

Diplomarbeit

Dysregulation in der Sekretion proangiogener Faktoren durch plazentare
Trophoblasten und Makrophagen bei Gestationsdiabetes

eingereicht von

Ursula Speidel

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an

Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

unter der Anleitung von

Ass.Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ rer.nat. Ursula Hiden

Dipl.-Ing.ⁱⁿ Silvija Tokic, PhD

Graz, den 27.9.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 27.9.2017

Ursula Speidel eh.

Danksagungen

Ich möchte mich für die Unterstützung, Geduld und Hilfe bei Frau Prof.in Hiden und bei Frau Dipl.-Ing.in Tokic bedanken.

Vielen lieben Dank an meine Familie, die mich immer unterstützt hat!

Zusammenfassung

GDM (GDM) zählt zu den häufigsten Komplikationen während einer Schwangerschaft und wirkt sich auch auf die Morphologie der Plazenta aus. Sie ist schwerer und stärker vaskularisiert. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das diabetische Milieu eine veränderte Sekretion verschiedener proangiogener Faktoren durch Zellen der Plazenta bewirkt, was zu dieser stärkeren Vaskularisierung beitragen könnte. Dazu wurden proangiogene Faktoren im Zellkulturmedium von zuvor kultivierter Endothelzellen aus der Plazenta, Trophoblasten und Makrophagen der Plazenta (Hofbauer Zellen) untersucht, die nach unkompliziert verlaufenden SW als auch nach SW mit GDM isoliert wurden. Mittels ELISA wurde die Konzentration dieser proangiogenen Faktoren (VEGF, PlGF, TNF α , EGF, FGF, Leptin und IGF-2) gemessen.

Signifikant verändert zeigte sich die Konzentration von TNF α , welcher von Trophoblasten, die mütterlichem GDM ausgesetzt waren, vermindert sezerniert wurde. Im Medium der Endothelzellen konnten keine der oben genannten Faktoren nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass diese stark durch von Nachbarzellen sezernierte, proangiogenen Faktoren der stimuliert werden können.

Abstract

Gestational diabetes mellitus (GDM) is one of the most common pregnancy complications and alters the placental morphology. The placenta in GDM is heavier and is more vascularized. The aim of the present study was to determine whether the diabetic environment of GDM alters the secretion of proangiogenic factors by isolated placental cells. Therefore, culture media of trophoblasts, placental endothelial cells and placental macrophages (Hofbauer cells) that were isolated after normal and GDM pregnancies, were analyzed. The concentration of proangiogenic factors (VEGF, PlGF, TNF α , EGF, FGF, Leptin, and IGF-2) was measured by ELISA. Results revealed a reduction of TNF α secretion by trophoblasts in GDM. None of the investigated factors could be detected in culture media of placental endothelial cells, suggesting that factors regulating placental angiogenesis derive from neighboring cells.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Inhaltsverzeichnis	v
Glossar und Abkürzungen	vi
1 Einleitung	1
1.1 Einteilung des Diabetes Mellitus	1
1.2 Folgen des GDM für das Kind	2
1.3 Plazentaentwicklung und Aufbau	3
1.4 Vasculogenese und Angiogenese	4
1.5 Hypoxie	5
1.6 Veränderungen der Plazenta bei Diabetes Mellitus	6
1.7 PROANGIOGENE FAKTOREN	6
1.7.1 VEGF-Familie	6
1.7.2 TNF α	16
1.7.3 TNF α Rezeptoren	18
1.7.4 Leptin.....	20
1.7.5 Expression in der Plazenta	20
1.7.6 Funktion von Leptin in der Entwicklung und in der Plazenta.....	21
1.7.7 Leptin-Rezeptoren	22
1.7.8 FGF	23
1.7.9 FGF Rezeptoren.....	24
1.7.10 EGF	25
1.7.11 Allgemein	25
1.7.12 Expression	26
1.7.13 Funktion.....	26
1.7.14 Rezeptoren	27
1.7.15 IGF-2	28
1.8 Hypothese und Ziel der Arbeit.....	31
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Isolation Endothelzellen	31
2.2 Isolation Makrophagen	32
2.3 Isolation Trophoblasten	33
2.4 ELISA	34
3 Ergebnisse – Resultate	35
3.1 Trophoblasten	36
3.2 Makrophagen	38
3.3 Endothelzellen.....	39
4 Diskussion.....	39
5 Literaturverzeichnis	44

Glossar und Abkürzungen

ARE (=androgens response element)

CCAAT/C/EBP (=enhancer binding protein)

CRE (=cAMP response element-binding protein)

EB-Modellen (=embryonic stem cells derived embryoid bodies)

EGF (=epidermal growth factor)

EGF-Rezeptor (=EGFR=Erb1=HER1)

eNOS (=endothelial nitric oxide synthase)

EPC-Zellen (=endothelial progenitor cells)

epithelialen Natrium-Kanal (=ENaC)

ERE (=estrogens response element)

GDM (=Gestationsdiabetes)

GRE (glucocorticoid response element)

HB-EGF (= heparin-binding EGF)

HBSS (=Hanks Balance Salt Solution)

HGF (=hepatocyte growth factor)

HIF (=Hypoxia-inducible factor)

HIF-1 β (=ARNT=aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator)

HREs (=hypoxic response elements)

HRP(= Meerrettichperoxidase)

HSBG (=heparan-sulfate-proteoglycane)

HUVEC-Zellen (=human umbilical vein endothelial cell)

INSM (=Insulinoma-associated protein 1).

Interferon γ (=INF γ)

IRE (Insulin response element)

IRES (=internal ribosomal entry site)

islet brain-2 (IB2)

JAK2 (=Janus tyrosine kinase 2)

MAP (=mitogen activated protein)

MMP-9 (=Matrix metalloproteinase 9)

MSC-Zellen (=multipotential stromal cell)

NC-Zellen (=neural crest)

Neuropillin 1 (NRP1)

Neuropillin 2 (NRP2)

NGF (=nerve growth factor)
PAI-1 (=plasminogen activator inhibitor 1)
PBS (=phosphate buffered saline buffer)
PLAD (=pre-ligand binding assembly domain)
Sp1 (=stimulant protein1)
SSW (0Schwangerschaftswoche)
STAT (signal transducers and activators of transcription)
TACE (=TNF-1-converting enzyme)
TGFalpha (=transforming growth factor alpha)
TRAFs (=TNFR associated factors)
TSAAd (=T cell-specific adapter molecule=VRAP=VEGF receptor associated protein)
Urokinase Plasminogen Aktivator (=uPA)
VEGFR-1 (=flt1)
VEGFR-2 (=KDR=flk1)
VEGFR-3

1 Einleitung

Schwangerschaftsdiabetes (gestational diabetes mellitus, GDM) zählt heute zu den häufigsten Komplikationen in einer Schwangerschaft und betrifft ca. 5 % aller Schwangerschaften. Schwangerschaftsdiabetes ist eine Hyperglykämie, die erstmals in der Schwangerschaft auftritt. Das veränderte, diabetische Milieu hat Auswirkungen auf die Morphologie der Plazenta. Sie ist schwerer und stärker vaskularisiert. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Hypervaskularisierung der Plazenta durch eine vermehrte Sekretion von pro-angiogenen Faktoren verschiedener Plazentazellen hervorgerufen werden könnte.

Dieses Thema gewinnt zunehmend an Bedeutung, da aufgrund des westlichen Lebensstils immer mehr Menschen in Österreich an Typ 2 Diabetes Mellitus erkranken. In Österreich sind ca. 573.000 bis 645.000 Menschen betroffen was ca. 8-9% der österreichischen Bevölkerung entspricht. Da Typ 2 Diabetes und GDM die gleichen Risikofaktoren aufweisen, steigt auch die Anzahl der Schwangerschaften, die durch Diabetes Mellitus beeinflusst werden. Die verschiedenen Diabetesformen sind im Folgenden kurz besprochen (diabetesbericht_20131021.pdf).

1.1 Einteilung des Diabetes Mellitus

Man unterscheidet 4 verschiedene Formen des Diabetes anhand der Pathogenese bzw. nach dem Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der Erkrankung (diabetesbericht_20131021.pdf, American Diabetes Association 2016).

Diabetes Mellitus Typ 1 entsteht durch eine autoimmunologische Zerstörung der Insulin produzierenden β -Zellen des Pankreas und führt zu einem absoluten Insulinmangel (diabetesbericht_20131021.pdf, American Diabetes Association 2016).

Diabetes Mellitus Typ 2 ist durch eine fortschreitende Insulinresistenz gekennzeichnet mit zunächst erhöhter Insulinproduktion und -Ausschüttung. Aufgrund der Insulinresistenz spricht man beim Diabetes Mellitus Typ 2 von einem relativen Insulinmangel. Das Risiko für Type 2 Diabetes wird durch einen ungesunden Lebensstil (ungesunde Ernährung, wenig körperliche Bewegung)

stark erhöht (diabetesbericht_20131021.pdf, American Diabetes Association 2016).

GDM ist per definitionem ein erstmalig diagnostizierter Diabetes Mellitus, der im 2. oder 3. Trimenon der Schwangerschaft auftritt. (American Diabetes Association 2016) In den meisten Fällen verschwindet diese Form des Diabetes nach der Geburt. Allerdings bleibt ein stark erhöhtes Risiko für die Frau, im Laufe ihres weiteren Lebens an einem DM Typ 2 zu erkranken. GDM stellt eine der häufigsten Komplikationen in der Schwangerschaft dar. (Neue deutsche Leitlinie zum GDM: Konsequenzen für die Praxis - 11814.pdf). Auch die gesunde Schwangerschaft stellt einen diabetogenen Zustand für die Mutter dar, der durch Insulin Resistenz gekennzeichnet ist. Die wichtigsten Faktoren, die dazu führen, sind die von der Plazenta ausgeschütteten Hormone wie z.B. Lactogen, Progesteron, Cortisol, Wachstumshormone und Prolaktin. All diese Hormone führen in der Folge dazu, dass weniger IRS-1 (Insulin-Rezeptor-Substrat) phosphoryliert wird und eine erhöhte Insulinresistenz entsteht. IRS-1 senkt schon in einer komplikationslos verlaufenden Schwangerschaft die Insulinsensitivität um 50-60% und die Funktion der Insulin produzierenden Betazellen in Pankreas um 50%! Um unter diesen Umständen einen normalen Blutzuckerspiegel zu erhalten, muss die Bauchspeicheldrüse das Doppelte an Insulin herstellen. (Meng, Shao et al. 2016) Risikofaktoren für die Entwicklung eines GDM sind zahlreich. Sie umfassen u.a. einen BMI >30kg/m², Alter von über 45 Jahren, körperliche Inaktivität usw. (Neue deutsche Leitlinie zum GDM: Konsequenzen für die Praxis - 11814.pdf).

In der vierten Untergruppe des Diabetes werden die „spezifischen“ Typen des Diabetes zusammengefasst, die im Rahmen anderer Erkrankungen bzw. Ursachen auftreten wie z.B. zystische Fibrose. (American Diabetes Association 2016)

1.2 Folgen des GDM für das Kind

Durch eine Zunahme des Übergewichts (in 3-20%) werdender Mütter kommt es auch zu einer steigenden Anzahl an Komplikationen in Schwangerschaften. Dies schließt gerade auch GDM mit ein. Dabei kommt es nicht nur zu kurzfristigen Folgen für das Kind, wie ein erhöhter fetaler Fettgehalt, sondern auch zu

langfristigen Folgen wie z.B. einem erhöhten kardiovaskulären Risiko im späteren Leben (Deierlein, Siega-Riz et al. 2011, West, Crume et al. 2011).

So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Übergewicht von Kindern mit 3 Jahren signifikant erhöht war, wenn der Blutzucker der Mutter während der Schwangerschaft über oder gleich 130 mg/dl betrug (Deierlein, Siega-Riz et al. 2011).

Eine weitere Studie untersuchte eine multi-ethnische Kohorte von Kindern im Alter zwischen 6 und 13 Jahren von Müttern, die an GDM erkrankt waren, und konnte zeigen, dass erhöhte Werte von E-Selektin, VCAM1, Leptin, Bauchumfang, BMI und systolischem Blutdruck zu finden waren. Adhäsionsmoleküle wie z.B. VCAM1 sind Biomarker für eine Störung des Endothels und stehen im Verdacht mit den frühesten präklinischen Stadien von Atherosklerose und Diabetes in Verbindung zu stehen (West, Crume et al. 2011).

Auch andere Arbeiten beleuchten diesen wichtigen Aspekt und untermauern zusätzlich die Bedeutung von GDM für die weitere Entwicklung des Kindes. Eine intrauterine Exposition einer diabetischen Umgebung führt zu einem gesteigertem Risiko für die Entwicklung eines DM und für Adipositas in Kindern und dies zusätzlich zu den vorhandenen genetischen Dispositionen (Dabelea, Hanson et al. 2000).

Des Weiteren erhöht sich auch die Inzidenz der diabetischen Embryopathie mit Anenzephalie, Mikrozephalie und Herzfehlern. Diese ist assoziiert mit dem HbA1c-Spiegel der Schwangeren. Je höher der HbA1c-Spiegel ist desto höher das Risiko für eine diabetische Embryopathie. Entscheidend ist hier, ob der DM schon vor der Schwangerschaft bestehend war oder nicht- denn umso höher sind die Risiken. Vor Empfängnis sollte der HbA1c-Spiegel unter 7% sein, um eine effektive Risikoreduktion zu gewährleisten (Guerin, Nisenbaum et al. 2007, Jensen, Korsholm et al. 2009).

1.3 Plazentaentwicklung und Aufbau

Die als erstes Organ des Fetus entstehende Plazenta spielt eine zentrale Rolle in der Versorgung des ungeborenen Kindes. Sie ermöglicht den Gas- und Stoffaustausch des Fetus über fetoplazentare Gefäße in den chorionischen Villi. Diese sind umspült von maternalem Blut. Jede Veränderung der mütterlichen

Hämodynamik und Blutzusammensetzung, zB die bei GDM bestehende Hyperglykämie, aber auch Wachstumsfaktoren und Cytokine, können so den Aufbau und die Funktion von fetoplazentaren Gefäßen und somit möglicherweise Veränderungen in den Gefäßen des Fetus selbst vorhersagbar machen (Meng, Shao et al. 2016).

Im groben Aufbau gliedert sich die Plazenta in zwei Platten (Basalplatte und Chorionplatte), zwischen denen die Zotten liegen. In den Zotten befinden sich die fetalen Gefäße, die von mütterlichem Blut umgeben sind (Ulfig 2009).

Die Plazenta entwickelt sich in der zweiten Schwangerschaftswoche. Der Synzytiotrophoblast dringt weiter in die Dezidua ein. Innerhalb der Synzytiotrophoblastenschicht entstehen Lakunen, die in der Folge zu einem Labyrinth verschmelzen. Der Synzytiotrophoblast, der in die Dezidua eingedrungen ist, öffnet mütterliche Gefäße (Spiralarterien), sodass maternales Blut in das entstandene Labyrinth eindringen kann. Der das Labyrinth umgebende Synzytiotrophoblast ist in Form von Säulen, den Trabekeln, aufgebaut. In der weiteren Folge wandern in diese Trabekeln Zytotrophoblasten ein, wodurch die primären Zotten (Villi) entstehen. Das Innere dieser Villi besteht aus dem Zytotrophoblasten, während das Äußere der Synzytiotrophoblast bildet. Die Villi reichen in das Lakunenlabyrinth (= intervillöser Raum) hinein. Der mütterliche und der kindliche Kreislauf stehen nun über die sich entwickelnde Plazenta in Verbindung. Ab dem 14. Tag wandern extraembryonale Mesodermzellen in das Innere der Primärzotten (in den Zytotrophoblasten) ein und es entstehen Sekundärzotten. Mit dem Beginn des 18. Tages bilden sich in den Zotten erste Kapillaren und Blutzellen. Diese Zotten nennt man Tertiärzotten (Ulfig 2009).

1.4 Vasculogenese und Angiogenese

Für die Entstehung eines neuen Blutgefäßes existieren zwei unterschiedliche Mechanismen. Man unterscheidet Vasculogenese und Angiogenese. Vasculogenese bezeichnet die Bildung von Blutgefäßen aus mesodermalen Stammzellen bzw. deren Vorläufern. Angiogenese ist die Entstehung von Blutgefäßen aus bereits existierenden Gefäßen (Folkman 2007, Risau, Flamme 1995).

Vasculogenese

Vasculogenese ist die Differenzierung und Migration von Vorläufern der Endothelzellen, die im weiteren Verlauf Kapillaren formen. Als erstes bilden sich Zusammenlagerungen (Aggregate) im entstehenden Dottersack. Ein bedeutender Faktor für deren Zustandekommen ist der scl-Faktor (stem cell leukemia Faktor). Es konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen dieses Faktors schwerwiegende negative Folgen hat (Robb, Lyons et al. 1995). diese Zellen weisen zusätzlich den VEGF-Rezeptor 2 auf. Mäusen, denen das Gen für VEGF-Rezeptor 2 fehlt, sterben sehr früh. Dies ist ein Hinweis auf die bedeutende Rolle, die VEGF in der Vasculogenese spielt (Detmar, Brown et al. 1998). Des Weiteren ist ein Fehlen des VEGF-Rezeptor-1 tödlich für den Embryo, wie bei Versuchen mit Mäusen festgestellt wurde (Fong, Rossant et al. 1995).

Angiogenese

Die Angiogenese kann man in 6 Teilschritte unterteilen. Als erstes erweitert sich das Gefäß und die Permeabilität (Durchlässigkeit) steigt. In einem zweiten Schritt werden Proteasen aktiviert, die die Basalmembran abbauen. Als dritter Schritt proliferieren Endothelzellen und werden chemotaktisch an ihren Bestimmungsort gelockt. In der Folge schließen sich diese Endothelzellen zusammen und formen einen neuen Kanal. Als sechsten und letzten Schritt lagern sich Perizyten an die Außenseite der Kapillare an, um ihr mehr Stabilität zu verleihen (Charnock-Jones, Kaufmann et al. 2004). Anhand dieser vielen kleinen Teilschritte kann man erahnen, dass hier zahlreiche Faktoren mitspielen und auch viele Regulierungsvorgänge stattfinden müssen! Einige Faktoren, die in der Angiogenese eine Rolle spielen, sind bekannt-so weiß man z.B. dass eine erhöhte Konzentration von VEGF-A, Angiopoetin-1 und PlGF eine Vermehrung der Gefäßanzahl bewirken kann (Detmar, Brown et al. 1998). Auch ist bekannt, dass VEGF-A und PlGF die vaskuläre Permeabilität steigern (Odorisio, Schietroma et al. 2002).

1.5 Hypoxie

Ein wichtiger Faktor für die Gefäßentstehung ist die am Beginn der Schwangerschaft bestehende Hypoxie (Sauerstoffarmut). Am Beginn einer Schwangerschaft existiert physiologisch eine sehr niedrige

Sauerstoffkonzentration. So ist die Konzentration des Sauerstoffs in der 8. Schwangerschaftswoche unter 20mmHg und macht nach 12 Wochen einen Sprung auf unter 50mmHg. Der Vorteil der niedrigen Sauerstoffkonzentration ist, dass eine geringere Anzahl an Sauerstoffradikalen entsteht. Auch hat man festgestellt, dass zwischen der 8. und 9. SSW ein plötzlicher Anstieg von antioxidativen Enzymen stattfindet. Vermutlich entsteht beim Einsetzen des mütterlichen Blutflusses vermehrt oxidativer Stress, und dies zu einer Stimulation für die Differenzierung innerhalb der normalen/gesunden Plazenta (Wu, Tian et al. 2015).

Auch die Hypoxie beeinflusst die Bildung von verschiedenen proangiogenen Faktoren. Es existieren unterschiedliche Mechanismen, über die die Hypoxie Einfluss auf die Expression von proangiogenen Faktoren nehmen kann. Hierzu gehören eine Regulation über die Transkription, eine Veränderung der Stabilität der mRNA und eine veränderte Regulierung der Translation (Cvitic, Desoye et al. 2014).

1.6 Veränderungen der Plazenta bei Diabetes Mellitus

Schon länger sind typische Veränderungen der Plazenta bei Diabetes Mellitus bekannt. Hierzu gehören Plazentaübergröße, Unreife der Zotten, Zottenstromaödem und eine Zunahme der Länge und auch der Oberfläche von plazentaren Gefäßen. Das Kapillarnetzwerk ist mangelhaft und unreif und es zeigen sich unter Umständen Zeichen der diabetischen Angiopathie (Proliferation der Kapillaren, gesteigerte Reifung, großer Durchmesser der Basalmembran und Gefäßfibrose). Allerdings sind auch Arbeiten bekannt, die eine Reduktion der Vaskularisation beschreiben. (Vogel 1992, Siegenthaler, Blum 2006, Knörr, Knörr-Gärtner et al. 1989)

1.7 PROANGIOGENE FAKTOREN

1.7.1 VEGF-Familie

1.7.1.1 Allgemein

In der VEGF-Familie werden 5 verschiedene Wachstumsfaktoren zusammengefasst. Die Familie umfasst: -VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD und PIGF. Der wichtigste und bekannteste Vertreter dieser Familie ist VEGFA. Sie alle sind Glykoproteine, die durch Disulfidbrücken verbundene Dimere bilden. Auch sind nicht nur Homodimere sondern auch Heterodimere zwischen VEGFA und PIGF bekannt. Gemeinsam ist ihnen, dass sie alle eine Domäne mit 8 verschiedenen Cysteinresten tragen (Cvitic, Desoye et al. 2014, Koch, Claesson-Welsh 2012). Auch von PLGF sind mehrere Formen bekannt. PIGF1 und PIGF3 sind NON-Heparin-Bindungsformen während PIGF2 und PIGF4 die Möglichkeit einer Heparinbindung besitzen. Des Weiteren ist PIGF2 in der Lage, an NRP1 (Neuropillin 1) Korezeptor und NRP2 (Neuropillin 2) Korezeptor zu binden (De Falco 2012).

1.7.1.2 Expression

Gebildet und exprimiert wird VEGF von verschiedenen Zelltypen in der Plazenta. Villöse Trophoblasten produzieren v.a. im 1. Trimester der Schwangerschaft VEGF, später wird VEGF auch von Makrophagen (Hofbauerzellen), glatten Muskelzellen, Endothelzellen und anderen Stromalen Zellen gebildet (Cvitic, Desoye et al. 2014, Koch, Claesson-Welsh 2012).

PIGF wird in der Plazenta v.a. von Cytotrophoblasten und Syncytiotrophoblasten und uNK, glatten Muskelzellen um fetoplazentare Gefäße gebildet (Cvitic, Desoye et al. 2014).

1.7.1.3 Funktion

PIGF

PIGF fördert die Bildung von stark verzweigten Kapillaren und die Vermehrung von Endothelzellen der Plazenta. Auch wird vermutet, dass PIGF v.a. bei verschiedenen Krankheiten verändert ist, wie z.B. in Übergewicht, Atherosklerose

und rheumatoider Arthritis (Cvitic, Desoye et al. 2014, Gobble, Groesch et al. 2009, De Falco 2012).

VEGF

VEGF kommt eine zentrale Rolle sowohl in der Vasculogenese als auch der Angiogenese zu. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Mäuse bei denen VEGF ausgeschaltet wurde, eine gescheiterte Vasculogenese zeigen. VEGF ist wichtig für Differenzierung, Wachstum und Zusammenlagerung von endothelialen Vorläuferzellen und später für die Bildung von haemangiogenen Strängen (Cvitic, Desoye et al. 2014, Burton, Charnock-Jones et al. 2009).

1.7.1.4 Regulation VEGF und PIGF

Man muss sich bewusst machen, welche Prozesse von Nöten sind, damit aus einem DNS-Abschnitt ein Protein entstehen kann, um die Regulation einzelner Proteine bzw. Faktoren zu verstehen. Zuerst muss ein bestimmter DNS-Abschnitt, beginnend am Promotor eines Gens, von einer RNA-Polymerase abgelesen und dabei eine RNA gebildet werden. An diesen Promoter können bestimmte Faktoren binden, die z.B. ein vermehrtes Ablesen dieses Abschnitts induzieren. Zu solchen bestimmten Stellen an der DNS gehören auch sogenannte HREs (hypoxic response elements), die durch Hypoxie reguliert werden und im VEGF-Gen vorkommen (Ziello, Jovin et al. 2007, Charnock-Jones, Kaufmann et al. 2004).

Der Schritt des Ablesens eines Gens durch eine RNA-Polymerase und den Aufbau einer RNA nennt man Transkription. Ein bekannter Faktor, der an HREs in der Regulation der Transkription bindet, ist HIF (Hypoxia-inducible factor). Der HIF-1-Komplex besteht aus 2 Untereinheiten: HIF-1 β (ARNT, acryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator) und HIF-1 α . Der HIF-1 α Unterfaktor regelt die Proteinbildung über die Sauerstoffkonzentration. Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen wird HIF-1 α stabilisiert und es kommt zum vermehrten Auftreten von HIF-Komplexen. Diese HIF-Komplexe binden an die DNS und fördern die Transkription von verschiedenen Genen und damit letztendlich die vermehrte Herstellung von verschiedenen Proteinen wie z.B. VEGF (Ziello, Jovin et al. 2007, Charnock-Jones, Kaufmann et al. 2004, Pastukh, Roberts et al. 2015).

Der nächste Schritt in der Proteinsynthese ist die Translation. Translation beschreibt das Ablesen einer mRNA und die Bildung des Proteins durch Ribosomen. Auch hier ist ein Regulationsmechanismus für VEGFA bekannt: die IRES (=internal ribosomal entry site). Normalerweise wird die Translation einer mRNA über ihre 5-Cap-Struktur initiiert-aber manche RNAs tragen IRES, die ihnen ermöglichen, über diese direkt an das Ribosom zu binden. So wird ermöglicht, das VEGF produziert wird, selbst wenn die Herstellung von allen anderen Proteinen über ihre 5-Cap-Struktur heruntergefahren ist (Cammass, Dubrac et al. 2015).

Regulation PIGF

PIGF wird in der Plazenta wohl nicht über HIF-Komplexe reguliert (Gobble, Groesch et al. 2009). Möglicherweise wird PIGF bei Hypoxie über MTF-1 und NF- κ B reguliert (De Falco 2012). Auch gibt es Arbeiten, die eine Herunterregulierung der PIGF-Produktion von Trophoblasten durch Hypoxie postulieren. Dies würde auch mit dem Verlauf der PIGF Expression zusammenpassen, die am Anfang der Schwangerschaft niedrig ist und gegen deren Ende immer weiter zunimmt. Die PIGF Konzentration ist bei Preeklampsie und bei GDM ebenfalls erniedrigt. Allerdings ist die Regulation durch Hypoxie in der Plazenta vom Zelltyp abhängig, da nicht Trophoblast-Zellen mit einer vermehrten Expression von PIGF auf Hypoxie reagieren. Es ist nicht bekannt, welche Rolle hier möglicherweise HREs spielen (Gobble, Groesch et al. 2009). Jedoch gibt es auch Publikationen, die eine vermehrte Expression von PIGF unter Hypoxie beschreiben. Diese Studien untersuchten HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) und von Erwachsenen stammende Endothelzellen (Xiang, Varshney et al. 2014).

1.7.1.5 Rezeptoren der VEGF-Familie

Um die Wirkungen von VEGF zu verstehen, und um Schlussfolgerungen aus einer Dysregulation von VEGF zu ziehen, muss man sich mit den einzelnen VEGF Rezeptoren beschäftigen, da VEGF nur über sie seine spezifischen Funktionen ausüben kann. Hier ist nicht nur die Wirkungsweise der einzelnen Rezeptoren von Bedeutung, sondern auch welche Zellen diese exprimieren. Sie sind die „Effektorzellen“ für VEGF.

1.7.1.5.1 Tyrosinkinaserzeptor

VEGF-Familienmitglieder entfalten ihre Wirkung über verschiedene Tyrosinkinaserzeptoren. Tyrosinkinasen sind Enzyme, deren Aufgabe es ist, Phosphatgruppen auf Tyrosinreste eines Eiweißes zu übertragen. Tyrosinkinaserzeptoren sind transmembrane Proteine, wobei der extrazelluläre Anteil die Bindungsstelle für den Liganden bildet und der intrazelluläre Anteil eine Tyrosinkinase beinhaltet. Bindet der Ligand an den Rezeptor, kommt es intrazellulär zu einer Dimerisierung des Rezeptors, zu einer Autophosphorylierung der intrazellulären Anteile und der Übertragung der Phosphatgruppen auf zelluläre Signalproteine durch die angesprochenen Tyrosinkinasen. So wird das Signal innerhalb der Zelle weitergegeben. Beim Menschen sind 58 verschiedene Rezeptorproteinkinasen bekannt, die wiederum in 20 unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Bekannte Tyrosinkinaserzeptoren sind u.a. der Insulinrezeptor und HER2 (Cvitic, Desoye et al. 2014, Koch, Claesson-Welsh 2012, Pharmazeutische Zeitung online: Tyrosinkinasen: Meister der Kommunikation).

Für VEGFs existieren 3 Tyrosinkinaserzeptoren: VEGFR-1 (flt1), VEGFR-2 (KDR, flk1), VEGFR-3 (flt4), sowie die zwei Korezeptoren Neuropillin 1 (NRP1) und Neuropillin 2 (NRP2). Alle VEGFs binden mit unterschiedlicher Spezifität an diese Rezeptoren. VEGFA bindet bevorzugt an VEGFR-1 und VEGFR-2. VEGFB bindet an VEGFR-1. PIGF bindet an VEGFR-1. VEGFC und VEGFD binden auch an VEGFR-2 und VEGFR-3. Im Folgenden gehe ich näher auf die einzelnen Rezeptoren, ihre Funktion und Expressionsmuster ein (Koch, Claesson-Welsh 2012).

1.7.1.5.2 VEGFR-1

In der Plazenta wird VEGFR-1 von Makrophagen und Trophoblasten exprimiert. VEGFR-1 besitzt nur eine geringe Kinaseaktivität und ist für eine funktionierende Endothelzellfunktion nicht essentiell. Eine wichtige Aufgabe des VEGFR-1 Rezeptors ist die negative Regulierung der VEGFR-2-Funktion. VEGFR-1 bindet mit einer sehr viel höheren Affinität VEGFA und könnte somit eine Bindung von VEGFA an VEGFR-2 unterbinden bzw. vermindern. Durch unterschiedliches Splicen existiert auch eine lösliche Form des VEGFR-1 Rezeptors: sFlt1. Auch die

lösliche Form des VEGFR1 Rezeptors hat eine höhere Affinität für VEGFA und kann somit auch VEGFA „wegfangen“ (Nevo, Lee et al. 2013). Auch während der Schwangerschaft wird sFlt1 gebildet und steht unter dem Verdacht, ein wichtiger Faktor in der Entstehung der Preeklampsie zu sein (Major, Campbell et al. 2014). Auch bei GDM ist die Konzentration von sFlt1 verändert, und zwar erhöht (El-Tarhouny, Almasry et al. 2014).

Die Plazenta produziert große Mengen an sFlt1 v.a. im frühen 1. Trimester der Schwangerschaft, wenn die Sauerstoffkonzentration niedrig ist. sFLT1 wird vermehrt gebildet bei Hypoxie. Später sinkt die Konzentration bei steigender Sauerstoffkonzentration von sFLT1 und die Konzentration von VEGFR-2 in der Plazenta steigt (Nevo, Lee et al. 2013).

Um einen direkten Zusammenhang zwischen sFLT1 Menge und VEGFR-2 expression nachzuweisen, wurden Proben von Plazentas des 1. Trimester mit sFlt1 behandelt, was zu einem Abfall der VEGFR-2 Expression führte. (Nevo, Lee et al. 2013).

In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass Mäuse ohne VEGFR-1 noch *in utero* am 9. Schwangerschaftstag versterben. Sie zeigen eine erhöhte Anzahl an endothelialen Stammzellen und schlecht organisierte Gefäße ohne erkennbares Lumen. Andere Versuche an Mäusen, in denen die Kinaseaktivität des VEGFR-1 Rezeptors fehlt, zeigen eine normale Gefäßentwicklung. Diese Arbeiten belegen, dass die negative Regulierung des VEGFR-2 durch VEGFR-1 eine große Bedeutung in der Gefäßentwicklung zukommt (Cvitic, Desoye et al. 2014, Koch, Claesson-Welsh 2012).

Im Folgenden muss noch erwähnt werden, dass eine Phosphorylierung des VEGFR-1 Liganden abhängig ist. Auch wenn sowohl VEGFA als auch PlGF an VEGFR-1 binden, findet das an unterschiedlichen Domänen statt und nur PlGF induziert eine Phosphorylierung des Rezeptors (Koch, Claesson-Welsh 2012).

Auch in einer Reihe von pathologischen Zuständen spielt VEGFR-1 eine Rolle v.a. bei Entzündungen und der Rekrutierung von Immunzellen (hier auch Makrophagen). Die rekrutierten Makrophagen beeinflussen wiederum Endothelzellen. Auf diese Weise beeinflusst VEGFR-1 indirekt auch Endothelzellen (Koch, Claesson-Welsh 2012).

VEGFB ist ein weiterer Ligand, der an VEGFR-1 binden kann. Er regelt vermutlich die Aufnahme von Fettsäuren in Endothelzellen. Diese Aufgabe ist aber auch

abhängig vom Korezeptor NRP1. Auch PIGF kann an NRP1 binden, ist aber nicht fähig, die Aufnahme von Fettsäuren in Endothelzellen zu steuern. So ist auch diese Funktion vom Ligand abhängig (Koch, Claesson-Welsh 2012).

1.7.1.5.3 VEGFR-2

VEGFR-2 befindet sich als Rezeptor an verschiedenen Zelltypen u.a. auch an Endothelzellen und Megakaryozyten. In der Plazenta exprimieren die Trophoblastenschicht, der Cytotrophoblast im 1. Trimester, haematopoetische Stammzellen, und Cytotrophoblasten der proximalen Zellsäulen VEGFR-2.

VEGFR-2 Expression wird reguliert durch die Sauerstoffkonzentration im umliegenden Gewebe. Bei hoher Sauerstoffkonzentration ist VEGFR-2 vermehrt an der Zelloberfläche zu finden. Negativ reguliert wird VEGFR-2 von sFlt1. Höhere sFlt-1 Konzentrationen bedingen einen Abfall von VEGFR-2 (Nevo, Lee et al. 2013).

VEGFR-2 bei GDM

In Plazentas von an GDM erkrankten Müttern wird im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe weniger VEGFR-2 gefunden. Möglicherweise ist dies auf den hypoxischen Zustand der Plazenta bei Schwangerschaftsdiabetes zurückzuführen. Auch ist der Ligand VEGFA erniedrigt in Plazentas von Frauen mit GDM (Meng, Shao et al. 2016).

Funktion

Außerdem enthält VEGFR-2 zusätzliche Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können, und unterschiedliche Wirkungen zeigen. Phosphorylierung an Y951 ermöglicht die Bindung von TSA_d (T cell-specific adapter molecule, VRAP, VEGF receptor associated protein). Dies findet nur in speziellen Endothelzellen während der Entwicklung und auch in der Tumorangiogenese statt. Eine weitere Phosphorylierungsmöglichkeit besteht an der Position Y1175, und diese Phosphorylierung spielt in der Entwicklung von endothelialen und haematopoetischen Stammzellen eine Rolle. Außerdem gibt es noch weitere Tyrosinreste von VEGFR-2, die auch phosphoryliert werden können (Koch, Claesson-Welsh 2012).

Über die Auswirkungen einer Aktivierung von VEGFR-2 ist mehr bekannt als über alle anderen VEGF-Rezeptoren. Ein Effekt ist die Steigerung der vaskulären Permeabilität. Es gibt zwei Wege, über die eine gesteigerte Gefäßdurchlässigkeit für Stoffe erreicht werden kann. Einerseits können transzelluläre endotheliale Poren gebildet werden andererseits können auch zeitweise offene Junctions (Zellverbindungen) zwischen den Endothelzellen die Permeabilität steigern. VEGF vermittelte Steigerung der Permeabilität geschieht über die Einbindung von eNOS (endothelial nitric oxide synthase), die NO herstellt. Die Zell-Zell Kontakte werden abhängig von SRC und YES gelockert, indem VE-Cadherin phosphoryliert wird. Auch wird diskutiert, ob eine durch VEGF ausgelöste Endozytose von VE-Cadherin für die gesteigerte Permeabilität verantwortlich ist. (Koch, Claesson-Welsh 2012)

Auch von VEGFR-2 gibt es eine lösliche Form, den sVEGFR-2. Diese lösliche Form bindet ausschließlich VEGFC und verhindert eine Vermehrung von lymphatischen Endothelzellen (Koch, Claesson-Welsh 2012).

Eine weitere Aufgabe des VEGFR-2 ist die Stimulation der Proliferation von Endothelzellen. Hier führt die Aktivierung von VEGFR-2 zur Aktivierung des RAS-Stoffwechselweges und auf diesem Weg zur Vermehrung der Zellen. Des Weiteren regt VEGFR-2 ERK an. ERK ist Teil des MAP-Kinase-Weges. MAPs (mitogen activated protein) sind mehrstufige Signaltransduktionswege, die 3 verschiedene MAP-Kinasen beinhalten. Sie werden der Reihe nach phosphoryliert bzw. aktiviert. So startet VEGFA durch Bindung an VEGFR-2 die Kaskade mit der Phosphorylierung von pY1175 und PLC γ , danach von PKCs und endlich von ERK. VEGFR-2 spielt auch eine wichtige Rolle für das Zellüberleben. So werden über mehrere Schritte apoptotisch wirksame Proteine durch Phosphorylierung ausgeschaltet. Hierzu gehört der Bcl2 assoziierte „Todespromoter“ BAD und Caspase 9. Aber VEGFR-2 unterstützt auch direkt antiapoptotisch wirkende Eiweiße wie Bcl2, A1 und Verhinderer der Apoptose wie Mitglieder der IAP-Familie. Dies sind z.B. XIAP und Survivin, welche die zentrale Caspase 3 und Caspase 7 blockieren (Koch, Claesson-Welsh 2012).

1.7.1.5.4 VEGFR-3

Expression

VEGFR-3 konnte hauptsächlich in der Schicht von Syncytiotrophoblasten in den Villi der Plazenta nachgewiesen werden. Hier konnte kein unterschiedliches Expressionsmuster von VEGFR-3 zwischen normalen Plazentas und Plazentas aus GDM-Schwangerschaften nachgewiesen werden (Helske, Vuorela et al. 2001). Ferner(Des Weiteren) ist bekannt, dass VEGFR-3 auch von vaskulären Endothelzellen exprimiert wird und bei aktiver Angiogenese verstärkt auf der Zelloberfläche zu finden ist. Interessant ist auch, dass Makrophagen sowohl VEGFC produzieren als auch VEGFR-3 exprimieren (Koch, Claesson-Welsh 2012).

Funktion

Eine wichtige Funktion von VEGFR-3 liegt in der Migration, Apoptose und DNS-Synthese in Lymphendothelzellen. Wird VEGFC oder VEGFD von VEGFR-3 gebunden, kommt es zu einer Phosphorylierung von mindestens 5 Tyrosinresten von VEGFR-3. Zu den aktivierten Tyrosinresten gehören Y1230 und Y1231, welche wahrscheinlich in Verbindung mit den vorher genannten drei Eigenschaften stehen. Auch wird durch VEGFC/VEGFR-3 Komplexe der PI3K/AKT Stoffwechselweg beeinflusst. Dies ist möglicherweise ein wichtiger Bestandteil in der Migration von Lymphendothelzellen (Koch, Claesson-Welsh 2012).

Jedoch ist die Wirkung von VEGFR-3 nicht nur beschränkt auf die Lymphangiogenese, sondern VEGFR-3 spielt auch eine Rolle in der Angiogenese. So wird VEGFR-3 auch von sogenannten „tip cells“ in der sich entwickelnden Retina exprimiert und auch in Gefäßen von Tumoren findet man VEGFR-3 (Koch, Claesson-Welsh 2012).

Heterodimere zwischen VEGFR-2 und VEGFR-3

Auch die Bildung von Heterodimeren zwischen VEGFR-2 und VEGFR-3 ist wichtig. Hierdurch wird das Muster der Autophosphorylierung von VEGFR-3 verändert (Koch, Claesson-Welsh 2012)! Heterodimere zwischen diesen beiden Rezeptoren konnten nicht nur in lymphatischen Endothelzellen nachgewiesen werden sondern auch in vaskulären Endothelzellen. Auch konnte gezeigt werden, dass die Bildung von diesen Heterodimeren zwar am besten durch VEGFC, dann aber in absteigender Reihenfolge auch durch VEGFD und letztendlich auch durch VEGFA ausgelöst werden konnte. EB-Modelle zeigten eine verstärkte

Verzweigung von Gefäßen als Antwort auf eine vermehrte Bildung von Heterodimeren durch Behandlung mit VEGFA und VEGFC. Die Anzahl der Heterodimere ist sehr wahrscheinlich abhängig von der Anzahl der vorhandenen Rezeptoren auf den Zellen und auch ihrer Lokalisation. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Heterodimere eine Rolle in der Angiogenese spielen, speziell in „sprouting angiogenesis“ (Nilsson, Bahram et al. 2010).

1.7.1.5.5 Neuropillin

Neuropilline werden von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert u.a. von Nerven, Gefäßen, Immunzellen und hämatopoetischen Stammzellen (Parker, Guo et al. 2012).

Es gibt 2 Formen des als Korezeptor fungierenden Neuropillins: NRP1 und NRP2. Neuropilline sind membrandurchspannende Proteine ohne eine innere katalytische Funktion. Entdeckt wurden sie zuerst als Rezeptoren für Semaphorine der Klasse 3 (Koch, Claesson-Welsh 2012).

Semaphorine sind bekannt für ihre Funktion als Leitsystem für Neurone und für ihre Rolle in der Entwicklung des Nervensystems. Aber auch für die Wirkung von VEGF sind sie von Bedeutung. So können bestimmte Isoformen von VEGFA (VEGF165) an NRP1 binden und im Folgenden eine Verbindung zwischen NRP1 und VEGFR-2 herstellen. Eine andere Isoform von VEGF VEGF121 bindet zwar an NRP1, kann aber keine Brücke zwischen NRP1 und VEGFR-2 bilden. (Koch, Claesson-Welsh 2012) Hier könnten vielleicht weitere versteckte Regulierungsmöglichkeiten von VEGF versteckt sein, z.B. in Form von einer Reduzierung bestimmter Isoformen von VEGF durch Bindung an NRP1. Verallgemeinernd kann gesagt werden, dass VEGFA, PIGF und VEGFB an NRP1 binden und VEGFC und VEGFD an NRP2. Aber von all diesen Faktoren existieren verschiedene Isoformen und es ist nicht klar, ob und in welcher Intensität diese an NRP binden. NRPs binden nicht nur VEGF und SEMA3, sondern auch eine Reihe anderer Liganden. Dazu gehören: Mitglieder der FGF-Familie, PDGF, TGF β 1 und HGF. Da SEMA3 und VEGF an denselben Kofaktor binden, konkurrieren diese beiden um Bindungsstellen an NRP. So hat Sema3F eine antiangiogene Wirkung (Parker, Guo et al. 2012).

Eine Wirkung von NRP1 ist die Verstärkung von Signalen von VEGFR-2 durch Stärkung der p38MAPK Aktivierung. Dies führt zu vermehrter Migration, unterstützt das Zellüberleben von Endothelzellen und ist von enormer Bedeutung für ein starkes VEGF Signal. Auch für die von VEGFA vermittelte branching (verzweigende) und sprouting (sprießende) Angiogenese ist NRP1 ein essentieller Faktor (Koch, Claesson-Welsh 2012). Des Weiteren reguliert NRP1 auch den VEGFR Transport in der Zelle und das Recycling von VEGFR. Wenn kein NRP1 vorhanden ist, kommt es zum vermehrten Abbau von VEGFR, aber mit Hilfe von NRP1 wird VEGFR erfolgreich recycelt und an die Zelloberfläche transportiert (Koch, Claesson-Welsh 2012, Parker, Guo et al. 2012).

1.7.2 TNF α

TNF α (tumor necrosis factor alpha) gehört in die Gruppe der inflammatorischen Cytokine. Entdeckt wurde TNF α 1975 in Sarkoma Meth A Zellen bei dem Versuch, Faktoren zu isolieren, die zytotoxische, Nekrose fördernde Wirkungen aufweisen. Ein weiterer, ähnlich schädlicher Faktor für Tumorzellen hat große Ähnlichkeiten mit TNF α : TNF β TNF β oder auch Lymphotoxin wird von Lymphoiden Zellen gebildet. TNF α dagegen wird zu einem großen Anteil von Monozyten/Makrophagen gebildet (Haider, Knofler 2009).

In der Plazenta verändert sich die Sekretion von TNF α im Verlauf der Schwangerschaft. Im 1. Trimester der Schwangerschaft bilden v.a. villöse Cytotrophoblasten, Syncytiotrophoblasten und invasive Trophoblasten TNF α . Mit Fortschreiten der Schwangerschaft verlagert sich die Expression von Trophoblasten hin zu den villösen stromalen Zellen. Gerade während der Invasion von Zellen bleibt die Bildung von TNF α gleichbleibend hoch oder nimmt sogar zu wie im Fall der extravillösen Trophoblasten, die Endothelzellen der Spiralarterien verdrängen. Später in der Schwangerschaft sinkt die TNF α Konzentration in invasiven Zellen. Auch konnte in Riesentrophoblasten kein TNF α isoliert werden (Haider, Knofler 2009).

1.7.2.1 Regulation von TNF α

Die Regulationsmechanismen der Transkription von TNF α sind vielschichtig und für einzelne Zelltypen spezifisch. Es ist bekannt, dass chronisch ischämische Zustände zu steigenden TNF α Konzentrationen führen. (Cvitic, Desoye et al. 2014) Auch Hyperglycämie kann in Trophoblasten TNF α -Ausschüttung bedingen. (Coughlan, Oliva et al. 2001)

Eine wichtige Aufgabe von TNF α in der Plazenta ist die Induktion der Apoptose von Trophoblasten. TNF α hat somit einen Einfluss auf die Zellerneuerung von Trophoblasten. Die Apoptoseinduktion durch TNF α wird in Trophoblasten sowohl des 1, als auch des 3. Trimester vermutet. In Trophoblasten aus dem 3. Trimester konnte die Einleitung der Apoptose durch ein Zusammenspiel aus Interferon γ (INF γ) und TNF α erreicht werden. In Trophoblasten des 1. Trimenons konnte festgestellt werden, dass Caspase 3 erhöht ist, was auf den Einfluss von TNF α zurückgeführt werden kann. Auch durch Entzündungen/Infektionen in der Schwangerschaft kann es zu erhöhten Werten von TNF α kommen. In einem Versuch konnte gezeigt werden, dass aktivierte mütterliche Monozyten syncytiale Apoptose durch TNF α initiieren. Eine Fehlerquelle in der Beurteilung der Funktion von TNF α könnte auch in der Isolierung von Trophoblasten durch Trypsin liegen. In anders isolierten invasiven Trophoblasten aus der Frühschwangerschaft konnte durch Zugabe von TNF α keine Apoptoseinitiation erreicht werden. Folglich könnte eine Vorschädigung der Trophoblasten durch Trypsin ein vermehrtes Ansprechen auf TNF α bedingen. Auch kann die Einleitung der Apoptose durch TNF α von verschiedenen Faktoren verhindert bzw. vermindert werden. Hierzu gehören u.a. auch EGF, bFGF, IGF-1 und PDGF. Aber nicht nur Trophoblasten können durch TNF α zur Apoptose gezwungen werden, sondern auch die glatten Muskelzellen der Gefäßwände der Spiralarterien in der mütterlichen Decidua. Hierfür fehlen aber noch klare Beweise und eine direkte Beteiligung von TNF α muss noch nachgewiesen werden (Haider, Knofler 2009).

Eine weitere Aufgabe von TNF α in der Schwangerschaft besteht auch in der Kontrolle der hCG-Expression in der Plazenta. In primären Trophoblasten verringert TNF α die hCG-Produktion und verhindert die Bildung von Syncytiotrophoblasten aus Zytotrophoblasten (Haider, Knofler 2009).

TNF α spielt v.a. in der Invasion von Trophoblasten eine Rolle. In 1. Trimester villösen Explantaten induzierte TNF α über die Aktivierung von PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) einen Rückgang in der Migration/Wanderung und Invasion

von Zellen. Aber TNF α beeinflusst auch positiv die Produktion von MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9) Trophoblasten des ersten Trimenons. MMP-9 gilt als ein wichtiges Enzym in der Invasion von Trophoblasten. Dies könnte auf einen Schutzmechanismus hinweisen um steigenden Cytokinkonzentrationen entgegenzuwirken. Aber auch eine vermehrte Menge von TNF α könnte Schäden verursachen, indem MMP-9 zu stark exprimiert wird und hierdurch Schäden der extrazellulären Matrix entstehen. So wurden erhöhte Konzentrationen von MMP-9 bei Präeklampsie festgestellt (Haider, Knofler 2009).

Die Rolle von TNF α innerhalb der Angiogenese ist noch nicht gut erforscht. TNF α werden proangiogene Eigenschaften nachgesagt und TNF α ist in der Lage, vermehrt VEGF freisetzen zu lassen. Der genaue Mechanismus ist hier aber nicht bekannt (Honorati, Cattini et al. 2004).

1.7.3 TNF α Rezeptoren

TNF α vermittelt seine Wirkung über zwei Rezeptoren: TNFR-1 und TNFR-2. Sie gehören zur TNF Rezeptor Superfamilie. In dieser Superfamilie sind mindestens 29 Transmembranproteine zusammengefasst, welche ihre Wirkung über intrazelluläre „Vermittlerproteine“ ausüben. Diese werden TRAFs (TNFR associated factors) genannt. Die Rezeptoren von TNF α formen Trimere und sind auch als solche aktiv. Typisch für die TNFR Superfamilie sind ihre 6 Cysteinreste. TNFR-1 und TNFR-2 besitzen jeweils 4 cysteinreiche Wiederholungen. Eine dieser cysteinreichen Regionen, genannt PLAD (pre-ligand binding assembly domain), verhindert, dass eine Autoaktivierung des trimeren Rezeptors stattfinden kann (Haider, Knofler 2009).

1.7.3.1 Expression

TNFR-1 wird allgemein gesehen von den meisten Gewebearten exprimiert, während TNFR-2 hauptsächlich in Immunzellen gefunden wird. Auch gibt es von beiden Rezeptoren lösliche Formen, die aus den extrazellulären Bestandteilen des Rezeptors bestehen. Diese besitzen aber anders als z.B. die sVEGFR-1 keine erhöhte Affinität, sondern binden TNF α schlechter als ihre membranständigen

Kollegen. Die lösliche Variante sTNFR-2 wird gebildet durch TACE (TNF-1-converting enzyme). Der Entstehungsmechanismus von sTNFR-1 ist unbekannt (Haider, Knofler 2009).

1.7.3.2 TNFR-1

Exprimiert wird TNFR-1 in der Plazenta v.a. von villösen Trophoblasten, Zellsträngen und von invasiven Trophoblasten in der Frühschwangerschaft. Am stärksten wird TNFR-1 wohl von Syncytiotrophoblasten gebildet und gleichbleibend stark exprimiert während der gesamten Schwangerschaft. Auch bilden diese Zellen die lösliche Form sTNFR-1 (Haider, Knofler 2009).

In Endothelzellen wird durch Aktivierung von TNFR-1 eine intrazelluläre Kaskade losgetreten. Durch den aktivierten TNFR-1 wird TRADD rekrutiert, welches dann eine Komplexbildung aus TRAF-2, RIP und FADD initiiert. Dieser aktiviert nun wiederum MAP-Kinase, NF- κ B und Caspase abhängige Apoptosewege. Auch der Weg von TRAF2-AIP1-ASK1-JNK/p38 kinase kaskade ist bekannt und bewirkt auch Apoptose (Luo, Luo et al. 2006).

In einem Mausmodell von „Gliedermaßenischämie“ konnte gezeigt werden, dass Mäuse ohne TNFR-1 eine höhere Dichte von Gefäßen erreichten als ihre Kontrollgruppe aus Mäusen ohne TNFR-2. Dies deutet daraufhin, dass TNFR-1 eine herunterregulierende Wirkung auf die Angiogenese hat. Auch eine geringere Endothelzellproliferation und verminderte Reife der Gefäße konnte festgestellt werden. TNFR-1 hat also wahrscheinlich eine antiangiogene Wirkung bei schwerer Ischämie (Luo, Luo et al. 2006).

1.7.3.3 TNFR-2

TNFR-2 kann in 1 Cytotrophoblasten des ersten Trimenons und im Syncytium nachgewiesen werden. Die Konzentrationen hier sinken mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft. Aber auch hier ist die Datenlage nicht klar, da es auch Arbeiten gibt, die hier keinen TNFR- nachweisen konnten. Steigende TNFR-2 mRNA Expression trat in villösen stromalen Zellen am Ende der Schwangerschaft auf.

Auch ist insgesamt die mRNA Expression von TNFR-2 ähnlich der von TNFR-1 in allen genannten Zellen schwächer (Haider, Knofler 2009).

Die oben schon genannten Versuche konnten auch zeigen, dass Mäuse ohne TNFR-2 weniger Hypoxie bedingte Angiogenese aufwiesen als ihre Kontrollgruppe. Auch Proliferation und Gefäßreife sind hier signifikant erniedrigt. Dies zeigt, dass TNFR-2 eine entscheidende Rolle innerhalb der durch Ischämie erzeugten Angiogenese spielt und TNFR-2 ein positiver Regulator der Gefäßneuentstehung ist (Luo, Luo et al. 2006).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass TNF α je nach Rezeptorlage antiangiogene Eigenschaften aufweisen kann, aber auch proangiogene Eigenschaften. Inwieweit die oben genannten Ergebnisse auch auf die Angiogenese innerhalb der Plazenta zutreffend ist, ist nicht klar, da hierzu Studien fehlen.

1.7.4 Leptin

Leptin ist ein nicht glykolysiertes Eiweiß, dessen Kristallstruktur derer anderer Cytokine wie IL-6, IL-11 usw. ähnelt. Im Menschen tritt Leptin vor allem durch seine regulierende Wirkung auf die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch in Erscheinung. So ist Leptin in der Lage, das Gewicht zu reduzieren, Insulinausschüttung zu unterbinden, den Verbrauch von Glucose und Lipolyse in Adipozyten zu induzieren und die Zuckeraufnahme aus dem Darm zu regulieren. Das Aufgabenfeld von Leptin ist riesig und so überrascht es nicht, dass Leptin auch von der Plazenta gebildet und in der Angiogenese eine Rolle spielt (Maymo, Perez Perez et al. 2011).

1.7.5 Expression in der Plazenta

In der Plazenta wird Leptin von Trophoblasten, Syncytiotrophoblasten und von fetalen Endothelzellen gebildet. Auch Cytotrophoblasten im 1. Trimester bilden Leptin (Cvitic, Desoye et al. 2014).

Reguliert wird Leptinexpression auf transkriptioneller Ebene am Promotor. Hier konnten verschiedene Regionen identifiziert werden, die einen Einfluss auf das Ableseverhalten des Leptinpromotors haben. Wichtig v.a. in Bezug auf die Angiogenese ist die Induktion der Leptinproduktion durch Hypoxie. Ähnlich wie VEGF besitzt auch Leptin in seinem Promotor sogenannte HREs. Diese bedingen ein vermehrtes Ablesen des Leptingens bei Sauerstoffarmut. Des Weiteren gehören CCAAT/C/EBP (enhancer binding protein), GRE (glucocorticoid response element), CRE (cAMP response element-binding protein), ERE (estrogens response element), IRE (Insulin response element), ARE (androgens response element), HRE (hypoxia response element), Sp1 (stimulant protein1), INSM (Insulinoma-associated protein 1) zu bekannten Regionen am Leptinpromotor (Maymo, Perez Perez et al. 2011).

1.7.6 Funktion von Leptin in der Entwicklung und in der Plazenta

Leptin spielt bei der Implantation des Embryos eine wichtige Rolle. Blastocysten produzieren Leptin und sekretorisches Endometrium stellt ein Effektorgewebe für Leptin dar. Des Weiteren sind Mutationen von Leptin als auch seiner Rezeptoren bekannt. Diese führen zu Übergewicht, Sterilität, Wachstumsverzögerung und zentralem Hypothyreoidismus (Maymo, Perez Perez et al. 2011).

Eine weitere Aufgabe von Leptin ist die Förderung der Proliferation der Trophoblasten. Auch vermindert Leptin die Apoptose. Leptin spielt außerdem eine Rolle für die Stimulierung der Bildung von Hormonen und Cytokinen. Dazu gehört u.a. die Förderung der Bildung von hCG in Trophoblasten. Auch kommt es zu einer vermehrten Aufnahme von Aminosäuren und einer verstärkten Produktion der ECM-Proteine und von Metalloproteinasen. Des Weiteren wird diskutiert, ob Leptin auch einen Einfluss auf das Immunsystem besitzt. Hier könnte es eher eine hemmende Auswirkung auf Entzündungen besitzen. In der Angiogenese hat Leptin eine fördernde Wirkung auf Endothelzellen in vitro. Auch für das Wachstum des Fetus spielt Leptin eine wichtige Rolle. In der Plazenta könnte Leptin gebildet werden, um einen erhöhten Nährstoffbedarf anzuzeigen und somit steht die Leptinbildung auch relativ zum Größenwachstum des Fetus. Möglicherweise fördert Leptin die Entwicklung des Pankreas. Erhöhte Leptinkonzentrationen könnten dazu führen, dass eine frühere Entwicklung des Pankreas induziert wird

und in der Folge der Fetus früher Insulin bildet und ein stärkeres Wachstum des Fetus ausgelöst wird (Maymo, Perez Perez et al. 2011).

In Bezug auf die Angiogenese konnte gezeigt werden, dass Leptin proangiogene Eigenschaften zugeschrieben werden können. So konnte gezeigt werden, dass Leptin eine positive Wirkung auf die Freisetzung von VEGF hat. VEGF ist, wie vorher schon beschrieben, einer der wichtigsten Faktoren in der Angiogenese. Aber nicht nur auf den Faktor VEGF besitzt Leptin eine regulierende Wirkung, sondern auch auf VEGF Rezeptoren. So wird VEGFR-1 durch Leptin weniger exprimiert, dagegen aber VEGFR-2 vermehrt. Wie oben beschrieben ist VEGFR-2 der wichtigste Rezeptor, um die proangiogenen Eigenschaften von VEGF zu induzieren. Diese Aufgaben sind höchstwahrscheinlich abhängig vom Schwangerschaftsstadium, da in späteren Entwicklungsstadien Leptin in EB-Modellen (embryonic stem cells derived embryoid bodies) die proangiogenen Eigenschaften nachlassen. So bewirkt Leptin hier eine Runterregulierung von VEGFR-2 zu einem späteren Zeitpunkt in den angesprochenen EB-Modellen. Inwieweit diese Ergebnisse auch auf die Angiogenese in der Plazenta zutreffen, ist unklar. Des Weiteren wurden für die angegebenen EB-Modelle Mausstammzellen verwendet (Kurtovic, Ng et al. 2015).

Ferner ist die Wirkung von Leptin wahrscheinlich spezifisch für den Zelltyp. So reagieren EPC-Zellen (endothelial progenitor cells) auf Leptin nicht mit vermehrter Proliferation (Wolk, Deb et al. 2005). Dies steht im Gegensatz zu HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cells) (Park, Kwon et al. 2001). Auch spielt die Konzentration von Leptin eine Rolle. So zeigen EPC-Zellen bei 10ng/ml eine höhere Rate von Gefäßbildung (tube formation) als bei einer Leptinkonzentration von 100 ng/ml (Wolk, Deb et al. 2005).

1.7.7 Leptin-Rezeptoren

Der Leptinrezeptor Ob-R wurde zuerst 1995 entdeckt. Es sind 6 Isoformen bekannt, von denen eine eine lösliche Form des Leptinrezeptors darstellt. Ihr fehlt die Transmembrandomäne. Zu beachten ist, dass alle Isoformen einen identischen extrazellulären Anteil haben und sich v.a. der intrazelluläre Anteil unterscheidet. Hier gibt es lange und kurze Formen der intrazellulären Domäne.

Die lange Form des Leptinrezeptors nennt sich OB-Rb und die kurzen Formen OB-Ra,c,d,f (Gorska, Popko et al. 2010).

Bindung von Leptin an seinen Rezeptor löst die Aktivierung von JAK2 (Janus tyrosine kinase 2) aus, was wiederum zur Aktivierung von STAT (signal transducers and activators of transcription) Proteinen führt. Diese aktivierten STAT Proteine (STAT3) begeben sich in den Zellkern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren (Gorska, Popko et al. 2010).

1.7.8 FGF

FGF wurde 1973 von Armelin in der Hypophyse entdeckt. In den durchgeführten Experimenten stimulierte Hypophysenextrakt das Wachstum einer Fibroblastenzelllinie (3T3-Zellen aus Mäusen)(Yun, Won et al. 2010). Gaspoddrowicz und Kollegen führten Versuche mit Gehirnextrakten von Kühen durch(Yun, Won et al. 2010). Auch diese Extrakte förderten das Wachstum von Fibroblasten. Bis heute sind 22 Mitglieder der FGF-Familie entdeckt worden. Im Menschen sind vier verschiedene FGF-Rezeptoren bekannt. Das Molekulargewicht der einzelnen FGF-Mitglieder liegt zwischen 14-16kDa. Die FGF-Familie wird nach Struktur, Aufgabe und charakteristischen Eigenschaften in 3 Gruppen unterteilt. FGF 1-10 bilden eine der drei Gruppen. Sie binden alle an einen FGF-Rezeptor. Am bekanntesten sind FGF1 (acidic form) und FGF2 (basic form). Die nächste Gruppe umfasst die Faktoren FGF11-14. Sie werden häufig auch als FGF homologe Faktoren bezeichnet (FGF homologues factors, FHF1-4). Sie binden nicht an einen der vier FGF-Rezeptoren sondern an „islet brain-2“ (IB2). Ihre Funktion üben sie durch intrazelluläre Kinase Scaffold Protein Regulation aus. Die letzte Gruppe besteht aus den FGF-Faktoren 16-23. Über diese Faktoren ist wenig bekannt. FGF15 existiert im Menschen nicht (Yun, Won et al. 2010).

Die am besten untersuchten FGF-Faktoren sind FGF1 und FGF2. Ihre Hauptaufgabe liegt in ihrer Angiogenese fördernden Wirkung. Sie unterstützen die Endothelzellproliferation und sind wichtig in der Vasculogenese. In einigen Versuchen an Tieren zeigte sich, dass FGF1 und FGF2 teilweise wirkungsvoller die Angiogenese fördern als VEGFA oder PDGF. FGF-Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung vieler unterschiedlicher

Zelltypen und Gewebearten. Sie fördern pluripotente Zellen und das Gefäßwachstum. In der Plazenta verhindert FGF4 die endgültige Differenzierung von Trophoblastenstammzellen und sie sind wichtig in der Selbsterneuerung dieser Zellen (Yun, Won et al. 2010).

Auch das FGF-2-Gen besitzt innerhalb seines Promotors HREs und IRES. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch in der Regulation von FGF-2 Hypoxie eine Rolle spielt. Aber auch hier ist der vorherrschende Mechanismus Zelltyp spezifisch (Cvitic, Desoye et al. 2014).

Die Plazenta selbst ist auch ein Ort, an welchem FGF gebildet wird. So produzieren Syncytiotrophoblasten, die die Villi umgeben, FGF2. Aber nicht nur Syncytiotrophoblasten stellen FGF2 her, auch Cytotrophoblasten im 1 Trimester bilden schon FGF2. Nahe dem Geburtstermin wurde die Genexpression von bFGF in der Plazenta gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass diese hoch ist im Syncytiotrophoblasten und in fetalen Membranen. Hohe Konzentrationen von bFGF-mRNA konnten in glatten Muskelzellen, die mittlere und größere Gefäße in der Plazenta umgeben, gemessen werden. Interessant ist auch, dass FGFR1-4 in der Plazenta gemessen wurden, nicht aber in der Decidua. Im Gegensatz dazu wurde FGF10 in Plazenta und Decidua gemessen (Yun, Won et al. 2010).

1.7.9 FGF Rezeptoren

Der FGF-Rezeptor besteht aus 3 extrazellulär gelegenen Ig-Domänen (D1-D3). FGF bindet an D3. Für die D3-Domäne sind verschiedene Splicing-Varianten bekannt. Sie binden die unterschiedlichen FGFs. Wird der FGF-Rezeptor durch die Bindung von FGF aktiviert, kommt es zur Rezeptor-Dimerisierung und es bildet sich ein Komplex aus FGF/FGFR/HSBG. In der Folge kommt es intrazellulär zur Transphosphorylierung von Tyrosinkinase. Dies löst die Aktivierung einer intrazellulären Signalkette aus. HSBG (heparan-sulfate-proteoglycane) ist ein Korezeptor des FGF-Rezeptors. HSBG ist entscheidend für die Aktivierung des FGF-Rezeptors (Tiong, Mah et al. 2013).

Das Expressionsmuster der einzelnen FGF-Rezeptoren verändert sich im Lauf der Schwangerschaft. Im 1. Trimester zeigen Hofbauer-Zellen die FGF-Rezeptoren 1-4. Auch Cytotrophoblasten und Syncytiotrophoblasten exprimieren FGFR1 und FGFR4. Im 2. Trimester ist die Verteilung ähnlich, hinzu kommt die Expression

von FGFR1 durch Blutgefäßwände. Im 3. Trimester ist die Verteilung von FGFR1 und FGFR2 ähnlich der im 2. Trimenons (Anteby, Natanson-Yaron et al. 2005).

1.7.10 EGF

1.7.11 Allgemein

EGF (epidermal growth factor) wurde 1962 von Stanley Cohen entdeckt (Zeng, Harris 2014). Dieser forschte ursprünglich an NGF (nerve growth factor) und injizierte in seinen Forschungen einen Extrakt aus der Submaxillardrüse in neugeborene Mäuse. In der Folge zeigten sich bei den Mäusen ein früheres Augenöffnen und Herausbrechen der Schneidezähne. Diese Ergebnisse konnten auf eine gesteigerte Anregung von epidermalen Wachstum und Keratinisierung (Verhornung) zurückgeführt werden. In der weiteren Forschung konnte EGF isoliert und charakterisiert werden (Zeng, Harris 2014).

EGF spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation, Differenzierung und Migration von verschiedenen Zelltypen, insbesondere aber für Epithelzellen (Zeng, Harris 2014).

EGF ist der Prototyp der I EGF-Familie, die aus Peptidwachstumsfaktoren besteht. In diese Familie gehören viele andere Faktoren wie TGF α (transforming growth factor alpha), HB-EGF (heparin-binding EGF), Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin und Epigen. Ihnen gemeinsam ist ihr struktureller Aufbau. Sie alle besitzen ein oder mehrere sogenannte EGF-Repeats/EGF-Motive in ihrer extrazellulären Domäne. Das EGF-Motiv besteht aus einer Sequenz von 35-40 Aminosäuren, die in regelmäßigen Abständen durch 6 Cysteine unterbrochen werden. Diese 6 Cysteine bilden zusammen 3 intramolekulare Disulfidbrücken. Interessant ist auch, dass alle Mitglieder dieser Familie an EGFR binden und dessen intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität auslösen können. In der Folge werden Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben und Motilität gefördert (Zeng, Harris 2014).

1.7.12 Expression

EGF ist in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachweisbar, wie z.B. in Milch, Speichel, Urin, Amnionflüssigkeit und im Plasma. EGF wird lokal gebildet durch die laktierende Brustdrüse, die Submaxillardrüse, die Niere, die Plazenta und die Brunner Drüsen im Duodenum. Der Hauptproduktionsort im Menschen für EGF ist die Niere. In der Plazenta wird EGF und EGFR auch produziert, hier u.a. von Trophoblasten, Makrophagen und in geringen Mengen von Endothelzellen und verschiedenen anderen Zelltypen. Während der Schwangerschaft steigt die EGF-Konzentration im Urin an. Sie erreicht ihren Höhepunkt in der 19-22 Schwangerschaftswoche. Bei Präeklampsie ist die Bildung von EGF signifikant verringert. Bei Schwangerschaftsdiabetes ist die maternale Serumkonzentration von EGF erhöht, in der Plazenta aber unverändert (Zeng, Harris 2014).

1.7.13 Funktion

EGF erfüllt eine Vielzahl an verschiedenen Aufgaben. In der Embryonalentwicklung unterstützt EGF das Wachstum des Embryos vor und nach erfolgter Implantation. Auch beim Eindringen des Trophoblasten in die Decidua ist EGF von Bedeutung. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass ein EGF-Mangel eine Wachstumsrestriktion des Embryos in Mäusen bedingen kann. In Mäusen sind Hauptorte der Bildung von EGF die Speicheldrüsen. Werden schwangeren Mäusen die Speicheldrüsen entfernt, kommt es zu einer Restriktion des Wachstums der Embryos. In der Plazenta spielt EGF eine wichtige Rolle. EGF, welches sowohl von Makrophagen und auch vom uterinen Gewebe gebildet wird, verstärkt das Wachstum von Trophoblasten und steuert den Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und die Bildung von MMP-9. Beide hier genannten Moleküle sind wichtig für die Gametogenese, Ovulation, Fertilität, die Frühentwicklung des Embryos und Embryoimplantation (Zeng, Harris 2014).

Lösliches EGF löst in MSC-Zellen (multipotential stromal cell) eine parakrine Ausschüttung von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie VEGF und HGF (hepatocyte growth factor) aus (Zeng, Harris 2014).

In der Entwicklung des Nervensystems spielt EGF eine entscheidende Rolle. In Anwesenheit von EGF differenzieren sich NC-Zellen (neural crest) zu neuronalen

und melanozytären Phänotypen aus. In Gegenwart von FGF2 entwickeln sich NC-Zellen zu Schwann-Zellen (Zeng, Harris 2014).

Eine weitere wichtige Aufgabe von EGF liegt im Ionentransport. EGF steuert unterschiedliche Ionentransportkanäle wie den epithelialen Natrium-Kanal (ENaC), Na/K/2Cl-Kotransporter und viele mehr. Diese Transportkanäle sind entscheidend für die Hämostase in verschiedenen Organen wie der Niere, Lunge und im Darm (Zeng, Harris 2014).

1.7.14 Rezeptoren

Der EGF-Rezeptor (EGFR, Erb1, HER1) ist ein transmembranärer Tyrosinkinase-Rezeptor des Typs 1. Er gehört zur EGFR/ErbB Superfamilie, zu der auch die Rezeptoren ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3, Erb4/HER4 gehören. Nach Bindung des Liganden kommt es zu einer Dimerbildung des Rezeptors. Hier sind sowohl Homodimere mit einem weiteren EGFR möglich als auch Heterodimere mit anderen Mitgliedern der EGFR-Familie. Nach der Dimerisierung kommt es zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase und zur Autophosphorylierung der c-terminalen spezifischen Tyrosin enthaltenden Reste. Diese dienen als Bindungsstellen für Signalmoleküle über die verschiedene Stoffwechselwege gestartet werden können. Zu diesen Stoffwechselwegen gehören: Ras/Raf/MEK/ERK, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR und PLC γ /PKC. Diesen Stoffwechselwegen ist gemein, dass sie Zellproliferation, Differenzierung usw. initiieren (Wieduwilt, Moasser 2008).

In der Plazenta wird EGFR stark exprimiert. Die Plazenta hat die größte Dichte an EGFR, verglichen mit allen nicht maligne entarteten Geweben. EGFR wird unter anderem exprimiert von villösen Syncytiotrophoblasten in Früh- und Spätschwangerschaft, im glatten Anteil der Zottenhaut, in extravillösen Trophoblasten Populationen und im mütterlichen uterinen Gewebe. Bei verschiedenen Krankheitsbildern ist die EGFR-Expression verändert. In Plazenta-Proben von an Präeklampsie erkrankten Frauen, konnte nachgewiesen werden, dass diese signifikant mehr EGFR mRNA aufweisen. Auch einige essentielle Signalproteine (Erk1/2, Akt, STAT3) des EGFR Signalweges innerhalb der Zelle sind in Plazenta-Proben von an Präeklampsie erkrankten Frauen vermehrt

(Hastie, Tong et al. 2016). Auch bei GDM ist die Expression von EGFR mRNA verändert. Hier ist der EGFR auch heraufreguliert (Grissa, Yessoufou et al. 2010). Des Weiteren führt eine Blockade des EGFR von primären Trophoblasten zu einer Verminderung der sFlt1 Sekretion um 30-70%. EGFR ist demnach an der Steuerung von sFlt1 beteiligt und steigert die Bildung von sFlt1 (Hastie, Tong et al. 2016).

1.7.15 IGF-2

1.7.15.1 Allgemein

Das Insulin/INS/IGF-System setzt sich zusammen aus 3 Liganden, 3 Rezeptoren und Bindungsproteinen von IGF-1 und IGF-2. Zu den Liganden gehören Insulin, IGF-1 und IGF-2 und deren Rezeptoren (Insulinrezeptor, IGF1R und IGF2R) (Cvitic, Desoye et al. 2014). IGF-1 und IGF-2 sind Einzelstrang-Polypeptide, die morphologisch dem Insulin ähnlich sind. Ihre Aminosäuresequenz ist zu 62% identisch mit der von Proinsulin. Im Gegensatz zu Insulin werden IGF-1 und IGF-2 von nahezu jeder Zelle im Körper gebildet, während Insulin nur von β -Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet wird. Auch IGF-1 und IGF-2 sind sich in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich; zwischen IGF-1 und IGF-2 ist die Aminosäuresequenz bis zu 70% identisch (Griffeth, Bianda et al. 2014).

1.7.15.2 Regulation

Reguliert wird IGF-2 einerseits über seine Bindungsproteine, die die Bioverfügbarkeit von IGF-2 regeln, andererseits über epigenetische Mechanismen wie genomic imprinting und DNS-Methylierung (Nawathe, Christian et al. 2016).

1.7.15.3 Funktion

IGF-2 spielt eine fundamentale Rolle in der fetalen Entwicklung, postnatal sinkt die Bedeutung von IGF-2 und wird ersetzt durch eine stärkere Expression von IGF-1. Die Hauptaufgabe von IGF-2 besteht in der Förderung des Zellwachstums und

in der Förderung der Zellproliferation. So führt eine verstärkte Expression von IGF-2 in Mäusen zu einem übermäßigen Wachstum der Plazenta und des Fetus. Umgekehrt kann bei einer Deletion des IGF-2-Gens festgestellt werden, dass das Gewicht der Plazenta und des Fetus abnimmt (Nawathe, Christian et al. 2016).

IGF-2 reguliert die Entwicklung und Funktion von Trophoblasten insbesondere am feto-maternalen Interface in der Plazenta. Auch ist IGF-2 ein wichtiger Faktor für die Deteminierung der Körpergröße (Griffeth, Bianda et al. 2014).

1.7.15.4 Expression

Produziert wird IGF-2 von mesenchymalen Zellen in der Plazenta sowie von Makrophagen und Endothelzellen. Die Expression von IGF-2 ist während der gesamten Schwangerschaft gleichbleibend. Während IGF-1 vor allem im Trophoblasten in allen Schwangerschaftsstadien gefunden werden konnte, findet man IGF-2 nicht im Syncytiotrophoblasten. Auch eine Expression von villösen und extravillösen Cytotrophoblasten, die 1. Trimester noch nachweisbar ist, ist bei Cytrophoblasten am Geburtstermin nicht mehr feststellbar (Cvitic, Desoye et al. 2014).

1.7.15.5 Rezeptoren

IGF-2 kann an verschiedene Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität binden. Mit hoher Affinität bindet IGF-2 an IGF1R, INSR-A und mit geringerer Affinität an INSR-A/IGF1R und INSR-B/IGF1R. Auch bindet IGF-2 an IGF2R (Griffeth, Bianda et al. 2014).

1.7.15.5.1 IGF1R

IGF1R ist ein Tyrosinkinaserzeptor. Er stellt ein heterotetrameres Glykoprotein dar, das aus 2 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist. Der IGF1R besteht aus 2 extrazellulären α -Untereinheiten und 2 transmembranären β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Durch Bindung von IGF-2 können 2 Signaltransduktionswege ausgelöst werden. Im Gegensatz zu anderen

Tyrosinkinasaserezeptoren, die direkt an zytoplasmatische Anteile ihrer Effektoren binden, wird das Signal hier über IRS-Proteine (insulin receptor substrate) weitergegeben. Es sind vier verschiedene IRS-Proteine bekannt. Durch diese IRS-Proteine können 2 Stoffwechselwege aktiviert werden. Zum einen kann der PI3K-Stoffwechselweg eingeschlagen werden (phosphatidyl-inositol 3-kinase) und zum anderen ein Weg über MAPK (mitogen activated protein kinase). Beide Wege sind bekannt für ihre proliferationsfördernden Eigenschaften sowie auch ihre metabolismusfördernden und ihre antiapoptischen Eigenschaften (Griffeth, Bianda et al. 2014).

Aber IGF-2 ist nicht der einzige Ligand, der in der Lage ist an IGF1R zu binden. Auch Insulin kann mit einer verringerten Affinität im Vergleich zum Insulinrezeptor an IGF1R binden. Des Weiteren bindet auch IGF-1 mit hoher Affinität an IGF1R (Griffeth, Bianda et al. 2014).

Exprimiert wird IGF1R in der Plazenta von villösen Cytotrophoblasten, Sycytiotrophoblasten, extravillösen Cytotrophoblasten, Makrophagen und von fetoplazentaren Endothelzellen (Cvitic, Desoye et al. 2014).

1.7.15.5.2 Insulinrezeptor

Der Insulinrezeptor ist gleich aufgebaut wie der IGF1-Rezeptor. Er besteht aus jeweils 2 α - und 2 β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Auch nutzt er die gleichen Signaltransduktionswege wie IGF1R. Auch er vermittelt seine Signale intrazellulär über IRS-Proteine und aktiviert die beiden Stoffwechselwege PI3K und MAPK (Griffeth, Bianda et al. 2014).

Des Weiteren ist bekannt, dass durch alternatives Splicen 2 Isoformen des Insulinrezeptors zustande kommen. Zwischen diesen Isoformen und IGF1R sind Heterodimere beschrieben, an die auch IGF-2 mit geringerer Affinität als für IGF1R und INSR-A binden kann (Griffeth, Bianda et al. 2014).

Nicht nur IGF-2 kann den Insulinrezeptor aktivieren, sondern auch Insulin und mit geringerer Affinität auch IGF-1 (Griffeth, Bianda et al. 2014).

1.7.15.5.3 IGF2R

IGF2R besitzt anders als INSR und IGF1R keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Er dient als „clearance“-Rezeptor für IGF-2. Kommt es zu einer Bindung von IGF-2 an IGF2R, wird IGF-2 in Lysosomen abgebaut. Auch zeigen Mäuse ohne (einen) IGF2R erhöhte Konzentrationen von IGF-2 und in der Folge kann eine vergrößerte Plazenta und ein verstärktes Zellwachstum nachgewiesen werden (Harris, Crocker et al. 2011).

Exprimiert wird IGF2R von Syncytiotrophoblasten am Ende der Schwangerschaft. Auch konnte IGF2R in 1. Trimester Trophoblasten nachgewiesen werden (Harris, Crocker et al. 2011).

1.8 Hypothese und Ziel der Arbeit

Da die Vaskularisierung der Plazenta bei Diabetes erhöht ist, und Plazentazellen eine reiche Quelle an pro-angiogenen Faktoren sind (Cvitic, Desoye et al. 2014), ist die Hypothese dieser Arbeit, dass bei GDM Plazentazellen vermehrt proangiogene Faktoren bilden.

Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkung von GDM auf die Sekretion der proangiogenen Faktoren VEGF, PlGF, TNF α , Leptin, FGF-2, EGF, IGF2 von verschiedenen Plazentazellen (Trophoblasten, Hofbauer-Zellen und Plazenta-Endothelzellen) zu untersuchen. Dazu wurden die Zellkulturmedien von Trophoblasten, Hofbauerzellen und Plazenta-Endothelzellen nach normalen (Kontrolle) und GDM Schwangerschaften mittels ELISA auf die Faktoren VEGF, PlGF, TNF α , Leptin, FGF, EGF und IGF2 untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Isolation Endothelzellen

Primäre fetoplazentare Endothelzellen wurden nach Standardprotokoll (Lang et al.2003) isoliert.

Hierbei wurden chorionische Gefäße zerschnitten und die gewonnen Präparate in 20 ml HBSS (Hanks Balance Salt Solution,Gibco) aufbewahrt. Im nächsten Schritt fand eine langsame Perfusion (2,5ml/min) dieser Präparate bei 37 °C mit 20ml Collagenase/Dispase (Roche, Mannheim, Deutschland), verdünnt mit HBSS auf 1:1, statt. Die Perfusionslösung wurde in einem Probenröhrchen mit 10ml FCS aufgefangen Die Lösung mit den darin enthaltenen Endothelzellen wurde bei 200 x g und 4 °C für 7 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in Endothelzellmedium (EBM, Lonza, USA) resuspendiert, das mit dem EGM-MV BulletKit (Lonza) supplementiert war. Im weiteren Verlauf wurden diese Zellen auf Kulturplatten ausgesät. Diese waren mit 1% Gelatine (Sigma-Aldrich) vorbehandelt. Die Endothelzellen wurden immunzytochemisch auf ihre Reinheit untersucht. Die isolierten Endothelzellen wurden bei 37 °C 21% Sauerstoff für inkubiert und der Überstand nach 48 h gesammelt und für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, um tote Zellen und Zelldebris zu entfernen. Die Überstände wurden bei -80 °C gelagert.

2.2 Isolation Makrophagen

Für die Isolation der Hofbauerzellen wurde das Protokoll, das von Tang et al (Tang et al. 2011) entwickelt wurde, verändert. Für die Charakterisierung (Dil-Ac-LDL Aufnahme, FACS Analyse, ELISA und Immunozytologie) der Hofbauerzellisolierung wurden 10 verschiedene Plazentas benutzt. Danach wurden 5 weitere Isolierungen für die Herstellung des konditionierten Mediums verwendet. Villöses Gewebe (60-100g) wurde zerkleinert und über Nacht bei 4 °C in PBS (phosphate buffered saline buffer) aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe drei aufeinanderfolgenden enzymatischen Verdauungsschritten unterzogen. Diese beinhalteten 0,25% Trypsin (Gibco, Lofer, Österreich), 0,2% DNase I in 25mM Hapes (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 2mM CaCl₂ und 0,8mM MgSO₄ in Hanks balanced Salt Solution (HBSS, Gibco). Die Verdauungsschritte fanden bei 37 °C statt. Nach jedem Schritt wurde das Gewebe mit PBS gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte durch Filtration durch Gaze und ein

100µm Sieb. Danach wurde das Gewebe mit Collagenase A (1mg/ml)/DNase I (0,2mg/ml) in RPMI-1640 (Gibco) für 1 Stunde bei 37 °C behandelt. RPMI-1640 enthielt 25mM HEPES, 5%FBS und 1% Antibiotikum/Antimykotikum. Die Zellsuspension wurde als nächstes durch Gaze und ein 70µm Sieb gefiltert und bei 4 °C und 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in RPMI Medium resuspendiert und auf einen diskontinuierlichen Percoll Gradienten (70% bis 10%) aufgetrennt. Die Gradientenschicht, die die Zellen enthielt, wurde herausgenommen und nach intensivem Waschen mit PBS wurden die Zellen immunologisch gereinigt. Dies geschah durch negative Selektion mit anti-EGFR-Antikörpern(clone528, Cat#MS-609-P0, Thermo Scientific, United Kingdom) und anti-CD10-Antikörpern(clone MEM-78, Cat#ab659, Abcam), die an magnetischen Beads gebunden waren (Tang et al.2011). Die verbliebenen Zellen wurden gezählt und bei 37 °C und 21% Sauerstoff in Makrophagenmedium (ScienCell, Carlsbad, USA) kultiviert. Nach einer Stunde in Kultur wurden die nicht angehafteten Zellen entfernt und die verbliebenen, hochgradig anhaftenden Makrophagen in Makrophagen Medium mit Supplements (ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA)weiter kultiviert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand gesammelt und für 5 Minuten bei 300xg zentrifugiert, um tote Zellen und Debris zu entfernen. Die Überstände wurden bei -80 °C aufbewahrt.

2.3 Isolation Trophoblasten

Primäre villöse Trophoblasten wurden aus reifen Plazentas (n=6) isoliert, wie bei Cervar et al., 1999 und Chen et al., 2010 beschrieben. Zerkleinertes villöses Gewebe wurde mit einer Lösung aus Trypsin/Dispase/DNase (Gibco, UK; Roche, Deutschland; Sigma, USA) behandelt. Nach einer Percoll-Gradient (Sigma) Zentrifugation, wurde eine negative Selektion mit MCA-81-gekoppelten magnetischen Beads (Sigma) durchgeführt, um eine reine Kultur aus villösen Trophoblasten zu erhalten. Die isolierten villösen Trophoblasten wuchsen in DMEM (Gibco), welches mit 10% FBS und mit Penicillin und Streptomycin (Sigma) supplementiert wurde. Nach der Isolierung wurden die Zellen auf ihre Viabilität und Differenzierung untersucht. Dazu wurde die Sekretion von β -hCG (Dade Behring, USA) (Polliotti et al.1995) gemessen. Die Reinheit wurde durch immunozytochemisches Anfärben mit dem Trophoblastenmarker Cytokeratin 7

(CK7, Dako, Denmark) (Cervar et al.1999) überprüft. Die frisch isolierten Zellen ($1,5 \times 10^6$ /ml) wurden in Plastikschaalen ausgesät und bei 37 °C in einer Mischung aus DMEM mit EBM Medium (1:1) mit 10% FCS und bei 21% Sauerstoff kultiviert. Nach 48h wurde der Überstand gesammelt und für 5 Minuten mit 300 x g zentrifugiert, um tote Zellen und Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde bei -80 Grad Celsius gelagert.

2.4 ELISA

ELISA-Ausführung

Diese wurden mit Hilfe des ELISA-Testkits von Peprotech auf die proangiogenen Faktoren VEGF, FGF, TNF α , EGF und PlGF hin untersucht. Zuerst wurde hierbei der jeweilige Capture-Antikörper mit PBS auf die angegebene Konzentration verdünnt und auf die Platten aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten mit Hilfe von 300 μ l Wash Buffer 4 mal gewaschen. Der nächste Schritt bestand nun in der Zugabe von 300 μ l Block Buffer, welcher für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. In dieser Zeit erfolgte die Herstellung der Standardreihen für die einzelnen proangiogenen Faktoren. Daraufhin wurden die Platten nochmals mit jeweils 300 μ l Wash Buffer 4 mal gereinigt und der Wash Buffer aus den Wells entfernt. Jetzt wurden die Standardreihen und die Proben aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den angegebenen 2 Stunden erfolgte ein 4maliger Waschgang mit Wash Buffer und die Entfernung desselben. Der nächste Schritt bestand im Auftragen des Detektions-Antikörpers, der mit Lösungsmittel auf die angegebenen Konzentrationen gebracht wurde. Dies wurde nun nochmals für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Detektions-Antikörper aus den Wells entfernt die Platten wurden 4 mal gewaschen. In jeden Well wurde nun 100 μ l Avidin-HRP Konjugat verdünnt mit Lösungsmittel in der Konzentration 1:2000 aufgetragen. Dies wurde nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein 4 maliger Waschgang mit Wash Buffer und die Zugabe von 100 μ l ABTS Liquid Substrat. Dies wurde nun bei

Raumtemperatur bis zur Farbentwicklung inkubiert und anschließend mit dem Fotometer über das Programm mittels Endpoint-ELISA bei 405nm mehrmals ausgemessen.

Des Weiteren wurde für IGF2 ein Testkit der Firma Abnova verwendet. Zur Durchführung wurde zuerst der Wash Buffer auf 1:30 mit destilliertem Wasser verdünnt und eine Standardreihe hergestellt. Die einzelnen Bestandteile (Standards, Platte etc.) wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Daraufhin wurden die Standards, Proben und die Kontrolle auf die einzelnen Wells aufgetragen und die Platte leicht geschüttelt. Danach wurde die Platte für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius inkubiert. Der nächste Schritt bestand in einem 5maligem Waschgang, wobei jeder Well vollständig mit Wash Buffer gefüllt wurde und dann mittels eines ELISA-Shakers für 2 Minuten gevortext wurde. Dann wurde der Wash Buffer vollständig aus den einzelnen Wells aspiriert. Diese Schritte wurden 5 mal wiederholt. Danach wurde 50µl HRP-Konjugat in jeden Well gegeben mit Ausnahme der beiden Kontrollwells. Nun wurde die Platte noch einmal für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius inkubiert. Danach erfolgte ein nochmaliger 5facher Waschgang wie vorher beschrieben. Der nächste Schritt bestand nun in der Zugabe von 50µl TMB chromogenic Reagenz A in jeden Well und danach die Zugabe von 50 µl TMB chromogenic Reagenz B. Nun kam die Platte für 30 Sekunden auf den ELISA-Shaker und wurde im Folgenden für 15 Minuten bei 37 Grad Celsius im Dunkeln inkubiert. Nun war in den einzelnen Wells eine leichte Blauschattierung zu sehen. Es wurde nun 50µl von der Stoplösung in jeden Well hinzugegeben wodurch sich nun eine gelbe Farbe zeigte. Die Platte wurde nun in einem Fotometer bei 450nm mittels Endpunkt Elisa und Excel ausgewertet.

3 Ergebnisse – Resultate

In den durchgeführten Tests zeigte sich, dass Trophoblasten und Makrophagen in der Plazenta proangiogene Faktoren sekretieren. Da sich während der Untersuchungen herausstellte, dass die Menge dieser Faktoren im Medium in den drei untersuchten Zelltypen sehr gering ausfiel, mussten die Proben aufkonzentriert werden. Die Probenmenge reichte aber nicht, um alle Faktoren so

zu messen, VEGF konnte deshalb nicht in den Trophoblastenmedien quantifiziert werden. Auffällig ist, dass Makrophagen innerhalb der Plazenta größere Mengen von TNF α produzieren als Trophoblasten. In den Medien der Endothelzellen konnten keine proangiogenen Faktoren nachgewiesen werden.

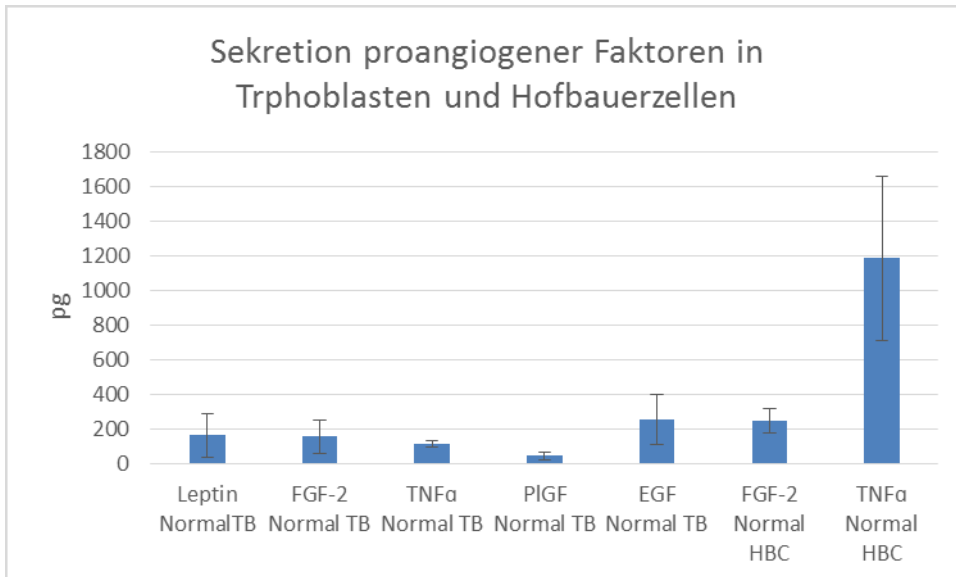


Abb.1 Sekretion pronangiogener Faktoren in Zellkulturmedien von Trophoblasten (TB) und Hofbauerzellen (HBC), dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung

3.1 Trophoblasten

In den getesteten Überständen der Trophoblasten konnten für die Faktoren EGF, FGF, PIGF keine Unterschiede zwischen den Überständen der Kontrollgruppe und der GDM-Gruppe festgestellt werden. VEGF wurde, da nicht genug Überstand vorhanden war, nicht getestet.

Für Leptin ergab sich ein nicht signifikanter Unterschied. Das Ergebnis des T-Tests ergab einen p-Wert von 0,08. Hier enthielt die Kontrollgruppe mehr Leptin als die GDM-Gruppe.

Da die Konzentrationen der einzelnen Faktoren sich in den Überständen als geringer herausstellten als angenommen, mussten diese aufkonzentriert werden. Hierdurch stand eine geringere Probenmenge zur Verfügung. Es konnten daher nicht alle Faktoren mit konzentrierten Proben gemessen werden. In der Folge

wurde darauf verzichtet VEGF mit konzentrierten Proben zu messen, da hier in Testläufen kaum Reaktionen mit den verwendeten Antikörpern stattfanden.

In den Überständen der Trophoblasten konnte Leptin nachgewiesen werden. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass diese Leptin produzieren, wie in der Literatur beschrieben. Ein signifikanter Unterschied zwischen den GDM und den Kontrollproben ergab sich nicht. Allerdings zeigte sich eine Tendenz. Leptin war in den Überständen der durch GDM beeinflussten Trophoblasten in geringeren Konzentrationen vorhanden. Dieser Unterschied stellte sich aber im T-Test als nicht signifikant heraus. Der T-Test ergab einen Wert von 0,08.

FGF2 war sowohl in den Überständen der gesunden Kontrollgruppe als auch in der GDM-Gruppe vorhanden. Auch hier gelang die Bestätigung, dass Trophoblasten FGF2 selbst bilden. Ein signifikanter Unterschied in der Konzentration zwischen den 2 Gruppen bestand nicht.

In weiterer Folge wurde PIGF in den Überständen der beiden Gruppen gemessen. PIGF wurde in beiden Gruppen nachgewiesen. Ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der GDM-Gruppe konnte nicht festgestellt werden. Der T-Test betrug 0,282.

Auch EGF wurde mittels ELISA in den Überständen der GDM-Gruppe und der Kontrollgruppe gemessen. EGF wurde von den Trophoblasten beider Gruppen gebildet. Eine Differenz zwischen den Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden.

Als letzten Faktor wurde IGF-2 gemessen. IGF-2 war in beiden Gruppen vorhanden-ein Unterschied war nicht nachweisbar.

Es gelang allerdings, einen signifikanten Unterschied festzustellen beim proangiogenen Faktor TNF α . Hier betrug der p-Wert 0,008. Es war hier mit im Mittel von 114,2pg in der Kontrollgruppe mehr TNF α enthalten als mit 18,9pg in der GDM-Gruppe.

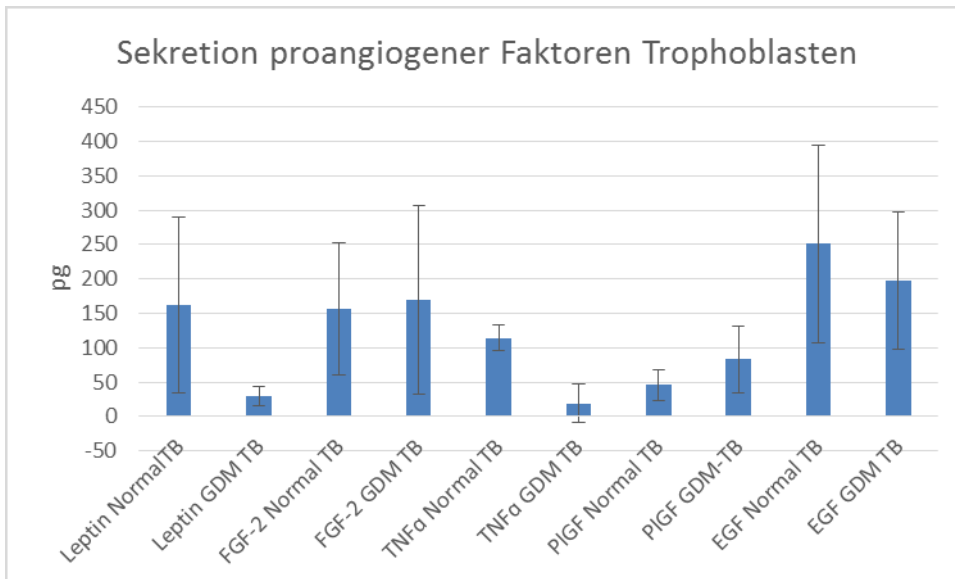


Abb.2 Sekretion proangiogener Faktoren in Zellkulturmedien von Trophoblasten(TB) der Kontrollgruppe (Normal TB) und der GDM-Trophoblasten (GDM TB), dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung

3.2 Makrophagen

Aufgrund der begrenzten Probenanzahl wurden hier nur die Faktoren FGF, VEGF, PIGF, TNF α untersucht. Auch hier stellte sich die erwartete Konzentration der Faktoren als vielfach geringer heraus als angenommen. Aufgrund der Annahme höherer Konzentrationen wurden die Überstände anfangs auf 1:20 verdünnt. Hier gelangen mit 1:20-fach verdünnten Proben der GDM-Makrophagen keine Ergebnisse, da die Konzentration für FGF unter die vom ELISA messbare Menge fiel. Daraufhin wurden die Proben 2,3-fach aufkonzentriert, aber auch hier konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Aufgrund der geringen Probenmenge konnten nur die Faktoren FGF und VEGF mit aufkonzentrierten Proben der GDM-Makrophagen getestet werden.

In den 2,3fach aufkonzentrierten Proben konnte FGF nachgewiesen werden. Sowohl Makrophagen der GDM-Gruppe als auch der Kontrollgruppe stellten FGF her. Ein Unterschied zwischen der GDM-Gruppe und der Kontrollgruppe ergab sich nicht. Außerdem wurden noch Überstände von Makrophagen, die bei 21% Sauerstoff kultiviert wurden untersucht.

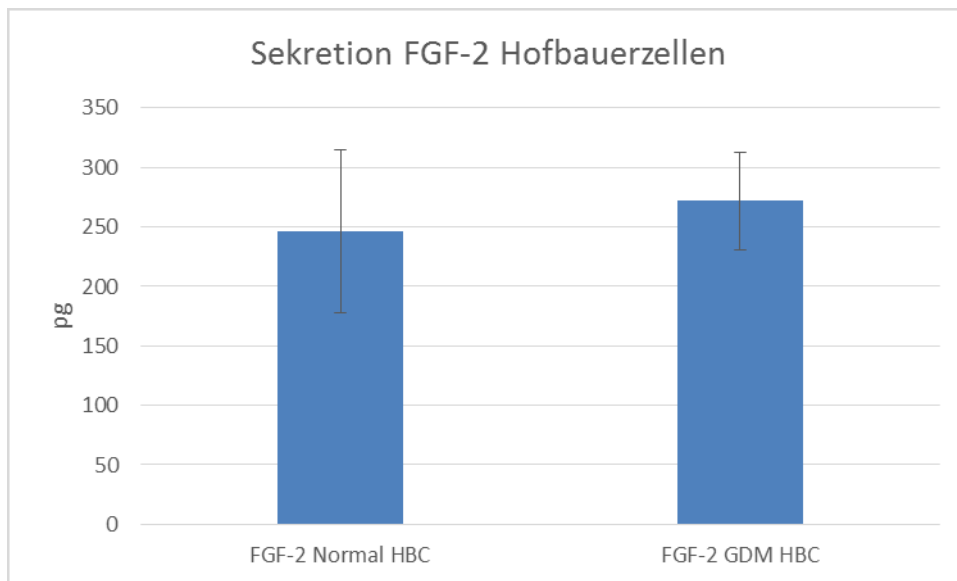


Abb.3 Sekretion FGF-2 in Zellkulturmedien von Hofbauerzellen(HBC) in der Kontrollgruppe (Normal HBC) und der GDM Hofbauerzellen (GDM HBC), dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung

3.3 Endothelzellen

In den Überständen der Endothelzellen konnten für die Faktoren VEGF, FGF, Leptin, PlGF und TNF α keine signifikanten Unterschiede zwischen der GDM-Gruppe und der Kontrollgruppe herausgefunden werden. Die Faktoren VEGF, FGF, Leptin, TNF α konnten mittels des ELISAs von Peprotech in den angegebenen Proben überhaupt nicht nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkung von GDM auf die Sekretion der proangiogenen Faktoren VEGF, PlGF, TNF α , Leptin, FGF-2, EGF, IGF2 von verschiedenen Plazentazellen (Trophoblasten, Hofbauer-Zellen und Plazenta-Endothelzellen) zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von GDM auf die Sekretion von proangiogenen Faktoren VEGF, PlGF, TNF α , Leptin, FGF-2, EGF, IGF2 von verschiedenen Plazentazellen (Trophoblasten, Hofbauer-Zellen und Plazenta-Endothelzellen) untersucht. Es zeigte sich, dass Hofbauerzellen mehr TNF α , FGF2 und VEGF sekretierten als Trophoblasten. Im Überstand von Endothelzellen konnten keine der proangiogene Faktoren nachgewiesen werden.

VEGF

Die VEGF Konzentration in den Überständen war entgegen den Erwartungen so niedrig, dass diese unverdünnt in den Überständen der Trophoblasten nicht nachzuweisen war. Dies galt sowohl für die Kontrollgruppe der Trophoblasten als auch für die GDM-Gruppe der Trophoblasten. Ursprünglich bestand die Hypothese einer vermehrten VEGF Produktion bei GDM, welche die Hypervaskularisation in der Plazenta bei GDM erklären würde. Jedoch findet sich in der Literatur auch vielfach eine Verringerung der VEGF-Expression bei GDM in den Zellen (Pietro, Daher et al. 2010). Weder das eine, noch das andere konnte aufgrund der geringen Menge von VEGF im Zellkulturüberstand hier nicht nachgewiesen werden.

Eine fehlende Sekretion von VEGF von Endothelzellen könnte darauf hinweisen, dass andere Zellen die VEGF sekretieren (zB Trophoblasten oder Hofbauer Zellen), die Angiogenese der Endothelzellen regulieren könnten.

PlGF

In den Überständen konnte kein Unterschied in der Sekretion zwischen GDM Trophoblasten und Kontrolltrophoblasten festgestellt werden. In der Literatur wird im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen bei GDM eine erniedrigte Konzentration von PlGF beschrieben (Cvitic, Desoye et al. 2014). Aber auch hier unterscheidet sich der Versuchsaufbau in wesentlichen Punkten. In einer Arbeit wurde die Plazenta von Ratten zur Bestimmung der PlGF-Konzentration bei Diabetes zuerst lysiert und im Lysat die Konzentration von PlGF mittels Western Blot gemessen (Koh, Sung et al. 2007). Auch wurde ein histologischer Schnitt der Plazenta angefertigt und dieses mittels ELISA auf PlGF Expression hin untersucht. Hierbei konnte eine erniedrigte Konzentration von PlGF bei DM festgestellt werden innerhalb von stromalen Zellen und Trophoblasten (Koh, Sung et al. 2007). In meiner Arbeit wurde der Überstand von vorher isolierten Trophoblasten auf eine Sekretion von PlGF untersucht während in anderen Arbeiten einfach Plazentagewebe lysiert wurde. Es fand keine Trennung der einzelnen Zelltypen statt.

TNF α

Hier konnte für TNF α eine signifikante Verringerung der Konzentration in den Überständen der Trophoblasten festgestellt werden bei GDM im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Arbeiten, in denen eine Erhöhung der Konzentration von TNF α bei GDM festgestellt werden konnte. Aber in diesen Arbeiten ist die Methodik eine andere. So wurde z.B. in einer Arbeit die Konzentration von TNF α und IL-10 im Plazentagewebe von Frauen mit einem durchschnittlichen Blut-Glukosewert von über oder unter 100mg/dl verglichen. (Moreli, Morceli et al. 2012). Die Gruppe mit einem durchschnittlichen Blutzucker über 100mg/dl zeigte erhöhte TNF α Werte in der Plazenta. Die IL-10 Konzentration zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In dieser Arbeit wurde keine Trennung der einzelnen Zelltypen vorgenommen und auch keine Kultivierung der Zellen durchgeführt. Auch existieren lösliche Formen der TNF α Rezeptoren. Diese könnten auch eine Rolle in der Regulierung von TNF α spielen.

Leptin

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Trophoblasten Leptin bilden und dieses in die Überstände sezernieren. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Überständen von normalen/gesunden Trophoblasten und Trophoblasten aus GDM-Schwangerschaften war nicht feststellbar. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz: die GDM-Trophoblasten produzierten weniger Leptin als die normalen Trophoblasten. Allerdings war dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,08 nicht signifikant. Das war überraschend, denn in der Literatur wird eine Erhöhung der Leptinkonzentration in der Plazenta von Frauen mit GDM beschrieben (Perez-Perez, Guadix et al. 2016). Aber auch in diesen Arbeiten wurden die Plazentaprobe nicht nach Zellarten getrennt und auch keine Zellkulturen angelegt.

FGF-2

Sowohl Trophoblasten als auch Plazenta-Makrophagen sezernieren FGF-2. Ein Unterschied in der Konzentration zwischen GDM-Trophoblasten und normalen Trophoblasten konnte nicht festgestellt werden. In der Literatur werden erhöhte FGF-2 Werte im Serum von GDM-Müttern und ihren Kindern beschrieben (Grissa, Yessoufou et al. 2010). Auch erhöhte FGF-2 mRNA Konzentration und erniedrigte Konzentration von FGF2-R-mRNA in GDM-Plazentas sind beschrieben (Grissa, Yessoufou et al. 2010). Im Gegensatz zu den hier durchgeführten

Untersuchungen wurden dort Plazentaprobe entnommen und mRNA isoliert. (Grissa, Yessoufou et al. 2010). Eine Unterscheidung der einzelnen Zelltypen und eine der Zellen Kultivierung wurde also nicht vorgenommen (Grissa, Yessoufou et al. 2010). Auch kann anhand dieser Arbeit keine Aussage zur Sekretion von FGF-2 getroffen werden, lediglich mRNA bestimmt wurde und nicht das fertige Protein, das sich von der Regulation der mRNA unterscheiden kann.

EGF

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass Trophoblasten EGF produzieren und sezernieren. Ein Unterschied in der Menge des produzierten EGFs zwischen GDM-Trophoblasten und normalen Trophoblasten konnte nicht festgestellt werden. Grissa, Yessoufou et al. (2010) konnten zeigen, dass im mütterlichen und kindlichen Serum bei GDM EGF erhöht ist. Des Weiteren ist die plazentare Expression von EGF-mRNA im Vergleich zu unkompliziert verlaufenden Schwangerschaften unverändert (Grissa, Yessoufou et al. 2010). Die Hauptproduktion von EGF im Menschen findet in der Niere statt (Zeng, Harris 2014). Das könnte bedeuten, dass EGF von der Plazenta sekretiert wird, aber nicht für die erhöhten EGF Serumwerte in GDM Müttern und deren Kindern verantwortlich ist.

IGF-2

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass Trophoblasten IGF-2 sezernieren. Es bestand kein Unterschied in der Expression zwischen GDM-Trophoblasten und normalen Trophoblasten. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Expression von IGF-2 bei Diabetes. So wird sowohl über eine Erhöhung der IGF-2-mRNA berichtet (Radaelli, Varastehpour et al. 2003) als auch über niedrigere IGF-2-Peptid Werte (Roth, Abernathy et al. 1996). Auch zu bei diesen Arbeiten verwendete Methodik bestehen Unterschiede. In beiden Arbeiten wurden keine Zellen isoliert und kultiviert.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit nur leichte Unterschiede in der Sekretion von proangiogenen Faktoren aus GDM-exponierten Zellen festgestellt. Eventuell könnten bei einer Wiederholung der Versuche mit einem größeren Kollektiv signifikante Unterschiede für weitere Faktoren gefunden werden. Grundsätzlich zeigten Hofbauerzellen die größten Mengen an sezernierten

proangiogenen Faktoren von insbesondere $\text{TNF}\alpha$ aber auch FGF2 . Dies hebt die besondere Rolle von Hofbauerzellen innerhalb der Angiogenese in der Plazenta hervor. Die einzelnen Rezeptoren, ihre löslichen Formen und deren Korezeptoren könnten eine Rolle in der veränderten Angiogenese in der Plazenta bei GDM spielen. So ist bekannt, dass bei GDM die Expression von VEGFR-2 erniedrigt ist. Dies könnte eine veränderte Konzentration von sflt1 zur Folge haben. Auch ist bekannt, dass sflt1 bei Hypoxie vermehrt gebildet wird. Auch die NRP-1 -Gen-Expression zeigt sich bei fetaler Wachstumsretardierung erniedrigt und Pazentas bei Wachstumsretardierung zeigen eine verminderte verzweigte Angiogenese (Maulik, De et al. 2016).

5 Literaturverzeichnis

ANTEBY, E.Y., NATANSON-YARON, S., HAMANI, Y., SCIAKI, Y., GOLDMAN-WOHL, D., GREENFIELD, C., ARIEL, I. and YAGEL, S., 2005. Fibroblast growth factor-10 and fibroblast growth factor receptors 1-4: expression and peptide localization in human decidua and placenta. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, **119**(1), pp. 27-35.

CHARNOCK-JONES, D.S., KAUFMANN, P. and MAYHEW, T.M., 2004. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta*, **25**(2-3), pp. 103-113.

CVITIC, S., DESOYE, G. and HIDEN, U., 2014. Glucose, insulin, and oxygen interplay in placental hypervascularisation in diabetes mellitus. *BioMed research international*, **2014**, pp. 145846.

EL-TARHOUNY, S.A., ALMASRY, S.M., ELFAYOMY, A.K., BAGHDADI, H. and HABIB, F.A., 2014. Placental growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 in diabetic pregnancy: A possible relation to distal villous immaturity. *Histology and histopathology*, **29**(2), pp. 259-272.

GORSKA, E., POPKO, K., STELMASZCZYK-EMMEL, A., CIEPIELA, O., KUCHARSKA, A. and WASIK, M., 2010. Leptin receptors. *European journal of medical research*, **15 Suppl 2**, pp. 50-54.

GRIFFETH, R.J., BIANDA, V. and NEF, S., 2014. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic and clinical andrology*, **24**, pp. 12-4190-24-12. eCollection 2014.

GRISSA, O., YESSOUFOU, A., MRISAK, I., HICHAMI, A., AMOUSSOU-GUENOU, D., GRISSA, A., DJROLO, F., MOUTAIROU, K., MILED, A., KHAIRI, H., ZAOUALI, M., BOUGMIZA, I., ZBIDI, A., TABKA, Z. and KHAN, N.A., 2010. Growth factor concentrations and their placental mRNA expression are modulated in gestational diabetes mellitus: possible interactions with macrosomia. *BMC pregnancy and childbirth*, **10**, pp. 7-2393-10-7.

HAIDER, S. and KNOFLER, M., 2009. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta*, **30**(2), pp. 111-123.

HARRIS, L.K., CROCKER, I.P., BAKER, P.N., APLIN, J.D. and WESTWOOD, M., 2011. IGF2 actions on trophoblast in human placenta are regulated by the insulin-like growth factor 2 receptor, which can function as both a signaling and clearance receptor. *Biology of reproduction*, **84**(3), pp. 440-446.

HASTIE, R., TONG, S., BROWNFOOT, F., HANNAN, N. and KAITU'U-LINO, T., 2016. *4 Epidermal growth factor receptor positively regulates sFlt1 secretion.*

HONORATI, M.C., CATTINI, L. and FACCHINI, A., 2004. IL-17, IL-1beta and TNF-alpha stimulate VEGF production by dedifferentiated chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage*, **12**(9), pp. 683-691.

KNÖRR, K., KNÖRR-GÄRTNER, H., BELLER, K., Fritz and LAURITZEN, C., 1989. *Geburtshilfe und Gynäkologie: Physiologie und Pathologie der Reproduktion*. 3.Auflage edn. Springer.

KOCH, S. and CLAESSION-WELSH, L., 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, **2**(7), pp. a006502.

KOH, P.O., SUNG, J.H., WON, C.K., CHO, J.H., MOON, J.G., PARK, O.S. and KIM, M.O., 2007. Streptozotocin-induced diabetes decreases placenta growth factor (PlGF) levels in rat placenta. *The Journal of veterinary medical science*, **69**(9), pp. 877-880.

KURTOVIC, S., NG, T.T., GUPTA, A., ARUMUGASWAMI, V., CHAIBOONMA, K.L., AMINZADEH, M.A., MAKKAR, R., DAFOE, D.C. and TALAVERA-ADAME, D., 2015. Leptin enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis in murine embryonic stem cells. *Microvascular research*, **97**, pp. 65-74.

MAJOR, H.D., CAMPBELL, R.A., SILVER, R.M., BRANCH, D.W. and WEYRICH, A.S., 2014. Synthesis of sFlt-1 by platelet-monocyte aggregates contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **210**(6), pp. 547.e1-547.e7.

MAULIK, D., DE, A., RAGOLIA, L., EVANS, J., GRIGORYEV, D., LANKACHANDRA, K., MUNDY, D., MUSCAT, J., GERKOVICH, M.M. and YE, S.Q., 2016. Down-regulation of placental neuropilin-1 in fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **214**(2), pp. 279.e1-279.e9.

MAYMO, J.L., PEREZ PEREZ, A., GAMBINO, Y., CALVO, J.C., SANCHEZ-MARGALET, V. and VARONE, C.L., 2011. Review: Leptin gene expression in the placenta--regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. *Placenta*, **32 Suppl 2**, pp. S146-53.

MORELI, J.B., MORCELI, G., DE LUCA, A.K., MAGALHAES, C.G., COSTA, R.A., DAMASCENO, D.C., RUDGE, M.V. and CALDERON, I.M., 2012. Influence of maternal hyperglycemia on IL-10 and TNF-alpha production: the relationship with perinatal outcomes. *Journal of clinical immunology*, **32**(3), pp. 604-610.

NAWATHE, A.R., CHRISTIAN, M., KIM, S.H., JOHNSON, M., SAVVIDOU, M.D. and TERZIDOU, V., 2016. Insulin-like growth factor axis in pregnancies affected by fetal growth disorders. *Clinical epigenetics*, **8**, pp. 11-016-0178-5. eCollection 2016.

NEVO, O., LEE, D.K. and CANIGGIA, I., 2013. Attenuation of VEGFR-2 expression by sFlt-1 and low oxygen in human placenta. *PloS one*, **8**(11), pp. e81176.

PARK, H.Y., KWON, H.M., LIM, H.J., HONG, B.K., LEE, J.Y., PARK, B.E., JANG, Y., CHO, S.Y. and KIM, H.S., 2001. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Experimental & molecular medicine*, **33**(2), pp. 95-102.

PEREZ-PEREZ, A., GUADIX, P., MAYMO, J., DUENAS, J.L., VARONE, C., FERNANDEZ-SANCHEZ, M. and SANCHEZ-MARGALET, V., 2016. Insulin and Leptin Signaling in Placenta from Gestational Diabetic Subjects. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, **48**(1), pp. 62-69.

PIETRO, L., DAHER, S., RUDGE, M.V., CALDERON, I.M., DAMASCENO, D.C., SINZATO, Y.K., BANDEIRA, C. and BEVILACQUA, E., 2010. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. *Placenta*, **31**(9), pp. 770-780.

RADAELLI, T., VARASTEHPOUR, A., CATALANO, P. and HAUGUEL-DE MOUZON, S., 2003. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes*, **52**(12), pp. 2951-2958.

ROTH, S., ABERNATHY, M.P., LEE, W.H., PRATT, L., DENNE, S., GOLICHOWSKI, A. and PESCOVITZ, O.H., 1996. Insulin-like growth factors I and II peptide and messenger RNA levels in macrosomic infants of diabetic pregnancies. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, **3**(2), pp. 78-84.

SIEGENTHALER, W. and BLUM, E., Hubert, 2006. *klinische Pathophysiologie*. 9.Auflage edn. Thieme.

TIONG, K.H., MAH, L.Y. and LEONG, C.O., 2013. Functional roles of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) signaling in human cancers. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, **18**(12), pp. 1447-1468.

ULFIG, N., ed, 2009. *Kurzlehrbuch Embryologie*. 2 edn. Stuttgart: Thieme.

VOGEL, M., 1992. *Atlas der morphologischen Plazentadiagnostik*. 1. Auflage edn. Springer.

WIEDUWILT, M.J. and MOASSER, M.M., 2008. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **65**(10), pp. 1566-1584.

WOLK, R., DEB, A., CAPLICE, N.M. and SOMERS, V.K., 2005. Leptin receptor and functional effects of leptin in human endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*, **183**(1), pp. 131-139.

WU, F., TIAN, F.J. and LIN, Y., 2015. Oxidative Stress in Placenta: Health and Diseases. *BioMed research international*, **2015**, pp. 293271.

YUN, Y.R., WON, J.E., JEON, E., LEE, S., KANG, W., JO, H., JANG, J.H., SHIN, U.S. and KIM, H.W., 2010. Fibroblast growth factors: biology, function, and

application for tissue regeneration. *Journal of tissue engineering*, **2010**, pp. 218142.

ZENG, F. and HARRIS, R.C., 2014. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Seminars in cell & developmental biology*, **28**, pp. 2-11.

ZIELLO, J.E., JOVIN, I.S. and HUANG, Y., 2007. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*, **80**(2), pp. 51-60.

