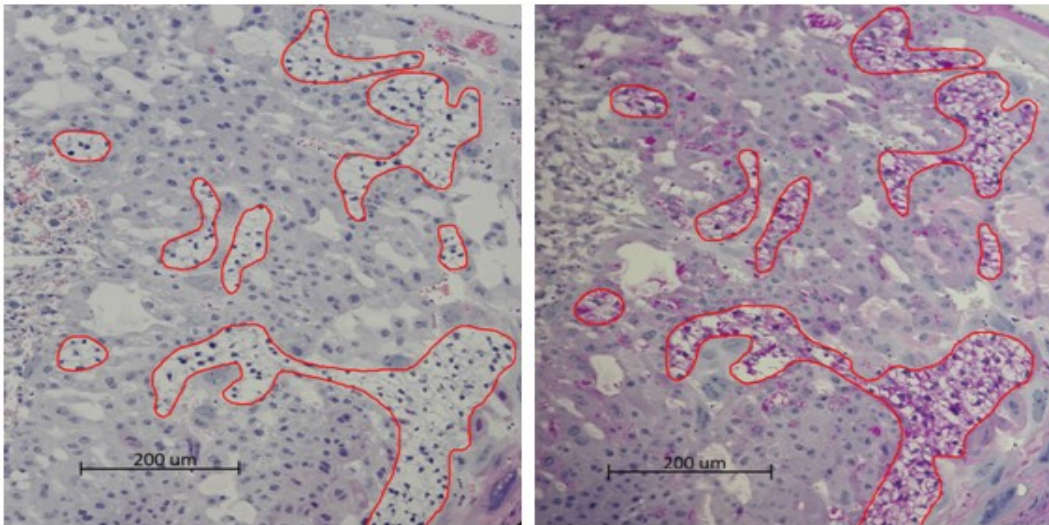
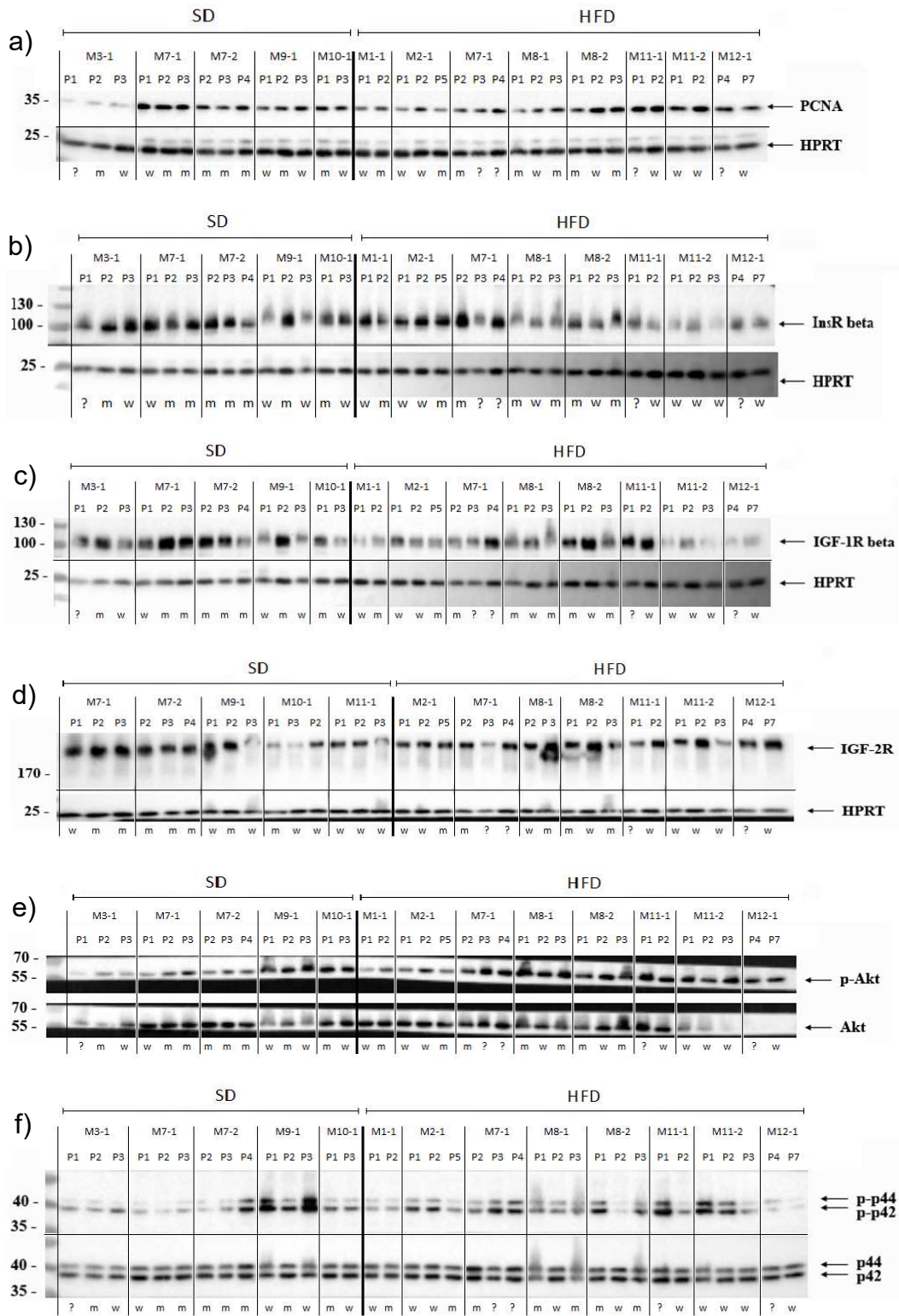


Abbildung A 1: Vergleich HE- und PAS-Färbung

Auschnitte von zwei unmittelbar aufeinander folgenden Schnitten mit unterschiedlicher Färbung: Links die standardmäßige HE-Färbung, rechts die Färbung nach PAS-Reaktion. Die Glykogenzellen erscheinen in der HE-Färbung als so genannte „Geisterzellen“ (leer), in der PAS-Färbung magentarot.

G16



G19

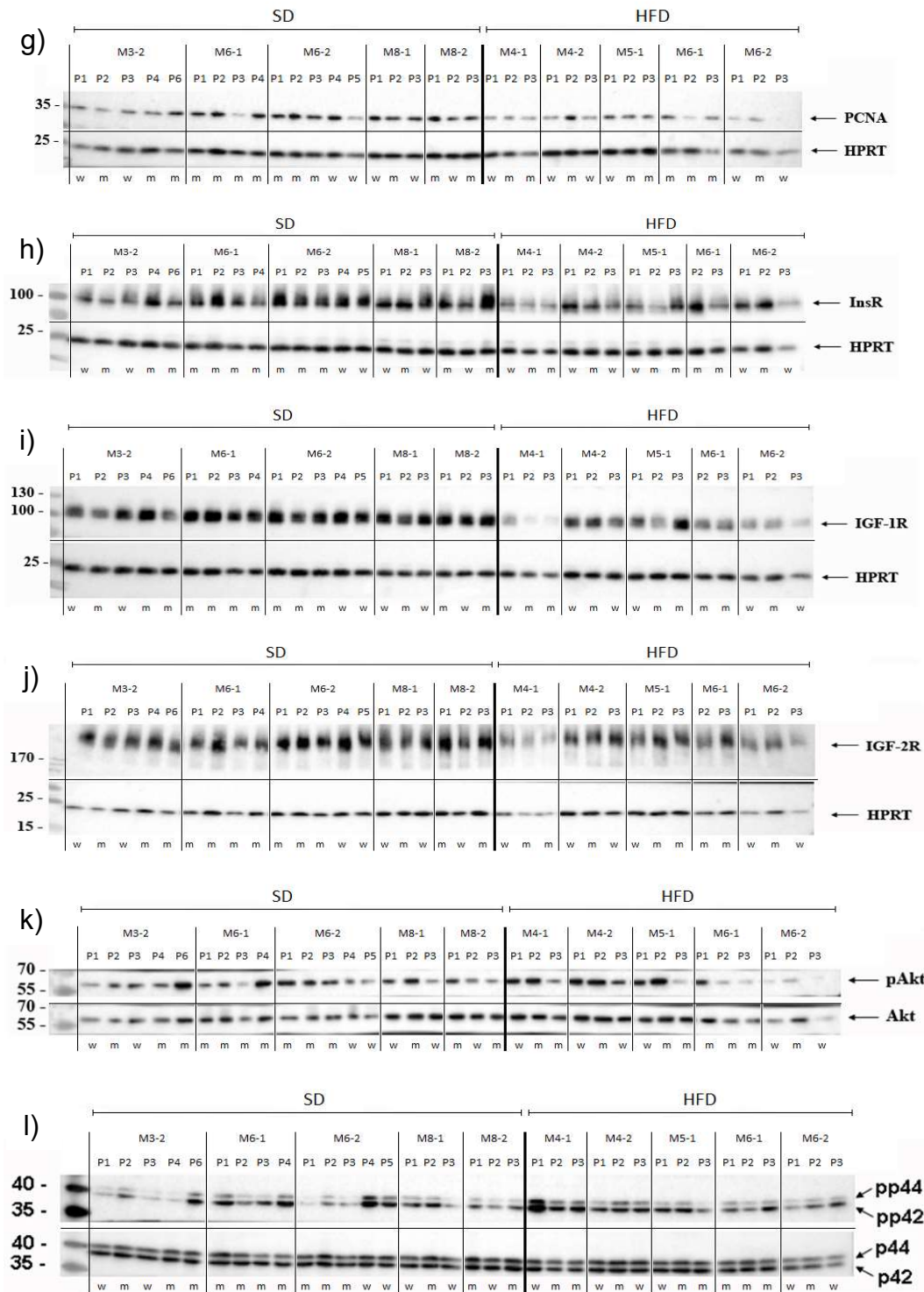


Abbildung A 2: Western Blots von proliferationsrelevanten Parametern

Western Blot Analyse von Plazentalysaten aus SD- und HFD-Müttern. Untersucht wurden PCNA, die Rezeptoren InsR, IGF-1R und IGF-2R sowie die Faktoren Akt und ERK1/2 (p44/p42) an den Gestationstagen G16 (a-f) und G19 (g-l). Als Abgleichprotein diente HPRT bzw. bei Akt und ERK1/2 ihre jeweilige inaktive Form. p = phosphoryliert/aktiviert. Die Intensität der Proteinbanden wurde anschließend densitometrisch bestimmt und das Geschlecht (m/w) der jeweiligen Plazenta (P) zugeordnet. Die Muttertiere (M) wurden durch vertikale Linien separiert.

8.4 Weitere Tabellen


	SD G16		HFD G16		SD G19		HFD G19	
	n Nester Ø	%	n Nester Ø	%	n Nester Ø	%	n Nester Ø	%
STB im Labyrinth	1,58	0,61	0,55	0,23	2,40	0,90	0,62	1,03

Tabelle A 1: Flächenanteil an Spongiotrophoblastzellen im Labyrinth

Dargestellt ist die durchschnittliche Menge an Glykogenzellnestern sowie der prozentuale Anteil an Glykogenzellen [%] bezogen auf die gesamte gemessene Glykogenzell-Fläche im Labyrinth und Spongiotrophoblast von SD und HFD Plazenten an den Gestationstagen G16 und G19.
n = Anzahl der Nester.

8.5 Copyright Genehmigung

Erlaubnis zur Verwendung der Abbildung 2: Vergleich von humaner und muriner Plazenta (Maltepe et al., 2010)



Copyright Clearance Center

Confirmation Number: 11745211
Order Date: 09/03/2018

Customer Information

Customer: Jon Grothe
Account Number: 3001330122
Organization: Jon Grothe
Email: jon.grothe@uk-koeln.de
Phone: +49 1783353990
Payment Method: Invoice

This is not an invoice

Order Details

JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. ONLINE Billing Status: N/A

<p>Order detail ID: 71528228 ISSN: 1558-8238 Publication Type: e-Journal Volume: Issue: Start page: Publisher: AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION Author/Editor: American Society for Clinical Investigation</p>	<p>Permission Status: <input checked="" type="checkbox"/> Granted Permission type: Republish or display content Type of use: Thesis/Dissertation Order License Id: 4421301183032</p>	<p>Requestor type: Academic institution Format: Print, Electronic Portion: chart/graph/table/figure Number of charts/graphs/tables/figures: 1 The requesting person/organization: Jon Grothe / University of Cologne Title or numeric reference of the portion(s): Figure 1 Title of the article or chapter the portion is from: The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development Editor of portion(s): American Society for Clinical Investigation Author of portion(s): Emin Maltepe, Anna I. Bakardjiev, Susan J. Fisher Volume of serial or monograph: 120 Issue, if republishing an article from a serial: 4 Page range of portion: 1016-1025 Publication date of portion: April 1, 2010 Rights for: Main product Duration of use: Life of current and all future editions Creation of copies for the disabled: no With minor editing privileges: no For distribution to: Worldwide In the following language(s): Original language plus one translation Specific languages: With incidental promotional use: no Lifetime unit quantity of new product: Up to 499 Title: Maternale Adipositas induziert eine plazentare Dysfunktion mit Auswirkung auf die fetale Entwicklung Instructor name: Dr. med. Jörg Dötsch Institution name: Universität zu Köln Expected presentation date: Jan 2019</p>
--	--	---

Note: This item was invoiced separately through our **RightsLink** service. [More info](#) \$ 0.00

Total order items: 1	Order Total: \$0.00
-----------------------------	----------------------------

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.