

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

**Untersuchungen zur Expression von Kernrezeptoren und HLA-G in  
Plazenten von Patientinnen mit Gestationsdiabetes**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rebecca Hüttenbrenner

aus Dachau

2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Parhofer  
Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Manfred Schmitt

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Julia Knabl

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2015

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Gestationsdiabetes mellitus.....	1
1.1.1 Definition und Diagnosekriterien .....	1
1.1.2 Risikofaktoren .....	2
1.1.3 Pathophysiologie .....	2
1.1.4 Folgen für die Mutter.....	3
1.1.5 Folgen für das Kind .....	3
1.1.6 Therapie .....	4
1.2 Die Plazenta .....	4
1.2.1 Entstehung und Aufbau der Plazenta.....	4
1.2.2 Funktion der Plazenta .....	6
1.2.2.1 Metabolische Funktion.....	6
1.2.2.2 Endokrine Funktion.....	7
1.2.2.3 Immunologische Funktion.....	8
1.3 Kernrezeptoren und ihre Liganden .....	8
1.3.1 Vitamin D und der Vitamin D-Rezeptor .....	9
1.3.2 <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i> .....	12
1.3.3 Estrogene und die Estrogen-Rezeptoren $\alpha$ und $\beta$ .....	13
1.4 Human leukocyte antigen-G .....	16
1.5 Die Chorionkarzinomzelllinie, BeWo .....	17
1.6 Fragestellung .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	18
2.1 Material .....	18
2.2 Methoden .....	19
2.2.1 Immunhistochemie .....	19
2.2.1.1 Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode.....	19
2.2.1.2 Anfertigung der Paraffinschnitte.....	20
2.2.1.3 Lösungsansätze und Antikörper .....	20
2.2.1.4 Ablauf der immunhistochemischen Färbung .....	22
2.2.1.5 Vitamin D-Rezeptor .....	23
2.2.2 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.....	24
2.2.3 RNA-Isolation und Reverse Transkription.....	26
2.2.4 Quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion.....	27
2.2.5 Westernblot.....	28
2.2.5.1 Erstellen von Gewebslysaten .....	28
2.2.5.2 Proteinassay nach Bradford.....	28
2.2.5.3 Durchführung des Westernblots.....	29
2.2.6 Zellkultur .....	30
2.2.6.1 Kultivierung der Zelllinien.....	30
2.2.6.2 Splitten der Zellen .....	31
2.2.6.3 Stimulation der Zellen .....	31
2.2.6.4 RNA-Isolation und Reverse Transkription .....	32
2.2.6.5 Immunocytochemische Färbung des Vitamin D-Rezeptors.....	33
2.2.7 DNA-Isolation .....	34
2.2.8 Natriumbisulfit-Behandlung.....	34
2.2.9 <i>Real-time</i> -methylierungsspezifische PCR .....	35
2.2.10 Statistik .....	36
<b>3. Ergebnisse</b> .....	37
3.1 Vitamin D-Rezeptor.....	37

3.1.1	Immunhistochemische Färbung.....	37
3.1.2	Westernblot für den Vitamin D-Rezeptor .....	40
3.1.3	Doppelexpression von Vitamin D-Rezeptor und <i>Human leukocyte antigen-G</i> .....	41
3.1.4	Doppelexpression von Vitamin D-Rezeptor und Ubiquitin .....	42
3.1.5	Quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion.....	43
3.1.6	Vitamin D-Rezeptor-Expression in BeWos nach Stimulation .....	44
3.1.7	Immuncytochemische Färbung des Vitamin D Rezeptors .....	45
3.2	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma .....	46
3.2.1	Immunhistochemische Färbung.....	46
3.2.2	Doppelexpression von <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i> und Cytokeratin-7 .....	47
3.2.3	Quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion.....	48
3.2.4	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i> -Expression in BeWos nach Stimulation.....	49
3.3	Estrogen-Rezeptoren $\alpha$ und $\beta$ .....	50
3.3.1	Immunhistochemische Färbung.....	50
3.3.2	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion für den Estrogen-Rezeptor $\alpha$ .....	53
3.3.3	Methylierung des Estrogen-Rezeptor $\alpha$ -Promotors .....	54
3.4	Human leukozyte antigen-G .....	55
3.4.1	Immunhistochemische Färbung.....	55
3.4.2	Doppelexpression von <i>Human leukozyte antigen-G</i> und Cytokeratin-7 ..	56
3.5	Klinische Parameter und Korrelationsanalyse .....	56
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>58</b>
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	58
4.2	Ist die Zelllinie BeWo geeignet für unsere Versuche? .....	58
4.3	Der Vitamin D-Rezeptor an der maternalen-fetalen Grenzzone.....	59
4.4	Vitamin D-Mangel als Ursache für die erhöhte Expression des Vitamin D-Rezeptors .....	60
4.5	Der Vitamin D-Rezeptor im feto-plazentaren Endothel .....	60
4.6	Der Vitamin D-Rezeptor und die geschlechtsspezifischen Unterschiede.....	61
4.7	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma und die veränderte Zusammensetzung der Fettsäuren bei GDM .....	61
4.8	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma und seine Liganden .....	62
4.9	Der Estrogen-Rezeptor $\alpha$ an der maternalen-fetalen Grenzzone .....	63
4.10	Methylierung des Estrogen-Rezeptor $\alpha$ -Promotors.....	64
4.11	Der Estrogen-Rezeptor $\beta$ und die Plazenta .....	64
4.12	Der Estrogen-Rezeptor $\beta$ und die geschlechtsspezifischen Unterschiede....	65
4.13	HLA-G an der maternalen-fetalen Grenzzone .....	65
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme</b> .....	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>83</b>
<b>9.</b>	<b>Labormaterial und Geräte</b> .....	<b>85</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>92</b>
<b>11.</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>93</b>
<b>12.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>95</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Gestationsdiabetes mellitus

### 1.1.1 Definition und Diagnosekriterien

Gestationsdiabetes mellitus (GDM) ist definiert als erstmalig in der Schwangerschaft aufgetretene oder diagnostizierte Glukosetoleranzstörung, die 3-8% aller Schwangerschaften betrifft (Metzger et al. 1998). Diese Definition ist unumstritten, aber die genauen Diagnosekriterien sind immer wieder Gegenstand von Diskussionen. Im Jahre 1964 wurden erstmals Diagnosekriterien für GDM aufgestellt (O'Sullivan et al. 1964), die, mit wenigen Änderungen, bis vor ein paar Jahren Bestand hatten (Carpenter et al. 1982). Diese Kriterien wurden teilweise einfach von den Empfehlungen für nicht schwangere Frauen übernommen, z.B. von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (1980), oder mit der Intention ausgewählt, Frauen zu erkennen, die nach der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko haben, einen Diabetes zu entwickeln (Metzger et al. 2007). Somit war nicht garantiert, Schwangerschaften zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko für ungünstige perinatale Verläufe und Folgen für Mutter und Kind haben (Metzger et al. 2010). Deshalb hat die „*International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG)*“, die sich aus Vertretern vieler internationaler gynäkologischer und diabetologischer Organisationen zusammensetzt, im März 2010 neue Empfehlungen für die Diagnose eines GDM herausgegeben (Metzger et al. 2010). Diese besagen, dass bei allen schwangeren Frauen, bei denen bisher kein Diabetes mellitus diagnostiziert ist, in der 24.-28. Schwangerschaftswoche ein oraler Glukosetoleranztest mit 75 g Glukose (75-g-OGTT) durchgeführt werden soll. Dieser sollte morgens stattfinden und mindestens 8 Stunden vorher sollte keine Nahrungsaufnahme erfolgt sein. Zunächst wird die Glukose im Plasma im nüchternen Zustand bestimmt, anschließend muss die Schwangere eine Glukose-Lösung trinken. Nun wird nach einer und nach zwei Stunden wiederum die Glukose im Plasma gemessen. Ein GDM wird laut IADPSG diagnostiziert, wenn einer oder mehrere der folgenden Blutzuckergrenzwerte im Plasma überschritten werden: Nüchtern  $\geq 92$  mg/dl, 1h  $\geq 180$  mg/dl, 2h  $\geq 153$  mg/dl. Die Verwendung dieser Kriterien könnte die Anzahl der Frauen mit GDM fast verdoppeln. Das leitliniengerechte Vorgehen zur Diagnose einer Hyperglykämie ist als Flussdiagramm in Abbildung 1 zusammengefasst. Als Basis für die neuen Empfehlungen der IADPSG diente v.a. die „*Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes (HAPO)*“ Studie (2002; Metzger et al. 2008).

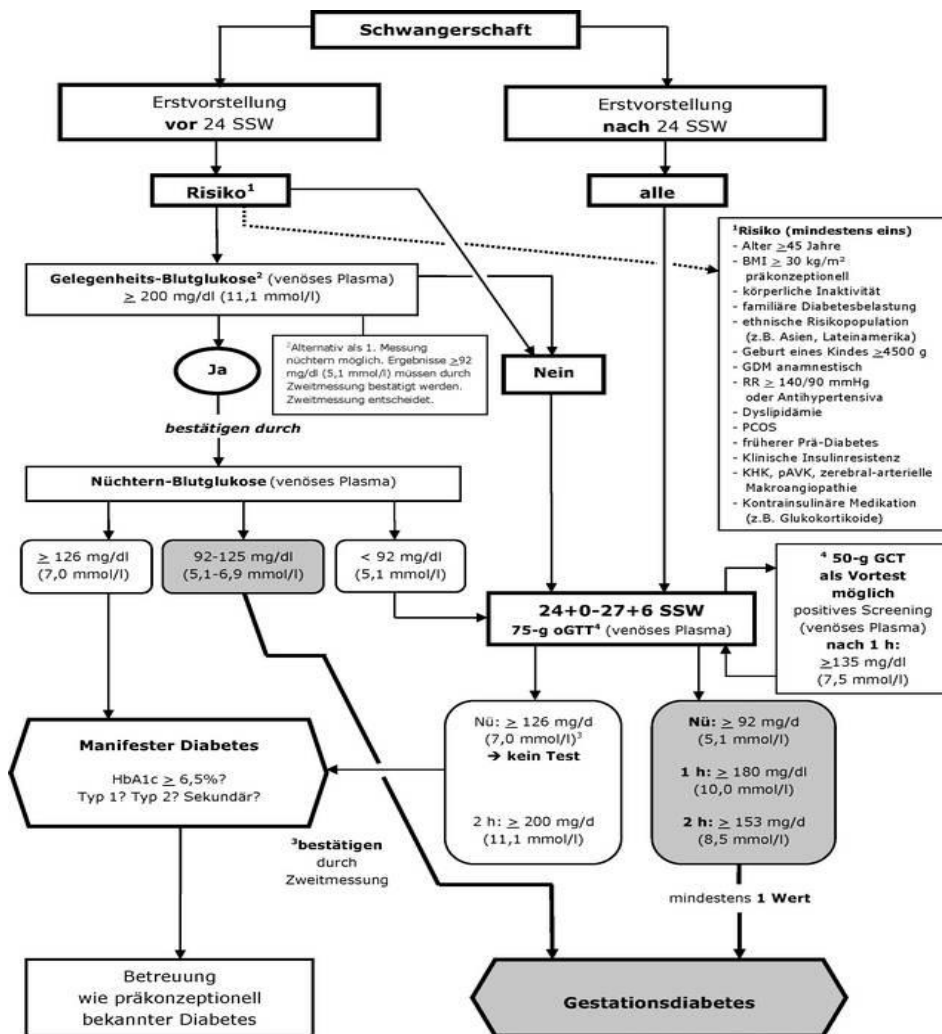


Abbildung 1: Flussdiagramm zur Diagnostik der Hyperglykämie in der Schwangerschaft (Kleinwechter 2011)

### 1.1.2 Risikofaktoren

Bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung eines GDM sind Alter der Mutter  $\geq 45$  Jahre, mütterlicher Body Mass Index (BMI)  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  präkonzeptionell, körperliche Inaktivität, Zugehörigkeit zu einer bestimmten Bevölkerungsgruppe (Asiatinnen, Lateinamerikanerinnen), GDM in der Vorgeschichte, positive Familienanamnese für Diabetes mellitus Typ 2, vorausgegangene Geburt eines Kindes  $\geq 4500\text{g}$  oder metabolisches Syndrom der Mutter (arterieller Hypertonus, Dyslipidämie, Prädiabetes).

### 1.1.3 Pathophysiologie

Pathophysiologisch besteht eine große Ähnlichkeit zwischen GDM und Diabetes mellitus Typ 2. Beiden liegt sowohl eine genetische als auch eine Lebensstil-Komponente (Übergewicht, Ernährung, Bewegung) zugrunde. Die genauen Mechanismen der Entstehung eines GDM sind noch nicht vollständig geklärt (Metzger et al. 2007). Ursächlich ist aber sicher die Kombination von bereits präkonzeptionell

herabgesetzter Insulinsensitivität mit der, ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW), physiologisch zunehmenden Insulinresistenz, die durch die endogene Insulinsekretion nur unzureichend kompensiert werden kann. Somit liegt bei GDM ein relativer Insulinmangel vor (Kautzky-Willer et al. 1997).

#### 1.1.4 Folgen für die Mutter

GDM hat für Mutter und Kind sowohl verschiedene akute Folgen während Schwangerschaft und Geburt als auch Langzeitfolgen. Zu den akuten negativen Effekten des GDM für die Mutter zählen fetale Makrosomie, erhöhte Sektiorate (Metzger et al. 2008), höhere Frühgeburtsrate < 37. SSW (Fadl et al. 2010; Ju et al. 2008), schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Präeklampsie (Fadl et al. 2010). Für das spätere Leben bringt die Diagnose eines GDM ein erhöhtes Risiko mit sich, einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln. Dies zeigten viele verschiedene Studien, lediglich über das Ausmaß der Risikoerhöhung gab es unterschiedliche Aussagen (10% bis 50 %) (Albareda et al. 2003; Bellamy et al. 2009; Feig et al. 2008; Hunger-Dathe et al. 2006; Lauenborg et al. 2004; Lobner et al. 2006).. Die Inzidenz eines Typ I- Diabetes nach der Diagnose eines GDM liegt hingegen lediglich bei 2,3–10 % (Albareda et al. 2003; Hunger-Dathe et al. 2006; Lauenborg et al. 2004; Lobner et al. 2006). Hierbei spielt der Nachweis von Inselzell-spezifischen Autoantikörpern während oder nach der Schwangerschaft die entscheidende Rolle (de Leiva et al. 2007; Fuchtenbusch et al. 1997; Lobner et al. 2006). Weiterhin besteht ein Wiederholungsrisiko für GDM bei weiteren Schwangerschaften: Frauen mit GDM in der ersten Schwangerschaft hatten in 41,3 % der Fälle wieder einen GDM in der zweiten, während Frauen ohne GDM in der vorangegangenen Schwangerschaft nur in 4,2 % einen GDM in der zweiten entwickelten. Frauen mit GDM in beiden Schwangerschaften hatten sogar ein 25,9fach erhöhtes Risiko (Getahun et al. 2010).

#### 1.1.5 Folgen für das Kind

Die bedeutendste postnatale Komplikation eines GDM für das Neugeborene ist die Hypoglykämie, gefolgt von Atemstörungen, Polyglobulie, Hypocalcämie, Hypomagnesiämie und Hyperbilirubinämie (Cordero et al. 1998). Auf lange Sicht gesehen, führt die intrauterine Exposition gegenüber erhöhten Glukosewerten beim Kind zu einem erhöhten Risiko, im Laufe seines Lebens, adipös zu werden oder an einem Diabetes bzw. sogar einem metabolischen Syndrom zu erkranken (Cho et al.

2000; Clausen et al. 2008; Schaefer-Graf et al. 2005; Silverman et al. 1995; Silverman et al. 1991; Silverman et al. 1998; Tam et al. 2008; Wright et al. 2009). Diese Beobachtung, dass veränderte intrauterine Bedingungen zu chronischen Krankheiten im Erwachsenenalter führen, begründete die Hypothese der fetalen metabolischen Programmierung (Barker Hypothese) (Hales et al. 1992). In letzter Zeit kristallisiert sich immer mehr heraus, dass epigenetische Modifizierungen eine große Rolle bei der fetalen Programmierung spielen (Ruchat et al. 2013). So konnte bereits gezeigt werden, dass GDM Einfluss auf den Methylierungsstatus von Genen nimmt, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung von metabolischen Erkrankungen spielen (Ruchat et al. 2013).

### 1.1.6 Therapie

Als Behandlungsoptionen des GDM stehen eine diätetische Einstellung sowie eine Insulintherapie zur Verfügung (Kleinwechter 2011). Zunächst sollte immer versucht werden durch entsprechende Lebensstilmaßnahmen (Ernährungsumstellung, Bewegung) die Blutzuckerwerte auf Normalniveau zu senken. Wenn dies nicht möglich ist, sollte relativ zügig, also innerhalb von 2 Wochen, die Indikation zur Insulintherapie gestellt werden (Kleinwechter 2011). Bei zu hohen Nüchtern-Blutglukosewerten ( $> 110$  mg/dl) kann dies auch sofort notwendig sein (Metzger et al. 1998). In den letzten Jahren wird Metformin zunehmend als Alternative zu Insulin bei Frauen mit GDM eingesetzt. Verschiedene Studien konnten eine mit Insulin vergleichbare Wirksamkeit ohne größere Nachteile für Mutter und Kind zeigen. Zudem kristallisierten sich einige Vorteile, wie ein geringeres Risiko für Hypoglykämien, eine verbesserte Insulinsensitivität und eine geringere Gewichtszunahme bei den Müttern, heraus (Gui et al. 2013; Heilmaier et al. 2014; Marques et al. 2014; Sullivan 2013).

## 1.2 Die Plazenta

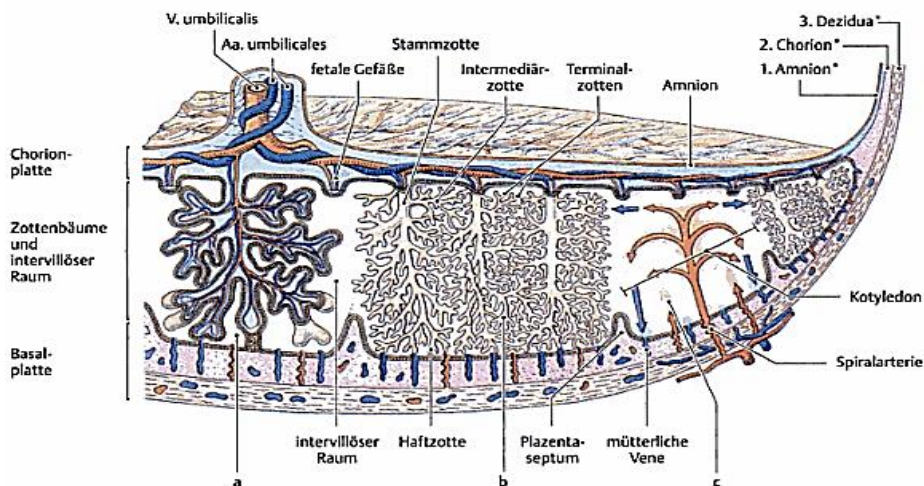
### 1.2.1 Entstehung und Aufbau der Plazenta

Die Plazenta ist ein speziell für die Zeit der Schwangerschaft angelegtes Organ, welches sowohl aus mütterlichen als auch aus kindlichen Zellen besteht (Gude et al. 2004; Ulfig 2005). Das Endometrium der Frau wird in der Zwischenzeit durch  $17\beta$ -Estradiol und Progesteron für die Implantation vorbereitet, indem sie über Wachstumsfaktoren, Zytokine und Adhäsionsmoleküle die Oberfläche des Endometriums verändern (Gude et al. 2004). Diese empfangsbereite Phase des Endometriums dauert vier Tage und wird Implantationsfenster genannt (Gätje et al. 2011). Nun beginnt, ab ca. dem 6. Tag nach



der Befruchtung, die Implantation der Blastozyste in das Endometrium. Hierbei teilt sich diese in Embryoblast und Trophoblast (Gätje et al. 2011). Aus dem Embryoblasten entsteht der Fetus, aus dem Trophoblasten die Plazenta (Gätje et al. 2011). Der Trophoblast differenziert sich in eine innere einkernige Schicht, den Cytotrophoblasten (CT) und eine äußere mehrkernige Schicht, den Syncytiotrophoblasten (SCT) (Gude et al. 2004). Die SCT dringen aktiv in das mütterliche Endometrium ein und lösen dort die deziduale Reaktion aus. Hierbei schwellen die Bindegewebszellen der Dezidua durch die Einlagerung von Fett und Glykogen zu großen polygonalen Zellen an (Gude et al. 2004). Weiterhin werden mütterliche Kapillaren arrodirt und es bilden sich so blutgefüllte Lakunen. Hierdurch erhält der kindliche Anteil der Plazenta Anschluss an das mütterliche Gefäßsystem (Gätje et al. 2011). Die SCT bilden nun die Grenzfläche zwischen kindlichem und mütterlichem Anteil der Plazenta (Gätje et al. 2011). Durch das fingerförmige Einwachsen der CT in die Schicht der SCT entsteht schließlich zwischen dem 11. und 13. Tag der Schwangerschaft die Primärzotte. Diese wird ungefähr ab dem 16. Tag durch das Einwachsen von kindlichem Binde- und Stützgewebe, dem sogenannten Mesoblasten zur Sekundärzotte. Letztendlich entsteht ab der 3. SSW durch Differenzierung von kindlichen Blutgefäßen im Mesoblasten die Tertiärzotte, in der mütterlicher und kindlicher Kreislauf erstmals gekoppelt sind (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004). Die CT lösen sich während des 4. Schwangerschaftsmonats (SSM) von der Basalmembran der Zotten, durchwandern die Schicht der SCT und wachsen in die Spiralarterien und die mütterliche Dezidua ein, wo sie die extravillösen Trophoblasten (EVT) bilden (Gätje et al. 2011). Durch die Invasion zerstören die CT die glatte Muskulatur der Spiralarterien und ersetzen teilweise die Endothelzellen. Damit gewinnen die Spiralarterien an Elastizität, wodurch wiederum die Durchblutung dieser fetoplazentären Einheit dem schnellen Wachstum des Feten Stand halten kann (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004; Kumpel et al. 2012). Nach der Abwanderung der CT bleibt die sogenannte Terminalzotte zurück, welche keine CT, sondern nur noch SCT enthält. Mit der 14. SSW besitzt die Plazenta nun ihre endgültige Struktur: Sie ist in Chorionplatte, Kotyledonen und Basalplatte unterteilt (Gätje et al. 2011). Die Chorionplatte liegt auf der fetalen Seite und besteht aus Amnion, extraembryonalem Mesenchym, CT und SCT (Ulfig 2005). Auf mütterlicher Seite liegt die Basalplatte, welche sich aus mütterlicher Dezidua basalis und embryonalem Gewebe (CT, SCT) zusammensetzt (Ulfig 2005). Dazwischen liegt der intervillöse Raum, welcher durch, von der Dezidua basalis ausgehende, bindegewebige Septen in ca. 20

Kotyledonen unterteilt ist. Ein Kotyledon besteht aus mindestens zwei Stammzotten und ihren Verästelungen (Gätje et al. 2011). Der Zusammenhalt der Plazenta wird durch Haftzotten, eine Sonderform der Stammzotten, gewährleistet, weil diese von der Chorionplatte bis zur Basalplatte reichen (Gätje et al. 2011). Durch die Plazentaschranke besteht zu keinem Zeitpunkt der Schwangerschaft eine direkte Verbindung zwischen mütterlichem und kindlichem Blutkreislauf. In der unreifen Plazenta setzt sich die Plazentaschranke aus dem Endothel der kindlichen Blutgefäße, dem Mesoderm sowie den SCT und den CT zusammen. Nach dem 4. SSM fehlen dann die CT und die Plazentaschranke besteht nur noch aus SCT, der vereinigten Basalmembran und dem Endothel der kindlichen Gefäße. Hierdurch nimmt die Diffusionsstrecke ab und der Stoffaustausch wird erleichtert (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004).



**Abbildung 2: Aufbau der Plazenta:**

(a) junge Plazenta (ca. 4. Woche); (b) reife Plazenta (ab 4. Monat); (c) Aufbau eines Kotyledons. (Ulfig 2009)

## 1.2.2 Funktion der Plazenta

### 1.2.2.1 Metabolische Funktion

Die Plazenta erfüllt sowohl metabolische als auch endokrine und immunologische Aufgaben (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004). Hierbei ist der Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind über die Plazentaschranke sicherlich eine der wichtigsten Aufgaben. Nicht-polare Moleküle und fettlösliche Stoffe (wie Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Kreatinin, Bilirubin, Harnstoff, Fette und Alkohol) werden einem Konzentrationsgefälle folgend, ohne Energieaufwand mittels einfacher Diffusion passiv transportiert (Gätje et al. 2011). Für das stark polare Wassermolekül gibt es spezielle Kanäle, die Aquaporine.

Andere größere Moleküle, wie Glukose und Laktat, werden an spezielle Transportmoleküle (z.B. Glukosetransporter (GLUT)) gekoppelt und ihre Diffusion wird dadurch erleichtert (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004). Weiterhin gibt es noch aktive, energiefordernde Transportmechanismen, wie z.B. für Aminosäuren und anorganische Ionen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) sowie vesikuläre Transportmechanismen (Endo-/Exozytose) z.B. für Immunglobuline (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004). Abschließend ist zu erwähnen, dass auch Krankheitserreger und Medikamente durch Lücken in der Plazentaschranke in den kindlichen Kreislauf gelangen können (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004). Die Plazenta reguliert also den Austausch von Nährstoffen und Abfallprodukten zwischen Mutter und Kind: Über die Umbilicalvene werden Sauerstoff und Nährstoffe aus dem mütterlichen Blut über die Plazentaschranke zum Feten transportiert. Die Abbauprodukte werden über die Umbilicalarterien zurück zur Plazenta und von dort über die Plazentaschranke in das mütterliche Blutsystem gebracht (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004).

#### 1.2.2.2 Endokrine Funktion

Die zweite wichtige Aufgabe der Plazenta besteht in der Produktion von Hormonen, nämlich von Östrogenen, Progesteron, humanem Choriongonadotropin (hCG) und humanem Plazentalaktogen (hPL) (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004). Die Östrogenkonzentration im mütterlichen Blut steigt während der gesamten Schwangerschaft kontinuierlich an. Im mütterlichen Organismus bewirken die Östrogene eine erhöhte Wasserretention und Elastizitätszunahme des Bindegewebes. Außerdem steuern sie u.a. das Uteruswachstum und unterstützen seine Geburtsbereitschaft am Ende der Schwangerschaft (Gätje et al. 2011). Die Progesteronkonzentration nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ebenfalls stetig zu. Allerdings wird seine Produktion erst ab der 12. SSW vom SCT übernommen, davor wird es vom Corpus luteum graviditatis gebildet. Seine wichtigste Funktion ist die Reduktion der Kontraktilität des Uterus und damit die Verhinderung von vorzeitigen Wehen (Gätje et al. 2011). Die Funktion des ebenfalls vom SCT gebildeten hCGs besteht hauptsächlich in der Stimulation der Progesteronproduktion des Corpus luteum und somit im Erhalt der Schwangerschaft (Gätje et al. 2011). Weiterhin bildet der SCT auch noch hPL, welches zum einen lipolytisch wirkt und so freie Fettsäuren freisetzt und zum anderen die periphere Insulinresistenz verstärkt und gleichzeitig einen insulinstimulierenden Effekt an den  $\beta$ -Zellen des Pankreas ausübt. Dadurch sichert es die Versorgung des Feten mit Glukose und Aminosäuren und steigert die

Proteinsynthese. So hat hPL auch Anteil an der Entstehung der diabetogenen Stoffwechsellage und des GDM (Gätje et al. 2011).

### 1.2.2.3 Immunologische Funktion

Obwohl der Fetus zur Hälfte ein allogenes Transplantat zum mütterlichen Organismus darstellt, da der halbe Chromosomensatz vom Vater stammt, wird er von der Mutter nicht abgestoßen. Dieses Faktum wird als immunologisches Paradoxon bezeichnet und kontrovers diskutiert (Kumpel et al. 2012). Die Mutter entwickelt für die Zeit der Schwangerschaft offensichtlich eine Toleranz gegenüber ihrem Kind. Dies scheint auf spezifischen Antigeneigenschaften von Embryo und Plazenta und Veränderungen des mütterlichen Immunsystems zu beruhen (Erlebacher 2013; Kumpel et al. 2012). Die Plazenta spielt dabei zwischen den beiden Immunsystemen eine Art vermittelnde Rolle. Innerhalb der Plazenta scheinen die Trophoblasten mit ihrem speziellen *Major histocompatibility-complex* (MHC)-Expressionsmuster die entscheidende Zellpopulation zu sein. So exprimieren Trophoblastzellen weder Moleküle des MHC-Klasse-II-Komplexes noch die zwei typischen Antigene des MHC-Klasse-I-Komplexes, HLA-A und HLA-B, welche die Abstoßung von Allografts bewirken (Juch et al. 2012; Moffett et al. 2006; Trundley et al. 2004). Der SCT, welcher mit den Immunzellen des mütterlichen Blutes in Kontakt kommt, besitzt auf seiner Oberfläche sogar kein einziges MHC-Antigen, was zum Konzept der Neutralität der Plazenta passt. Dadurch ist er vor einer T-Zell-vermittelten Immunantwort geschützt (Moffett et al. 2006; Trundley et al. 2004). Da normalerweise die Präsenz von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche aber auch die Zerstörung durch die uterinen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) verhindert, müsste der SCT aufgrund des kompletten Fehlens von MHC-I-Molekülen von diesen angegriffen werden (Trundley et al. 2004). Warum dies nicht der Fall ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Rolle könnten das Fehlen von aktivierenden Liganden der uterinen NK-Zellen und der Oberflächenschutz durch die starke Glykosylierung spielen (Trundley et al. 2004). Im Gegensatz dazu exprimiert der EVT eine unübliche Kombination aus HLA-C, HLA-G und HLA-E. Durch diese wird er ebenfalls nicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt, ist aber gleichzeitig auch vor den uterinen NK-Zellen geschützt (Moffett et al. 2006; Trundley et al. 2004).

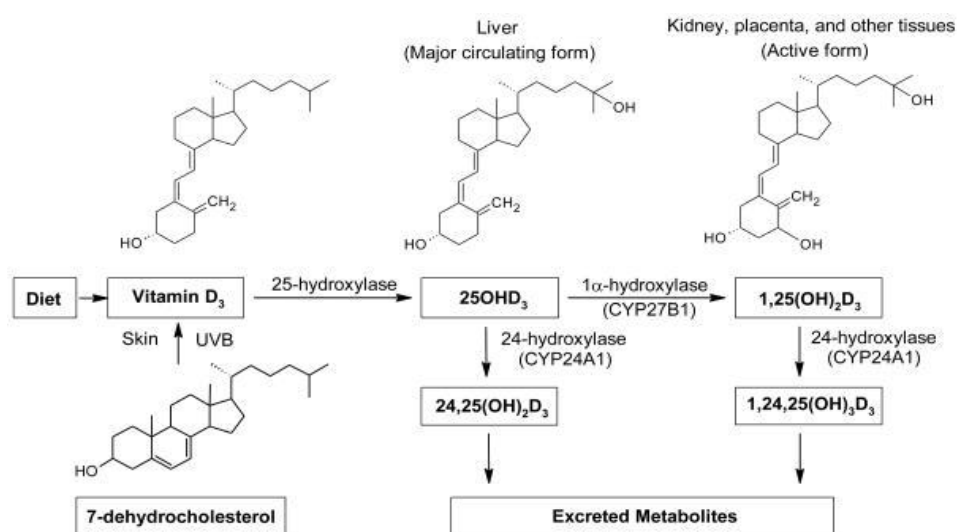
## 1.3 Kernrezeptoren und ihre Liganden

Bis heute sind beim Menschen 48 verschiedene Kernrezeptoren bekannt, die als Superfamilie der nukleären Rezeptoren zusammengefasst werden (McEwan 2009).

Dazu gehören u.a. der Vitamin D-Rezeptor (VDR), der Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) und die Estrogen-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  (ER $\alpha$  und  $\beta$ ). Kernrezeptoren befinden sich im Zellkern und agieren dort als Transkriptionsfaktoren. Nach erfolgreicher Aktivierung durch ihre Liganden binden die Kernrezeptoren entweder als Homo-oder Heterodimere an die entsprechenden DNA-Elemente ihrer Zielgene und regulieren so deren Transkription (Arck et al. 2010; Forman et al. 1990; Pan et al. 2000; Pritts et al. 2002; Wu et al. 1999).

### 1.3.1 Vitamin D und der Vitamin D-Rezeptor

Vitamin D<sub>3</sub>, auch Cholecalciferol genannt, ist ein Secosteroid, welches mit der Nahrung aufgenommen, aber auch vom menschlichen Körper selbst produziert werden kann. Durch die Exposition des in der Haut vorhandenen 7-Dehydrocholesterol mit ultraviolettem (UV) Licht entsteht das Prävitamin D<sub>3</sub>, welches nicht-enzymatisch in Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt wird und die Haut verlässt. Im Blut bindet es an das Vitamin-D-bindende-Protein und an Albumin und gelangt so in die Leber. Dort wird es durch das Enzym Cytochrom P450 2R1 zu 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25-(OH)D<sub>3</sub>), auch Calcidiol genannt, hydroxyliert. Dieses bindet wieder an das Vitamin-D-bindende-Protein und zirkuliert so im Blut. Calcidiol hat eine Halbwertszeit von 4-8 Wochen und stellt so eine Art Speicherform des Vitamin D<sub>3</sub> dar. Die aktive Form entsteht schließlich durch die Hydroxylierung von 25-(OH)D<sub>3</sub> zu 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), auch Calcitriol genannt, durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase in den Nieren.



**Abbildung 3: Synthese von Calcitriol**  
(Shin et al. 2010)

Diese aktive Form ist der wichtigste aktivierende Ligand des VDR, eines klassischen Steroidhormonrezeptors aus der Familie der nuklearen Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) (Barrett et al. 2010).

Nach erfolgter Ligandenbindung bindet der VDR an einen anderen Rezeptor, typischerweise den RXR-Rezeptor und bildet so ein Heterodimer. Dieses bindet an *vitamin D response elements* (VDRE) in der Promotorregion der Zielgene und reguliert so deren Transkription (Shin et al. 2010). Über diesen Mechanismus übt Calcitriol seine klassischen und nicht-klassischen Funktionen aus. Zu seinen klassischen Funktionen zählen die Zunahme der Absorption von Calcium und Phosphat im Dünndarm und die Abnahme der Sekretion von Parathormon durch die Nebenschilddrüsen. Außerdem nimmt es Einfluss auf die Knochenmineralisation, indem es die Aktivität der Osteoblasten- und -klasten verändert (Barrett et al. 2010).

Der VDR wurde in 37 verschiedenen menschlichen Geweben gefunden, u.a. in denen, die in die Regulation des Glukose-Stoffwechsels involviert sind sowie im Skelettmuskel, in der Haut, im kardiovaskulären System und in Komponenten des Immunsystems (Barrett et al. 2010), in denen er seine nicht-klassischen Funktionen ausübt.

Calcitriol beeinflusst sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem: Die Aktivität des adaptiven Immunsystems setzt es herab, während es die des angeborenen Immunsystems steigert (Adams et al. 2008; Adams et al. 2007; Bikle 2009). Weiterhin beeinflusst Calcitriol sowohl die Zellzyklusprogression und Zelldifferenzierung als auch die Induktion der Apoptose. Somit werden Calcitriol proliferationshemmende und differenzierungsfördernde Effekte in vielen verschiedenen Zelltypen zugeschrieben (Banerjee et al. 2003; Gurlek et al. 2002; Masuda et al. 2006; Nagpal et al. 2005; Samuel et al. 2008; Shin et al. 2010; Verstuyf et al. 2010).

Schwangere Frauen haben einen höheren Vitamin D-Spiegel im Serum, bis zu 2fach höher im drittem Trimester, als Nicht-Schwangere (Cross et al. 1995; Kovacs et al. 1997). Die erhöhten Serumlevel sind auf eine gesteigerte Vitamin D-Produktion und einen Anstieg des Vitamin-D-bindenden-Proteins zurückzuführen. In der maternalen Niere kommt es während der Schwangerschaft zu einer erhöhten  $1\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität. Zusammen mit einem kleinen Beitrag der fetalen Niere und der Plazenta, führt dies zu der gesteigerten Produktion von  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  (Barrett et al. 2010; Bouillon et al. 1981). Vitamin D ist während der Schwangerschaft an der Implantation, dem Erhalt der Schwangerschaft über die verringerte Produktion von pro-

inflammatorischen Zytokinen und der Sekretion von einigen plazentaren Hormonen beteiligt. Außerdem unterstützt es das Wachstum des Feten über die Freisetzung von Calcium (Shin et al. 2010) und spielt eine wichtige Rolle als Immunmodulator (Verstuyf et al. 2010). Als solcher fördert Calcitriol die Immunantwort in der mütterlichen Dezidua und dem fetalen Trophoblasten und steuert die Entzündungsreaktion in der Plazenta (Evans et al. 2006; Liu et al. 2009; Liu et al. 2011).

Ein Vitamin D-Mangel während der Schwangerschaft wird mit Präeklampsie, Insulinresistenz, GDM und bakterieller Vaginose in Verbindung gebracht (Bodnar et al. 2007; Bodnar et al. 2009; Lapillonne 2010; Lewis et al. 2010; Shin et al. 2010; Zhang et al. 2008). Da man weiß, dass  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  die Insulinproduktion stimuliert (Chiu et al. 2004) und die Insulinsensitivität verbessert (Teegarden et al. 2009), geht man davon aus, dass ein Vitamin D-Mangel eine Rolle bei der Entstehung eines GDM spielt (Maghbooli et al. 2008; Zhang et al. 2008). In einigen Studien wurde bereits gezeigt, dass bei Frauen mit GDM tatsächlich ein Vitamin D-Mangel vorliegt (Clifton-Bligh et al. 2008; Lau et al. 2011; Maghbooli et al. 2008; Soheilykhah et al. 2010). Außerdem ist bereits bekannt, dass ein Mangel an Vitamin D und Calcium mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 einhergeht (Pittas et al. 2007; Pittas et al. 2007). Die eigentliche Rolle von Vitamin D in der Regulation des Glukose-Stoffwechsels besteht in der Stimulation der Expression des Insulin-Rezeptors (IR) und damit in der Verbesserung der Insulinempfindlichkeit sowie in der Regulation der extra- und intrazellulären Calcium-Konzentration, welche für Insulin-vermittelte Funktionen essentiell ist (Pittas et al. 2007). Außerdem scheint Vitamin D die Funktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen zu verbessern, sowohl direkt durch Bindung an den VDR der  $\beta$ -Zellen, als auch indirekt über die Regulation der extra- und intrazellulären Calcium-Konzentration in den  $\beta$ -Zellen (Pittas et al. 2007).

Weiterhin hat ein Vitamin D-Mangel während der Schwangerschaft auch Auswirkungen auf das Kind. So weisen solche Kinder häufiger ein vermindertes Femurwachstum in utero (Mahon et al. 2010), ein geringeres Geburtsgewicht (Gale et al. 2008; Mannion et al. 2006; Scholl et al. 2009), akute Infektionen des unteren Atemtrakts (Karatekin et al. 2009), Rachitis und Kraniotabes (Yorifuji et al. 2008) sowie Herzfehler (Maiya et al. 2008) auf.

Trotz der offensichtlich negativen Auswirkungen eines Vitamin D-Mangels in der Schwangerschaft, gibt es laut der derzeitigen Leitlinien keine einheitliche Empfehlung

für eine Substitution in der Schwangerschaft, da die optimalen Serumlevel von Vitamin D während Schwangerschaft und Stillzeit noch nicht definiert sind (Lapillonne 2010; Lewis et al. 2010).

### 1.3.2 *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*

PPAR $\gamma$  ist ein ligandenaktivierter Hormonrezeptor, der zur Superfamilie der Kernrezeptoren gehört (Giaginis et al. 2008; Jawerbaum et al. 2011; Suwaki et al. 2007). Bindet ein Ligand an den Rezeptor erfolgt die Bindung an spezifische DNA *response* Elemente, die *peroxisome proliferator response elements* (PPRE), der Promotorregion der jeweiligen Zielgene. Durch diese Bindung kann PPAR $\gamma$  die Genexpression entweder steigern oder reduzieren. Voraussetzung für die Funktion von PPAR $\gamma$  ist die Bildung von Heterodimeren mit RXR $\alpha$  (Giaginis et al. 2008; Holdsworth-Carson et al. 2010; Holdsworth-Carson et al. 2009; Schaiff et al. 2006; Toth et al. 2009; Toth et al. 2007). Die Benennung erfolgte ursprünglich aufgrund der Fähigkeit, nach Stimulation mit Xenobiotica die hepatischen Peroxisomen in Mäusen aktivieren zu können (Giaginis et al. 2008; Toth et al. 2009).

Bisher sind vier verschiedene Isoformen von PPAR $\gamma$  bekannt:  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3 und  $\gamma$ 4. PPAR $\gamma$  verfügt über einige natürliche und synthetische Liganden. Zu den natürlichen Liganden zählen Fettsäuren, wie die Arachidonsäure, Eikosanoide und Leukotriene, oxidierte *low density lipoproteins* (LDL), Prostaglandine, wie 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 (15d-PGJ2), Nitrolinolsäure und ihre Derivate (Barlic et al. 2007; Giaginis et al. 2008; Jawerbaum et al. 2011; Kersten et al. 2000; Kliewer et al. 1997; Nagy et al. 1998; Schaiff et al. 2006; Schopfer et al. 2005; Suwaki et al. 2007; Toth et al. 2009; Toth et al. 2007). Unter den natürlichen Liganden besitzt 15d-PGJ2 die höchste Affinität (Forman et al. 1995; Jawerbaum et al. 2011). Die bekanntesten synthetischen Liganden sind die Thiazolidinedione (=Glitazone), wie Rosiglitazon und Pioglitazon. Die Glitazone werden bereits in der Therapie des Typ-2-Diabetes eingesetzt. Dort macht man sich den Effekt zunutze, dass sie die Insulinsensitivität verbessern und so positiven Einfluss auf die Blutzuckerwerte ausüben können (Arck et al. 2010; Berger et al. 2002; Giaginis et al. 2008; Jawerbaum et al. 2011; Lehmann et al. 1995; O'Moore-Sullivan et al. 2002; Ricote et al. 1999; Toth et al. 2009; Toth et al. 2007). Daneben gibt es aber auch noch MCC-555, Mesalazin (5-Aminosalicylsäure (5-ASA)) und FMOC-L-Leucin (Toth et al. 2009; Toth et al. 2007). Darüber übt PPAR $\gamma$  verschiedene wichtige Funktionen wie die Regulation des Fettverteilungsmusters im Körper, des Glukose-Metabolismus und der



Insulinsensitivität aus (Holdsworth-Carson et al. 2010; Jawerbaum et al. 2011; Kubota et al. 1999; Lee et al. 2003; Schaiff et al. 2006; Suwaki et al. 2007; Toth et al. 2007). PPAR $\gamma$  spielt außerdem eine bedeutende Rolle in der Regulation des Immunsystems und der Kanzerogenese (Toth et al. 2007). Weiterhin ist PPAR $\gamma$  an wichtigen Prozessen in der Plazenta beteiligt.

Im ersten Trimenon wird PPAR $\gamma$  in der Plazenta von den villösen CT und den einwandernden EVT exprimiert (McCarthy et al. 2013; Wang et al. 2004), im zweiten von Stammzotten und CT (McCarthy et al. 2013; Waite et al. 2000). Somit weisen nicht-invasive, differenzierte SCT weder im ersten noch im zweiten Trimenon eine PPAR $\gamma$ -Expression auf (Capparuccia et al. 2002; McCarthy et al. 2013; Rodie et al. 2005; Waite et al. 2000). Im Gegensatz dazu findet man im dritten Trimenon sowohl im SCT als auch im CT und EVT eine PPAR $\gamma$ -Expression (McCarthy et al. 2013; Schaiff et al. 2000; Tarrade et al. 2001; Wang et al. 2004).

In der Plazenta beeinflusst PPAR $\gamma$  die Differenzierung und Invasion der Trophoblastzellen, den Stoffwechsel und den Zeitpunkt der Entbindung (Fournier et al. 2011; Fournier et al. 2007; Fournier et al. 2007; Holdsworth-Carson et al. 2010; Holdsworth-Carson et al. 2009; Schaiff et al. 2006; Suwaki et al. 2007). PPAR $\gamma$  nimmt durch die Induktion der autokrinen plazentaren Hormonsekretion indirekt Einfluss auf die Differenzierung der Trophoblasten (Daoud et al. 2005; Tarrade et al. 2001). Die Invasion der Trophoblasten wird durch hCG gefördert, die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch seine Liganden verringert aber die Sekretion von hCG durch die invasiven EVT und hemmt damit deren Invasion (Handschuh et al. 2007).

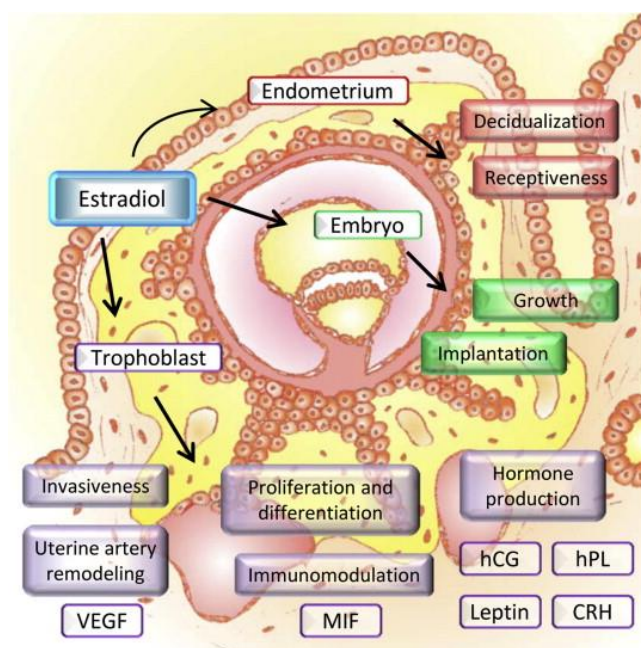
PPAR $\gamma$  reguliert weiterhin als Heterodimer mit RXR  $\alpha$  die Aufnahme von Fettsäuren in Trophoblasten, welche für die intrauterine Entwicklung des Feten wichtig sind und als Vorläufer für die Steroidhormonbiosynthese in den Trophoblastzellen dienen (Toth et al. 2007).

### 1.3.3 Estrogene und die Estrogen-Rezeptoren $\alpha$ und $\beta$

ER $\alpha$  und  $\beta$  sind als liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren ebenfalls Teil der Superfamilie der Kernrezeptoren (Faulds et al. 2012). Neben der Expression im Kern, kann man die Estrogen-Rezeptoren je nach Zellart auch im Zytoplasma oder sogar in der Zellmembran finden (Bukovsky et al. 2003). Exprimiert werden die Estrogen-Rezeptoren in den weiblichen und männlichen Fortpflanzungsorganen, im Knochen, in der Leber, im Immunsystem sowie im kardiovaskulären und zentralnervösen System

(Diel 2002; Gruber et al. 2002). Nachdem ein Ligand an den Estrogen-Rezeptor gebunden hat, erfolgt die Translokation in den Kern, wo der Liganden-Rezeptor-Komplex entweder direkt an Estrogen *Response* Elemente (ERE) bindet oder mit anderen Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion des Zielgens interagiert (Gambino et al. 2012). Zusätzlich zu diesem genomischen Signalweg ist inzwischen ein nicht-genomischer bekannt, worüber schnelle zelluläre Effekte erzielt werden können. Dabei aktiviert  $17\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) über die Bindung an membranständige Estrogen-Rezeptoren verschiedene Signaltransduktionswege, z.B. über Proteinkinasen (Gambino et al. 2012).

Die Plazenta produziert einen wichtigen Anteil an Estrogenen, wie Estriol (E<sub>3</sub>), E<sub>2</sub> und Estron (E<sub>1</sub>), selbst (Guibourdenche et al. 2009; Rama et al. 2004). Im Gegensatz zu anderen Organen, wie dem Hoden, dem Ovar oder der Nebennierenrinde, verfügt die Plazenta nicht über das Enzym  $17\alpha$ -Hydroxylase und benötigt deshalb andere Ausgangsstoffe als die sonst üblichen (z.B. Progesteron oder Pregnenolon) für die Estrogensynthese (Malassine et al. 2002). Die Plazenta benutzt deshalb Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S), welche in der mütterlichen und der fetalen Nebenniere produziert werden, als Grundlage für die Synthese der Estrogene (Malassine et al. 2002). Während der Schwangerschaft steigt die Produktion von  $17\beta$ -Estradiol um das 80fache an, von 0,75 nM präovulatorisch auf 60 nM am Ende der Schwangerschaft (Bukovsky et al. 2003).



**Abbildung 4: Übersicht über die Funktion von Estradiol an der fetomaternalen Grenzzone in der frühen Schwangerschaft** (Gambino et al. 2012)

Die Estrogene und ihre Rezeptoren sind sowohl für den Embryo als auch für das Endometrium und die Trophoblastzellen essentiell (Gambino et al. 2012). Am

Endometrium führt die Estrogenwirkung zur Dezidualisation und somit zu einer besseren Empfänglichkeit des Uterus für die Implantation der Blastozyste (Bazer et al. 2009; Ramathal et al. 2010). Weiterhin fördern die Estrogene die Proliferation und Differenzierung der Trophoblastzellen (Cronier et al. 1999), genauso wie die Invasion der EVT in die uterinen Spiralarterien und deren daraus resultierenden Umbau (Albrecht et al. 2006). In der frühen Schwangerschaft wird den EVT durch die niedrigen Estrogenspiegel die Invasion in die uterinen Spiralarterien ermöglicht, während eine weitere Invasion später in der Schwangerschaft durch die höhere Konzentration an Estrogenen verhindert wird (Albrecht et al. 2006). Dabei scheinen Mitglieder der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) Familie eine Rolle zu spielen, deren Expression durch die Estrogene erhöht wird (Albrecht et al. 2006). Ebenso beeinflussen die Estrogene v.a. in der frühen Schwangerschaft das Immunsystem, indem sie je nach Konzentration und Gewebe sowohl pro-als auch anti-inflammatorische Effekte ausüben (Straub 2007). So scheint Estradiol z.B. die Sekretion des Makrophagen migrationsinhibierenden Faktors (MIF) an der feto-maternalen Interphase regulieren zu können. MIF ist ein wichtiger Modulator der Entzündungs- und Immunantwort, da er u.a. die Produktion von Matrix-Metalloproteasen, Arachidonsäure-Produkten und T-Zell Zytokinen reguliert (Ietta et al. 2010). Eine weitere wichtige Funktion der Estrogene ist die Regulation der Hormonproduktion, v.a. von hCG, hPL (Cronier et al. 1999) und Leptin (Gambino et al. 2010) durch die Trophoblasten.

Neben ihren Funktionen während der Schwangerschaft regulieren Estrogene und ihre Rezeptoren auch metabolische Vorgänge im menschlichen Körper. So beeinflussen sie das Körpergewicht, das Fettverteilungsmuster im Körper und die Insulinsensitivität sowohl bei Frauen als auch bei Männern (Meyer et al. 2011). Ein Estrogenmangel führt bekanntermaßen zu einer Zunahme des Körpergewichts und zu einer Umverteilung des Körperfetts von den subkutanen zu den viszeralen Depots (Brown et al. 2010; Shi et al. 2009). Dieser Effekt lässt sich v.a. bei postmenopausalen Frauen, Frauen mit polycystischem Ovarialsyndrom (PCOS) oder Frauen nach Ovariectomie sehr gut beobachten. Durch die Behandlung mit Estrogenen können diese Veränderungen rückgängig gemacht werden (Asarian et al. 1999; Gambineri et al. 2002; Pedersen et al. 1992). Dabei reduzieren diese die Nahrungsaufnahme nicht nur durch direkte Wirkung auf das zentrale Nervensystem (Wade 2009), sondern auch durch das Zusammenspiel mit anderen Hormonen, wie Insulin, Leptin, Neuropeptid Y und Ghrelin, die ebenfalls das Essverhalten beeinflussen (Brown et al. 2010). Weiterhin kann ein Estrogenmangel

in einer Insulinresistenz resultieren, welche auf eine Behandlung mit Estrogenen anspricht (Bailey et al. 1980). Deren Wirkung besteht hierbei sowohl in der Steigerung der Insulinsensitivität durch die Reduzierung der Gluconeogenese und der Glykolyse (Ahmed-Sorour et al. 1981) als auch in der vermehrten Insulinsekretion durch die Langerhans-Inseln des Pankreas (Alonso-Magdalena et al. 2008).

#### **1.4 Human leukocyte antigen-G**

*Human leukocyte antigen-G* (HLA-G) gehört zu den MHC-Molekülen der Klasse I und wird v.a. in Trophoblasten exprimiert (Cirulli et al. 2006; Oztekin 2007). HLA-G spielt eine wichtige Rolle bei der Toleranzentwicklung der Mutter gegenüber dem Fetus. Der Fetus stellt aus immunologischer Sicht für den mütterlichen Organismus ein semiallogenes Transplantat dar. Dieses würde normalerweise vom mütterlichen Immunsystem als fremd erkannt und abgestoßen werden. Diesen Prozess zu verhindern, ist u.a. Aufgabe von HLA-G. Wie unter 1.2.2 bereits beschrieben, exprimieren die Trophoblastzellen weder Moleküle des MHC-II-Komplexes noch die klassischen Antigene HLA-A und HLA-B des MHC-I-Komplexes (Juch et al. 2012; Moffett et al. 2006; Trundley et al. 2004). Dadurch sind sie einerseits vor der T-Zell vermittelten Immunantwort geschützt, aber andererseits auch der Zerstörung durch die NK-Zellen ausgesetzt (Moffett et al. 2006; Trundley et al. 2004). Dies verhindern die EVT durch die Expression von HLA-G auf ihrer Oberfläche (Kuroki et al. 2007). Die Unterdrückung der Immunantwort bewirkt HLA-G durch das Binden an inhibitorische Rezeptoren, wie *leukocyte Ig-like receptors* (LILR) B1 und B2, *killer cell Ig-like receptor* (KIR) 2DL4, CD 160 und CD8 (Colonna et al. 1999; Hunt et al. 2005; Kuroki et al. 2007; O'Callaghan et al. 1998). HLA-G zeichnet sich außerdem durch zwei Besonderheiten aus. Zum einen durch das fast vollständige Fehlen von Polymorphismen, wodurch es sich von Individuum zu Individuum nicht unterscheidet. Somit kann das mütterliche Immunsystem das HLA-G der fetalen Trophoblastzellen nicht als fremd erkennen (Bainbridge et al. 2000; Kuroki et al. 2007). Zum anderen durch das Vorhandensein vieler Splice-Varianten, darunter finden sich sowohl membran-gebundene (HLA-G 1-4) als auch lösliche Formen (HLA-G 5 und 6) (Bainbridge et al. 2000).

## 1.5 Die Chorionkarzinomzelllinie, BeWo

Bei der Zelllinie BeWo handelt es sich um humane Chorionkarzinomzellen. BeWo-Zellen besitzen sehr viele Eigenschaften der SCT, aber auch einige der EVT (Grummer et al. 1994; Hirano et al. 1999; Orendi et al. 2010; Wadsack et al. 2003). Deshalb sind sie das beliebteste *in vitro* Modell, um die Fusion der Trophoblasten zum Syncytium zu untersuchen (Orendi et al. 2010). Weiterhin dienen sie als Modell für die Regulation von Transport und Aufnahme von Stoffen über die Plazenta (Wadsack et al. 2003). Außerdem produzieren sie, entsprechend dem SCT, plazentare Hormone wie Progesteron, 17 $\beta$ -Estradiol und  $\beta$ -hCG (Grummer et al. 1994). Sie weisen aber auch Charakteristiken der invasiven Trophoblasten auf. So exprimieren sie z.B. CD9, welches eine Rolle bei der Invasion spielt und sonst nur auf der Oberfläche von EVT zu finden ist (Hirano et al. 1999).

## 1.6 Fragestellung

Gestationsdiabetes mellitus stellt eine bedeutende Komplikation dar, die 3-8% aller Schwangerschaften betrifft (Metzger et al. 1998). Die Plazenta mit ihren wichtigen metabolischen, endokrinen und immunologischen Funktionen während der Schwangerschaft (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004) spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des GDM. Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit, Expressionsveränderungen verschiedener wichtiger metabolisch aktiver Rezeptoren (VDR, PPAR  $\gamma$ , ER $\alpha$  und  $\beta$ ) sowie von HLA-G und deren Regulation in der Plazenta bei GDM zu untersuchen, um die pathophysiologischen Vorgänge in der Plazenta bei GDM besser verstehen und Rückschlüsse auf die Auswirkungen auf die feto-maternale Einheit ziehen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Für diese Studie wurden die Plazenten von 80 Patientinnen, die in der Frauenklinik der Universität München in der Maiastraße entbunden und sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben, verwendet. Bei 40 dieser Patientinnen war anhand der deutschen Leitlinien durch einen OGTT (Carpenter et al. 1982) ein GDM diagnostiziert worden. Die restlichen 40 Patientinnen wiesen einen unauffälligen OGTT auf. Die beiden Gruppen setzten sich jeweils aus 20 Plazenten männlicher Feten und 20 Plazenten weiblicher Feten zusammen. Ausschlusskriterien waren Mehrlingsschwangerschaften, Frühgeburtlichkeit, Zeichen einer Infektion bei Entbindung, Fehlbildungen und Wachstumsretardierung. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der LMU München genehmigt, von den Patientinnen lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor. Die Proben wurden direkt nach der Geburt aus dem zentralen Anteil der Plazenta entnommen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass Kotyledonen ausgewählt wurden, die ausreichend durchblutet waren. Ischämische oder nekrotische Anteile wurden ausgeschlossen. Auf diesem Weg wurden von jeder Probe zwei 2x2 cm große Gewebstücke gesammelt, die sowohl Dezidua mit EVT als auch villöse Trophoblasten und Amnionepithel enthielten. Der erste Satz wurde bei -80°C eingefroren und der zweite sofort für 24 Stunden in 4%igem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden Schnitte für die Immunhistochemie und aus dem eingefrorenen Gewebe Gefrierschnitte für die Doppel-Immunfluoreszenz angefertigt.

Tabelle 1 zeigt die Durchschnittswerte für das Geburtsgewicht, die Schwangerschaftswoche bei der Entbindung und den BMI der Mutter vor der Schwangerschaft in den vier Gruppen.

	<b>GDM</b>	<b>Kontrollen</b>	
<b>Alter der Mutter (Jahre)</b>	32.82 ± 4.56	31.15 ± 6.10	n.s.
<b>BMI (vor der SS)</b>	28.1 ± 6.96	23.4 ± 6.21	P < 0,0001*
<b>Ø Gravida (min, max)</b>	2 (1;6)	2 (1;7)	n.s.
<b>Ø Para (min, max)</b>	1 (1;4)	1 (1;3)	n.s.
<b>SS-Alter bei Geburt</b>	39.85 ± 1.29	39.78 ± 1.35	n.s.
<b>Geburtsgewicht (g)</b>	3611.4 ± 536	3316.9 ± 502	P = 0,006*
<b>pH Umbilikalarterie</b>	7.30 ± 0.08	7.29 ± 0.09	n.s.
<b>Ø 5 min APGAR (min;max)</b>	10 (8;10)	10 (8;10)	n.s.
<b>% vaginale Geburt</b>	67	80	
<b>% Wehen vorhanden</b>	85	85	n.s.
<b>Ø Hba1c %</b>	5,8	n.u..	

**Tabelle 1: Klinische Charakteristika der einzelnen Gruppen**

(arithmetisches Mittel ± Standardabweichung). Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikante P-Werte.  
n.u. = nicht untersucht; n.s. = nicht signifikant

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischer Färbung können Proteine z.B. in der Plazenta über die Antigen-Antikörper Bindung und deren Detektion mikroskopisch sichtbar gemacht werden.

#### 2.2.1.1 Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Die immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte erfolgte anhand der Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Peroxidase-Methode. Diese Methode beruht auf der Affinität des Glykoproteins Avidin zu Biotin. Auf gentechnischem Weg wird das reinere Streptavidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen, wodurch unspezifische Reaktionen besser verhindert werden können. An den jeweils

verwendeten Primärantikörper bindet ein biotinylierter Brückenantikörper (Anti-Antikörper mit Biotin markiert), an den sich wiederum der Avidin-Biotin-Komplex anlagert. Bei diesem ist an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins je ein Molekül Biotin gebunden. So stellt der biotinylierte Brückenantikörper eine Verbindung zwischen dem Primärantikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex her. An diesen Komplex wird das Enzym Peroxidase gekoppelt (Noll et al. 2000). Aus der Wechselwirkung der Peroxidase mit jeweiligen Chromogen resultiert schließlich eine Farbreaktion.



**Abbildung 5: Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode**  
(Noll et al. 2000)

### 2.2.1.2 Anfertigung der Paraffinschnitte

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden aus den Paraffinblöcken jeweils 2-3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und zur Glättung in ein Streckbad mit 45°C warmem, destilliertem Wasser gegeben. Daraufhin wurden sie auf die, speziell für die Immunhistochemie beschichteten, Superfrost Plus Objektträger (durch Beschichtung erhalten die Objektträger eine positive Ladung, was für eine bessere Haftung der Schnitte sorgt) aufgezogen und im Brutschrank bei ca. 56-58°C getrocknet, um eine noch bessere Haftung zu gewährleisten.

### 2.2.1.3 Lösungsansätze und Antikörper

- 7,5%ige Wasserstoffperoxidlösung: 15 ml 30%ige Wasserstoffperoxidlösung + 200 ml destilliertes Wasser (Aqua dest.)
- 3%ige Wasserstoffperoxidlösung: 6 ml 30%ige Wasserstoffperoxidlösung + 194 ml Methanol
- Lösung A: 21,01 g 0,1M Citronensäure + 1 l Aqua dest.
- Lösung B: 29,41g 0,1M Na-Citrat + 1 l Aqua dest.
- Citratpuffer zum Kochen: 82 ml Lösung A + 18 ml Lösung B + 900 ml Aqua dest.



- Sekundärantikörper *Mouse*: 3 Tropfen *Horse*-Normalserum + 1 Tropfen Anti-*Mouse*-IgG + 10 ml steriles *Phosphate buffered saline* (PBS)
- Sekundärantikörper *Rabbit*: 3 Tropfen *Goat*-Normalserum + 1 Tropfen Anti-*Rabbit*-IgG + 10 ml steriles PBS
- ABC-Komplex: 4 Tropfen Reagenz A + 4 Tropfen Reagenz B + 10 ml steriles PBS (der ABC-Komplex muss vor Gebrauch 30 Minuten ruhen)
- PBS: für 5 l Stammlösung: 450 g NaCl + 71,65 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 13,35 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 5 l Aqua dest.; für 5 l Gebrauchslösung: 500 ml Stammlösung + 4,5 l Aqua dest. + pH auf 7,4 einstellen mit KOH
- VIP Substrate Kit für Peroxidase:  
5 ml steriles PBS + 3 Tropfen Reagenz 1, gut mischen  
+ 3 Tropfen Reagenz 2, gut mischen  
+ 3 Tropfen Reagenz 3, gut mischen  
+ 4 Tropfen Reagenz 4, gut mischen
- Aceton mit 0,05% Essigsäure: 80 ml Aceton + 40 µl Essigsäure
- 3,3-Diaminobenzidin (DAB): 10 ml Substratpuffer + 10 Tropfen DAB-Chromogen
- Power Block zur Blockierung: 1: 10 in Aqua dest. verdünnen
- Power Block zur Antikörper-Verdünnung: Blockierungslösung nochmal 1:10 in PBS verdünnen

Antikörper	Isotyp	Klon	Hersteller
ER $\alpha$	<i>Rabbit</i> IgG	EPR703(2)	Abcam
ER $\beta$	<i>Mouse</i> IgG2a	PPG5/10	Dako
HLA-G	<i>Mouse</i> IgG1	4H84	Novus Biologicals
PPAR $\gamma$	<i>Rabbit</i> IgG	polyklonal	Abcam
VDR	<i>Mouse</i> IgG2a	2F4	AbD Serotec

**Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper, Immunhistochemie**

Negativkontrolle	Hersteller
<i>Negative Control Mouse</i> IgG1	Dako
<i>Negative Control for super sensitive RAT antibodies</i>	BioGenex

**Tabelle 3: Verwendete Negativkontrollseren**

#### 2.2.1.4 Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Zunächst wurden die Paraffinschnitte für 15 Minuten in Xylol entparaffiniert und zweimal in 100%igen Alkohol gestellt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase folgte eine 20minütige Inkubation in einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung. Daraufhin durchliefen die Schnitte die absteigende Alkoholreihe (100% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol) bis zum Aqua dest. Die Demaskierung des jeweiligen Antigens erfolgte durch 5minütiges Kochen mit Citratpuffer im Dampfkochtopf. Anschließend wurden die Objektträger 5 Minuten in Aqua dest. und 10 Minuten in PBS gewaschen. Eine unspezifische Anfärbung wurde durch verschiedene Blockierungsreagenzien erreicht. Auf diesem Wege wurden elektrostatische Ladungen im Gewebe abgesättigt und so verhindert, dass sich Immunglobuline durch hydrophobe Bindung unspezifisch an Membranen oder Fettgewebe anheften. Darauf folgende Schritte waren die Inkubation mit dem Primärantikörper, dem Sekundärantikörper und dem ABC-Serum aus dem Vectastain® Elite ABC-Kit für jeweils 30 Minuten. Zwischen diesen Schritten wurde jeweils für 10 Minuten in PBS gewaschen. Weiterhin wurden die Schnitte für 2 Minuten mit DAB gefärbt und 10 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit saurem Hämalaun nach P. Mayer für ebenfalls 2 Minuten, woraufhin die Schnitte 5 Minuten mit Leitungswasser gebläut wurden. Anschließend durchliefen sie die aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, 2x 100% Ethanol) bis zum Xylol und wurden mit *Shandon Consul Mount* Medium eingedeckelt. Als Positivkontrolle wurden Schnitte von Mamma Karzinomen für PPAR  $\gamma$ , ER $\alpha$  und  $\beta$ , und von Ersttrimester-Plazenten für HLA-G verwendet. Bei der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch das *Mouse IgG*- bzw. *Rabbit IgG*-Negativkontrollserum ersetzt. Hierbei war es wichtig, dass die IgG-Konzentration des Negativserums der des Primärantikörpers entsprach. Nach abgeschlossener Färbung wurde die Farbintensität (0 = keine, 1 = schwache, 2 = mittlere, 3 = starke Färbung) und der prozentuale Anteil an positiv gefärbten Zellkernen (0 = keine Färbung, 1 = < 10% der Zellen, 2 = 11-50% der Zellen, 3 = 51-80% der Zellen, 4 = > 80% der Zellen) anhand des *Immunoreactive Score* (IRS) (Remmele et al. 1987) durch zwei unabhängige Gutachter ausgewertet. Aus der Multiplikation der ermittelten Werte ergab sich der IRS für den jeweiligen Schnitt. Zur Beurteilung der Färbung wurde ein Lichtmikroskop benutzt. Mit einem digitalen Kamerasystem wurden Bilder angefertigt.

Antikörper	Verdünnung	Inkubationsdauer	Blockierung	Antigendemaskierung
ER $\alpha$	1:400 in PBS	bei 4°C über Nacht	Gelbes Blockierungsserum aus dem <i>Rabbit</i> Kit für 20 Min.	Kochen im Dampfkochtopf mit Citratpuffer
ER $\beta$	1:700 in Verdünnungsmedium	bei 4°C über Nacht	Gelbes Blockierungsserum aus dem <i>Mouse</i> Kit für 20 Min.	Kochen im Dampfkochtopf mit Citratpuffer
HLA-G	1:100 in Power Block (1:100 in PBS)	bei 4°C über Nacht	Power Block (1:10 in Aqua dest.) für 3 Min.	keine
PPAR $\gamma$	1:1000 in Verdünnungsmedium	bei 4°C über Nacht	Power Block (1:10 in Aqua dest.) für 3 Min.	Kochen im Dampfkochtopf mit Citratpuffer
VDR	1:200 in PBS	bei 4°C über Nacht	Humanes AB-Serum für 45 Min.	Kochen im Dampfkochtopf mit Citratpuffer

**Tabelle 4: Vorgehen für die immunhistochemische Färbung der einzelnen Antikörper**

#### 2.2.1.5 Vitamin D-Rezeptor

Nachdem die Paraffinschnitte 15 Minuten in Xylol entparaffiniert wurden, durchliefen sie die absteigende Alkoholreihe (2x 100% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol) bis zum Aqua dest. Anschließend erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch eine 20minütige Inkubation in 7,5%iger Wasserstoffperoxidlösung, woraufhin die Schnitte wiederum 10 Minuten mit Leitungswasser gewässert wurden. Zur Demaskierung des Antigens wurden die Schnitte 5 Minuten mit Citratpuffer im Schnellkochtopf gekocht. Als nächstes wurde für 45 Minuten mit humanem AB-Serum blockiert. Die Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper *Mouse Anti-Human VDR* erfolgte für 16 Stunden bei einer Temperatur von 4°C. Weiterhin wurden die Schnitte für jeweils 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper und dem ABC-Serum aus dem Vectastain® Elite *Mouse* ABC-Kit inkubiert. Zwischen den letzten drei Schritten wurde jeweils für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Proben für 15 Minuten mit *VIP Substrate Kit for peroxidase* gefärbt. Durch das Waschen in Aqua dest. und Leitungswasser für jeweils 5 Minuten wurden die Schnitte für die

Gegenfärbung vorbereitet. Diese erfolgte mit Methylgrün für 5 Minuten bei 60°C in einem Brutschrank. Danach wurde der überschüssige Farbstoff durch Aqua dest. ausgewaschen und die Schnitte für 5 Minuten in Aceton, welches 0,05% Essigsäure enthielt, gestellt. Abschließend durchliefen die Proben die aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, 2x 100 % Ethanol) bis hin zum Xylol und wurden mit *Shandon Consul Mount* Medium eingedeckelt. Die Niere diente als Gewebe für die Positiv- und Negativkontrolle. Bei der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch das *Mouse IgG* Negativkontrollserum ersetzt. Hierbei war es wichtig, dass die IgG-Konzentration des Negativserums der des Primärantikörpers entsprach. Die Färbung des VDR wurde analog zu der der anderen Rezeptoren anhand des IRS (Remmele et al. 1987) ausgewertet.

### 2.2.2 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Mittels der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung kann eine Simultanexpression zweier Rezeptoren an derselben Zelle der Plazenta nachgewiesen werden. Diese basiert wie die Immunhistochemie ebenfalls auf der Antigen-Antikörper-Bindung und deren Detektion. Hierfür wurden die angefertigten Gefrierschnitte verwendet. Die Schnitte wurden zunächst 10 Minuten mit Alufolie zugedeckt aufgetaut, dann 20 Minuten ohne Alufolie zum Trocknen gestellt. Anschließend wurden sie für 5 Minuten mit Aceton fixiert und wieder getrocknet. Weiterhin wurde dreimal für 2 Minuten in PBS gewaschen und 15 Minuten bei RT mit dem Ultra V Block blockiert, um unspezifische Anfärbungen zu verhindern. Die beiden Primärantikörper wurden gemäß ihrer Verdünnung in das Antikörper-Verdünnungsmedium gegeben. Daraufhin wurden die Schnitte mit diesem Gemisch über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde wiederum dreimal für 2 Minuten in PBS gewaschen und schließlich das Sekundärantikörper-Gemisch (analog zum Primärantikörper-Gemisch hergestellt) für 30 Minuten bei RT auf die Schnitte gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurde im Dunkeln gearbeitet, um ein Zerfallen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Zum Abschluss wurden die Objektträger noch dreimal für 2 Minuten in PBS gewaschen und dann zum Trocknen ins Dunkle gestellt. Sobald die Schnitte vollständig getrocknet waren, wurden sie mit Vectashield® *Mounting* Medium für Fluoreszenz, welches 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI) enthielt, eingedeckt. Ausgewertet wurden die Schnitte mit einem Axiophot Photomikroskop. Mit Hilfe der digitalen Kamera AxioCam und des Computerprogramms Axio Vision wurden Bilder erstellt.

<b>Verwendete Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung (in Dako Antikörper- Verdünnungs- medium)</b>	<b>Inkubations- dauer</b>	<b>Inkubations- temperatur</b>
Cytokeratin-7 (CK-7) Polyklonal, <i>Rabbit</i> Firma: Santa Cruz	1:100	über Nacht	4°C
CK-7 Klon: OV-TL 12/30 Monoklonal, <i>Mouse</i> kappa IgG1 Firma: Novocastra	1:1500	1h	RT
HLA-G Klon: MEM-G/9 Monoklonal, <i>Mouse</i> IgG1 Firma: AbD Serotec	1:50	über Nacht	4°C
PPAR $\gamma$ Polyklonal, <i>Rabbit</i> Firma: Abcam	1:1000	über Nacht	4°C
Ubiquitin Klon: FK2 Monoklonal, <i>Mouse</i> IgG1 Firma: Enzo Life Sciences	1:500	über Nacht	4°C
VDR Polyklonal, <i>Rabbit</i> Firma: Abcam	1:1000	über Nacht	4°C
VDR Klon: 2F4 Monoklonal, <i>Mouse</i> IgG2a Firma: AbD Serotec	1:200	über Nacht	4°C

Tabelle 5: Verwendetes Primärantikörper, Doppelimmunfluoreszenz

<b>Verwendete Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung (in Dako Antikörper- Verdünnungs- medium)</b>	<b>Inkubations- dauer</b>	<b>Inkubations- temperatur</b>
<i>Goat-Anti-Mouse</i> IgG Cy2 markiert Firma: Dianova	1:100	30 Min.	RT
<i>Goat-Anti-Rabbit</i> IgG Cy3 markiert Firma: Dianova	1:500	30 Min.	RT

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper, Doppelimmunfluoreszenz

### 2.2.3 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Aus dem Gefriermaterial von 40 Plazenten (10 GDM weiblich, 10 GDM männlich, 10 Ko männlich, 10 Ko weiblich) wurde mit dem *Rneasy® Lipid Tissue Mini Kit* RNA isoliert. Hierzu wurden jeweils 100 mg des dezidualen Gewebes zerkleinert und in 1 ml Quiazol *Lysis* Reagenz gegeben. Anschließend wurde das auf Eis gekühlte Gewebe mit Ultraschall zerkleinert und homogenisiert. Nachdem zu jeder Probe jeweils 200 µl Chloroform hinzugegeben wurden, musste 15 Sekunden kräftig geschüttelt werden und 15 Minuten bei 12000xg zentrifugiert werden, um eine Auftrennung in folgende drei Phasen zu erreichen:

- oben: farblose, wässrige Phase → RNA
- Mitte: weiße Interphase
- unten: rote, organische Phase

Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Sammelgefäß pipettiert und im Verhältnis 1:1 mit Ethanol gemischt. 700 µl des Proben/Ethanol Gemisches wurden auf eine *Rneasy Mini Column®*, die sich in einem 2 ml Sammelgefäß befand, gegeben. Daraufhin wurde für 15 Sekunden bei 8000xg(= 10000upm) zentrifugiert. Das Durchflussvolumen im Sammelgefäß wurde anschließend verworfen und dieser Schritt mit dem restlichen Proben-Ethanol Gemisch wiederholt. Im Folgenden wurden zunächst 700 µl RW1 Puffer auf die Säule pipettiert, für 15 Sekunden bei 8000xg zentrifugiert und anschließend das Sammelgefäß mitsamt der darin enthaltenen Flüssigkeit verworfen. Nachdem das Sammelgefäß erneuert worden war, wurden 500 µl RPE Puffer auf die Säule pipettiert und wiederum für 15 Sekunden bei 8000xg zentrifugiert. Das Durchflussvolumen wurde verworfen und der Schritt nochmals mit 500 µl RPE Puffer wiederholt, wobei diesmal für 2 Minuten bei 8000xg zentrifugiert wurde. Um die Silica-Gel-Membran im Inneren der Säule vollständig zu trocknen, wurde sie für 1 Minute bei 11000xg zentrifugiert. Zur Eluation der so gewonnenen und gereinigten RNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gesteckt und 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Durch Zentrifugieren für 1 Minute bei 8000xg wurde die an die Membran gebundene RNA in das Sammelgefäß ausgewaschen. Dieser Vorgang wurde mit 50 µl RNase-freiem Wasser wiederholt und das Eluat im gleichen Sammelgefäß erneut aufgefangen. Die durch diesen Prozess gewonnene RNA wurde bis zur cDNA-Synthese bei -80°C aufbewahrt.

Die Reverse Transkription wurde mit dem *High Capacity cDNA* Reverse Transkription Kit durchgeführt. Für die Umschreibung von 20 µl mRNA wurden 20 µl des RT-Mastermixes benötigt, der sich wie folgt zusammensetzte:

- 4 µl 10x RT-Puffer
- 1,6 µl 25x dNTP Mix
- 4 µl Oligo-dT Primer
- 2 µl RNase Inhibitor
- 6,4 µl Nuclease-freies Wasser
- 2 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase

Nachdem die mRNA und der RT-Mastermix in einem Sammelgefäß zusammenpipettiert worden waren, wurden diese in den Eppendorf *Mastercycler* eingestellt und die Umschreibung gestartet. Hierbei wurde 10 Minuten bei 25°C, anschließend 120 Minuten bei 37°C und zuletzt 5 Sekunden bei 85°C inkubiert. Die Lösung wurde dann 5 Minuten bei 4°C abgekühlt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.4 Quantitative *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion

Durch die quantitative *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) kann DNA *in-vitro* vervielfältigt werden.

Es wurde eine relative Quantifizierung bestimmter mRNA-Sequenzen durchgeführt, wobei  $\beta$ -Actin als endogene Kontrolle verwendet wurde, um Veränderungen der RNA-Ausgangsmenge zu normieren. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte hierbei durch eine Fluoreszenzmessung während der Amplifikation.

Zunächst wurde der Mastermix, bestehend aus 1 µl TaqMan® *Gene Expression Assay* 20x, 10 µl TaqMan® *Fast Universal PCR Master Mix* 2x und 8 µl H<sub>2</sub>O (*DEPC treated DI water*) pipettiert. Nun wurden jeweils 19 µl des Mastermixes in das jeweilige Well der 96-Well-Platte vorgelegt und anschließend 1 µl der cDNA der jeweiligen Probe bzw. 1 µl H<sub>2</sub>O (*DEPC treated DI water*) für die Negativkontrolle hinzugegeben. Abschließend wurde die Platte mit einem *Adhesive Cover* abgedeckt und in das ABI PRISM 7500 *Fast Real-Time-PCR*-Gerät eingelegt. In diesem wurde folgendes PCR-Temperatur-Protokoll durchlaufen: 20 Sekunden bei 95°C, 40 Zyklen mit 3 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung und 30 Sekunden bei 60°C zum Anlagern der Primer (*Annealing*) und zur Elongation. Die Quantifizierung wurde mit  $\beta$ -Actin

(Hs99999903\_m1) als *housekeeping*-Gen mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode durchgeführt (Livak et al. 2001).

<b>Primer</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>
β-Actin	Hs99999903_m1	Applied Biosystems
ERα	Hs01046818_m1	Applied Biosystems
PPAR γ	Hs01115513_m1	Applied Biosystems
VDR	Hs01045840_m1	Applied Biosystems

**Tabelle 7: Verwendete Primer, qRT-PCR**

### 2.2.5 Westernblot

Der Westernblot dient dem Nachweis und der Quantifizierung bestimmter Proteine in Zell- oder Gewebslysaten. Dabei werden die Proteine durch eine Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Durch eine spezifische Bindung zwischen dem jeweiligen Antikörper und den Proteinen auf der Membran und die anschließende Detektion mit einem Chromogen können einzelne Proteine quantifiziert werden.

#### 2.2.5.1 Erstellen von Gewebslysaten

Von den gleichen 40 Plazenten, aus denen die RNA isoliert wurde, wurde ein kleines Stück deziduales Gewebe zerkleinert, um aus diesem ein Gewebslysat für einen Westernblot herzustellen. Hierbei wurden alle GDM männlich sowie alle GDM weiblich bzw. Ko männlich bzw. Ko weiblich zu einem Pool zusammengefasst. Das zerkleinerte Gewebe wurde mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml RIPA-Puffer mit 10 µl Protease-Inhibitor gegeben. Mit Ultraschall wurde das Gewebe weiter zerkleinert und die restlichen Gewebsbröckchen bei 1000upm für 5 Minuten abzentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde bei -20°C eingefroren.

#### 2.2.5.2 Proteinassay nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate und der Gewebslysate wurde der Proteinassay nach Bradford durchgeführt. Hierzu wurde das Bradfordreagenz zunächst im Verhältnis 1:4 mit Aqua dest. verdünnt. Die Zelllysate wurden ebenfalls im Verhältnis 1:4 mit Aqua dest. verdünnt, während die Gewebslysate im Verhältnis 1:20



verdünnt wurden. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Protein Assay Standard II (Bio-Rad) hergestellt:

1000 µg/ml = 840 µl Standard (unverdünnt) + 160 µl Aqua dest.

800 µg/ml = 400 µl Standardlösung (1000 µg/ml) + 100 µl Aqua dest.

400 µg/ml = 200 µl Standardlösung (800 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.

200 µg/ml = 200 µl Standardlösung (400 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.

100 µg/ml = 200 µl Standardlösung (200 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.

50 µg/ml = 200 µl Standardlösung (100 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.

Für den Leerwert wurden 1 ml Bradfordreagenz mit 20 µl Aqua dest. vermischt, für die Standards jeweils 1 ml Bradfordreagenz und 20 µl der jeweiligen Standardlösung und für die Proben 1 ml Bradfordreagenz und 20 µl der jeweiligen Probenverdünnung. Anschließend wurde der jeweilige Ansatz in eine Küvette überführt und im Photometer Ultrospec™ gemessen. Dieses wurde hierzu auf 595 nm eingestellt und eine lineare Regression als Aufzeichnungsart gewählt. Zunächst wurde der Nullabgleich mit der Küvette mit dem Leerwert durchgeführt. Anschließend wurden die Standards gemessen und so die Standardkurve erstellt. Als Letztes wurden die einzelnen Proben gemessen und so die Proteinkonzentrationen ermittelt.

### 2.2.5.3 Durchführung des Westernblots

Der Westernblot setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

Vorbereiten der Proben und der Puffer

Das Probenvolumen pro Gel-Well betrug 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen: x µl Probe + x µl Aqua dest. + 5 µl Roti-Load Probenpuffer. Dabei betrug die Proteinmenge für β-Actin jeweils 2 µg und die für VDR jeweils 20 µg. Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei 95°C im Thermoblock denaturiert und anschließend 15 Minuten im Kühlschrank abgekühlt.

Für den Laufpuffer wurden 100 ml des 10fach Konzentrats des Tris-Glycin-SDS-Puffers mit 900 ml Aqua dest., für den Blotpuffer 100 ml Tris-Glycin-Puffer mit 200 ml Methanol und 700 ml Aqua dest. vermischt.

Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurde in einer Gelelektrophorese-Kammer durchgeführt. Dazu wurden die Wells des 12%igen Tris-HCL Ready Gels mit dem Standard und den Proben bestückt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Vom Standard wurden jeweils 7 µl, von den Proben jeweils 18 µl in

das vorgesehene Well pipettiert. Die Kammer wurde verschlossen und zunächst eine Spannung von 80 Volt für 30 Minuten, anschließend von 100 Volt für 50 Minuten angelegt. So erfolgte die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe.

#### Blotten auf die Polyvinylidenfluorid -Membran

Die aufgetrennten Proteinbanden mussten nun auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran transferiert werden. Dazu wurde die Membran kurz in Methanol eingelegt und die Klemmkammer wie folgt vorbereitet: Fiberpad-Filterpapier-Gel-Membran-Filterpapier-Fiberpad. Die Blotkammer wurde auf Eis gestellt, mit Blotpuffer gefüllt und die Klemmkammer eingehängt. Für 90 Minuten wurde eine Spannung von 100 Volt angelegt und die Proteine so von dem Gel auf die Membran übertragen.

#### Färben der Polyvinylidenfluorid -Membran

Hierfür wurde als Detektionssystem der Vectastain ABC-*Amplification* (ABC-AmP) *Kit for western blotting* verwendet. Als erstes wurde die Membran für 60 Minuten in Casein-Lösung blockiert und dann mit dem Primärantikörper Anti-Vitamin D-Rezeptor (polyklonal, Abcam) für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach jedem Schritt wurde die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten mit Casein-Lösung gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 45 Minuten bei RT, mit dem ABC-Komplex für 20 Minuten. Weiterhin wurde die Membran für 5 Minuten mit 0,1M Tris-Puffer (pH = 9,5) gewaschen und abschließend mit der BCIP/NBT-Chromogen-Substrat-Lösung (10 ml 0,1 M Tris-Puffer pH = 9,5 + 4 Tropfen BCIP Lsg. 1 - mixen - + 4 Tropfen NBT Lsg. 2 – mixen – 4 Tropfen MgCl<sub>2</sub> Lsg. 3 – mixen) gefärbt. Die Reaktion wurde schließlich mit Aqua dest. gestoppt und die Membran getrocknet.

#### Auswertung

Im GelDoc-Gerät wurde die trockene Membran eingescannt und anschließend die einzelnen Banden mit Hilfe der Bio-Rad *Quantity One* Software quantifiziert. Hierbei wurde die Signalintensität der VDR-Bande in Quadratmillimetern jeweils auf die von  $\beta$ -Actin normalisiert. Der Blot wurde dreimal wiederholt.

## 2.2.6 Zellkultur

### 2.2.6.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Trophoblasttumorzellen der Zelllinie BeWo (ECACC) wurden in einem Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Hierfür wurden die Zellen in 75 ml (T 75) bzw. 175 ml (T 175) Zellkulturflaschen in 12 ml bzw. 24 ml

Dulbecco's *Modified Eagle* Medium (DMEM), welches 10% *fetal calf serum* (FCS) enthielt, ausgesät. Einmal die Woche wurden die Zellen gezählt und passagiert und wiederum einmal die Woche erfolgte ein Mediumswechsel.

#### 2.2.6.2 Splitten der Zellen

Um die Zellen zu splitten, wurde das alte Medium abgezogen und verworfen. Daraufhin wurde mit 6 ml (für die T 75 Flasche) bzw. 8 ml (für die T 175 Flasche) PBS gewaschen und mit 2 ml bzw. 3 ml Trypsin für 8-10 Minuten inkubiert. Nachdem sich die Zellen nach der Inkubationszeit vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden 8 ml bzw. 12 ml DMEM/FCS zugegeben und gut gemischt. Für die Zellzählung wurden 25 µl dieser Zellsuspension mit 50 µl PBS und 25 µl Trypanblau gemischt und in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Die restliche Zellsuspension wurde in ein Falcon pipettiert und 5 Minuten bei 1000upm bei RT und Bremse 2 zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde abgezogen und das Zellpellet nun mit so viel Medium gemischt, dass sich eine Zellzahl von 1 Million Zellen pro 1 ml ergab. Um die gewünschte Zellzahl zu erreichen, wurde die entsprechende Menge der Zellsuspension zurück in die Flasche gegeben und mit DMEM/FCS auf 12 ml bzw. 24 ml aufgefüllt.

#### 2.2.6.3 Stimulation der Zellen

Als Stimulantien wurden humanes Insulin, rekombinantes humanes Leptin, humanes Calcitriol und die PPAR $\gamma$ -Agonisten Arachidonsäure und 15d-PGJ2 verwendet.

Insgesamt wurden 3 voneinander unabhängige Stimulationsversuche für die jeweilige Substanz in den verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

BeWo-Zellen wurden für die PCR in einer 24-Well-Platte mit einer Densität von 1 Mio. Zellen pro Well, für die immuncytochemische Färbung auf Teflon Objektträgern in einer Dichte von 100.000 Zellen pro Feld ausgesät. Nach 24 Stunden waren sie konfluent gewachsen und die Stimulantien wurden in der jeweiligen Konzentration zugegeben. Die Menge, die an Stimulanz in ein Well pipettiert wurde, wurde vorher an Medium abgezogen. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle und wurden gleich behandelt wie die Stimulierten.

Die Stimulation mit Insulin erfolgte in den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml und 10000 ng/ml. 1 µl Insulin wurde mit 999 µl DMEM/FCS vorverdünnt und von dieser Vorverdünnung wurden 6 µl für die Konzentration von 10 ng/ml bzw. 60 µl für die Konzentration von 100 ng/ml in die jeweiligen Wells gegeben. Weiterhin

wurden 3 µl Insulin mit 27 µl DMEM/FCS vorverdünnt und 6 µl dieser Vorverdünnung in das jeweilige Well pipettiert, um eine Konzentration von 1000 ng/ml zu erhalten. 6 µl des unverdünnten Insulins wurden für eine Konzentration von 10000 ng/ml in die Wells pipettiert.

Calcitriol wurde in den Konzentrationen 0,01 nmol/ml, 0,1 nmol/ml und 1 nmol/ml auf die Zellen gegeben. Dazu wurde eine Vorverdünnung von 1:1000 hergestellt und 0,42 µl bzw. 4,2 µl bzw. 42 µl von dieser in die jeweiligen Wells pipettiert.

BeWo-Zellen wurden außerdem mit 1 µg, 10 µg und 100 µg Arachidonsäure stimuliert. Die 10 mg Arachidonsäure in Pulverform mussten zunächst in 1 ml DMEM/FCS gelöst werden. Von dieser Lösung wurde 1 µl mit 9 µl DMEM/FCS vorverdünnt und wiederum 1 µl dieser Vorverdünnung in die jeweiligen Wells pipettiert. So wurden diese Wells mit 1 µg Arachidonsäure versetzt. Für die Stimulation mit 10 µg bzw. 100 µg Arachidonsäure wurden in die jeweiligen Wells 1 µl bzw. 10 µl der Lösung in der Ampulle pipettiert.

Die Stimulation mit 15d-PGJ2 erfolgte in den Konzentrationen 1 nmol/ml und 10 nmol/ml. Zunächst wurde 1 µl 15d-PGJ2 mit 9 µl DMEM/FCS vorverdünnt und dann 3,2 µl dieser Vorverdünnung den jeweiligen Wells zugegeben, um eine Konzentration von 1 nmol/ml zu erzielen. Für eine Konzentration von 10 nmol/ml wurden 3,2 µl des unverdünnten 15d-PGJ2 verwendet.

Nach der Zugabe der Stimulantien wurden die Zellen für weitere 2 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend die RNA isoliert. Für die Stimulation mit 15d-PGJ2 gab es zwei verschiedene Versuchsansätze: Für den ersten wurden die Zellen direkt mit 15d-PGJ2 stimuliert, für den zweiten ging der Stimulation eine 72stündige Inkubation mit 50 µmol/ml Forskolin voraus.

Für die immunocytochemische Färbung des VDR wurden die BeWo-Zellen für 48 Stunden mit humanem Calcitriol stimuliert.

#### 2.2.6.4 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Die RNA-Isolation aus den Zellen wurde mit Hilfe des NucleoSpin®RNAII Kits durchgeführt.

Das Zellmedium wurde aus den Wells abgezogen und jedes Well mit 1 ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 350 µl RA1 Puffer zugegeben und das Zelllysate in ein Sammelgefäß gegeben. Jede Probe wurde dann noch mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Zur Filtration wurde das Zelllysate auf einen NucleoSpin-

Filter, der sich in einem Sammelgefäß befand, pipettiert und anschließend bei 11000g für 1 Minute zentrifugiert. Der Filter wurde verworfen und das Lysat mit 350 µl 70%igem Ethanol gemischt. Weiterhin wurde die NucleoSpin RNA II Säule in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und das Lysat auf die Säule pipettiert. Nach 30sekündiger Zentrifugation bei 11000g wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß gesteckt. Zum Entsalzen der Silca Membran wurden 350 µl Membran *Desalting Buffer* auf diese gegeben und erneut für 1 Minute bei 11000g zentrifugiert. Im Folgenden wurden für jede Probe 10 µl rekonstituierte rDNAse mit 90 µl *Reaction Buffer for rDNAse* gemischt und 95 µl dieses DNAse Mix auf die Membran der Säule pipettiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert, um die DNA zu verdauen. Anschließend erfolgten 3 Waschschrte, der erste mit 200 µl RA2 Puffer und der zweite mit 250 µl RA3 Puffer. Es wurde jeweils für 30 Sekunden bei 11000g zentrifugiert und nach dem ersten Waschschrte das Sammelgefäß gewechselt. Nach dem zweiten Schritt wurde das Zentrifugat verworfen, das Sammelgefäß aber behalten. Für den dritten Waschschrte wurden 250 µl RA3 Puffer auf die Säule pipettiert und für 2 Minuten bei 11000g zentrifugiert. Als letztes wurde die Säule in ein nucleasefreies 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gesteckt und 60 µl RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert. Durch die 1minütige Zentrifugation bei 11000g befand sich in dem Sammelgefäß nun die eluierte RNA, welche sofort bei -80°C eingefroren wurde. Die Reverse Transkription und die PCR wurden wie unter 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben, durchgeführt.

#### 2.2.6.5 Immuncytochemische Färbung des Vitamin D-Rezeptors

Die Chamberslides wurden für 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend bei -20°C für 10 Minuten in eiskaltem Methanol fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten wurde die Zellmembran durch die 10minütige Inkubation mit 0,2%igem Nonylphenoethoxylat 40 (NP40) permeabilisiert. Es folgten nochmals zwei Waschschrte in PBS für jeweils 5 Minuten und dann die 3minütige Blockierung mit Power Block, der 1:10 in Aqua dest. verdünnt wurde. Der Primärantikörper wurde 1:1000 in PBS verdünnt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Darauf folgende Schritte waren die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und dem ABC-Serum aus dem *Rabbit Vectastain® Elite ABC-Kit* für jeweils 30 Minuten. Zwischen diesen wurde jeweils für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 10 Minuten mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) gefärbt und 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Die

Gegenfärbung erfolgte mit saurem Hämalaun nach Mayer für 30 Sekunden. Nach 3minütigem Wässern mit Leitungswasser wurde mit Aquatex wässrig eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ und beinhaltete folgende Möglichkeiten: keine Färbung (negativ), schwache Färbeintensität (einfach positiv), mittlere Intensität (zweifach positiv) und starke Intensität (dreifach positiv). Verglichen wurde jeweils der Anteil an mittel und stark gefärbten Zellen in Prozent der stimulierten Zellen mit dem der nicht-stimulierten Kontrollzellen.

### 2.2.7 DNA-Isolation

Als Grundlage für die *real-time*-methylierungsspezifische PCR (rt-MSP) diente die genomische DNA, welche mit Hilfe des NucleoSpin® Tissue Kits aus dem Gefriermaterial von 40 Plazenten isoliert wurde. Dazu wurden jeweils 25 mg des eingefrorenen Plazentagewebes zerkleinert und über Nacht bei 56°C in 180 µl Lysepuffer T1 mit 25 µl Proteinase K inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu jeder Probe 200 µl Puffer B3 pipettiert und bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Weiterhin wurden je 210 µl Ethanol zugegeben, anschließend die gesamte Flüssigkeit auf die jeweilige *NucleoSpin-Tissue Column* pipettiert und für 1 Minute bei 11000xg zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Säule einmal mit 500 µl Puffer BW und ein zweites Mal mit 600 µl Puffer B5 gewaschen. Dazwischen und danach erfolgte jeweils eine 1minütige Zentrifugation bei 11000xg. Zur Elution der DNA wurde die Säule mit 100 µl vorgewärmtem Puffer BE für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und abschließend noch einmal bei 11000xg zentrifugiert. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten DNA wurden mit dem Nanodrop® gemessen. Die so gewonnene DNA wurde bei -20°C eingefroren.

### 2.2.8 Natriumbisulfit-Behandlung

Entscheidende Voraussetzung für die Durchführung einer rt-MSP ist die vorherige Natriumbisulfit-Behandlung der isolierten, genomischen DNA. Diese bewirkt eine biochemische Modifizierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt. Hierzu wurden von jeder DNA-Probe jeweils 2 µg mit dem EpiTect® *Bisulfite* Kit behandelt. Je nach Konzentration der jeweiligen DNA-Probe ergab sich ein variables Volumen, welches immer mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt wurde. Hierzu wurden 85µl Bisulfit-Mix und 35 µl *DNA protection* Puffer gegeben. Die Bisulfit-Konvertierung

erfolgte anschließend im Eppendorf *Mastercycler* entsprechend den Bedingungen in Tabelle 8.

Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	5 Min.	95°C
Inkubation	25 Min.	60°C
Denaturierung	5 Min.	95°C
Inkubation	85 Min.	60°C
Denaturierung	5 Min.	95°C
Inkubation	175 Min.	60°C
Hold	unbegrenzt	20°C

**Tabelle 8: Protokoll für die Bisulfit-Konvertierung im Mastercycler**

Am nächsten Tag erfolgte die Reinigung der modifizierten DNA in mehreren Schritten. Zwischen jedem Schritt wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert und anschließend das Zentrifugat verworfen. Zunächst wurden 560 µl Puffer BL zu jeder Probe gegeben, anschließend 500 µl Puffer BW. Weiterhin wurden 500 µl Puffer BD hinzu pipettiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit 500 µl Puffer BW. Um die restliche Flüssigkeit aus den einzelnen Säulen zu entfernen, wurde nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert und die Säulen zusätzlich für 5 Minuten mit geöffnetem Deckel bei 56°C in einem Heizblock inkubiert. Zur Elution der modifizierten und gereinigten DNA wurden 20 µl Puffer EB auf jede Säule pipettiert und diese für 1 Minute bei 15000xg zentrifugiert. Schließlich wurde die DNA bei -20°C eingefroren.

### 2.2.9 Real-time-methylierungsspezifische PCR

Die rt-MSP wurde in 96-Well-Platten durchgeführt, wobei in jedes Well ein Volumen von 25 µl, bestehend aus 2,5 µl Vorwärts-Primer (Sequenz: 5'-ggcgttcgtttgggattg-3', Applied Biosystems), 2,5 µl Rückwärts-Primer (Sequenz: 5'-gccgacacgcgaactctaa-3', Applied Biosystems), 3 µl TaqMan® Sonde (Sequenz: FAM 5'-cgataaaaccgaacgaccgcgacga-3' TAMRA, Applied Biosystems), 12,5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x, 3µl H<sub>2</sub>O (*DEPC treated DI water*) und 2 µl bisulfit-konvertierter DNA, gegeben wurde. Das PCR-Temperatur-Protokoll lautete wie folgt: 20 Sekunden bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen Amplifizierung für 3 Sekunden bei 95°C und für 30 Sekunden bei 60°C. Jede Platte enthielt Patientenproben, Positiv- (MDA-

MB-231) und Negativkontrollen (MCF-7 Zelllinie) sowie Wasser als Leerwert. Für die PCR wurde das ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR Gerät benutzt.

### 2.2.10 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit der SPSS Statistik Software (Version 19). Für den Vergleich arithmetischer Mittelwerte wurden der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test und der T-Test angewandt. Univariate und multivariate lineare Regressionsmodelle wurden für die Berechnung der Korrelation zwischen IRS und klinischen Daten benutzt. Die Modelle wurden jeweils für alle möglichen und bekannten Störgrößen (Alter der Mutter, BMI, Parität, Geschlecht des Kindes, Gestationsalter) adjustiert. Als statistisch signifikant wurden P-Werte  $< 0,05$  gewertet.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vitamin D-Rezeptor

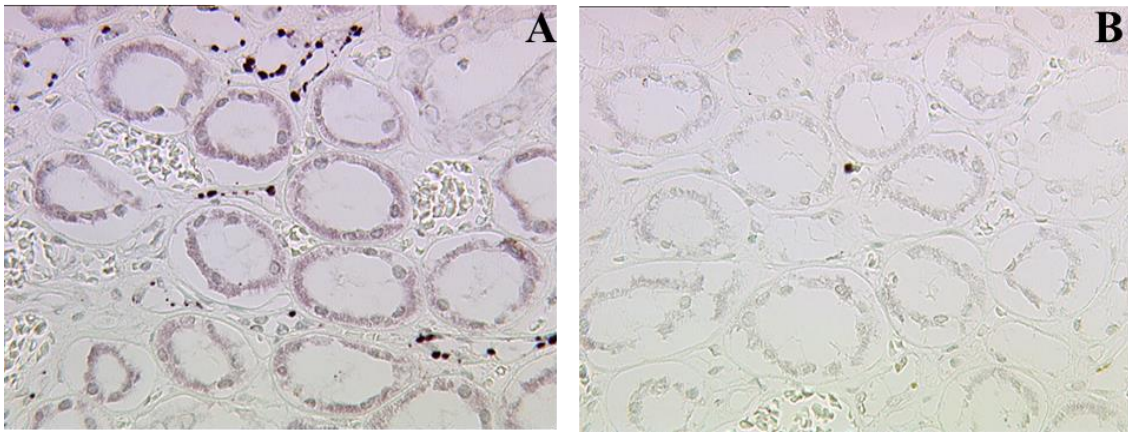
##### 3.1.1 Immunhistochemische Färbung

Wir fanden eine VDR-Expression in den Kernen der SCT und der EVT sowohl bei den Normalkontrollen als auch bei den GDM positiven Plazenten. Außerdem exprimierte auch das Endothel VDR.

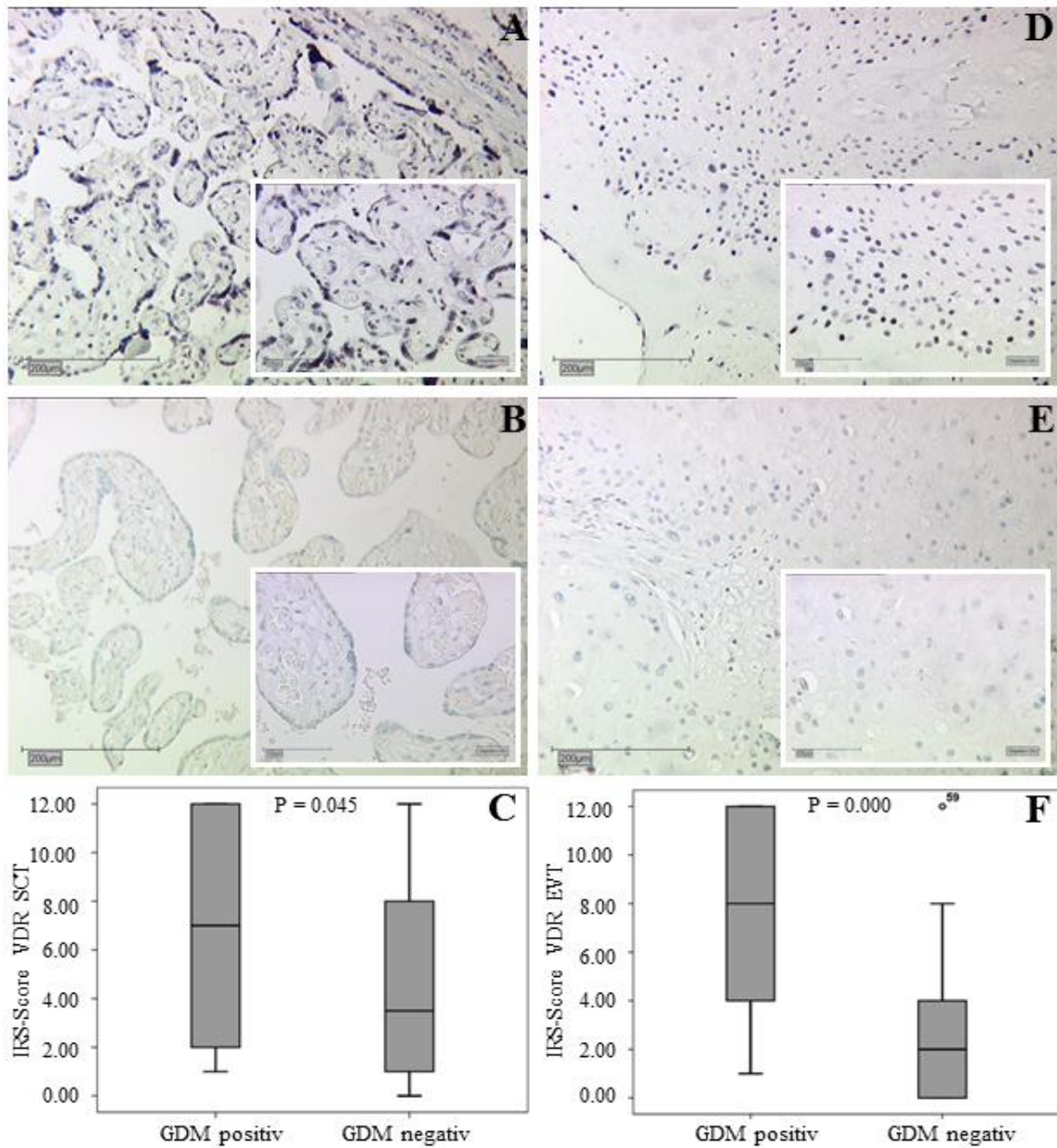
Die Expression des VDR war im SCT bei GDM positiven Plazenten im Vergleich zu den Normalkontrollen (median IRS 7 vs. 3,  $P = 0,045$ ) erhöht. Des Weiteren fanden sich geschlechtsspezifische Unterschiede. Im SCT männlicher Feten zeigte sich bei den Kontrollen (median IRS 6 vs. 2,  $P = 0,010$ ) eine stärkere Expression des VDR als bei den weiblichen Feten. Dieser Geschlechtsunterschied war bei den GDM positiven Plazenten nicht zu beobachten (median IRS 8 vs. 4,  $P = 0,062$ ).

Im EVT war die Expression des VDR, analog zu der im SCT, bei GDM positiven Plazenten gegenüber den Kontrollen erhöht (median IRS 8 vs. 2,  $P = 0,000$ ). Innerhalb der Normalkontrollen exprimierte die EVT männlicher Feten mehr VDR als die der weiblichen (median IRS 3 vs. 0,  $P = 0,030$ ). Dieser Geschlechtsunterschied war bei den GDM positiven Plazenten nicht vorhanden (median IRS 8 vs. 8,  $P = 0,798$ ).

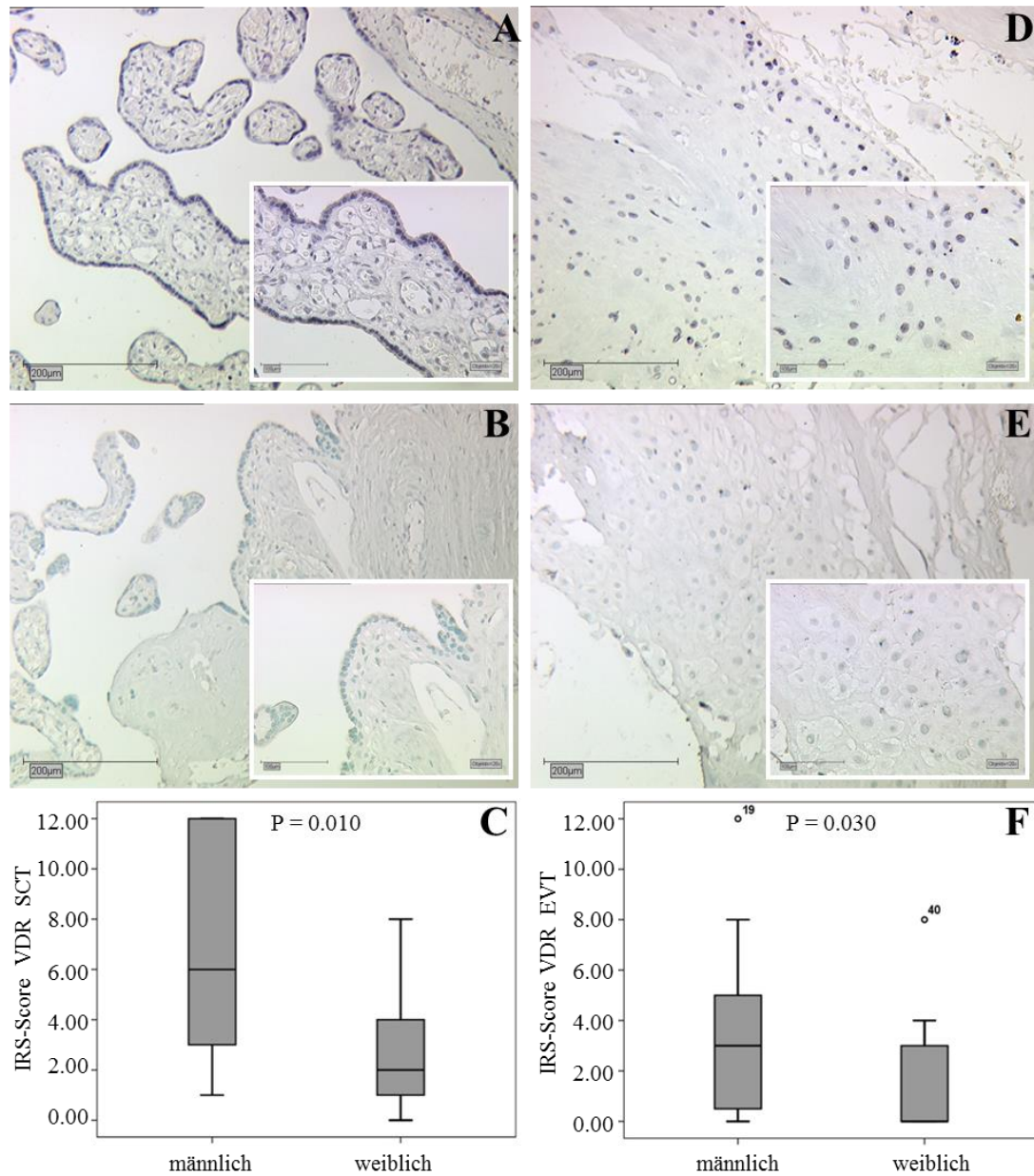
Die Expression des VDR verhielt sich im Endothel ebenso wie in den Trophoblastzellen. Das Endothel GDM positiver Plazenten zeigte eine signifikant höhere Expression des VDR als das der Kontrollen (median IRS 8 vs. 2,  $P = 0,001$ ). Außerdem fanden wir auch im Endothel geschlechtsspezifische Unterschiede. So zeigte sich im Endothel männlicher Feten eine stärkere VDR-Expression als in dem weiblicher Feten (median IRS 3 vs. 1,  $P = 0,049$ ). Innerhalb der GDM-Gruppe fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern.



**Abbildung 6: Positiv- und Negativkontrolle für VDR.**  
VDR-Positivkontrolle (A) und VDR-Negativkontrolle (B) an Nierengewebe



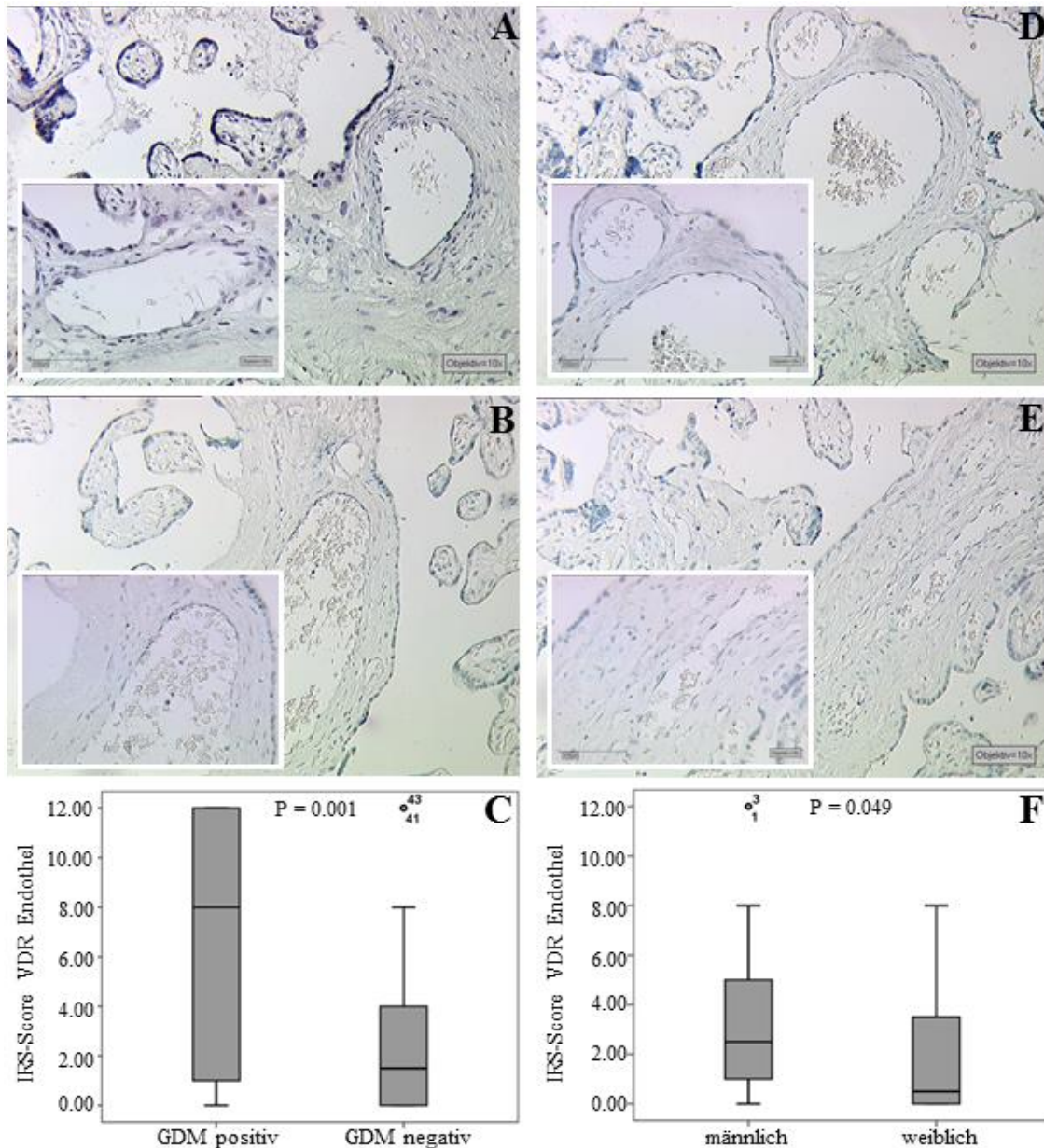
**Abbildung 7: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung des VDR.**  
VDR-Expression im SCT GDM positiver Plazenten (A) und im SCT von Kontrollplazenten (B) sowie im EVT GDM positiver Plazenten (D) und im EVT von Kontrollplazenten (E). VDR-Expression in GDM positiven und in Kontrollplazenten im SCT (C) und im EVT (F) in Form von Boxplots.



**Abbildung 8: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung des VDR in männlichen und weiblichen Kontrollplazenten.**

VDR-Expression im SCT männlicher (A) und weiblicher (B) Kontrollplazenten sowie im EVT männlicher (D) und weiblicher (E) Kontrollplazenten. VDR-Expression männlicher und weiblicher Kontrollplazenten im SCT (C) und im EVT (F) in Form von Boxplots.



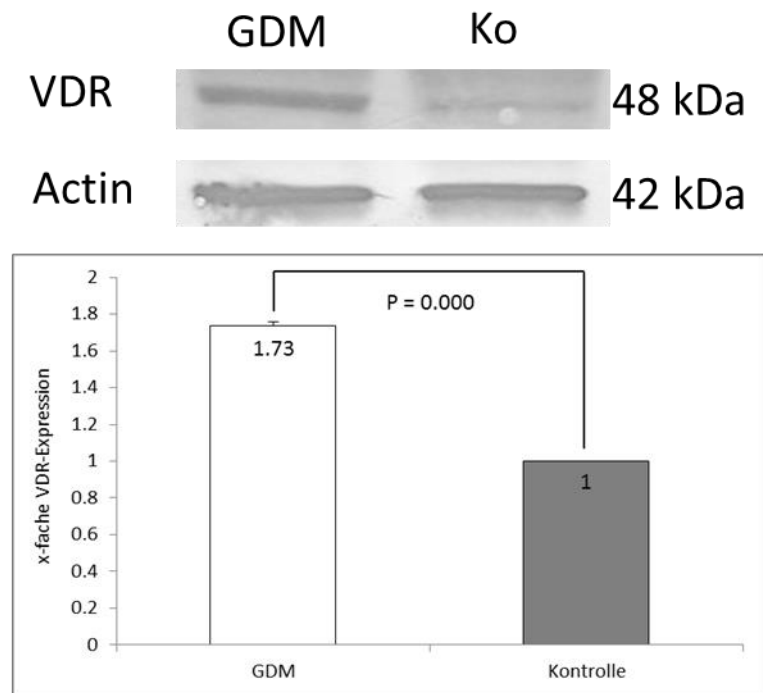


**Abbildung 9: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung des VDR im Endothel.**

VDR-Expression im Endothel GDM positiver Plazenten (A) und im Endothel von Kontrollplazenten (B) sowie im Endothel männlicher (D) und weiblicher (E) Kontrollplazenten. VDR-Expression im Endothel von GDM positiven und Kontrollplazenten (C) sowie von männlichen und weiblichen Kontrollplazenten (F) in Form von Boxplots.

### 3.1.2 Westernblot für den Vitamin D-Rezeptor

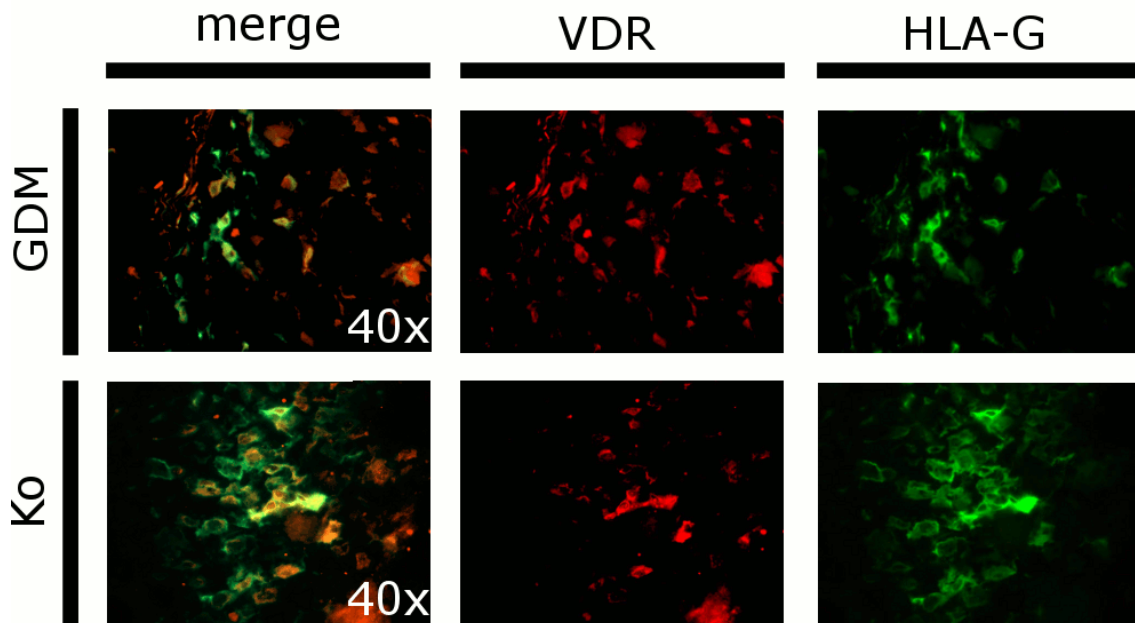
Zur Bestätigung der in der Immunhistochemie gefundenen Veränderungen in der VDR-Expression wurde ein Westernblot mit gepoolten Gewebslysaten aus dem Bereich der Dezidua durchgeführt. VDR erzeugte eine Hauptbande mit einer molekularen Masse um die 48kDa. Die Auswertung des Westernblots ergab eine 1,7fach höhere VDR-Expression in der Dezidua von GDM positiven Plazenten im Vergleich zu den normalen Kontrollen (P = 0,000).



**Abbildung 10: Westernblot für VDR mit Geweblysaten aus dem Bereich der Dezidua von GDM positiven und Kontrollplazenten**

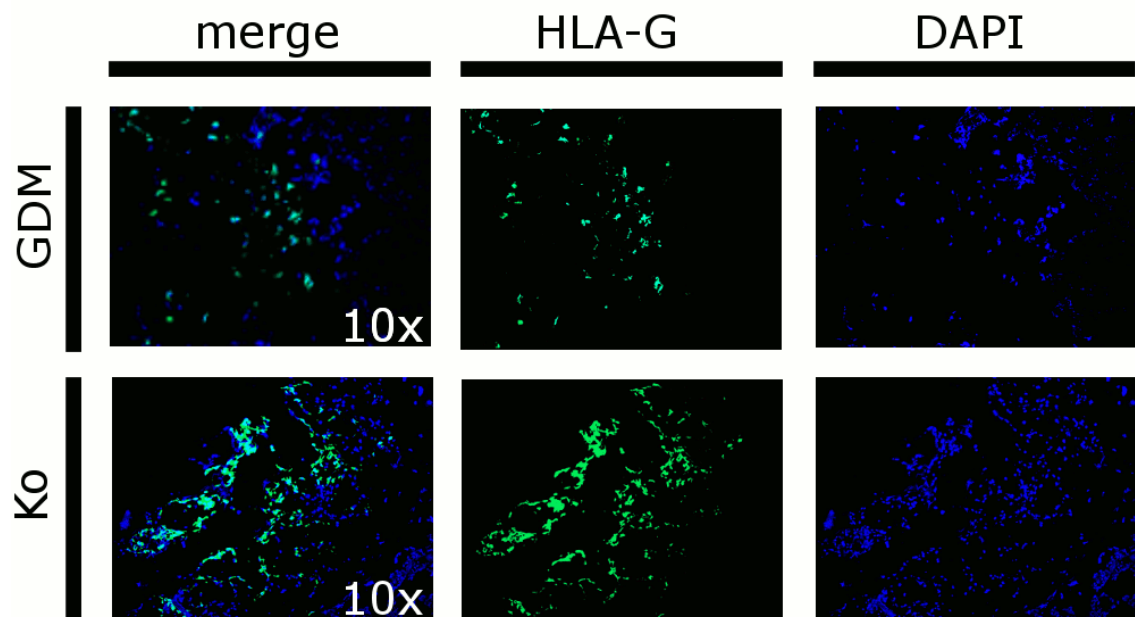
### 3.1.3 Doppelexpression von Vitamin D-Rezeptor und *Human leukocyte antigen-G*

HLA-G wurde als spezifischer Marker für den EVT verwendet. Ziel dieser Doppelimmunfluoreszenz war es, die Expression des VDR im EVT nachzuweisen. Deshalb wurden die Gefrierschnitte gleichzeitig mit HLA-G und VDR inkubiert. Da die Zellen sowohl grün für HLA-G als auch rot für den VDR markiert wurden, konnte gezeigt werden, dass es eine Kolo-kalisation von HLA-G und dem VDR gibt. Somit konnten die EVT als VDR exprimierende Zellen identifiziert werden. Außerdem fiel auf, dass die HLA-G-Expression der EVT bei GDM positiven Plazenten im Vergleich zu den Kontrollplazenten reduziert war.



**Abbildung 11: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung für VDR und HLA-G an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten.**

VDR wurde mit dem Cy-3-gebundenen Sekundärantikörper markiert und fluoresziert deshalb rot, HLA-G mit dem Cy-2-gebundenen und zeigt eine grüne Färbung.



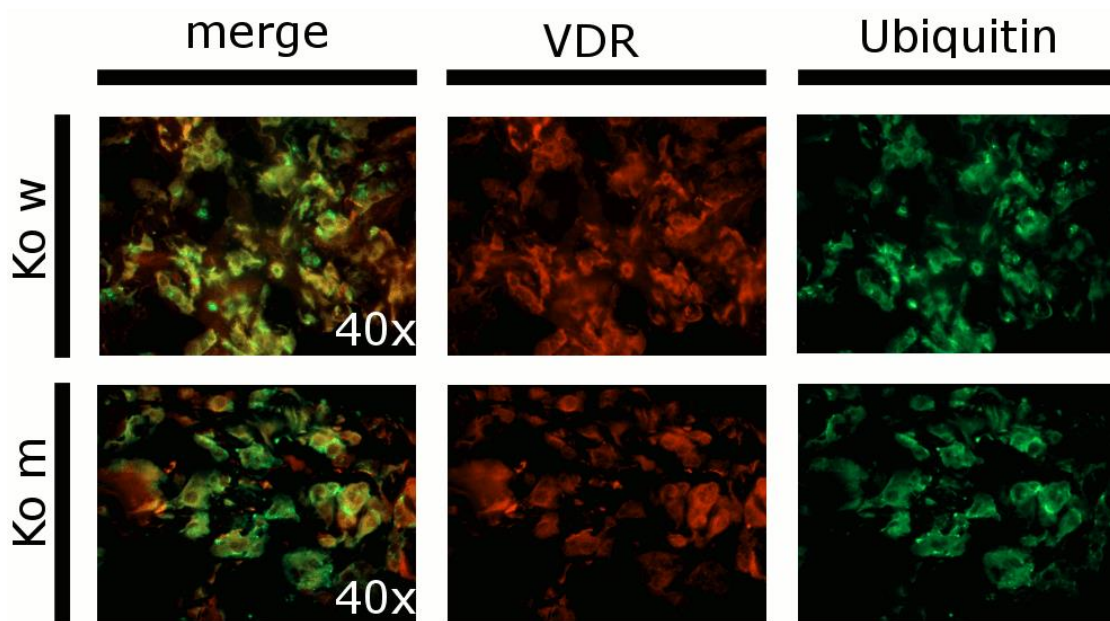
**Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Färbung für HLA-G an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten.**

HLA-G wurde mit dem Cy-2-gebundenen Sekundärantikörper markiert und fluoresziert deshalb grün.

### 3.1.4 Doppelexpression von Vitamin D-Rezeptor und Ubiquitin

Die Doppelfärbung des Vitamin-D-Rezeptors mit Ubiquitin wurde nur für die Kontrollgruppe durchgeführt. Dabei ergab sich bei den weiblichen Kontrollen eine 97%ige Kolo-kalisation zwischen dem VDR (rot) und Ubiquitin (grün), während dies bei den männlichen Kontrollen nur zu 81% der Fall war. Somit konnte gezeigt werden, dass

der VDR bei den weiblichen Kontrollen signifikant mehr im ubiquitinierten Zustand vorliegt als bei den männlichen ( $P = 0.014$ ).

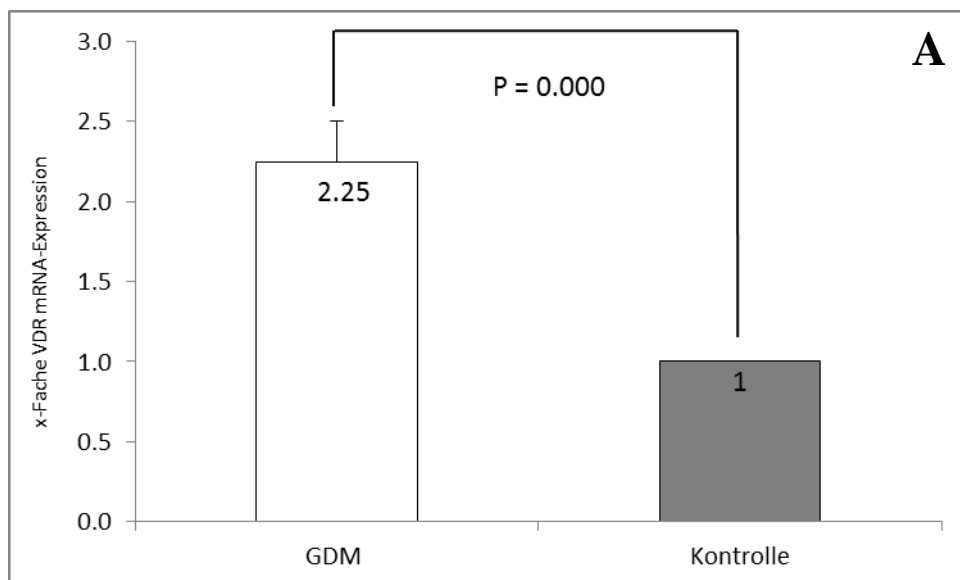


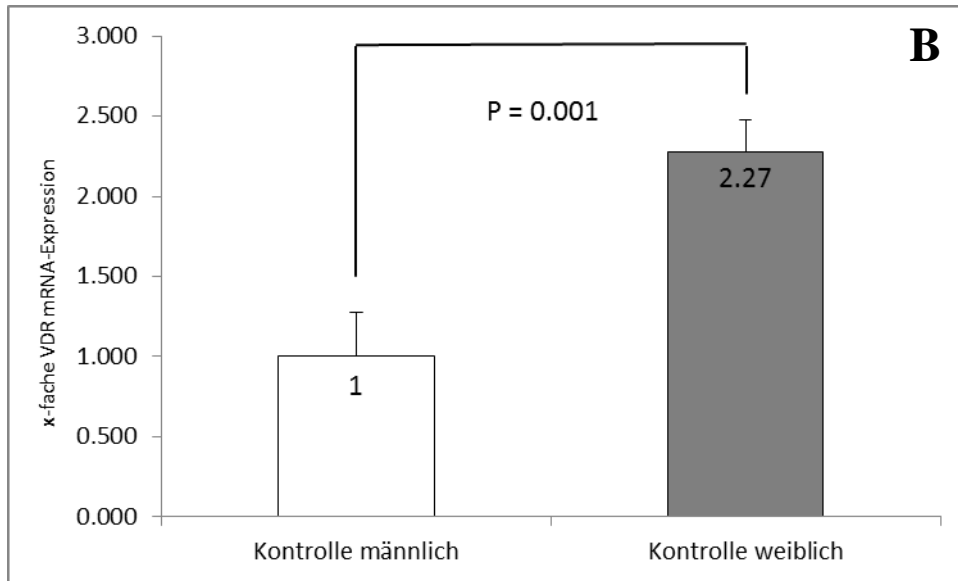
**Abbildung 13: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung für VDR und Ubiquitin an weiblichen und männlichen Kontrollplazenten.**

VDR wurde mit dem Cy-3-gebundenen Sekundärantikörper markiert und fluoresziert deshalb rot, Ubiquitin mit dem Cy-2-gebundenen und fluoresziert deshalb grün.

### 3.1.5 Quantitative *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion

Die Expression von VDR wurde auf mRNA-Ebene mittels einer qRT-PCR nachgewiesen. Hierbei bestätigten sich die Ergebnisse der Immunhistochemie. So war die mRNA-Expression von VDR in der Dezidua der GDM Patientinnen 2,25fach höher als bei den Kontrollen ( $P = 0,000$ ). Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied: So wiesen die weiblichen Feten eine 2,27fach höhere VDR mRNA-Expression auf als die männlichen ( $P = 0,001$ ).

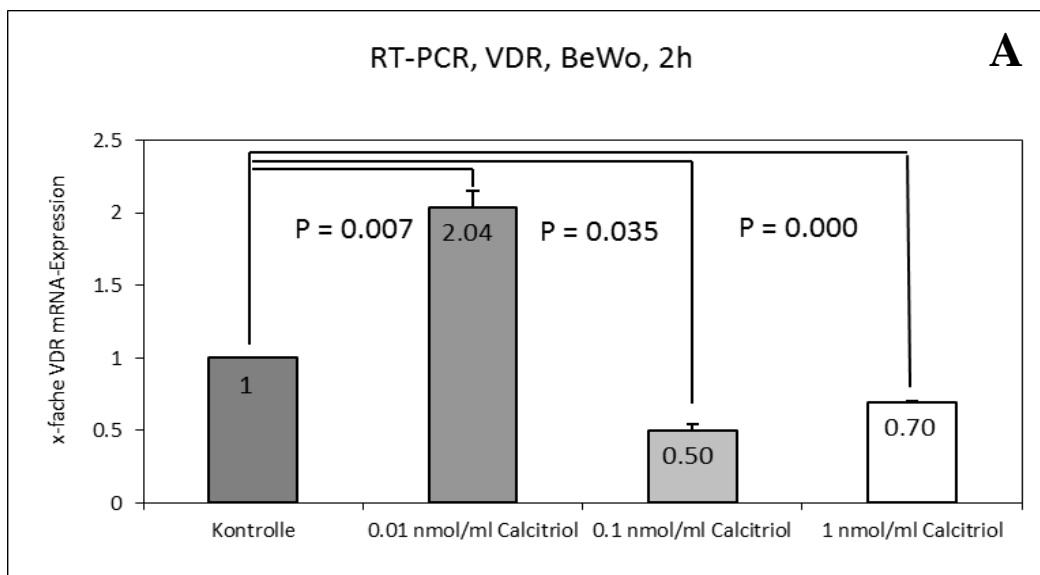




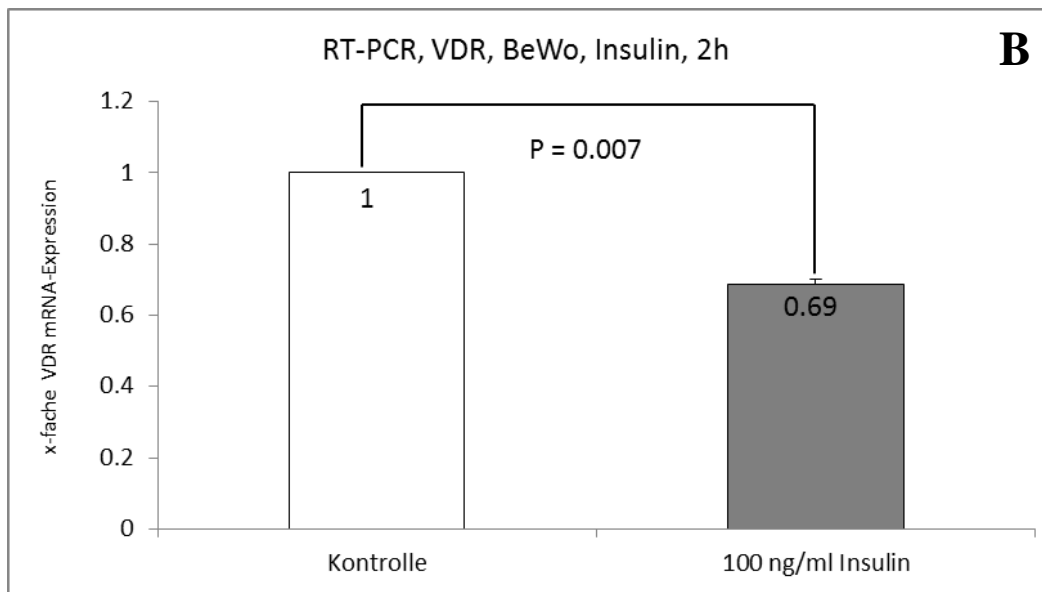
**Abbildung 14: qRT-PCR für VDR in der Dezidua von GDM positiven und Kontrollplazenten.** VDR mRNA-Expression in GDM positiven und Kontrollplazenten (A) sowie in männlichen und weiblichen Kontrollplazenten (B).

### 3.1.6 Vitamin D-Rezeptor-Expression in BeWos nach Stimulation

Mittels qRT-PCR wurden die Effekte der Stimulation mit 10 und 100 ng/ml humanem Insulin und mit 0,01, 0,1 und 1 nmol/ml Calcitriol auf die VDR mRNA-Expression in BeWos untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Stimulation der BeWos mit 100 ng/ml humanem Insulin für 2h die VDR mRNA-Expression signifikant ( $P = 0,007$ ) von 100% auf 64% reduzierte. Die Stimulation mit 10 ng/ml humanem Insulin zeigte hingegen keinen signifikanten Effekt. Durch die Stimulation mit 0,01 nmol/ml Calcitriol erhöhte sich die VDR mRNA-Expression signifikant von 100% auf 204% ( $P = 0,007$ ), wohingegen die Stimulation mit 0,1 nmol/ml die VDR mRNA-Expression signifikant von 100% auf 50% ( $P = 0,035$ ) senkte. Ebenso reduzierte die Stimulation mit 1 nmol/ml Calcitriol die VDR mRNA-Expression signifikant ( $P = 0,000$ ) von 100% auf 70%.







**Abbildung 15: qRT-PCR für VDR nach Stimulation von BeWos mit Calcitriol und Insulin.** VDR mRNA-Expression in BeWos nach 2ständiger Stimulation mit 0,01, 0,1 und 1 nmol/ml humanem Calcitriol (A) sowie mit 100 ng/ml humanem Insulin (B).

### 3.1.7 Immuncytochemische Färbung des Vitamin D Rezeptors

Die Stimulation der BeWos mit 0,01 nmol/ml Calcitriol führte zu einer signifikanten ( $P = 0,009$ ) Zunahme des Anteils an mittel und stark gefärbten Zellen von 0% auf 90%. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil dieser durch die Stimulation mit 0,1 nmol/ml Calcitriol von 100% auf 10% und mit 1 nmol/ml Calcitriol von 90% auf 40% signifikant ( $P = 0,008$ ;  $P = 0,009$ ) ab.

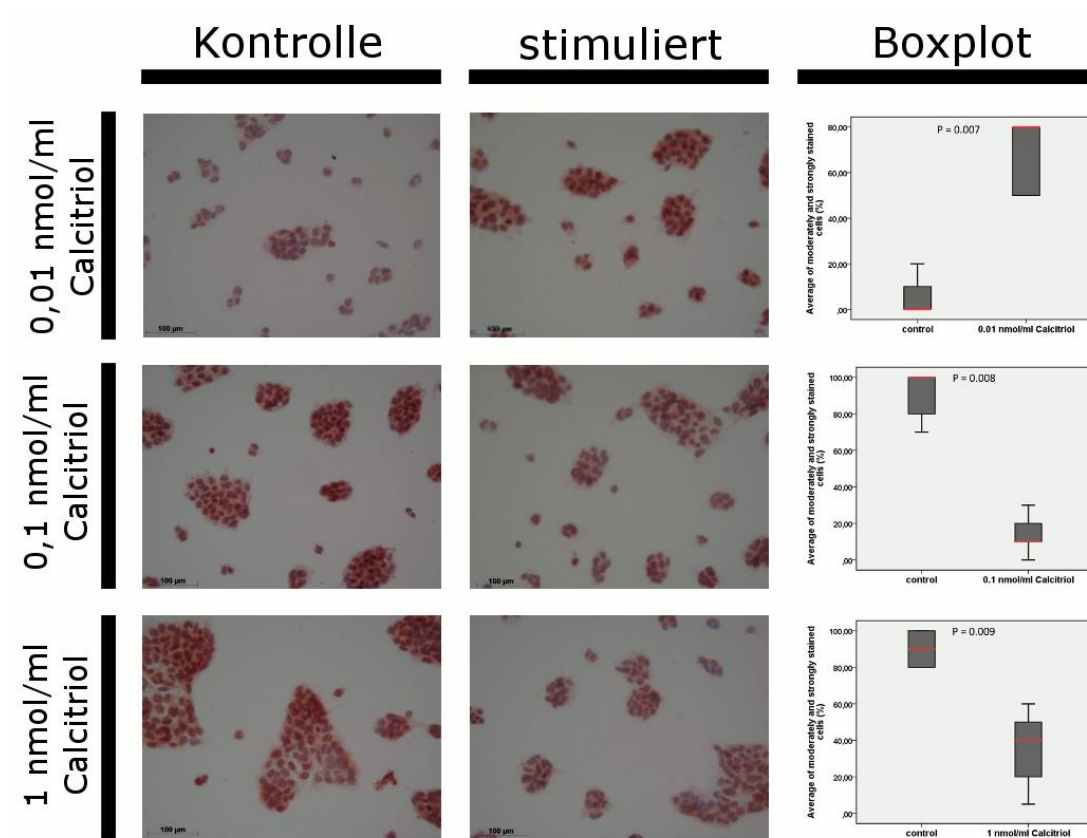


Abbildung 16: Immuncytochemische Färbung des VDR an BeWos nach Stimulation mit Calcitriol

### 3.2 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma

#### 3.2.1 Immunhistochemische Färbung

Bei GDM war die Expression von PPAR $\gamma$  im SCT (median IRS 2 vs. 4,  $P = 0,001$ ) und EVT (median IRS 6 vs. 12,  $P = 0,000$ ) im Vergleich zu den Normalkontrollen vermindert. Die beiden Geschlechter erreichten bei den Kontrollen ebenso wie bei den GDM positiven Plazenten ähnliche IRS-Werte.

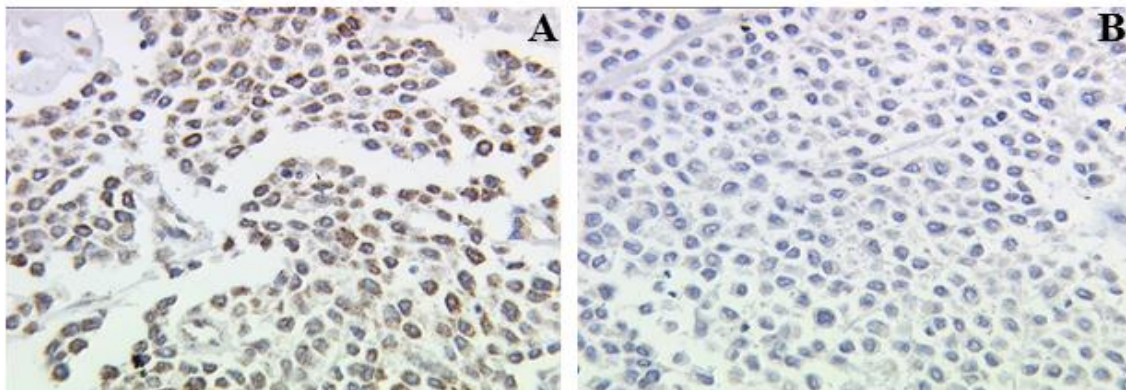
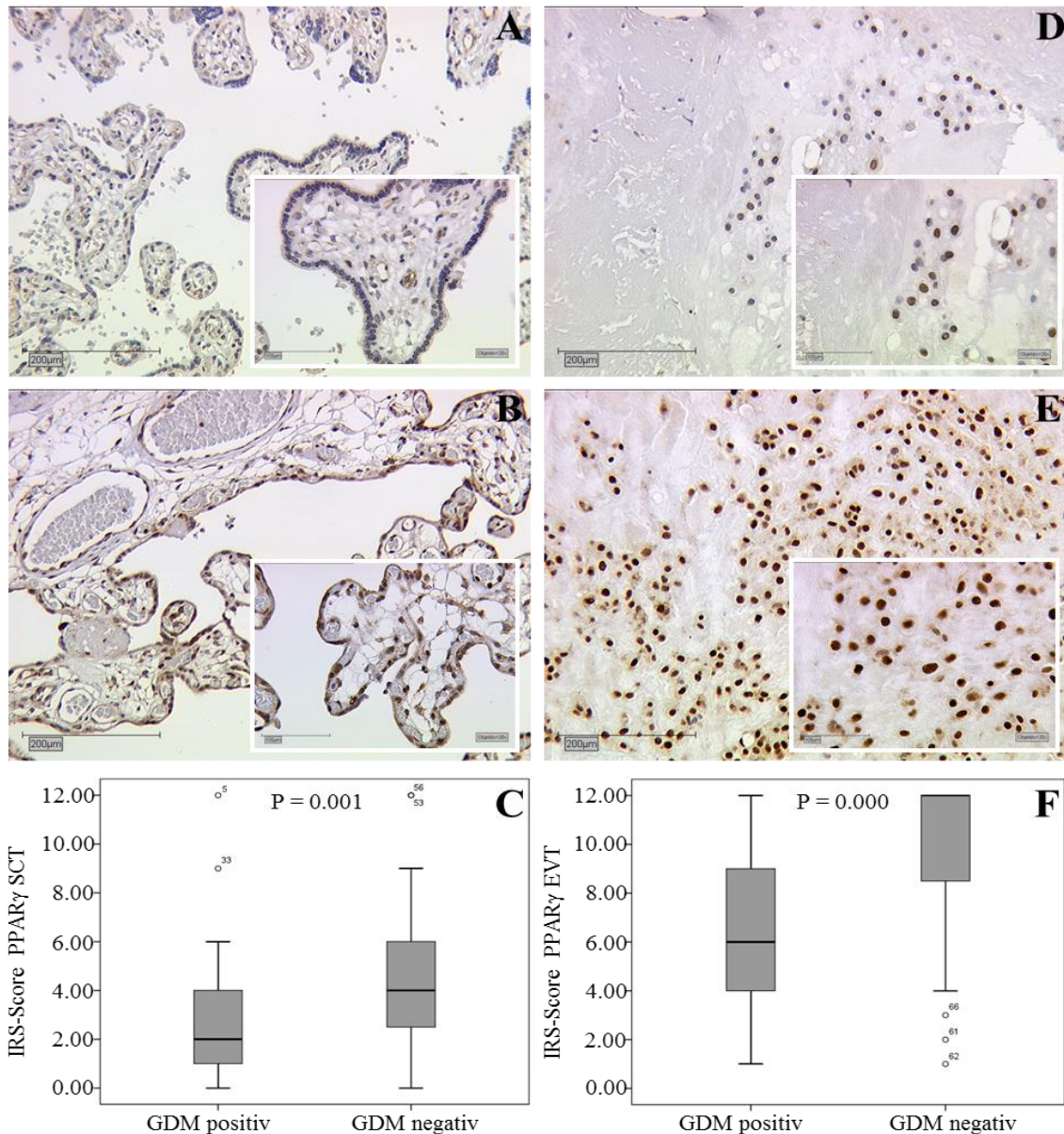


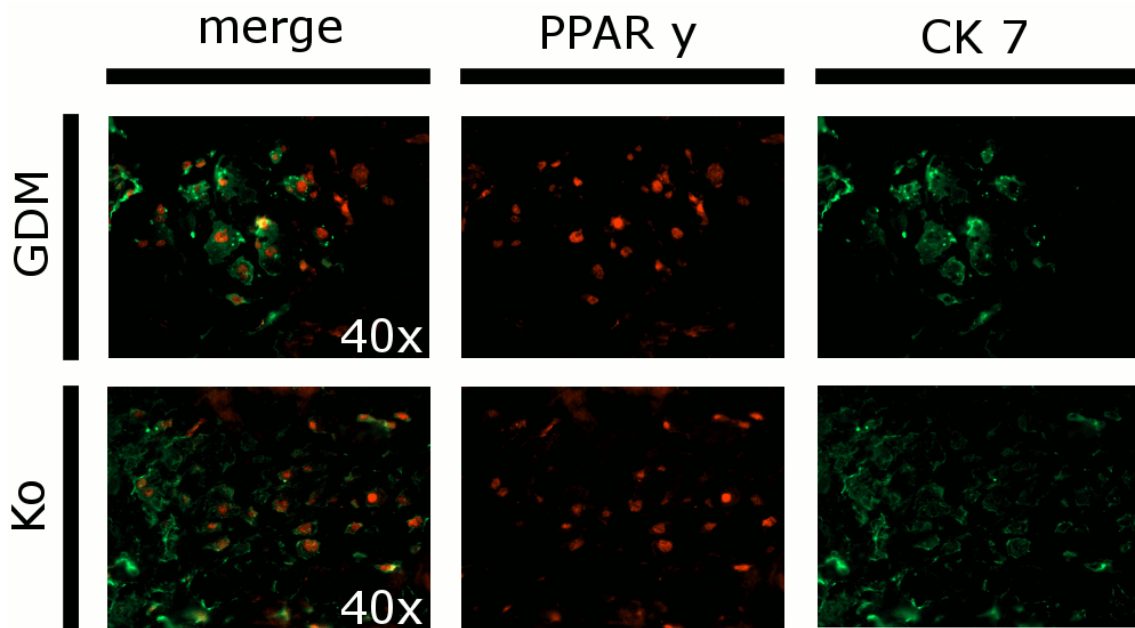
Abbildung 17: Positiv- und Negativkontrolle für PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$ -Positivkontrolle (A) und PPAR $\gamma$ -Negativkontrolle an Mamma-Carcinom.



**Abbildung 18: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von PPAR $\gamma$ .** PPAR $\gamma$ -Expression im SCT GDM positiver Plazenten (A) und im SCT von Kontrollplazenten (B) sowie im EVT GDM positiver Plazenten (D) und im EVT von Kontrollplazenten (E). PPAR $\gamma$ -Expression in GDM positiven und in Kontrollplazenten im SCT (C) und im EVT (F) in Form von Boxplots.

### 3.2.2 Doppelexpression von *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* und Cytokeratin-7

Cytokeratin-7 diente bei dieser Doppelfärbung als spezifischer Marker für Trophoblasten, da es nur in Trophoblast-Zellen und niemals in dezidualen Stromazellen gefunden wurde (Haigh et al. 1999). Nach simultaner Inkubation mit beiden Antikörpern, zeigten die EVT sowohl eine Expression von PPAR $\gamma$  (rot) als auch von CK7 (grün). Somit konnte eine Kolokalisation von PPAR $\gamma$  und CK-7 im EVT bewiesen werden.

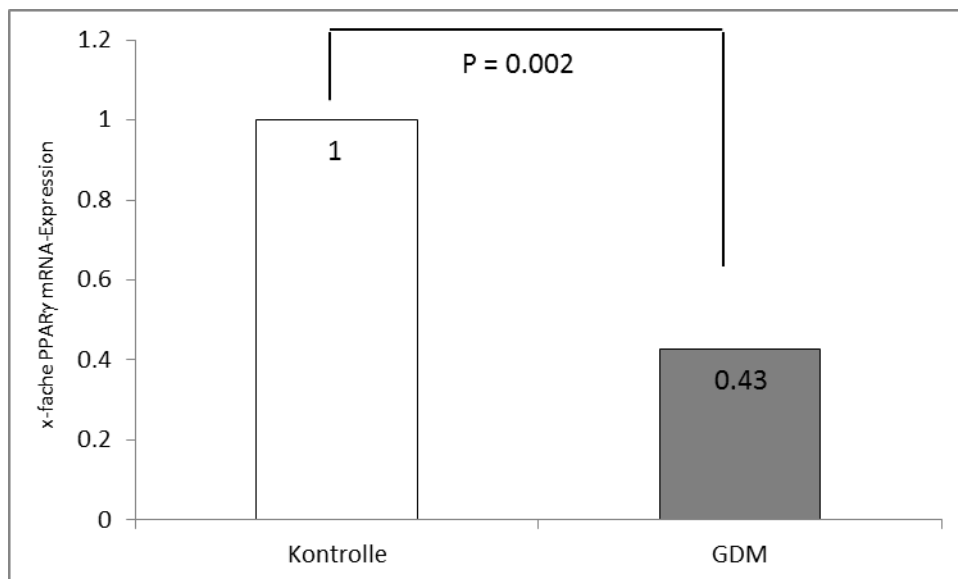


**Abbildung 19: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung für PPAR $\gamma$  und CK-7 an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten.**

PPAR $\gamma$  wurde mit dem Cy-3-gebundenen Sekundärantikörper markiert und fluoresziert deshalb rot, CK-7 mit dem Cy-2-gebundenen und fluoresziert deshalb grün.

### 3.2.3 Quantitative *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion

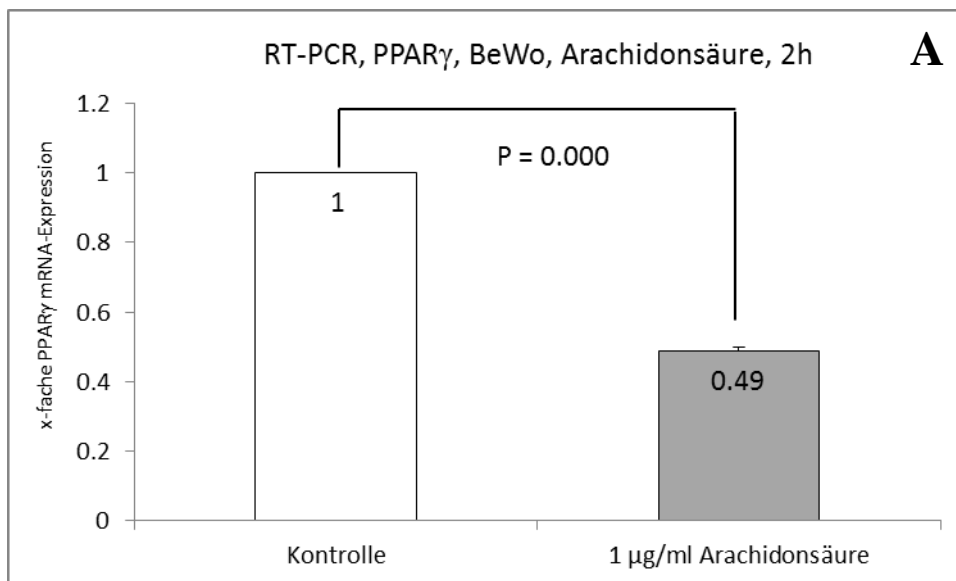
Die Expression von PPAR $\gamma$  auf mRNA-Ebene wurde mittels qRT-PCR untersucht. Dabei bestätigten sich die Ergebnisse der Immunhistochemie. Die PPAR $\gamma$  mRNA-Expression war bei den GDM positiven Frauen im Vergleich zu den Kontrollen von 100% auf 43% gesunken ( $P = 0,002$ ).

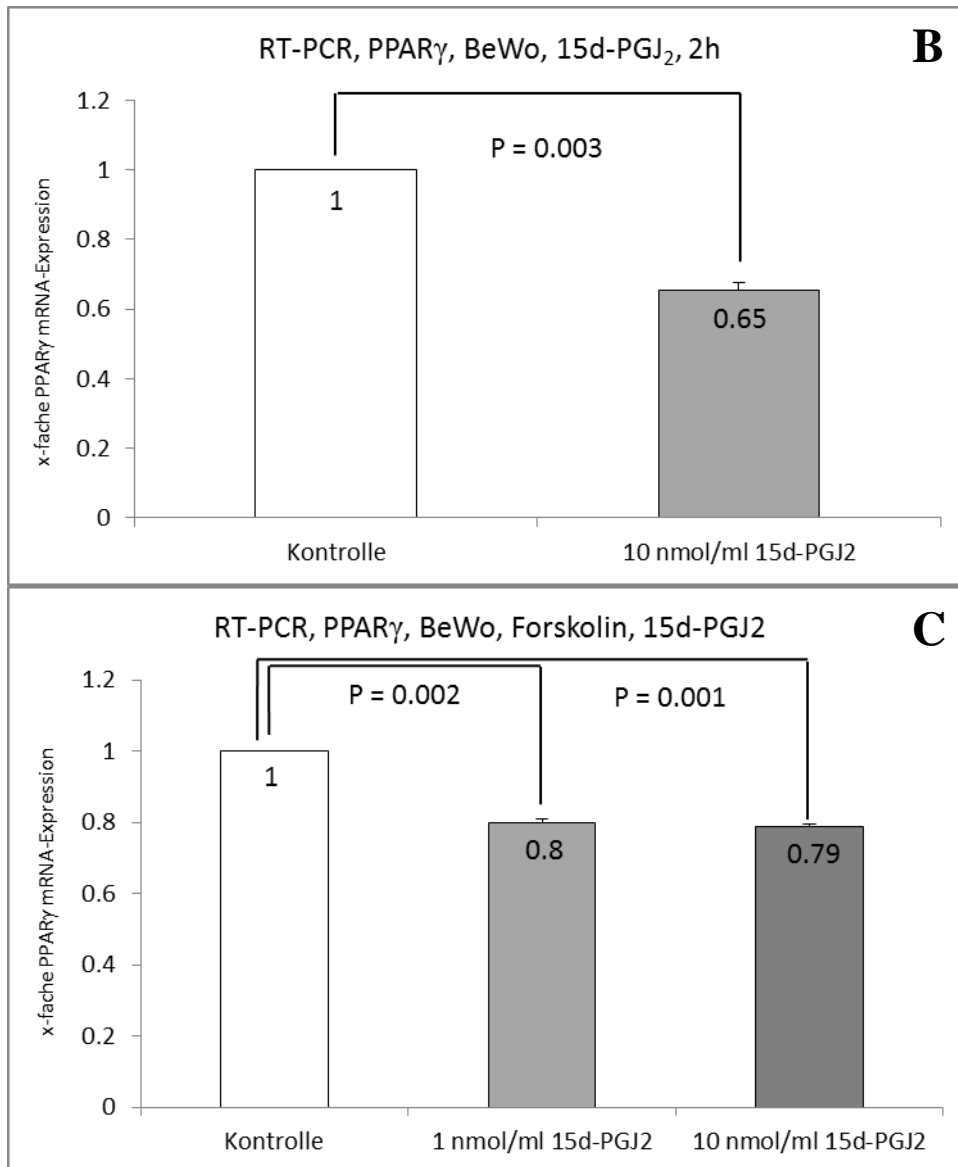


**Abbildung 20: qRT-PCR für PPAR $\gamma$  an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten.**  
PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in GDM positiven und Kontrollplazenten

### 3.2.4 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-Expression in BeWos nach Stimulation

Die PPAR $\gamma$ -Expression in BeWos nach Stimulation mit zwei seiner Liganden, der Arachidonsäure und dem 15d-PGJ<sub>2</sub>, wurde ebenfalls auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR analysiert. Diese ergab eine signifikant ( $P = 0,000$ ) von 100% auf 49% reduzierte PPAR $\gamma$  mRNA-Expression nach Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  (3,3 nmol/ml) Arachidonsäure für 2 Stunden. Außerdem bewirkte die Stimulation mit 10 nmol/ml 15d-PGJ<sub>2</sub> eine signifikante ( $P = 0,003$ ) Reduktion der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression von 100% auf 65%. Im Gegensatz dazu konnte für die Stimulation mit 1 nmol/ml 15d-PGJ<sub>2</sub> kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Durch die Stimulation von BeWos mit 10 nmol/ml 15d-PGJ<sub>2</sub>, nach Inkubation mit Forskolin, kam es ebenfalls zu einer signifikanten ( $P = 0.001$ ) Abnahme der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression von 100% auf 79%. Weiterhin führte die vorherige Inkubation mit Forskolin dazu, dass auch die Stimulation von BeWos mit nur 1 nmol/ml 15d-PGJ<sub>2</sub> eine signifikante ( $P = 0.002$ ) Reduktion der PPAR $\gamma$  mRNA-Expression von 100% auf 80% bewirkte.





**Abbildung 21: qRT-PCR für PPAR $\gamma$  nach Stimulation von BeWos mit Arachidonsäure und 15d-PGJ<sub>2</sub>.**

PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in BeWos nach 2stündiger Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml Arachidonsäure (A) sowie mit 10 nmol/ml 15d-PGJ<sub>2</sub> (B). PPAR $\gamma$  mRNA-Expression in BeWos nach Inkubation mit Forskolin und anschließender Stimulation mit 1 und 10 nmol/ml 15d-PGJ<sub>2</sub> (C).

### 3.3 Estrogen-Rezeptoren $\alpha$ und $\beta$

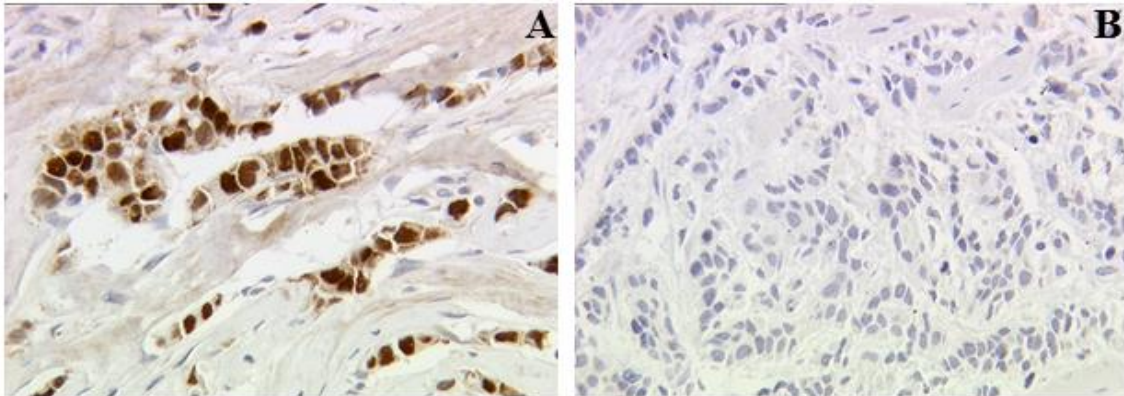
#### 3.3.1 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung ergab eine ER $\alpha$ -Expression im Zytoplasma der SCT und EVT. Bei GDM zeigte sich eine vermehrte ER $\alpha$ -Expression im EVT (median IRS 4 vs. 2, P= 0,011) und keine signifikante Veränderungen im SCT.

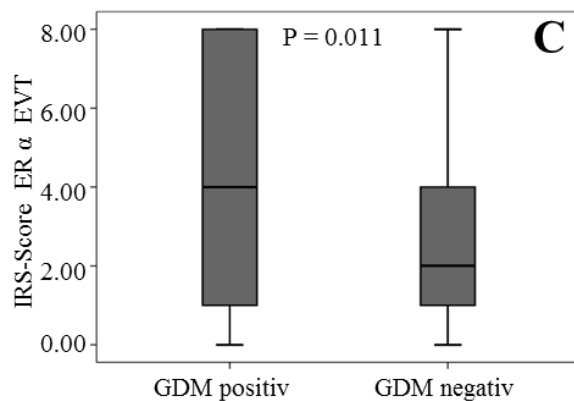
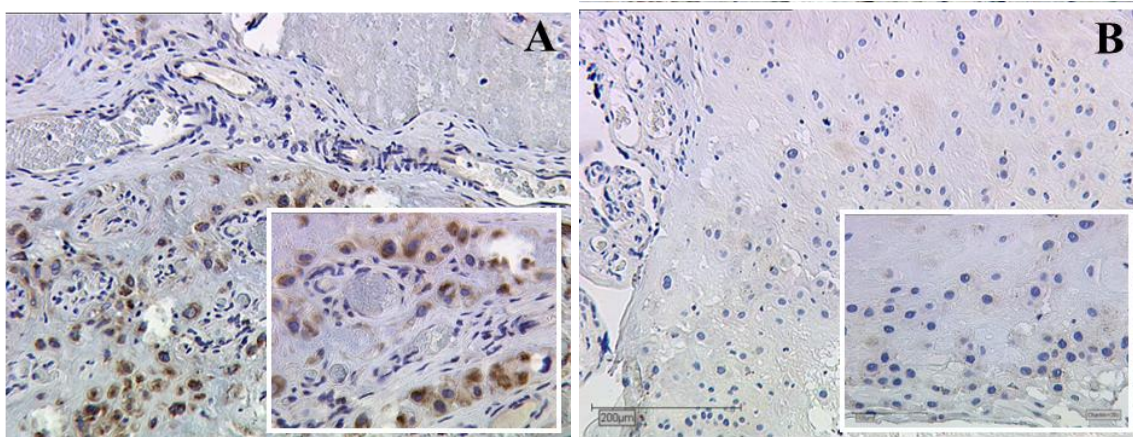
Für ER $\beta$  fanden wir eine positive Färbung in den Kernen von SCT und EVT. Hierbei zeigte sich eine reduzierte Expression des ER $\beta$  im SCT und EVT bei den GDM positiven Plazenten (SCT: median IRS 8 vs. 8, P = 0,000; EVT: median IRS 8 vs. 8, P = 0,000). Weiterhin exprimierten beide Zelltypen bei den männlichen Kontrollen mehr



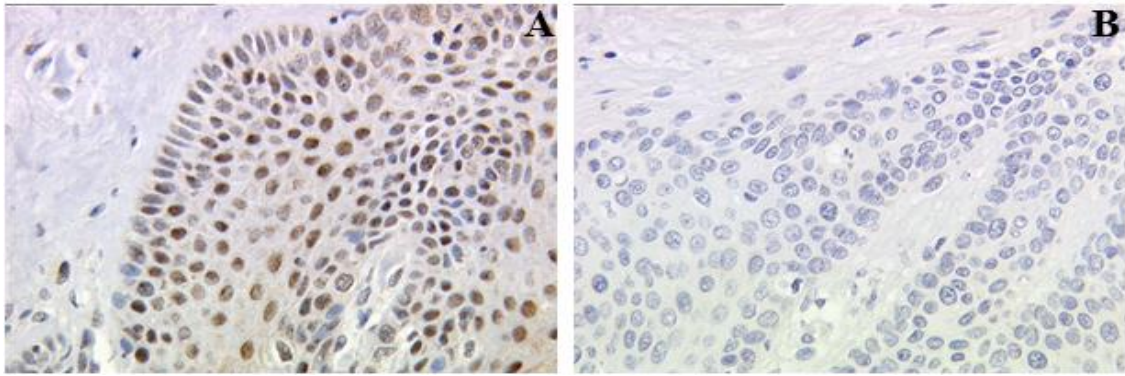
ER $\beta$  als bei den weiblichen (SCT: median IRS 12 vs. 8,  $P = 0,001$ ; EVT: median IRS 12 vs. 8,  $P = 0,002$ ). Innerhalb der GDM-Gruppe spielten geschlechtsspezifische Unterschiede keine Rolle.



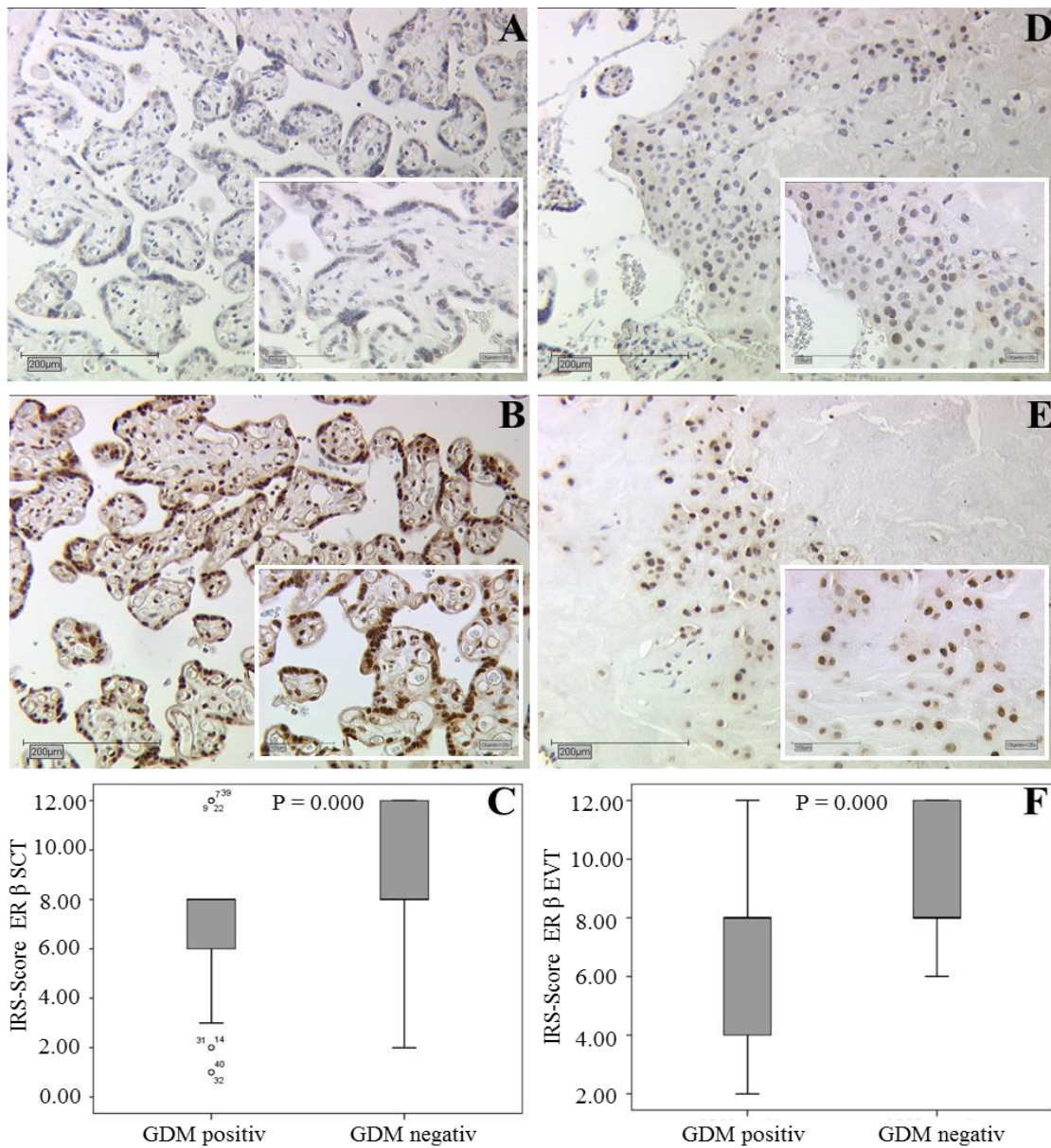
**Abbildung 22: Positiv- und Negativkontrolle für ER $\alpha$ .**  
ER $\alpha$ -Positivkontrolle (A) und ER $\alpha$ -Negativkontrolle (B) an Mamma-Carcinom.



**Abbildung 23: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von ER $\alpha$ .**  
ER $\alpha$ -Expression im EVT GDM positiver Plazenten (A) und im EVT von Kontrollplazenten (B). ER $\alpha$ -Expression in GDM positiven und in Kontrollplazenten im EVT (C) in Form eines Boxplots.

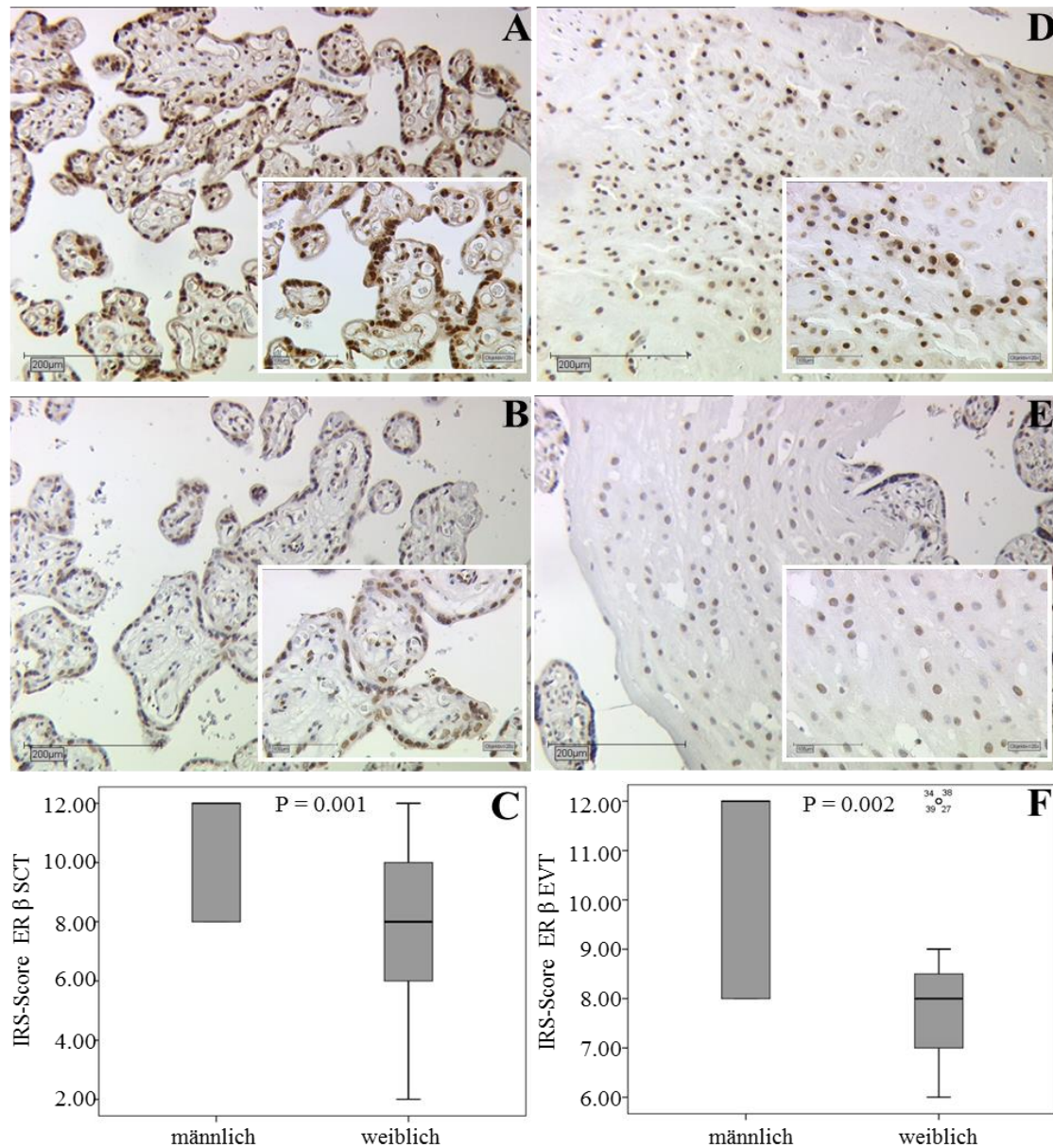


**Abbildung 24: Positiv- und Negativkontrolle für ERβ.**  
ERβ-Positivkontrolle (A) und ERβ-Negativkontrolle (B) an Mamma-Carcinom.



**Abbildung 25: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von ERβ.**  
ERβ-Expression im SCT GDM positiver Plazenten (A) und im SCT von Kontrollplazenten (B) sowie im EVT GDM positiver Plazenten (D) und im EVT von Kontrollplazenten (E). ERβ-Expression in GDM positiven und in Kontrollplazenten im SCT (C) und im EVT (F) in Form von Boxplots.





**Abbildung 26: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von ERβ.**

ERβ-Expression im SCT männlicher (A) und im SCT weiblicher Kontrollplazenten (B) sowie im EVT männlicher (D) und im EVT weiblicher Kontrollplazenten (E). ERβ-Expression in männlichen und weiblichen Kontrollplazenten im SCT (C) und im EVT (F) in Form von Boxplots.

### 3.3.2 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion für den Estrogen-Rezeptor $\alpha$

Mittels qRT-PCR konnten die immunhistochemisch festgestellten Expressions-Veränderungen auf RNA-Ebene verifiziert werden. Die ER $\alpha$  mRNA-Expression war im Plazentagewebe von Patientinnen mit GDM 1.77fach höher als im Plazentagewebe der normalen Kontrollen (P = 0,024).

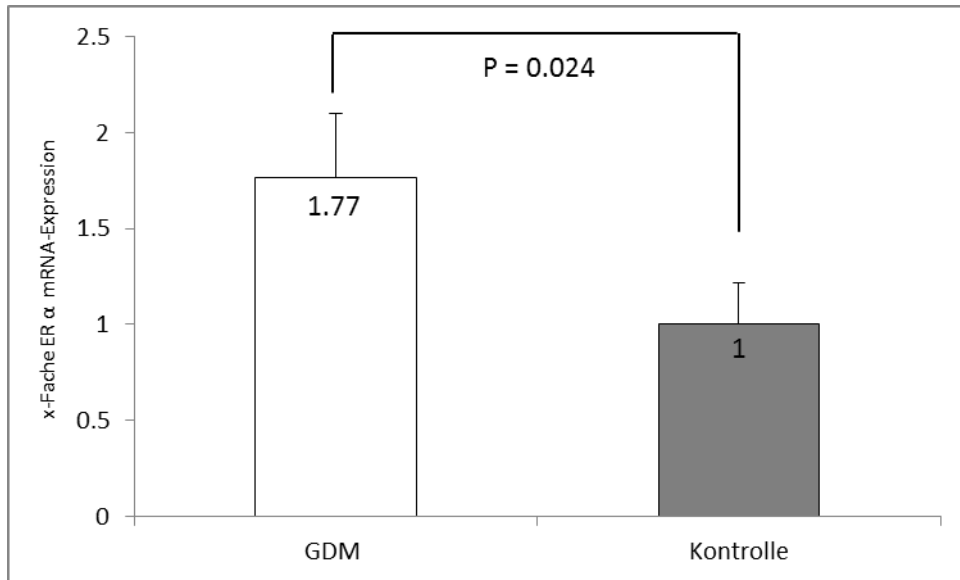


Abbildung 27: qRT-PCR für ERα an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten.

### 3.3.3 Methylierung des Estrogen-Rezeptor α-Promotors

Die Methylierungs-PCR zeigte eine Methylierung des ERα-Promotors bei allen getesteten Kontrollen, während alle GDM positiven Proben keine Methylierung des ERα-Promotors aufwiesen. Zwischen dem IRS der immunhistochemischen Färbung von ERα und dem Methylierungsstatus des ERα-Promotors ergab sich für den EVT ein statistisch signifikanter Zusammenhang (P = 0,011).

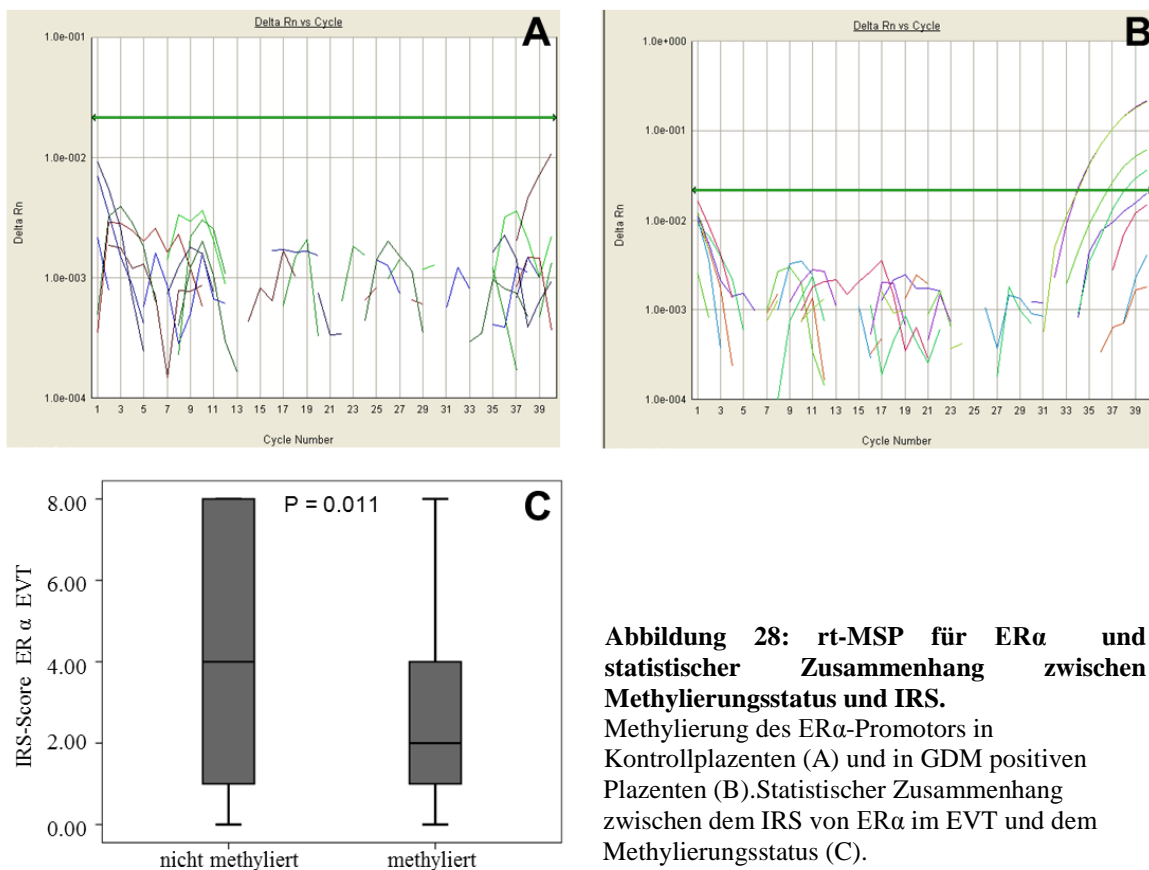
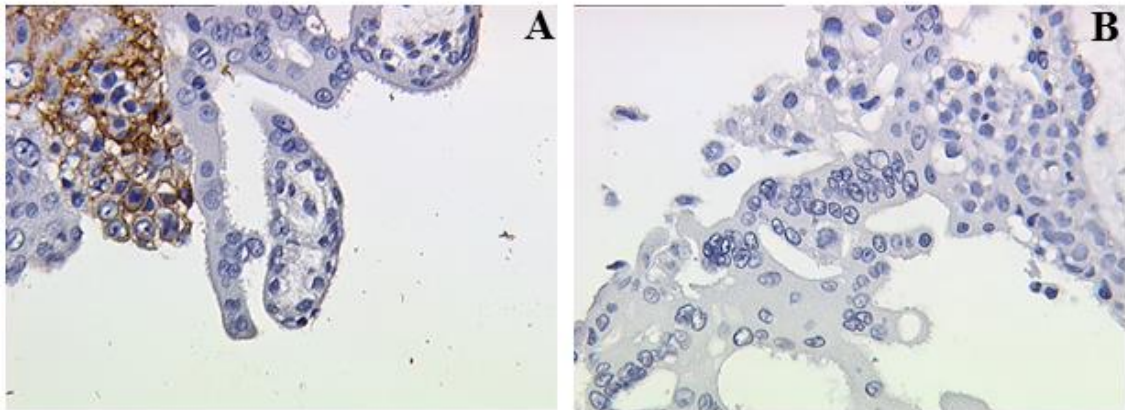


Abbildung 28: rt-MSP für ERα und statistischer Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus und IRS. Methylierung des ERα-Promotors in Kontrollplazenten (A) und in GDM positiven Plazenten (B). Statistischer Zusammenhang zwischen dem IRS von ERα im EVT und dem Methylierungsstatus (C).

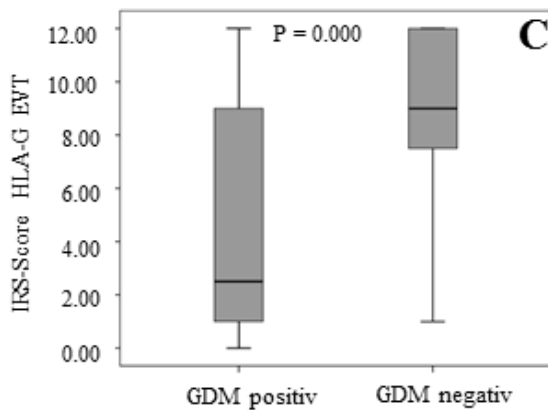
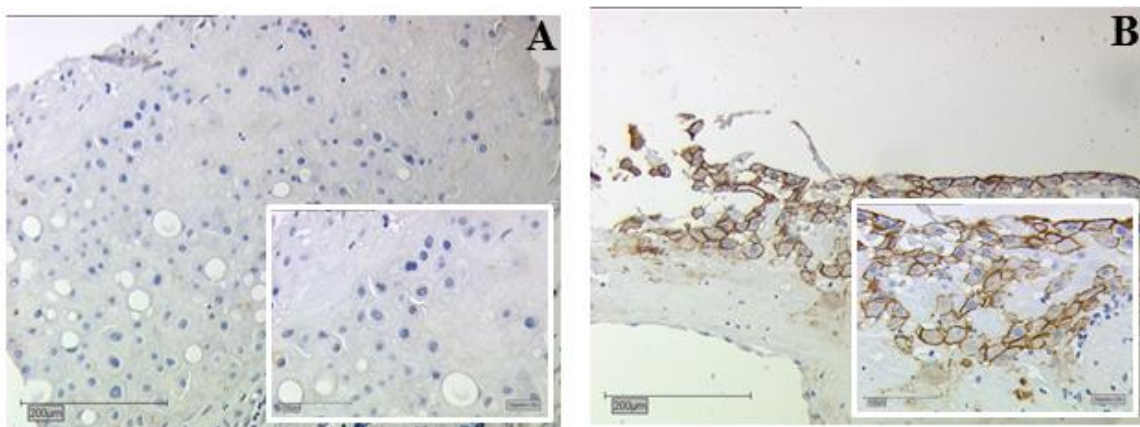
### 3.4 Human leukozyte antigen-G

#### 3.4.1 Immunhistochemische Färbung

HLA-G wurde in den Plazenten beider Gruppen in der Membran der EVT exprimiert. Die Expression von HLA-G war in den GDM positiven Plazenten verglichen mit den gesunden Kontrollen deutlich reduziert (median IRS 3 vs. 9,  $P = 0,000$ ). Weiterhin ergaben sich keine geschlechtsbezogenen Unterschiede.



**Abbildung 29: Positiv- und Negativkontrolle für HLA-G.**  
HLA-G-Positivkontrolle (A) und HLA-G-Negativkontrolle (B) an Gewebe von Ersttrimester-Plazenten

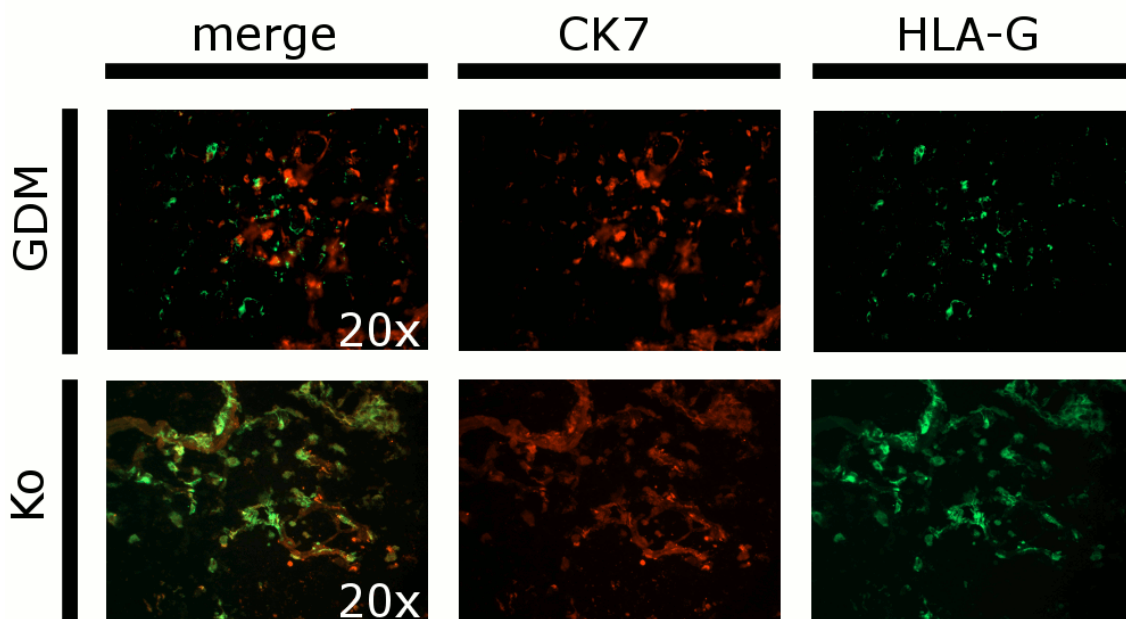


**Abbildung 30: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von HLA-G.**

HLA-G-Expression im EVT GDM positiver Plazenten (A) und im EVT von Kontrollplazenten (B). HLA-G-Expression in GDM positiven und in Kontrollplazenten im EVT (C) in Form eines Boxplots.

### 3.4.2 Doppelexpression von *Human leukozyte antigen-G* und Cytokeratin-7

Bei dieser Doppelfärbung diente HLA-G wiederum als spezifischer Marker für den EVT und CK-7 als Marker sowohl für den EVT als auch für den SCT. Mit dieser Färbung sollten die Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit VDR und HLA-G verifiziert werden, also die Tatsache, dass die HLA-G-Expression bei Gestationsdiabetes abnimmt. Die EVT zeigten eine deutliche CK-7-Expression (rot) als auch eine HLA-G-Expression (grün). Somit konnte eine Kolo-kalisation dieser beiden im EVT gezeigt werden. Zusätzlich bestätigte sich auch in dieser Färbung, dass die HLA-G-Expression bei Gestationsdiabetes vermindert ist.



**Abbildung 31: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung für CK-7 und HLA-G an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten.**

CK-7 wurde mit dem Cy-3-gebundenen Sekundärantikörper markiert und fluoresziert deshalb rot, HLA-G mit dem Cy-2-gebundenen und fluoresziert deshalb grün.

## 3.5 Klinische Parameter und Korrelationsanalyse

Beide Gruppen waren hinsichtlich der Schwangerschaftswoche und des Alters der Mutter gleich verteilt, wiesen aber Unterschiede bezüglich des BMI der Mutter ( $P = 0,000$ ) und des Geburtsgewichtes der Kinder ( $P = 0,019$ ) auf (Tabelle 1). Die Kinder GDM positiver Mütter wogen bei Geburt deutlich mehr als die Kinder der gesunden Kontrollen. Weiterhin wiesen die Frauen mit GDM vor der Schwangerschaft einen höheren BMI auf als die Frauen der Kontrollgruppe. Aufgrund der oben erwähnten statistisch signifikanten Unterschiede das Geburtsgewicht und den BMI betreffend, analysierten wir den statistischen Zusammenhang zwischen dem IRS und diesen

Störgrößen. Nach *matched-pair* Analysen und Anpassen der Störgrößen konnte ein Einfluss von BMI und Geburtsgewicht auf den IRS der jeweiligen Rezeptoren ausgeschlossen werden.



## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass bei GDM Expressionsveränderungen einiger wichtiger Rezeptoren in der Plazenta vorliegen, darunter nicht-steroidale Kernrezeptoren, wie VDR, PPAR $\gamma$  sowie ER $\alpha$  und  $\beta$ , aber auch HLA-G. Dabei ergab sich bei GDM eine signifikante Stimulation der VDR-Expression im SCT, EVT und Endothel. Weiterhin untersuchten wir die Regulation der Expression von VDR durch Stimulation mit seinen Liganden. So führte die Stimulation von BeWo-Zellen mit humanem Calcitriol in niedriger Konzentration zu einer Zunahme der VDR-Expression. Im Gegensatz dazu reduzierte die Stimulation mit höheren Konzentrationen von Calcitriol die VDR-Expression in BeWos. Die Stimulation mit humanem Insulin ergab ebenfalls eine verminderte VDR-Expression in diesen Zellen. Die PPAR $\gamma$ -Expression war bei GDM sowohl im SCT als auch im EVT vermindert. Mittels *in vitro*-Experimenten untersuchten wir an BeWos den Einfluss der Liganden auf die PPAR $\gamma$ -Expression. Nach Stimulation mit den PPAR $\gamma$ -Liganden Arachidonsäure und 15d-PGJ2 nahm die PPAR $\gamma$ -Expression in diesen Zellen ab. Eine Zunahme der Expression bei GDM zeigte sich bei ER $\alpha$ , aber lediglich im EVT. Zusätzlich fanden wir noch einen Unterschied im Methylierungsstatus des ER $\alpha$ -Promotors zwischen GDM und Kontrollen: Während alle Kontrollen eine Methylierung des ER $\alpha$ -Promotors aufwiesen, war dies bei GDM bei keiner Probe der Fall. Bei GDM lag im SCT und EVT eine verminderte ER $\beta$ -Expression vor. Außerdem fanden wir für den VDR und ER $\beta$  geschlechtsspezifische Unterschiede in der Kontrollgruppe: Auf Proteinebene exprimierten die Plazenten männlicher Feten mehr VDR bzw. ER $\beta$  als die der weiblichen. Somit zeigten die Plazenten der weiblichen Feten die stärksten Expressionsveränderungen zwischen Kontrolle und GDM. Für den VDR verhielt sich der geschlechtsspezifische Unterschied auf mRNA-Ebene genau entgegengesetzt zur Proteinebene. Im EVT GDM positiver Plazenten konnten wir zu guter Letzt noch eine verminderte Expression von HLA-G identifizieren.

### 4.2 Ist die Zelllinie BeWo geeignet für unsere Versuche?

Für unsere *in vitro*-Experimente verwendeten wir die Chorionkarzinom-Zelllinie BeWo. Diese besitzen sowohl Eigenschaften des SCT als auch des EVT (Grummer et al. 1994; Hirano et al. 1999; Orendi et al. 2010; Wadsack et al. 2003). BeWo-Zellen dienen

deshalb als beliebtes Modell, um sowohl die Fusion der Trophoblasten (Orendi et al. 2010) als auch Transport- und Aufnahmemechanismen in den Zellen der Plazenta zu analysieren (Wadsack et al. 2003). BeWos exprimieren aber auch CD9, welches charakteristisch für den EVT ist (Hirano et al. 1999). Teilweise griffen wir auf Forskolin zurück, um die Synzytienbildung zu beschleunigen und so ein Modell für den SCT zu erhalten. Zum Vergleich hatten wir mit den nicht-fusionierten BeWo-Zellen, die invasive Eigenschaften aufweisen, ein Modell für den EVT.

### **4.3 Der Vitamin D-Rezeptor an der maternalen-fetalen Grenzzone**

Wir fanden in unserer Studie im SCT, EVT und im Endothel GDM positiver Plazenten eine höhere VDR-Expression als in den Kontrollplazenten. Diese Expressionsveränderung war im SCT am stärksten ausgeprägt. Dieses Ergebnis widerspricht einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, die bei GDM keine signifikanten Unterschiede in der VDR-Expression in villösen Trophoblasten zeigte (Cho et al. 2013). Eine Erklärung für diesen vermeintlichen Widerspruch könnte sein, dass unser Kollektiv über eine größere Anzahl an GDM-Patientinnen verfügte (40 vs. 20). Darüber hinaus differenzierten wir in unserer Studie zwischen villösen und extravillösen Trophoblasten sowie Endothel, was wiederum in der anderen Studie nicht der Fall war. Durch die Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von VDR und HLA-G konnten wir den EVT eindeutig als VDR-exprimierende Zelle identifizieren. In diesem war in der Immunhistochemie der Unterschied in der VDR-Expression zwischen GDM und Kontrollen wesentlich stärker ausgeprägt als im SCT. Deshalb verwendeten wir für die weiteren Versuche (Westernblot und qRT-PCR) ausschließlich deziduales Gewebe und konnten dort die Ergebnisse der Immunhistochemie bestätigen. Die EVT wandern in den Uterus ein und bilden so die Grenzzone zwischen fetalem und mütterlichem Gewebe (Kumpel et al. 2012). Auf diese Weise verhindern sie die Abstoßung des Feten durch das mütterliche Immunsystem in Form von NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen (Kumpel et al. 2012). Einige Studien sprachen Vitamin D eine wichtige Rolle als Immunmodulator zu (Verstuyf et al. 2010). Als solcher fördert Calcitriol die Immunantwort in der mütterlichen Dezidua und dem fetalen Trophoblasten und steuert die Entzündungsreaktion in der Plazenta (Evans et al. 2006; Liu et al. 2009; Liu et al. 2011). Da GDM, ähnlich wie ein präexistenter Diabetes, ein pro-inflammatorischer Zustand zu sein scheint (Radaelli et al. 2003), könnte die Erhöhung der VDR-Expression bei GDM eine Art Kompensationsmechanismus sein.

Weiterhin kontrolliert VDR die Zellproliferation und –differenzierung (Shin et al. 2010). Diese wichtigen Funktionen scheinen bei GDM aufgrund der niedrigen Serumlevel von Calcitriol eingeschränkt zu sein.

#### **4.4 Vitamin D-Mangel als Ursache für die erhöhte Expression des Vitamin D-Rezeptors**

Vitamin D-Mangel stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Glukosetoleranzstörung dar (Rudnicki et al. 1997) und Frauen mit GDM weisen erniedrigte Vitamin D-Serumlevel auf (Lau et al. 2011; Soheilykhah et al. 2010). Deshalb nehmen wir an, dass die erhöhte VDR-Expression in Trophoblasten GDM positiver Plazenten aus den niedrigen Vitamin D-Spiegeln resultiert. Diese Hypothese konnten wir durch unsere Zellkulturexperimente sowohl auf Proteinebene in Form der immunocytochemischen Färbung als auch auf mRNA-Ebene in Form der qRT-PCR bestätigen. Die physiologische Serumkonzentration von Calcitriol liegt bei gesunden Schwangeren zwischen 0,0002 nmol/ml und 0,0026 nmol/ml (Bikle et al. 1984; Seely et al. 1997). Die Plazenta produziert zusätzlich Calcitriol (Zerwekh et al. 1986). Wir gingen deshalb davon aus, dass die Vitamin D-Konzentration im plazentaren Gewebe höher liegt als im Serum und stimulierten mit Konzentrationen am oberen Ende des Normalbereichs oder höher. Die Stimulation mit niedriger Konzentration führte zu einer Erhöhung der VDR-Expression, während die Stimulation mit höheren Konzentrationen eine Inhibition ergab.

#### **4.5 Der Vitamin D–Rezeptor im fetoplazentaren Endothel**

Weiterhin fanden wir die Erhöhung der VDR-Expression auch im fetoplazentaren Endothel. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei GDM auch im kindlichen Kreislauf ein Vitamin D-Mangel vorliegt. Bisher liegen aber für GDM noch keine Daten über die Serumlevel von Vitamin D im Nabelschnurblut vor, aber man weiß, dass die Vitamin D-Konzentration im kindlichen Nabelschnurblut mit der im mütterlichen Blut korreliert (Markestad et al. 1984). Zu diesem Zeitpunkt bleibt aber die Frage, ob der Fetus von diesen Veränderungen im Endothel auch betroffen ist, noch unbeantwortet. Eine Studie konnte zeigen, dass Calcitriol das Endothel vor Dysfunktion schützt (Dong et al. 2012). Bei GDM könnte es also, bedingt durch den Vitamin D-Mangel, zu einer Störung der Endothelfunktion, zu Hypertension sowie zu einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität kommen (Dong et al. 2012).



#### **4.6 Der Vitamin D-Rezeptor und die geschlechtsspezifischen Unterschiede**

Auf Proteinebene fanden wir eine höhere VDR-Expression in den Kontrollplazenten männlicher Feten als in den weiblichen. Der geschlechtsspezifische Unterschied auf mRNA-Ebene verhielt sich genau entgegengesetzt zu dem auf Proteinebene: Hier exprimierten die Plazenten weiblicher Feten signifikant mehr VDR als die der männlichen. Eine Erklärung für diesen vermeintlichen Widerspruch könnte die vermehrte Ubiquitinylierung des VDR in den Plazenten der weiblichen Feten sein. Für andere Kernrezeptoren ist bereits bekannt, dass die Ubiquitinylierung den Abbau des Rezeptors nach sich zieht (Wallace et al. 2001). Deshalb nehmen wir an, dass der VDR in den Plazenten weiblicher Feten aufgrund der, im Vergleich zu den männlichen, stärkeren Ubiquitinylierung vermehrt abgebaut wird und daher auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar ist. Die niedrigere VDR-Expression in den Plazenten weiblicher Feten verglichen mit den männlichen passt zu den Ergebnissen anderer Studien, die bei Kindern geschlechtsspezifische Unterschiede in der Anfälligkeit für Diabetes-bedingte Komplikationen beschreiben (Pettitt et al. 2008; Thone-Reineke et al. 2006; Yajnik et al. 2007). Schon bei der Geburt weisen Mädchen um 25% höhere Insulinspiegel im Nabelschnurblut auf als Jungen, was bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine verstärkte Insulinresistenz bedingt (Shields et al. 2007). Diese, gegenüber den Jungen erhöhte Insulinresistenz, bleibt auch während der Pubertät und dem Erwachsenenalter erhalten (Wilkin et al. 2004).

#### **4.7 *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* und die veränderte Zusammensetzung der Fettsäuren bei GDM**

Unsere Studie ergab eine reduzierte PPAR $\gamma$ -Expression im SCT und EVT der GDM positiven Plazenten im Vergleich zu den Kontrollplazenten. Die Ergebnisse für den SCT stimmen mit denen bisheriger Studien überein (Holdsworth-Carson et al. 2010; Jawerbaum et al. 2004). Außerdem ist bereits bekannt, dass PPAR $\gamma$  im EVT gesunder Plazenten exprimiert wird (Fournier et al. 2011). Wir konnten aber als erste die verminderte Expression von PPAR $\gamma$  im EVT GDM positiver Plazenten beschreiben.

Der Transport von Nährstoffen von der Mutter zum Feten ist für diesen überlebensnotwendig. Die Nährstoffe diffundieren entweder durch die Schicht der SCT oder werden aktiv transportiert: So finden sich im SCT z.B. Glukosetransporter (Baumann et al. 2002; Jansson et al. 1993) und Membrantransportproteine für

Fettsäuren (Gil-Sanchez et al. 2011; Hanebutt et al. 2008). Weiterhin haben andere Studien gezeigt, dass sich im Nabelschnurblut von GDM-Patientinnen erhöhte Werte für Glukose, Insulin und Fettsäuren finden (Ortega-Senovilla et al. 2011; Schaefer-Graf et al. 2011). Deshalb nehmen wir an, dass die veränderte Konzentration von Fettsäuren bei GDM die Expression von PPAR $\gamma$  im SCT beeinflusst. Die Konzentration von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), wie Arachidonsäure (AA) und Docosahexaensäure (DHA), ist bei GDM-Patientinnen (Chen et al. 2010) und deren Plazenten (Bitsanis et al. 2006) erhöht. PUFA sind Liganden von PPAR $\gamma$  und können so die Immunantwort beeinflussen (Maes et al. 2007). Da der EVT der Ort ist, an dem das mütterliche und das fetale Immunsystem interagieren, könnte das für diesen eine wichtige Rolle spielen.

#### **4.8 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma und seine Liganden**

Mithilfe unserer *in vitro*-Experimente konnten wir zeigen, dass steigende Konzentrationen der PPAR $\gamma$ -Agonisten eine Inhibition von PPAR $\gamma$  bewirken. Die Stimulation mit Arachidonsäure und 15d-PGJ2 führte zu einer Abnahme der Expression von PPAR $\gamma$  in BeWos. Es ist bereits bekannt, dass die Arachidonsäure-Spiegel bei GDM-Patientinnen erhöht sind (Bitsanis et al. 2006; Min et al. 2006). Deshalb stimmt die reduzierte PPAR $\gamma$ -Expression nach Stimulation mit Arachidonsäure mit unseren Ergebnissen in der Immunhistochemie, welche eine Inhibierung von PPAR $\gamma$  im SCT und EVT GDM positiver Plazenten zeigten, überein. In Trophoblasten dient Arachidonsäure als Vorstufe für die Synthese von 15d-PGJ2 (Forman et al. 1995). Trotzdem beschreiben andere Studien keine erhöhten Level von 15d-PGJ2 im Serum und der Plazenta von GDM-Patientinnen, sondern sogar erniedrigte (Capobianco et al. 2005; Jawerbaum et al. 2004). Die Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch und die Tatsache, dass trotz niedrigerer Konzentrationen von 15d-PGJ2 bei GDM eine verminderte Expression von PPAR $\gamma$  vorliegt, könnte ein veränderter Metabolismus der Arachidonsäure bei Diabetes sein (Knabl et al. 2013). Dieser bei Diabetes veränderte Stoffwechsel der Arachidonsäure könnte z.B. zu einer vermehrten Bindung der Arachidonsäure selbst an PPAR $\gamma$  führen, was wiederum zur Fehlfunktion der diabetischen Plazenta beitragen könnte (Jawerbaum et al. 2004; Kuhn et al. 1990; White et al. 2002). Zusammenfassend kann man also festhalten, dass bei GDM sowohl im Plasma und Nabelschnurblut als auch in der Plazenta erhöhte Spiegel von

Arachidonsäure und anderen Fettsäuren vorliegen (Bomba-Opon et al. 2006; Chen et al. 2010; Ortega-Senovilla et al. 2011; Schaefer-Graf et al. 2011). Fettsäuren, insbesondere die mehrfach ungesättigten, sind ebenfalls Liganden von PPAR $\gamma$  (AlSaleh et al. 2012). Deshalb nehmen wir an, dass die reduzierte Expression von PPAR $\gamma$  in GDM positiven Plazenten aus den höheren Konzentrationen von Fettsäuren und anderen PPAR $\gamma$ -Agonisten resultiert. Diese Inhibierung von PPAR $\gamma$  könnte eine wichtige Rolle für die Regulation des Immunsystems und speziell für die pro-inflammatorischen Veränderungen in der Plazenta bei Diabetes spielen (Knabl et al. 2013).

#### **4.9 Der Estrogen-Rezeptor $\alpha$ an der maternalen-fetalen Grenzzone**

Wir konnten zeigen, dass die ER $\alpha$ -Expression im EVT GDM positiver Plazenten im Vergleich zu gesunden Kontrollplazenten erhöht ist, während sich für den SCT keine signifikanten Unterschiede ergaben. Dies konnten wir mittels Immunhistochemie sowohl auf Proteinebene als auch mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene bestätigen. Dieses Ergebnis passt zu einer früheren Studie, die ebenfalls eine vermehrte ER $\alpha$ -Expression in der Dezidua GDM positiver Plazenten fand (Alonso et al. 2006). Eine weitere Arbeitsgruppe beschreibt keine signifikanten Unterschiede in der ER $\alpha$ -Expression zwischen GDM und Kontrollen (Kleiblova et al. 2010). Allerdings untersuchten diese die ER $\alpha$ -Expression nur mittels qRT-PCR und nicht mittels Immunhistochemie und ihr Kollektiv bestand darüber hinaus nur aus 10 GDM- und 13 Kontrollplazenten.

Der EVT bildet einen Teil der Grenzzone zwischen mütterlichem und kindlichem Gewebe und ist so der entscheidende Ort für die Immunmodulation der Plazenta (Kumpel et al. 2012). An dieser ist ER $\alpha$  ähnlich wie der VDR beteiligt (Straub 2007). Deshalb könnte die Hochregulation von ER $\alpha$  bei GDM, einem pro-inflammatorischen Zustand (Radaelli et al. 2003), analog zum VDR eine Art Gegenregulation der Plazenta sein. Weiterhin nimmt man an, dass eine Aktivierung von ER $\alpha$  vor Insulinresistenz schützt (Naaz et al. 2002). So konnte an Mäusen bereits gezeigt werden, dass ein *knock-out* von ER $\alpha$  zu Insulinresistenz und Glukoseintoleranz führt (Heine et al. 2000). Die vermehrte Expression von ER $\alpha$  in den GDM-Plazenten könnte also ein Versuch sein, der Insulinresistenz entgegenzuwirken.

#### **4.10 Methylierung des Estrogen-Rezeptor $\alpha$ -Promotors**

Mit Hilfe der rt-MSP konnten wir den Methylierungsstatus des ER $\alpha$ -Promotors untersuchen. Dabei wiesen die Kontrollplazenten eine Methylierung des ER $\alpha$ -Promotors auf, während dies bei GDM nicht der Fall war. Die Methylierung von CpG-Inseln ist oft Bestandteil epigenetischer Analysen und so ist es bekannt, dass eine vermehrte Methylierung der Promotorregion zu einer verminderten Transkription des Zielgens führt (Bouchard et al. 2012; Jones et al. 1999). Da die Plazenta eine wichtige Rolle für den Nährstoff-Austausch und das fetale Wachstum spielt, könnten epigenetische Veränderungen in der Plazenta entscheidend sein für die metabolische Programmierung des Feten sein (Maccani et al. 2009). So wurde bereits ein Zusammenhang zwischen dem Muster der DNA-Methylierung der Plazenta und dem fetalen Wachstum (Banister et al. 2011; Filiberto et al. 2011) sowie GDM (Ruchat et al. 2013) hergestellt. Weiterhin haben frühere Studien gezeigt, dass der Grad der Methylierung bestimmter Promotorregionen in unterschiedlichen Geweben direkt von der Glukosekonzentration abhängt (Plagemann et al. 2009; Plagemann et al. 2010). Höhere Blutglukosespiegel führten einerseits zu einer Zunahme der Methylierung des IR-Promotors (Plagemann et al. 2010), andererseits aber zu einer Abnahme der Methylierung der Adiponektin- und Leptin-Gene (Bouchard et al. 2012; Bouchard et al. 2010). Unsere Studie ergab eine verminderte Methylierung des ER $\alpha$ -Promotors bei den GDM-Plazenten. Dies steht in Einklang mit der, in der Immunhistochemie und qRT-PCR gefundenen, vermehrten Expression von ER $\alpha$  bei GDM. Die reduzierte Methylierung des ER $\alpha$ -Promotors könnte also eine Folge des erhöhten Blutzuckerspiegels bei GDM sein. Außerdem könnte die Demethylierung über die daraus resultierende Steigerung der ER $\alpha$ -Expression Teil der Kompensationsmechanismen sein, mit denen die Plazenta einer fortschreitenden Insulinresistenz entgegenzuwirken versucht.

#### **4.11 Der Estrogen-Rezeptor $\beta$ und die Plazenta**

Wir fanden außerdem eine reduzierte Expression von ER $\beta$  im SCT und EVT von GDM positiven Plazenten. Im Gegensatz zu ER $\alpha$  scheint die Aktivierung von ER $\beta$  eher zu Insulinresistenz zu führen als davor zu schützen (Naaz et al. 2002). Deshalb könnte die verminderte Expression von ER $\beta$  in Plazenten von GDM-Patientinnen wiederum eine kompensatorische Gegenregulation sein, um ein Fortschreiten der Insulinresistenz zu verhindern.

#### **4.12 Der Estrogen-Rezeptor $\beta$ und die geschlechtsspezifischen Unterschiede**

Für den ER $\beta$  zeigte sich in der Immunhistochemie, analog zum VDR, ebenfalls ein geschlechtsspezifischer Unterschied. Die Plazenten männlicher Feten exprimierten mehr ER $\beta$  als die der weiblichen. Somit war bei den Plazenten der weiblichen Feten der Unterschied in der ER $\beta$ -Expression zwischen Kontrollen und GDM ebenfalls am stärksten ausgeprägt. Dies passt wiederum zu der bei Mädchen erhöhten Insulinresistenz (Shields et al. 2007; Wilkin et al. 2004) und deren stärkeren Anfälligkeit für Diabetes und seine Komplikationen (Pettitt et al. 2008; Thone-Reineke et al. 2006; Yajnik et al. 2007).

#### **4.13 HLA-G an der maternalen-fetalen Grenzzone**

Die Expression von HLA-G war im EVT der GDM-Plazenten im Vergleich zu den Kontrollplazenten reduziert. HLA-G wird an der maternalen-fetalen Grenzzone eine wichtige Funktion bei der Immunmodulation zugesprochen (Kuroki et al. 2007). So scheint HLA-G beispielsweise durch die Unterdrückung der Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Schwangerschaftskomplikationen, wie Präeklampsie oder rezidivierenden Aborten, zu spielen (Kuroki et al. 2007). Darüber hinaus ist HLA-G an der Toleranzentwicklung des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem semiallogenen Fetus beteiligt (Kuroki et al. 2007; Oztekin 2007). Die verminderte Expression von HLA-G in GDM-Plazenten könnte ein begünstigender Faktor für die Entstehung des pro-inflammatorischen Zustands bei GDM sein.

## 5. Zusammenfassung

Gestationsdiabetes mellitus (GDM) ist eine erstmalig in der Schwangerschaft aufgetretene oder diagnostizierte Glukosetoleranzstörung, die 3-8% aller Schwangerschaften betrifft (Metzger et al. 1998). Pathophysiologisch besteht eine große Ähnlichkeit zwischen GDM und Diabetes mellitus Typ 2, die genauen Mechanismen sind aber noch nicht bekannt (Metzger et al. 2007). Die Diagnose eines GDM bringt für Mutter und Kind verschiedene akute und langfristige Komplikationen mit sich. Veränderungen in der Plazenta mit ihren wichtigen metabolischen, endokrinen und immunologischen Funktionen während der Schwangerschaft (Gätje et al. 2011; Gude et al. 2004), könnten dabei eine wichtige Rolle spielen. Ziel dieser Studie war es daher, Expressionsveränderungen verschiedener wichtiger Rezeptoren, darunter nicht-steroidale Kernrezeptoren, wie Vitamin D-Rezeptor (VDR), *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (PPAR $\gamma$ ) sowie Estrogen-Rezeptor  $\alpha$  und  $\beta$  (ER $\alpha$  und  $\beta$ ), und *Human leukocyte antigen-G* (HLA-G), in der Plazenta bei GDM zu untersuchen, um dadurch die pathophysiologischen Vorgänge in der Plazenta bei GDM besser verstehen zu können.

Für diese Studie wurden die Plazenten von 40 Patientinnen mit GDM und von 40 gesunden Frauen verwendet. Beide Gruppen enthielten jeweils 20 Plazenten von männlichen Feten und 20 von weiblichen. Zunächst wurde die Expression der einzelnen Rezeptoren mittels immunhistochemischen Färbungen untersucht. Signifikante Unterschiede in der Expression einzelner Rezeptoren wurden mit Hilfe weiterer Methoden, wie Doppelimmunfluoreszenz, qRT-PCR, Zellkultur oder rt-MSP bestätigt.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass bei GDM eine gesteigerte Expression von VDR vorliegt. Im Gegensatz zum VDR fanden wir eine Inhibition der PPAR $\gamma$ -Expression bei GDM. Mit Hilfe unserer *in vitro*-Versuche konnten wir zusätzlich die konzentrationsabhängige Regulation der Expression von VDR und PPAR $\gamma$  durch ihre Liganden belegen. Bei GDM lag weiterhin eine erhöhte Expression von ER $\alpha$  vor. Zudem konnten wir zeigen, dass der ER $\alpha$ -Promotor in GDM-Plazenten demethyliert vorliegt. GDM positive Plazenten wiesen zudem eine verminderte Expression von ER $\beta$  und HLA-G auf. Abschließend konnten wir für den VDR und ER $\beta$  geschlechtsspezifische Unterschiede in der Kontrollgruppe identifizieren: Die Plazenten männlicher Feten exprimierten mehr VDR bzw. ER $\beta$  als die der weiblichen.

Die besonders ausgeprägten Expressionsveränderungen im EVT an der maternalen-fetalen Grenzzone könnten dafür sprechen, dass diese Teil der Regulation der

Immunantwort und der Insulinresistenz in GDM-Plazenten sind. Weiterhin scheinen die Expressionsveränderungen einiger Rezeptoren eine Folge der bei GDM veränderten Konzentrationen bzw. Zusammensetzung der Liganden zu sein. Unsere Studie liefert wichtige Vorkenntnisse, um mit Hilfe klinischer Studien die allgemeinen Empfehlungen zur Nahrungszusammensetzung und Supplementation in der Schwangerschaft zu klären.

## 6. Literaturverzeichnis

1. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;78:69-77.
2. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: second report. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1980;646:1-80.
3. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4:80-90.
4. Adams JS, Liu PT, Chun R, Modlin RL, Hewison M. Vitamin D in defense of the human immune response. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1117:94-105.
5. Ahmed-Sorour H, Bailey CJ. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis, glycogen formation and gluconeogenesis. *Ann Nutr Metab* 1981;25:208-12.
6. Albareda M, Caballero A, Badell G, Piquer S, Ortiz A, de Leiva A, Corcoy R. Diabetes and abnormal glucose tolerance in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:1199-205.
7. Albrecht ED, Bonagura TW, Burleigh DW, Enders AC, Aberdeen GW, Pepe GJ. Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. *Placenta* 2006;27:483-90.
8. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquie M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E, Nadal A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One* 2008;3:e2069.
9. Alonso A, Del Rey CG, Navarro A, Tolivia J, Gonzalez CG. Effects of gestational diabetes mellitus on proteins implicated in insulin signaling in human placenta. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:526-35.
10. AlSaleh A, Sanders TA, O'Dell SD. Effect of interaction between PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  and ADIPOQ gene variants and dietary fatty acids on plasma lipid profile and adiponectin concentration in a large intervention study. *Proc Nutr Soc* 2012;71:141-53.
11. Arck P, Toth B, Pestka A, Jeschke U. Nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family in gestational diabetes: from animal models to clinical trials. *Biol Reprod* 2010;83:168-76.
12. Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment phasically potentiates endogenous cholecystokinin's satiating action in ovariectomized rats. *Peptides* 1999;20:445-50.
13. Bailey CJ, Ahmed-Sorour H. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects of insulin secretion. *Diabetologia* 1980;19:475-81.
14. Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL. The short forms of HLA-G are unlikely to play a role in pregnancy because they are not expressed at the cell surface. *J Reprod Immunol* 2000;47:1-16.
15. Banerjee P, Chatterjee M. Antiproliferative role of vitamin D and its analogs--a brief overview. *Mol Cell Biochem* 2003;253:247-54.
16. Banister CE, Koestler DC, Maccani MA, Padbury JF, Houseman EA, Marsit CJ. Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas. *Epigenetics* 2011;6:920-7.
17. Barlic J, Murphy PM. An oxidized lipid-peroxisome proliferator-activated receptor gamma-chemokine pathway in the regulation of macrophage-vascular smooth muscle cell adhesion. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:269-74.
18. Barrett H, McElduff A. Vitamin D and pregnancy: An old problem revisited. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24:527-39.



19. Baumann MU, Deborde S, Illsley NP. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 2002;19:13-22.
20. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 2009;138:195-209.
21. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009;373:1773-9.
22. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409-35.
23. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:26-34.
24. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Haddad JG. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. *J Clin Invest* 1984;74:1966-71.
25. Bitsanis D, Ghebremeskel K, Moodley T, Crawford MA, Djahanbakhch O. Gestational diabetes mellitus enhances arachidonic and docosahexaenoic acids in placental phospholipids. *Lipids* 2006;41:341-6.
26. Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, Holick MF, Powers RW, Roberts JM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3517-22.
27. Bodnar LM, Krohn MA, Simhan HN. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *J Nutr* 2009;139:1157-61.
28. Bomba-Opon D, Wielgos M, Szymanska M, Bablok L. Effects of free fatty acids on the course of gestational diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett* 2006;27:277-80.
29. Bouchard L, Hivert MF, Guay SP, St-Pierre J, Perron P, Brisson D. Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration. *Diabetes* 2012;61:1272-80.
30. Bouchard L, Thibault S, Guay SP, Santure M, Monpetit A, St-Pierre J, Perron P, Brisson D. Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:2436-41.
31. Bouillon R, Van Assche FA, Van Baelen H, Heyns W, De Moor P. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> concentration. *J Clin Invest* 1981;67:589-96.
32. Brown LM, Clegg DJ. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;122:65-73.
33. Brown LM, Gent L, Davis K, Clegg DJ. Metabolic impact of sex hormones on obesity. *Brain Res* 2010;1350:77-85.
34. Bukovsky A, Caudle MR, Cekanova M, Fernando RI, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF. Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant--comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:36.
35. Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF. Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:13.
36. Capobianco E, Jawerbaum A, Romanini MC, White V, Pustovrh C, Higa R, Martinez N, Mugnaini MT, Sonez C, Gonzalez E. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) levels in term placental tissues from control and diabetic rats: modulatory effects of a PPARgamma

- agonist on nitridergic and lipid placental metabolism. *Reprod Fertil Dev* 2005;17:423-33.
37. Capparuccia L, Marzioni D, Giordano A, Fazioli F, De Nictolis M, Busso N, Todros T, Castellucci M. PPARgamma expression in normal human placenta, hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Mol Hum Reprod* 2002;8:574-9.
38. Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144:768-73.
39. Chen X, Scholl TO, Leskiw M, Savaille J, Stein TP. Differences in maternal circulating fatty acid composition and dietary fat intake in women with gestational diabetes mellitus or mild gestational hyperglycemia. *Diabetes Care* 2010;33:2049-54.
40. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004;79:820-5.
41. Cho GJ, Hong SC, Oh MJ, Kim HJ. Vitamin D deficiency in gestational diabetes mellitus and the role of the placenta. *Am J Obstet Gynecol* 2013;209:560 e1-8.
42. Cho NH, Silverman BL, Rizzo TA, Metzger BE. Correlations between the intrauterine metabolic environment and blood pressure in adolescent offspring of diabetic mothers. *J Pediatr* 2000;136:587-92.
43. Cirulli V, Zalatan J, McMaster M, Prinsen R, Salomon DR, Ricordi C, Torbett BE, Meda P, Crisa L. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes* 2006;55:1214-22.
44. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, Damm P. High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care* 2008;31:340-6.
45. Clifton-Bligh RJ, McElduff P, McElduff A. Maternal vitamin D deficiency, ethnicity and gestational diabetes. *Diabet Med* 2008;25:678-84.
46. Colonna M, Nakajima H, Cella M. Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells. *J Leukoc Biol* 1999;66:718-22.
47. Cordero L, Treuer SH, Landon MB, Gabbe SG. Management of infants of diabetic mothers. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998;152:249-54.
48. Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassine A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 1999;20:669-76.
49. Cross NA, Hillman LS, Allen SH, Krause GF, Vieira NE. Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy, lactation, and postweaning: a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 1995;61:514-23.
50. Daoud G, Simoneau L, Masse A, Rassart E, Lafond J. Expression of cFABP and PPAR in trophoblast cells: effect of PPAR ligands on linoleic acid uptake and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2005;1687:181-94.
51. de Leiva A, Mauricio D, Corcoy R. Diabetes-related autoantibodies and gestational diabetes. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S127-33.
52. Diel P. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett* 2002;127:217-24.
53. Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y. Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J* 2012;33:2980-90.
54. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol* 2013;31:387-411.

55. Evans KN, Nguyen L, Chan J, Innes BA, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Effects of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on cytokine production by human decidual cells. *Biol Reprod* 2006;75:816-22.
56. Fadl HE, Ostlund IK, Magnuson AF, Hanson US. Maternal and neonatal outcomes and time trends of gestational diabetes mellitus in Sweden from 1991 to 2003. *Diabet Med* 2010;27:436-41.
57. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol* 2012;212:3-12.
58. Feig DS, Zinman B, Wang X, Hux JE. Risk of development of diabetes mellitus after diagnosis of gestational diabetes. *CMAJ* 2008;179:229-34.
59. Filiberto AC, Maccani MA, Koestler D, Wilhelm-Benartzi C, Avissar-Whiting M, Banister CE, Gagne LA, Marsit CJ. Birthweight is associated with DNA promoter methylation of the glucocorticoid receptor in human placenta. *Epigenetics* 2011;6:566-72.
60. Forman BM, Samuels HH. Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. *Mol Endocrinol* 1990;4:1293-301.
61. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-12.
62. Fournier T, Guibourdenche J, Handschuh K, Tsatsaris V, Rauwel B, Davrinche C, Evain-Brion D. PPARgamma and human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol* 2011;90:41-9.
63. Fournier T, Handschuh K, Tsatsaris V, Evain-Brion D. Involvement of PPARgamma in human trophoblast invasion. *Placenta* 2007;28 Suppl A:S76-81.
64. Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. PPARs and the placenta. *Placenta* 2007;28:65-76.
65. Fuchtenbusch M, Ferber K, Standl E, Ziegler AG. Prediction of type 1 diabetes postpartum in patients with gestational diabetes mellitus by combined islet cell autoantibody screening: a prospective multicenter study. *Diabetes* 1997;46:1459-67.
66. Gale CR, Robinson SM, Harvey NC, Javaid MK, Jiang B, Martyn CN, Godfrey KM, Cooper C. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:68-77.
67. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:883-96.
68. Gambino YP, Maymo JL, Perez-Perez A, Duenas JL, Sanchez-Margalet V, Calvo JC, Varone CL. 17Beta-estradiol enhances leptin expression in human placental cells through genomic and nongenomic actions. *Biol Reprod* 2010;83:42-51.
69. Gambino YP, Maymo JL, Perez Perez A, Calvo JC, Sanchez-Margalet V, Varone CL. Elsevier Trophoblast Research Award lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells--focus on leptin expression. *Placenta* 2012;33 Suppl:S63-70.
70. Gätje R, Eberle C, Scholz C, Lübke M, Solbach C, Muschel K, Kissler S, Siedentopf F, Weißenbacher T, Debus G, Schuhmacher I, Sänger N. Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011.
71. Getahun D, Fassett MJ, Jacobsen SJ. Gestational diabetes: risk of recurrence in subsequent pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:467 e1-6.
72. Giaginis C, Spanopoulou E, Theocharis S. PPAR-gamma signaling pathway in placental development and function: a potential therapeutic target in the treatment of gestational diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:1049-63.

73. Gil-Sanchez A, Demmelmair H, Parrilla JJ, Koletzko B, Larque E. Mechanisms involved in the selective transfer of long chain polyunsaturated Fatty acids to the fetus. *Front Genet* 2011;2:57.
74. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002;346:340-52.
75. Grummer R, Hohn HP, Mareel MM, Denker HW. Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system. *Placenta* 1994;15:411-29.
76. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004;114:397-407.
77. Gui J, Liu Q, Feng L. Metformin vs insulin in the management of gestational diabetes: a meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e64585.
78. Guibourdenche J, Fournier T, Malassine A, Evain-Brion D. Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochem Cytobiol* 2009;47:S35-40.
79. Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev* 2002;23:763-86.
80. Haigh T, Chen C, Jones CJ, Aplin JD. Studies of mesenchymal cells from 1st trimester human placenta: expression of cytokeratin outside the trophoblast lineage. *Placenta* 1999;20:615-25.
81. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
82. Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Endocrinology* 2007;148:5011-9.
83. Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larque E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr* 2008;27:685-93.
84. Heilmaier C, Thielscher C, Ziller M, Altmann V, Kostev K. Use of antidiabetic agents in the treatment of gestational diabetes mellitus in Germany, 2008-2012. *J Obstet Gynaecol Res* 2014;40:1592-7.
85. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12729-34.
86. Hirano T, Higuchi T, Katsuragawa H, Inoue T, Kataoka N, Park KR, Ueda M, Maeda M, Fujiwara H, Fujii S. CD9 is involved in invasion of human trophoblast-like choriocarcinoma cell line, BeWo cells. *Mol Hum Reprod* 1999;5:168-74.
87. Holdsworth-Carson SJ, Lim R, Mitton A, Whitehead C, Rice GE, Permezel M, Lappas M. Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Placenta* 2010;31:222-9.
88. Holdsworth-Carson SJ, Permezel M, Riley C, Rice GE, Lappas M. Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptor-alpha in term human gestational tissues: tissue specific and labour-associated changes. *Placenta* 2009;30:176-86.
89. Hunger-Dathe W, Mosebach N, Samann A, Wolf G, Muller UA. Prevalence of impaired glucose tolerance 6 years after gestational diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;114:11-7.
90. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J* 2005;19:681-93.

91. Ietta F, Bechi N, Romagnoli R, Bhattacharjee J, Realacci M, Di Vito M, Ferretti C, Paulesu L. 17{beta}-Estradiol modulates the macrophage migration inhibitory factor secretory pathway by regulating ABCA1 expression in human first-trimester placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E411-8.
92. Jansson T, Wennergren M, Illsley NP. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1554-62.
93. Jawerbaum A, Capobianco E. Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: implications in maternal diabetes. *Placenta* 2011;32 Suppl 2:S212-7.
94. Jawerbaum A, Capobianco E, Pustovrh C, White V, Baier M, Salzberg S, Pesaresi M, Gonzalez E. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by its endogenous ligand 15-deoxy Delta12,14 prostaglandin J2 on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women. *Mol Hum Reprod* 2004;10:671-6.
95. Jones L, Hamilton AJ, Voinnet O, Thomas CL, Maule AJ, Baulcombe DC. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 1999;11:2291-301.
96. Ju H, Rumbold AR, Willson KJ, Crowther CA. Borderline gestational diabetes mellitus and pregnancy outcomes. *BMC Pregnancy Childbirth* 2008;8:31.
97. Juch H, Blaschitz A, Dohr G, Hutter H. HLA class I expression in the human placenta. *Wien Med Wochenschr* 2012;162:196-200.
98. Karatekin G, Kaya A, Salihoglu O, Balci H, Nuhoglu A. Association of subclinical vitamin D deficiency in newborns with acute lower respiratory infection and their mothers. *Eur J Clin Nutr* 2009;63:473-7.
99. Kautzky-Willer A, Prager R, Waldhausl W, Pacini G, Thomaseth K, Wagner OF, Ulm M, Strelci C, Ludvik B. Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. *Diabetes Care* 1997;20:1717-23.
100. Kersten S, Wahli W. Peroxisome proliferator activated receptor agonists. *EXS* 2000;89:141-51.
101. Kleiblova P, Dostalova I, Bartlova M, Lacinova Z, Ticha I, Krejci V, Springer D, Kleibl Z, Haluzik M. Expression of adipokines and estrogen receptors in adipose tissue and placenta of patients with gestational diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol* 2010;314:150-6.
102. Kleinwechter H. [Update gestational diabetes--the new guidelines]. *MMW Fortschr Med* 2011;153:44-7.
103. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4318-23.
104. Knabl J, Huttenbrenner R, Hutter S, Gunthner-Biller M, Vrekoussis T, Karl K, Friese K, Kainer F, Jeschke U. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) is down regulated in trophoblast cells of gestational diabetes mellitus (GDM) and in trophoblast tumour cells BeWo in vitro after stimulation with PPARgamma agonists. *J Perinat Med* 2013:1-9.
105. Knabl J, Pestka A, Huttenbrenner R, Plosch T, Ensenaer R, Welbergen L, Hutter S, Gunthner-Biller M, Jeschke U. The liver x receptor in correlation with other nuclear receptors in spontaneous and recurrent abortions. *PPAR Res* 2013;2013:575604.

106. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev* 1997;18:832-72.
107. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999;4:597-609.
108. Kuhn DC, Botti JJ, Cherouny PH, Demers LM. Eicosanoid production and transfer in the placenta of the diabetic pregnancy. *Prostaglandins* 1990;40:205-15.
109. Kumpel BM, Manoussaka MS. Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sang* 2012;102:2-12.
110. Kuroki K, Maenaka K. Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface. *Eur J Immunol* 2007;37:1727-9.
111. Lapillonne A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. *Med Hypotheses* 2010;74:71-5.
112. Lau SL, Gunton JE, Athayde NP, Byth K, Cheung NW. Serum 25-hydroxyvitamin D and glycated haemoglobin levels in women with gestational diabetes mellitus. *Med J Aust* 2011;194:334-7.
113. Lauenborg J, Hansen T, Jensen DM, Vestergaard H, Molsted-Pedersen L, Hornnes P, Locht H, Pedersen O, Damm P. Increasing incidence of diabetes after gestational diabetes: a long-term follow-up in a Danish population. *Diabetes Care* 2004;27:1194-9.
114. Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 2003;144:2201-7.
115. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995;270:12953-6.
116. Lewis S, Lucas RM, Halliday J, Ponsonby AL. Vitamin D deficiency and pregnancy: from preconception to birth. *Mol Nutr Food Res* 2010;54:1092-102.
117. Liu N, Kaplan AT, Low J, Nguyen L, Liu GY, Equils O, Hewison M. Vitamin D induces innate antibacterial responses in human trophoblasts via an intracrine pathway. *Biol Reprod* 2009;80:398-406.
118. Liu NQ, Kaplan AT, Lagishetty V, Ouyang YB, Ouyang Y, Simmons CF, Equils O, Hewison M. Vitamin D and the regulation of placental inflammation. *J Immunol* 2011;186:5968-74.
119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
120. Lobner K, Knopff A, Baumgarten A, Mollenhauer U, Marienfeld S, Garrido-Franco M, Bonifacio E, Ziegler AG. Predictors of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 2006;55:792-7.
121. Maccani MA, Marsit CJ. Epigenetics in the placenta. *Am J Reprod Immunol* 2009;62:78-89.
122. Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Bosmans E. Why fish oils may not always be adequate treatments for depression or other inflammatory illnesses: docosahexaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated fatty acid, induces a Th-1-like immune response. *Neuro Endocrinol Lett* 2007;28:875-80.
123. Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Karimi F, Shafaei AR, Larijani B. Correlation between vitamin D3 deficiency and insulin resistance in pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24:27-32.

124. Mahon P, Harvey N, Crozier S, Inskip H, Robinson S, Arden N, Swaminathan R, Cooper C, Godfrey K. Low maternal vitamin D status and fetal bone development: cohort study. *J Bone Miner Res* 2010;25:14-9.
125. Maiya S, Sullivan I, Allgrove J, Yates R, Malone M, Brain C, Archer N, Mok Q, Daubeney P, Tulloh R, Burch M. Hypocalcaemia and vitamin D deficiency: an important, but preventable, cause of life-threatening infant heart failure. *Heart* 2008;94:581-4.
126. Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine* 2002;19:3-11.
127. Mannion CA, Gray-Donald K, Koski KG. Association of low intake of milk and vitamin D during pregnancy with decreased birth weight. *CMAJ* 2006;174:1273-7.
128. Markestad T, Aksnes L, Ulstein M, Aarskog D. 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D of D2 and D3 origin in maternal and umbilical cord serum after vitamin D2 supplementation in human pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1984;40:1057-63.
129. Marques P, Carvalho MR, Pinto L, Guerra S. Metformin safety in the management of gestational diabetes. *Endocr Pract* 2014;1-21.
130. Masuda S, Jones G. Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions. *Mol Cancer Ther* 2006;5:797-808.
131. McCarthy FP, Delany AC, Kenny LC, Walsh SK. PPAR-gamma - a possible drug target for complicated pregnancies. *Br J Pharmacol* 2013;168:1074-85.
132. McEwan IJ. Nuclear receptors: one big family. *Methods Mol Biol* 2009;505:3-18.
133. Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, de Leiva A, Dunger DB, Hadden DR, Hod M, Kitzmiller JL, Kjos SL, Oats JN, Pettitt DJ, Sacks DA, Zouzas C. Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S251-60.
134. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 2:B161-7.
135. Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, Dyer AR, Leiva A, Hod M, Kitzmiller JL, Lowe LP, McIntyre HD, Oats JJ, Omori Y, Schmidt MI. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:676-82.
136. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991-2002.
137. Meyer MR, Clegg DJ, Prossnitz ER, Barton M. Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. *Acta Physiol (Oxf)* 2011;203:259-69.
138. Min Y, Nam JH, Ghebremeskel K, Kim A, Crawford M. A distinctive fatty acid profile in circulating lipids of Korean gestational diabetics: a pilot study. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;73:178-83.
139. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* 2006;6:584-94.
140. Naaz A, Zakroczymski M, Heine P, Taylor J, Saunders P, Lubahn D, Cooke PS. Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). *Horm Metab Res* 2002;34:758-63.

141. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005;26:662-87.
142. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998;93:229-40.
143. Noll S, Schaub-Kuhnen S. Praxis der Immunhistochemie. München, Jena: Urban & Fischer Verlag; 2000;17-18.
144. O'Callaghan CA, Bell JI. Structure and function of the human MHC class IIb molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev* 1998;163:129-38.
145. O'Moore-Sullivan TM, Prins JB. Thiazolidinediones and type 2 diabetes: new drugs for an old disease. *Med J Aust* 2002;176:381-6.
146. O'Sullivan JB, Mahan CM. Criteria for the Oral Glucose Tolerance Test in Pregnancy. *Diabetes* 1964;13:278-85.
147. Orendi K, Gauster M, Moser G, Meiri H, Huppertz B. The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction* 2010;140:759-66.
148. Ortega-Senovilla H, Schaefer-Graf U, Meitzner K, Abou-Dakn M, Graf K, Kintscher U, Herrera E. Gestational diabetes mellitus causes changes in the concentrations of adipocyte fatty acid-binding protein and other adipocytokines in cord blood. *Diabetes Care* 2011;34:2061-6.
149. Oztekin O. New insights into the pathophysiology of gestational diabetes mellitus: possible role of human leukocyte antigen-G. *Med Hypotheses* 2007;69:526-30.
150. Pan DA, Mater MK, Thelen AP, Peters JM, Gonzalez FJ, Jump DB. Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) as the mediator for polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic L-pyruvate kinase gene transcription. *J Lipid Res* 2000;41:742-51.
151. Pedersen SB, Borglum JD, Moller-Pedersen T, Richelsen B. Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1992;85:13-9.
152. Pettitt DJ, Lawrence JM, Beyer J, Hillier TA, Liese AD, Mayer-Davis B, Loots B, Imperatore G, Liu L, Dolan LM, Linder B, Dabelea D. Association between maternal diabetes in utero and age at offspring's diagnosis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008;31:2126-30.
153. Pittas AG, Harris SS, Stark PC, Dawson-Hughes B. The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care* 2007;30:980-6.
154. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2017-29.
155. Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 2009;587:4963-76.
156. Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J Perinat Med* 2010;38:393-400.
157. Pritts EA, Zhao D, Ricke E, Waite L, Taylor RN. PPAR-gamma decreases endometrial stromal cell transcription and translation of RANTES in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1841-4.



158. Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Hauguel-de Mouzon S. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* 2003;52:2951-8.
159. Rama S, Petrusz P, Rao AJ. Hormonal regulation of human trophoblast differentiation: a possible role for 17beta-estradiol and GnRH. *Mol Cell Endocrinol* 2004;218:79-94.
160. Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med* 2010;28:17-26.
161. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987;8:138-40.
162. Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* 1999;66:733-9.
163. Rodie VA, Young A, Jordan F, Sattar N, Greer IA, Freeman DJ. Human placental peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma expression in healthy pregnancy and in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:320-9.
164. Ruchat SM, Hivert MF, Bouchard L. Epigenetic programming of obesity and diabetes by in utero exposure to gestational diabetes mellitus. *Nutr Rev* 2013;71 Suppl 1:S88-94.
165. Ruchat SM, Houde AA, Voisin G, St-Pierre J, Perron P, Baillargeon JP, Gaudet D, Hivert MF, Brisson D, Bouchard L. Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics* 2013;8:935-43.
166. Rudnicki PM, Molsted-Pedersen L. Effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on glucose metabolism in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997;40:40-4.
167. Samuel S, Sitrin MD. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutr Rev* 2008;66:S116-24.
168. Schaefer-Graf UM, Meitzner K, Ortega-Senovilla H, Graf K, Vetter K, Abou-Dakn M, Herrera E. Differences in the implications of maternal lipids on fetal metabolism and growth between gestational diabetes mellitus and control pregnancies. *Diabet Med* 2011;28:1053-9.
169. Schaefer-Graf UM, Pawliczak J, Passow D, Hartmann R, Rossi R, Buhner C, Harder T, Plagemann A, Vetter K, Kordonouri O. Birth weight and parental BMI predict overweight in children from mothers with gestational diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1745-50.
170. Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y. The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 2006;249:10-5.
171. Schaiff WT, Carlson MG, Smith SD, Levy R, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3874-81.
172. Scholl TO, Chen X. Vitamin D intake during pregnancy: association with maternal characteristics and infant birth weight. *Early Hum Dev* 2009;85:231-4.
173. Schopfer FJ, Lin Y, Baker PR, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen K, Chen YE, Freeman BA. Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2340-5.
174. Seely EW, Brown EM, DeMaggio DM, Weldon DK, Graves SW. A prospective study of calciotropic hormones in pregnancy and post partum: reciprocal changes in serum intact parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:214-7.

175. Shi H, Clegg DJ. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* 2009;97:199-204.
176. Shields BM, Knight B, Hopper H, Hill A, Powell RJ, Hattersley AT, Clark PM. Measurement of cord insulin and insulin-related peptides suggests that girls are more insulin resistant than boys at birth. *Diabetes Care* 2007;30:2661-6.
177. Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta* 2010;31:1027-34.
178. Silverman BL, Metzger BE, Cho NH, Loeb CA. Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism. *Diabetes Care* 1995;18:611-7.
179. Silverman BL, Rizzo T, Green OC, Cho NH, Winter RJ, Ogata ES, Richards GE, Metzger BE. Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes* 1991;40 Suppl 2:121-5.
180. Silverman BL, Rizzo TA, Cho NH, Metzger BE. Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 2:B142-9.
181. Soheilykhah S, Mojibian M, Rashidi M, Rahimi-Saghand S, Jafari F. Maternal vitamin D status in gestational diabetes mellitus. *Nutr Clin Pract* 2010;25:524-7.
182. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 2007;28:521-74.
183. Sullivan SD. Should metformin be preferred over insulin therapy in the management of gestational diabetes (GDM)? *Evid Based Med* 2013;18:e60.
184. Suwaki N, Masuyama H, Masumoto A, Takamoto N, Hiramatsu Y. Expression and potential role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the placenta of diabetic pregnancy. *Placenta* 2007;28:315-23.
185. Tam WH, Ma RC, Yang X, Ko GT, Tong PC, Cockram CS, Sahota DS, Rogers MS, Chan JC. Glucose intolerance and cardiometabolic risk in children exposed to maternal gestational diabetes mellitus in utero. *Pediatrics* 2008;122:1229-34.
186. Tarrade A, Schoonjans K, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D. PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2001;142:4504-14.
187. Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, Fournier T. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5017-24.
188. Teegarden D, Donkin SS. Vitamin D: emerging new roles in insulin sensitivity. *Nutr Res Rev* 2009;22:82-92.
189. Thone-Reineke C, Kalk P, Dorn M, Klaus S, Simon K, Pfab T, Godes M, Persson P, Unger T, Hocher B. High-protein nutrition during pregnancy and lactation programs blood pressure, food efficiency, and body weight of the offspring in a sex-dependent manner. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R1025-30.
190. Toth B, Bastug M, Mylonas I, Scholz C, Makovitzky J, Kunze S, Thaler C, Friese K, Jeschke U. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in normal human pregnancy and miscarriage. *Acta Histochem* 2009;111:372-8.
191. Toth B, Hornung D, Scholz C, Djalali S, Friese K, Jeschke U. Peroxisome proliferator-activated receptors: new players in the field of reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:289-310.
192. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004;63:1-12.
193. Ulfing N. *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
194. Ulfing N. *Kurzlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005.

195. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int* 2010;78:140-5.
196. Wade J. Estradiol can modulate sensory processing with rapid and longer term consequences. *J Biosci* 2009;34:345-7.
197. Wadsack C, Hrzenjak A, Hammer A, Hirschmugl B, Levak-Frank S, Desoye G, Sattler W, Malle E. Trophoblast-like human choriocarcinoma cells serve as a suitable in vitro model for selective cholesteryl ester uptake from high density lipoproteins. *Eur J Biochem* 2003;270:451-62.
198. Waite LL, Person EC, Zhou Y, Lim KH, Scanlan TS, Taylor RN. Placental peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is up-regulated by pregnancy serum. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3808-14.
199. Wallace AD, Cidlowski JA. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 2001;276:42714-21.
200. Wang LH, Yang XY, Zhang X, Huang J, Hou J, Li J, Xiong H, Mihalic K, Zhu H, Xiao W, Farrar WL. Transcriptional inactivation of STAT3 by PPARgamma suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells. *Immunity* 2004;20:205-18.
201. White V, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Capobianco E, Gonzalez E. Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Reprod Fertil Dev* 2002;14:117-23.
202. Wilkin TJ, Voss LD, Metcalf BS, Mallam K, Jeffery AN, Alba S, Murphy MJ. Metabolic risk in early childhood: the EarlyBird Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28 Suppl 3:S64-9.
203. Wright CS, Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Taveras EM, Gillman MW, Oken E. Intrauterine exposure to gestational diabetes, child adiposity, and blood pressure. *Am J Hypertens* 2009;22:215-20.
204. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 1999;3:151-8.
205. Yajnik CS, Godbole K, Otv SR, Lubree HG. Fetal programming of type 2 diabetes: is sex important? *Diabetes Care* 2007;30:2754-5.
206. Yorifuji J, Yorifuji T, Tachibana K, Nagai S, Kawai M, Momoi T, Nagasaka H, Hatayama H, Nakahata T. Craniotabes in normal newborns: the earliest sign of subclinical vitamin D deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1784-8.
207. Zerwekh JE, Breslau NA. Human placental production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3: biochemical characterization and production in normal subjects and patients with pseudohypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:192-6.
208. Zhang C, Qiu C, Hu FB, David RM, van Dam RM, Bralley A, Williams MA. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and the risk for gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 2008;3:e3753.

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
15d-PGJ2	15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2
ABC	<i>Avidin-Biotin-Complex</i>
ABC-AmP-Kit	<i>Avidin-Biotin-Complex-Amplification Kit</i>
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser ( <i>Aqua destillata</i> )
BMI	<i>Body mass index</i>
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	Circa
CD9	<i>Cluster of differentiation 9</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CK-7	Cytokeratin-7
CT	Cytotrophoblast
Cy	Cyanine
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
D.h.	Das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECACC	<i>European collection of animal cell cultures</i>
EVT	Extravillöser Trophoblast
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FMOC-L-Leucin	N-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-Leucin
g	Gramm
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
GLUT	Glucosetransporter
h	Stunde
HAPO-Studie	<i>Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes</i>
hCG	humanes Choriogonadotropin
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>

hPL	humanes Plazentalaktogen
IADPSG	<i>International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups</i>
Ig	Immunglobulin
IRS	<i>Immunoreactive score</i>
IUGR	<i>Intrauterine growth restriction</i>
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
Konz.	Konzentration
l	Liter
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
M	Molar
m	männlich
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nmol	Nanomol
NP40	Nonylphenolethoxylat 40 = Nonoxinol 40
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Plac.	Placentar
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPRE	<i>Peroxisome proliferator response element</i>
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
qRT-PCR	quantitative <i>Real-time</i> -Polymerase-Ketten-Reaktion
RIPA-Puffer	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> -Puffer
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
rt-MSP	<i>Real-time-methylation specific</i> -Polymerase-Ketten-Reaktion
RXR	Retinoid-X-Rezeptor

---

SCT	Syncytiotrophoblast
Sek.	Sekunde
SS	Schwangerschaft
SSM	Schwangerschaftsmonat
SSW	Schwangerschaftswoche
Std.	Stunde
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
v.a.	vor allem
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	<i>Vitamin D response element</i>
VIP	<i>violet-colored precipitate</i>
w	weiblich
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B.	zum Beispiel

## 8. Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der einzelnen Gruppen .....	19
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper, Immunhistochemie.....	21
Tabelle 3: Verwendete Negativkontrollseren .....	21
Tabelle 4: Vorgehen für die immunhistochemische Färbung der einzelnen Antikörper	23
Tabelle 5: Verwendet Primärantikörper, Doppelimmunfluoreszenz.....	25
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper, Doppelimmunfluoreszenz.....	25
Tabelle 7: Verwendete Primer, qRT-PCR.....	28
Tabelle 8: Protokoll für die Bisulfit-Konvertierung im Mastercycler.....	35
Tabelle 9: Verwendete Software .....	85
Tabelle 10: Geräte .....	86
Tabelle 11: Chemikalien.....	88
Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien.....	89
Tabelle 13: Firmenverzeichnis .....	91
Abbildung 1: Flussdiagramm zur Diagnostik der Hyperglykämie in der Schwangerschaft.....	2
Abbildung 2: Aufbau der Plazenta: .....	6
Abbildung 3: Synthese von Calcitriol .....	9
Abbildung 4: Übersicht über die Funktion von Estradiol an der feto-maternalen Grenzzone in der frühen Schwangerschaft.....	14
Abbildung 5: Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode .....	20
Abbildung 6: Positiv-und Negativkontrolle für VDR. ....	38
Abbildung 7: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung des VDR. ....	38
Abbildung 8: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung des VDR in männlichen und weiblichen Kontrollplazenten. ....	39
Abbildung 9: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung des VDR im Endothel. ....	40
Abbildung 10: Westernblot für VDR mit Gewebslysaten aus dem Bereich der Dezidua von GDM positiven und Kontrollplazenten .....	41
Abbildung 11: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung für VDR und HLA-G an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten. ....	42
Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Färbung für HLA-G an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten. ....	42
Abbildung 13: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung für VDR und Ubiquitin an weiblichen und männlichen Kontrollplazenten. ....	43
Abbildung 14: qRT-PCR für VDR in der Dezidua von GDM positiven und Kontrollplazenten. ....	44
Abbildung 15: qRT-PCR für VDR nach Stimulation von BeWos mit Calcitriol und Insulin. ....	45
Abbildung 16: Immunocytochemische Färbung des VDR an BeWos nach Stimulation mit Calcitriol.....	46
Abbildung 17: Positiv-und Negativkontrolle für PPAR $\gamma$ . ....	46
Abbildung 18: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von PPAR $\gamma$ . ....	47
Abbildung 19: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung für PPAR $\gamma$ und CK-7 an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten. ....	48

---

Abbildung 20: qRT-PCR für PPAR $\gamma$ an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten. PPAR $\gamma$ mRNA-Expression in GDM positiven und Kontrollplazenten .....	48
Abbildung 21: qRT-PCR für PPAR $\gamma$ nach Stimulation von BeWos mit Arachidonsäure und 15d-PGJ $_2$ .....	50
Abbildung 22: Positiv-und Negativkontrolle für ER $\alpha$ .....	51
Abbildung 23: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von ER $\alpha$ . .....	51
Abbildung 24: Positiv-und Negativkontrolle für ER $\beta$ .....	52
Abbildung 25: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von ER $\beta$ . .....	52
Abbildung 26: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von ER $\beta$ . .....	53
Abbildung 27: qRT-PCR für ER $\alpha$ an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten. ....	54
Abbildung 28: rt-MSP für ER $\alpha$ und statistischer Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus und IRS. ....	54
Abbildung 29: Positiv-und Negativkontrolle für HLA-G. ....	55
Abbildung 30: Repräsentative Schnitte für die immunhistochemische Färbung von HLA-G.....	55
Abbildung 31: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung für CK-7 und HLA-G an Gewebe von GDM positiven und Kontrollplazenten. ....	56



## 9. Labormaterial und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
AC Adaptor AA P700	JVC
Axio Vision, V.4.5	Carl Zeiss
Bio-Rad Quantity One Software	Bio-Rad
DISKUS Version 4.60.2017#22 3	Carl H. Hilgers Technisches Büro
SPSS Version 19	IBM

**Tabelle 9: Verwendete Software**

Gerät	Hersteller
ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR	Applied Biosystems
Axiocam	Zeiss
Brutschrank	Heraeus
Co2 Flasche	Linde
Dampfkochtopf vitavit	Fissler
Electrophoresis Power Supply Consort	Life Technologies
Elektrische Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss
Gefrierschrank -80°C Forma 900 Series	Thermo Scientific
Gefrierschränke -20°C	Siemens, LIEBHERR
GelDoc™ XR+	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer Mini-PROTEAN®	Bio-Rad
IH-Kamera: 3 CCD Colour Video Camera	JVC
Kryostat HM 550	MICROM International GmbH
Kühlschränke 4°C Zellkultur	Siemens, LIEBHERR
Lichtmikroskop Immunhistochemie Type 307-148.001 514 686	Leitz
Lichtmikroskop Zellkultur	Leitz
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCH	IKA GmbH&Co KG
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Mikrotom Hn 40	Reichert-Jung
Nanodrop®	PeqLab

PCR Sterile Bank Captair	Erlab
pH Meter	Schott
Photometer Ultrospec	Amersham Biosciences GmbH
Pipette (10, 100, 500, 1000)	Eppendorf
Sonifier® Cell Disruptor B15	Branson Ultrasonics
Steril Bank Uniflow UV 1200 mini	Kendro Laboratory Products
Stickstofftank	Taylor Wharton GmbH
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Vortex Genie 2	Bender&Hobein
Waage Kern 572	Kern & Sohn GmbH
Waage Kombimag Reo	Kern & Sohn GmbH
Wärmeschrank	Binder GmbH
Wasserbad	Medax
Wasserbad Zellkultur	GFL
Zentrifuge mini Spin	Eppendorf
Zentrifuge Z323K	HERMLE

Tabelle 10: Geräte

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezug</b>
0,1 M Citronensäure	Merck
0,1 M Na-Citrat	Merck
15d-PGJ2	Sigma-Aldrich
Aceton	AppliChem
AEC+High Sensitivity Substrate Chromogen Ready to Use	Dako
Aqua ad iniectabilia	Braun
Aqua dest.	Apothekenbedarf der LMU
Aquatex	Merck
Arachidonsäure	Sigma-Aldrich
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Chloroform	Merck
Dako Antibody Diluent	Dako
DEPC treated DI water	Sigma-Aldrich
DMEM	Biochrom AG

EpiTect® Bisulfite Kit	Qiagen
Essigsäure	Merck
Ethanol 50%, 70%, 96%, 100%	Apothekenbedarf der LMU
FCS	Biochrom AG
Forskolin	Sigma-Aldrich
High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems
Humanes AB-Serum	Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
Humanes Calcitriol	Sigma-Aldrich
Humanes Insulin	B.Braun
Humanes Leptin	R&D Systems
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
KOH	Merck
Liquid DAB+Substrate Chromogen System	Dako
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
Methylgrün	Vector Laboratories
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaCl	Merck
NP40	Sigma-Aldrich
NucleoSpin®RNAII Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Tissue Kit	Macherey-Nagel
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Protein-Assay Standard II	Bio-Rad
Protein Assay	Bio-Rad
PVDF-Membran	Roth
Qiazol Lysis Reagenz	Qiagen
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich
Rneasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen
Roti-Load Probenpuffer	Roth

Saures Hämalaun nach Mayer	Apothekenbedarf der LMU
Shandon Consul Mount	Thermo Fisher Scientific
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
Tris-Glycin-Puffer	Bio-Rad
Tris-Glycin-SDS-Puffer	Bio-Rad
Tris-HCL Ready Gel (12%ig)	Bio-Rad
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin	Biochem
Ultra V Block	Thermo Fisher Scientific
Universal Blocking Reagent Power Block	Biogenex
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories
Vectastain ABC-Amp Kit for western blotting	Vector Laboratories
Vectastain Elite ABC mouse IgG Kit	Vector Laboratories
Vectastain Elite ABC rabbit IgG Kit	Vector Laboratories
Verdünnungsmedium S3022	Dako
VIP Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid	VWR International S.A.S
Xylol	Roth

Tabelle 11: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific (Menzel Gläser)
Falcons 50 ml	Sarstedt
Färbegestell, Färbekasten, Färbetrog	Roth
MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml	Applied Biosystems/life Technologies
Feuchtkammer	Aus Eigenherstellung
Lab-Tec Chamberslide	Nunc
Micro Amp Optical Adhesive Film PCR	Applied Biosystems/life Technologies
Mikroküvetten	Sarstedt

PCR Tubes 0,2 ml, 0,5 ml	Eppendorf
Pipettenspitze Plastik 1 ml Safe Seal Tips Premium	Biozym
Pipettenspitze Plastik 10 µl, 100 µl Premium Tips	Biozym
Pipettenspitze Plastik 5 ml epTips Dualfilter	Eppendorf
Safe Lock Tubes Eppendorf Tubes, 2 ml	Eppendorf
Serologische Pipettenspitze 5ml, 10ml, 25ml	BD Biosciences
Super Frost Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Teflon beschichtete Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien

<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
Abcam	Cambridge, UK
AbD Serotec	Oxford, UK
Amersham Biosciences GmbH	Freiburg, Deutschland
Apothekenbedarf der LMU	München, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Applied Biosystems	Weierstadt, Deutschland
ATCC	Manassas, USA
Branson Ultrasonics	Danbury, USA
B.Braun	Melsungen, Deutschland
BD Biosciences	Franklin Lakes, United states
Bender&Hobein	Bruchsal, Deutschland
Binder GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Biochem	Karlsruhe, Deutschland
Biochrom AG	Berlin, Deutschland
BioGenex	Fremont, USA
Bio-Rad	Hercules, USA
Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH	Dreieich, Deutschland
Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland

Braun	Kronberg, Deutschland
Canon Inc.	Tokio, Japan
Carl H. Hilgers Technisches Büro	Königswinter, Deutschland
Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Dako	Glostrup, Dänemark
Dianova	Hamburg, Deutschland
ECACC	Salisbury, England
Enzo Life Sciences	Farmingdale, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Erlab	Val de Reuil cedex, Frankreich
BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Fissler	Idar-Oberstein, Deutschland
GE Healthcare Biosciences	Piscataway, USA
GFL	Burgwedel, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
HERMLE	Wehingen, Deutschland
IBM	Armonk, USA
IKA GmbH&Co KG	Staufen, Deutschland
Immunotech	Marseille, Frankreich
JVC	Yokohama, Japan
Kendro Laboratory Products	Asheville, USA
Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Labvision	Fremont, USA
Leitz	Wetzlar, Deutschland
Lifespan Biosciences	Seattle, USA
Life Technologies	Carlsbad, USA
Linde	München, Deutschland
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Medax	Neumünster, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
MICROM International GmbH	Walldorf, Deutschland
Novocastra	Wetzlar, Deutschland
Novus Biologicals	Littleton, USA

Nunc	Wiesbaden, Deutschland
PeqLab	Erlangen, Deutschland
Perseus Proteomics	Tokyo, Japan
Qiagen	Hilden, Deutschland
R&D Systems	Minneapolis, USA
Reichert-Jung	Buffalo, USA
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Santa-Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Schott	Mainz, Deutschland
Serotec	Kidlington, UK
Shandon Inc.	Pittsburgh, USA
Siemens	München, Deutschland
LIEBHERR	Bulle, Schweiz
Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Taylor Wharton GmbH	Mildstedt, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Vector Laboratories	Burlingame, USA
VWR International S.A.S	West Chester, USA
Zeiss	Jena, Deutschland

**Tabelle 13: Firmenverzeichnis**

## 10. Danksagung

Zuerst möchte ich mich sowohl aus fachlicher als auch aus menschlicher Sicht von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Udo Jeschke bedanken. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und stand mir bei fachlichen Problemen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, was ich als sehr außergewöhnlich zu schätzen weiß. Außerdem möchte ich ihm für das ausgesprochen angenehme Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe danken, welches dazu führte, dass mir die Arbeit so viel Spaß machte, dass ich immer weitere Experimente durchführte. Weiterhin möchte ich mich dafür bedanken, dass er es mir ermöglichte zu publizieren und an Fachkongressen teilzunehmen. Mein größter Dank gebührt auch meiner Betreuerin Frau Dr. Julia Knabl, die ihre Aufgabe als Betreuerin sehr ernst nahm und ebenfalls immer für mich da war. Sie unterstützte mich in jeglichen wissenschaftlichen Fragen und sorgte mit ihrer sympathischen und menschlichen Art immer für ein sehr gutes Klima.

Außerdem möchte ich mich von ganzen Herzen bei den MTAs Christina Kuhn, Simone Hofmann, Irmgard Wiest und Susi Kunze bedanken. Ohne Ihre tatkräftige Unterstützung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Sie haben mir alle Methoden beigebracht und mich mit grenzenloser Geduld bei allen experimentellen Fragen unterstützt. Zudem sorgten sie stets für beste Stimmung im Labor und haben so sehr großen Anteil an der sehr guten Arbeitsatmosphäre. Zusammen mit meinen Mitdoktoranden, Carolin „Heidi“ Vosseler, Miriam Ennouri, Verena Wolf und Sanja Milak standen sie mir immer zur Seite und sind so zu Freunden geworden, worüber ich mich sehr freue. Sie sorgten dafür, dass ich immer gerne ins Labor ging. Dafür möchte ich mich bei allen bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Sabine Heublein, bedanken, die mich bei experimentellen und wissenschaftlichen Fragen stets unterstützte.

Aus meinem privaten Umfeld möchte ich meinen Eltern danken, die immer für mich da waren und mich immer bedingungslos unterstützten. Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinem Mann bedanken. Er stand immer an meiner Seite und baute mich nach Tiefschlägen immer wieder auf.



## 11. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

**J Knabl, R Hüttenbrenner, S Hutter, M Günthner-Biller, F Kainer, U Jeschke.**

Expressionsveränderungen des Vitamin D Rezeptors bei Gestationsdiabetes - Folge eines Vitamin D Mangels? Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2013; 73-P04

(Gemeinsame Tagung der OEGG/BGGF 2013 in Innsbruck)

**Rebecca Hüttenbrenner, Julia Knabl, Stefan Hutter, Christina Kuhn, Sabine**

Hoffmann, Margit Günthner-Biller, Klaus Friese, Franz Kainer, Udo Jeschke. Welche Rolle spielen die Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  bei der Pathogenese des Gestationsdiabetes? Arch Gynecol Obstet (2012) 286 (Suppl 1):S64

(59.Tagung der DGGG 2012 in München)

**R Hüttenbrenner, J Knabl, S Hutter, C Kuhn, S Hofmann, M Günthner-Biller, F**

Kainer, U Jeschke, K Friese. Expression und Regulation des Kernrezeptors PPAR  $\gamma$  bei Gestationsdiabetes. Geburtsh Frauenheilk 2012; 72-P48

(86.Tagung der BGGF 2012 in Würzburg)

**R Hüttenbrenner, J Knabl, S Hutter, MM Günthner-Biller, K Friese, F Kainer, U**

Jeschke. Die erhöhte Anfälligkeit des weiblichen Geschlechts für diabetische Programmierung - Auswirkungen eines gestörten Vitamin D Systems? Z Geburtshilfe Neonatol 2011; 215 - FV08\_04

(25. Deutscher Kongress für Perinatale Medizin 2011 in Berlin)

**R Hüttenbrenner, J Knabl, S Hutter, S Kunze C Kuhn, M Günthner-Biller, F Kainer,**

U Jeschke, K Friese. Expression des Vitamin D Rezeptors bei Gestationsdiabetes - Gibt es geschlechtsspezifische Veränderungen? Geburtsh Frauenheilk 2011; 71-P119

(85.Tagung der BGGF 2011 in Erlangen)

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

Knabl J, **Hüttenbrenner R**, Hutter S, Gunthner-Biller M, Riedel C, Hiden U, Kainer F, Desoye G, Jeschke U. Gestational Diabetes Mellitus Upregulates Vitamin D Receptor in Extravillous Trophoblasts and Fetoplacental Endothelial Cells. *Reprod Sci* 2014.

Knabl J, **Hüttenbrenner R**, Hutter S, Gunthner-Biller M, Vrekoussis T, Karl K, Friese K, Kainer F, Jeschke U. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) is down regulated in trophoblast cells of gestational diabetes mellitus (GDM) and in trophoblast tumour cells BeWo in vitro after stimulation with PPARgamma agonists. *J Perinat Med* 2013:1-9.

## **12. Eidesstattliche Versicherung**

Rebecca Hüttenbrenner

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Untersuchungen zur Expression von Kernrezeptoren und HLA-G in Plazenten von Patientinnen mit Gestationsdiabetes**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 10.05.2015