

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

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Systematische Untersuchung  
zur plazentaren Expression der humanen Galectine  
im ersten Trimenon und bei Gestationsdiabetes**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Laura Christina Unverdorben

aus Prien am Chiemsee

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Parhofer

PD Dr. Katrin Karl

Prof. Dr. Peter Bartenstein

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. med. Stefan Hutter

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

07.06.2018

Nach §4a der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München wird diese Dissertation als kumulative Doktorarbeit eingereicht.

## Inhaltsübersicht:

I.	Einleitung .....	1
A.	Lektine und Galectine: Expression und Funktion.....	1
1.	„Prototype“-Galectine.....	2
2.	„Chimera-type“-Galectine.....	5
3.	„Tandem-repeat-type“-Galectine .....	6
B.	Aufbau und Funktion der Plazenta .....	7
1.	Entwicklung und Aufbau .....	7
2.	Hormonproduktion in der Plazenta .....	9
3.	Feto-maternale Toleranz.....	9
C.	Rolle der Galectine in der feto-maternalen Toleranz .....	10
1.	Plazenta im ersten Trimenon .....	10
2.	Gestationsdiabetes mellitus (GDM) .....	11
D.	Zielsetzung .....	13
E.	Methodik.....	14
1.	Immunhistochemie .....	14
2.	Immunfluoreszenz.....	15
3.	Polymerase-Ketten-Reaktion .....	16
4.	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	16
F.	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	17
II.	Publikationen .....	18
A.	„Comparative analyses on expression of galectins1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells <i>in vitro</i> “ .....	18
B.	„Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies“ .....	19
III.	Zusammenfassung (Deutsch).....	20
IV.	Zusammenfassung/Summary (Englisch).....	22
V.	Literaturverzeichnis .....	24
VI.	Anhang .....	34
A.	Abbildungen .....	34
B.	Tabellen.....	34
C.	Abkürzungsverzeichnis.....	35
D.	Publikationsliste .....	37
VII.	Eidesstattliche Versicherung.....	38
VIII.	Danksagung.....	39

# I. Einleitung

## A. Lektine und Galectine: Expression und Funktion

Lektine sind kohlenhydrat-bindende Proteine, die unterschiedliche an Lipide oder Proteine gebundene Kohlenhydrate sowohl auf Zelloberflächen als auch in der extrazellulären Matrix erkennen und binden. Sie können viele unterschiedliche Funktionen wie die Vermittlung der Zelladhäsion und Zell-Zell-Interaktionen oder auch die Erkennung von pathogenen Strukturen haben [1].

Galectine, eine Untergruppe der Lektine, zeichnen sich durch ihre  $\beta$ -galactosid-bindende Eigenschaft und eine für alle Galectine charakteristische Aminosäuren-Sequenz aus [2]. Außerdem zeigen sie eine starke evolutionäre Konservierung der galectin-typischen Gensequenzen [3]. Derzeit sind 19 verschiedene Galectine bekannt. Davon sind bis heute 13 Galectine im menschlichen Körper in unterschiedlichen Organen beschrieben [4, 5].

Galectine sind Teil der Proteininteraktion und haben Einfluss auf die Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose [6]. Eine besondere Rolle spielen sie unter anderem in der Tumorforschung, da sie beispielsweise T-Zellfunktion und T-Zell-Überlebenszeiten beeinflussen können [1, 7-13]. Diese Eigenschaft wird auch für mögliche therapeutische Ansätze zur Tumorthherapie erforscht [12-14]. Zudem wird die Rolle von manchen Galectinen im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen und chronischer Entzündung untersucht [15-17].

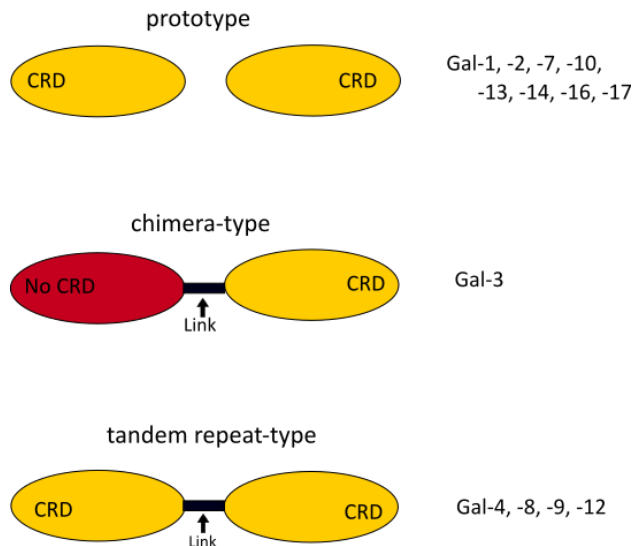
Im weiblichen Reproduktionstrakt, insbesondere in der Plazenta und im Endometrium, ist ein diffiziles Wechselspiel von Immunreaktionen bekannt. Galectine scheinen hierbei unter anderem eine Rolle in der Implantation zu spielen [18, 19]. Deshalb wurden bereits einige Galectine in diesen Gewebetypen auf ihre Expression und Funktion hin untersucht [4, 5, 20, 21].

Zu den Galectinen(Gal)-1 und -3 in der Plazenta und im Endometrium gibt es bereits viele Forschungsergebnisse [22-36]. Zu den anderen Galectinen fehlen derzeit noch umfassende Erkenntnisse im Bereich der Schwangerschaft.

Die Familie der Galectine zeichnet eine konservierte Kohlenhydrat-erkennende Region aus, im Englischen „carbohydrate-recognition domain“ (CRD) genannt, die aus 130 Aminosäuren besteht und für die kohlenhydrat-bindende Funktion verantwortlich ist [2, 37].

Anhand der Anzahl und Anordnung dieser CRDs können Galectine in drei Untergruppen unterteilt werden:

die Galectine „Prototype“, „Chimera-type“ und „Tandem-repeat-type“ [1, 38] (vgl. Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Einteilung der menschlichen Galectine nach struktureller Architektur - modifiziert aus: Jeschke et al. 2013 [4]

Im Folgenden sollen die einzelnen Galectine mit den wichtigsten Fakten und Funktionen nach derzeitigem Stand kurz dargestellt werden. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Expression in der Plazenta.

### 1. „Prototype“-Galectine

Zu den „Prototype“-Galectinen zählen Gal-1, -2, -7, -10, -13, -14, -16 und -17, die in menschlichen Geweben nachgewiesen sind [4, 39], und Gal-5, -11, -15, -19 und -20, die in nicht-menschlichen Geweben beschrieben werden [4, 5, 40-42].

„Prototype“-Galectine haben nur eine einzelne Galectin-typische CRD und können als Monomere, als Homodimere oder als Multimere vorliegen [43-45]. Sie stehen im Verdacht, die Immunmodulation zu beeinflussen [1, 4, 45-48]. In der Plazenta sind manche dieser Galectine, wie beispielsweise Gal-1, -2 und -13, in ihrer Expressionsstärke und ihrem Expressionsverteilungsmuster in Pathologien verändert, wie beispielsweise bei Präeklampsie, HELLP-Syndrom (Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets), aber auch Gestationsdiabetes (GDM) oder Früh-Abort [24, 34, 49-56]. Jedoch unterscheiden sich die einzelnen Expressionsmuster eines jeden „Prototype“-Galectins: Über Gal-1, als eines der ersten entdeckten Galectine, liegen detaillierte Kenntnisse vor. Es erkennt mit seinen CRDs Typ I und Typ II N-acetyllactosamin-Strukturen, die an allen komplexen N- und vielen O-gebundenen Glycoproteinen vorhanden sind [57, 58].

In Bezug auf die Plazenta ist Gal-1 vor allem im Trophoblast (intra- und extravillös) beschrieben [59-61]. Dies konnte sowohl in *In-Vitro*-Versuchen, teils auch in Tierversuchen für alle Schwangerschaftsabschnitte festgestellt werden [4, 23, 35, 62]. Es besteht der Verdacht, dass ein Zusammenhang der Gewebekonzentration mit der Serumkonzentration bestehen könnte und Gal-1 somit als

Serummarker für den Schwangerschaftsverlauf oder -ausgang fungieren könnte [34, 61]. Ähnliche Hinweise gibt es auch bei anderen „Prototype“-Galectinen wie Gal-7 und -13 [63, 64].

Gal-1 bindet Thomsen-Friedenreich(TF)-Antigen im extravillösen Trophoblast (EVT) und Syncytiotrophoblast der Plazenta und in BeWo-Chorioncarcinom-Zellen [30, 60]. TF-Antigen bindet wiederum an das essentielle Träger-Protein Mucin-1 (MUC-1), welches unter anderem als positiv korrelierender Faktor in der Entstehung von Ovarialkarzinomen bekannt ist [65, 66]. Zudem könnte die Bindung von Gal-1 an TF-Antigen wichtig für die Invasion des Trophoblasten in die mütterliche Dezidua sein [67]. Zusammen könnten Gal-1 und TF eine modulatorische Funktion auf die Immuntoleranz in der Schwangerschaft haben [33, 60].

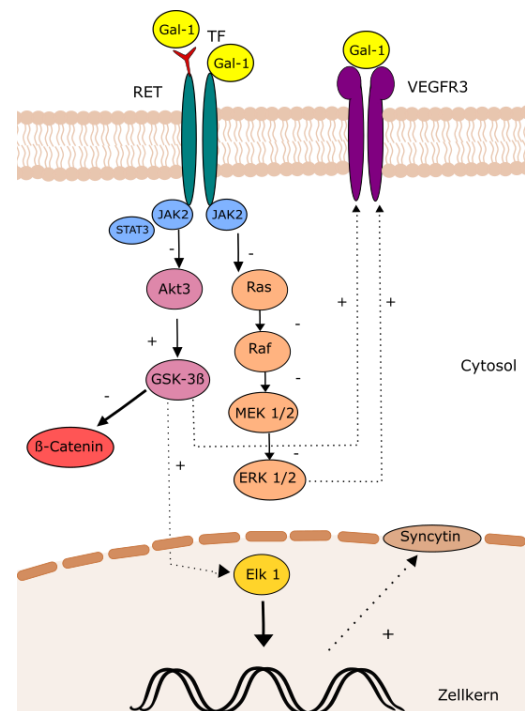
Für Gal-1 werden für die Signal-Transduktion vor allem Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) vermutet [17, 68] (Abbildung 2). Zusätzlich kann ein stimulierender Einfluss auf den vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) vermutet werden, welcher ebenfalls in der Plazenta beschrieben ist [69, 70].

**Abbildung 2:** möglicher vereinfachter Signaltransduktionsweg von Gal-1 in Trophoblastzellen im BeWo-Chorioncarcinom-Zellmodell:

Gal-1 bindet direkt oder über Thomsen-Friedenreich-Antigen an Membranproteinen und führt zu einer reduzierten Phosphorylierung der RTK „RET“. Hierdurch wird der MEK1/2/ERK1/2 Signaltransduktionsweg über JAK2 inhibiert. Dieser Weg betrifft ebenso STAT3 [70]. Eine Inhibition dieses Signaltransduktionsweges führt ebenso zur Inhibition der Syncytiumformierung [67].

Gal-1 hemmt auch die Phosphorylierung von Akt-3 und GSK-3 $\beta$ . Dies könnte eine bessere Bindung des Transkriptionsfaktors Elk1 zu seinen spezifischen Bindungspartnern vermitteln [70]. Zusätzlich kommt es zur Inhibition der Phosphorylierung von Beta-Catenin durch GSK-3 $\beta$  Kinaseaktivität, welche von Gal-1 inhibiert wird [27, 67]. Gal-1 stimuliert auch die Phosphorelierung von VEGFR3 an der Zellmembran, welches unter anderem über den MEK1/2/ERK1/2 Signalweg reguliert wird.

(Abbildung modifiziert aus [27])



Fischer et al. [27, 67] konnten zeigen, dass Gal-1 die Expression von membrangebundenen  $\beta$ -Catenin hemmt, welches ein Indikator für Zellfusion ist. Somit hat Gal-1 einen Effekt auf die Zell-Zell-Interaktion und auf die verminderte Syncytiumbildung in Trophoblastzellen und ebenso in Myoblasten [67, 71].

Für das erste Trimenon wurde dieser Effekt für weitere Galectine in der Plazenta mittels „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) im vorliegenden Artikel „Comparative analyses on expression of galectins 1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells *in vitro*“ untersucht [72].

Gal-2 ist in seiner Struktur Gal-1 ähnlich [73]. Die verminderte Expression in der Plazenta des dritten Trimenons ist in Zusammenhang mit der Präeklampsie beschrieben worden [56]. Darüber hinaus wurde auch eine verminderte Expression in Plazenten in Fällen von IUGR bei männlichen Föten gezeigt [74].

Gal-7 ist bereits im ersten Trimenon im Endometrium als auch im Syncytiotrophoblast und im extravillösen Trophoblast der Haftstiele der Plazenta immunhistochemisch nachweisbar [75]. Außerhalb der Schwangerschaft wurde es in der Wundregeneration des Endometriums nach der Desquamationsphase beschrieben [76]. In Epithelien spielt es eine Rolle in der Genese von Vulva-Karzinomen [77].

Gal-10 wird auch als eosinophiles Charcot-Leyden Crystal Protein (CLC) beschrieben [78, 79]. Es besitzt eine Lysosphosphatase-Aktivität und weist eine Interaktion mit CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen auf [80-82].

Gal-1, -2, -7 und -10 wurden in ihrer Expression in der Plazenta im ersten Trimenon nach spontanen beziehungsweise rezidivierenden Aborten systematisch untersucht. Sie alle waren im Trophoblast in beiden Fällen signifikant erniedrigt, weshalb ein möglicher Einfluss auf die Immunregulation in der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft vermutet wird [83].

Gal-13 wird auch als Placental-Protein-13 (PP-13) bezeichnet [84, 85]. Es wird hauptsächlich in der Plazenta exprimiert und ist besonders in Fällen der Präeklampsie erforscht [39, 50, 64]. Dabei korrelieren veränderte Blutserum-Werte von Gal-13 besonders im ersten Trimenon mit der Inzidenz einer Präeklampsie [53, 64, 86]. Es werden zusätzlich eine pro-inflammatorische Wirkung von Gal-13 auf Makrophagen sowie proapoptotische Effekte auf T-Zellen vermutet [4, 39, 87]. Da Gal-13 als Chemokin wirkt, könnte die Bildung von sogenannten ZONEs („zones of necrosis“) in der Dezidua gefördert werden [86]. Diese sehr plazentaspezifischen Ergebnisse sind dementsprechend auch für andere Krankheitsbilder interessant, weshalb Gal-13 einen besonderen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt. In der vorliegenden Studie im Rahmen dieser Dissertation konnte die Korrelation einer verminderten Gal-13-Expression in der Plazenta sowohl im Syncytiotrophoblast als auch im Trophoblast aus Schwangerschaften mit GDM im Vergleich zu gesunden Plazenten im dritten Trimenon gezeigt werden. Dies ist ein möglicher Hinweis für eine immunmodulatorische Wirkung von Gal-13 im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens in der GDM-Pathogenese [88].



Gal-14, strukturell ähnlich zu Gal-9, ist besonders in eosinophilen Granulozyten und im Rahmen allergischer Reaktionen bekannt [89-92]. Eine signifikant erniedrigte Expression in menschlichen Trophoblast-Zellen aus der Zervix uteri im ersten Trimenon ist mit einem unvorteilhaften Schwangerschaftsausgang assoziiert [93].

Zur Expression von Gal-16 ist *LGALS16* als kodierendes Gen in der Plazenta beschrieben [5, 94].

Ebenso ist zu Gal-17 bislang vergleichsweise wenig bekannt. Das korrelierende Gen zu Gal-17, *LGALS17*, konnte in 19 Geweben nachgewiesen werden, darunter auch in placentarem Gewebe [39]. Funktion und differenzierte Gewebeexpression in der Plazenta und in weiblichen Reproduktionsorganen bedürfen noch weiterer Forschung.

## 2. „Chimera-type“-Galectine

Der „Chimera-type“-Subtyp der Galectine enthält jeweils eine CRD und eine andere Nicht-CRD-Region. Bislang ist diesem Typ nur Gal-3 zugeordnet. Es ist in verschiedenen Geweben exprimiert, in besonders hohem Maße auch in der Plazenta [30]. Im extravillösen Trophoblast reifer Plazenten im dritten Trimenon war die Expression von Gal-3 neben Gal-1 in Fällen von Präeklampsie und HELLP-Syndrom im Vergleich zu normalen Plazenten (immunhistochemisch) erhöht. In Fällen der intrauterinen Wachstumsretardierung (intrauterine growth restriction = IUGR) gab es keinen Unterschied der Gewebeexpression im Vergleich zu gesunden Plazenten [30]. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Gal-3-Expression im Extravillösen Trophoblast in Fällen der Präeklampsie und des HELLP-Syndroms die verminderte Trophoblastinvasion ausgleichen könnte [30]. Im Mäusemodell wird eine Suppression der Gal-3-Expression vermutet, um eine erfolgreiche Implantation durch Modulation der Immunreaktion und Zell-Adhäsion zu ermöglichen [95].

Außerhalb der Schwangerschaft wurde Gal-3 als Faktor bei der Initiation der Adhäsion von Brust- und Prostata-Karzinom-Zellen am Endothel beschrieben [96, 97]. Auf molekularbiologischer Ebene hat Gal-3 auch einen Einfluss auf das Pre-splicing der DNA (Desoxyribonuclein-Acid) [26].

Neben Gal-1 und vielen weiteren Faktoren wie ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1), EGFR (epithelial growth factor receptor) oder beta-catenin bindet Gal-3 über TF-Antigen an das membrangebundene MUC-1 und kann hierüber intrazelluläre Signalkaskaden modellieren [98]. Dies ist besonders bei der Regulation von Tumorzellen wichtig [36, 98-100].

### 3. „Tandem-repeat-type“-Galectine

Zur Gruppe der „tandem-repeat-type“-Galectine gehören Gal-4, -6, -8, -9 und -12. Dieser Typ zeichnet sich durch zwei gleichartige miteinander verbundene CRDs aus [101].

Gal-4 ist in einer seriellen Analyse der Galectin-Familie in der menschlichen Plazenta beschrieben [39, 102]. Es bindet an Glycosphingolipide, aber auch an „Carcinoembryonic Antigene“ (CEA) an der Zelloberfläche, welcher unter anderem als Tumormarker diagnostisch genutzt wird [103, 104]. Ebenso wurden für Gal-4, -8 und -9 eine signifikant niedrigere Expression im Trophoblast männlicher Feten, die aus IUGR-Schwangerschaften stammten, beschrieben [102].

Gal-6 wurde bislang in Geweben der Maus gefunden und ist strukturell nahezu identisch zu Gal-4 [45].

Gal-8 besitzt eine große Spezifität für Leukozyten und kann Zelladhäsion aufgrund seiner di- oder multivalenten Struktur vermitteln [105, 106]. Ebenso sind proinflammatorische Effekte vor allem im Endothel bekannt [107]. Gal-8 bindet über Glucoseketten der Integrin-Familie an Leukozyten. Dadurch stehen oft Tumormodelle oder entzündliche Vorgänge im Vordergrund wie zum Beispiel die Genese von Colon- oder Bronchial-Karzinomen [9, 10, 106, 108-110]. In der Plazenta wurde Gal-8 im villösen und extravillösen Zytotrophoblast unter Zellkultur-Bedingungen beschrieben [111].

Gal-9 kann einerseits die Produktion geringerer Mengen proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin(IL)-17, IL-12 und Interferon(IFN)- $\gamma$  und andererseits die Differenzierung von naiven T-Zellen in T<sub>reg</sub>-Zellen induzieren [11, 112-121]. Außerdem wird unter anderem die Entwicklung von Th17-Zellen durch Gal-9 gehemmt [122]. Es wird eine wichtige Rolle in der Veränderung der Autoimmunität eines allogenen Implantats durch die Interaktion von Gal-9 mit dem T-cell immunoglobulin and mucin domain (TIM)<sub>3</sub>-Ligand angenommen [123, 124]. Somit kann ein Effekt von Gal-9 auf das semiallogene Implantat des Fetus in der Schwangerschaft nicht ausgeschlossen werden [125].

Die Expression von Gal-12 ist in peripheren Leukozyten im zirkulierenden Blut und in Adipozyten nachgewiesen [126]. Intrazellulär kann die mit Gal-12 korrelierende mRNA in Tumorzellen möglicherweise einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase hervorrufen und somit Zellwachstum supprimieren [127]. Außerdem führte eine Gal-12-Ablation in Mäusen zu einer erhöhten Lipolyse, verminderter Adipositas und erhöhter Insulin-Sensitivität [128, 129]. In IUGR-Schwangerschaften war die Expression von Gal-9 und -12 im extravillösen Trophoblast bei weiblichen Föten erhöht, während sie bei männlichen Föten erniedrigt war. Dabei war Gal-12 ebenso in endothelialen Zellen erhöht feststellbar [102]. Auf dieser Grundlage wird ein geschlechtsspezifisches Verhalten der „tandem-repeat-type“-Galectine in Fällen von IUGR in der Plazenta vermutet [102].

## B. Aufbau und Funktion der Plazenta

Die Plazenta ist als essentielles Organ in der Schwangerschaft für die Versorgung und den Stoffaustausch des heranwachsenden Kindes zuständig. Ebenso fungiert sie als Grenzzone zwischen Mutter und Kind und ist für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft wichtig [130, 131].

### 1. Entwicklung und Aufbau

Die Plazenta besteht sowohl aus mütterlichem als auch aus embryonalem Gewebe. Ihre Entwicklung beginnt mit der Nidation der Blastozyste in das Endometrium: Die äußere Schicht der Blastozyste, der fetale Trophoblast, wächst in das Stratum functionalis des Endometriums ein. Ab Implantation wird dieser Endometriumteil als Dezidua bezeichnet [132].

Die Plazenta gliedert sich in drei aufeinander abgestimmte Kompartimente [131, 132]: Basalplatte (maternales Gewebe), Chorionplatte (fetales Gewebe) und die dazwischen liegenden fetalen Zotten im intervillösen Raum. Das Stratum basale des Endometriums bleibt erhalten [131].

Im Verlauf der Schwangerschaft ist die Plazenta gekennzeichnet von zahlreichen Umbauprozessen, die den einzelnen Bedürfnissen und Anforderungen des jeweiligen Schwangerschaftsstadiums folgen.

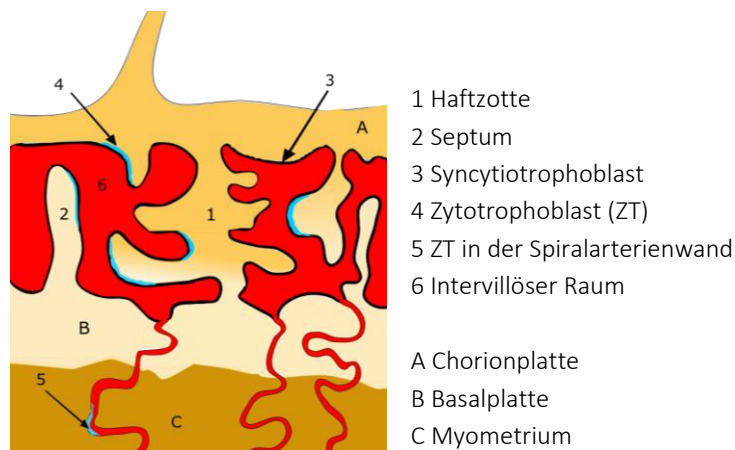
Der fetale Teil der Plazenta besteht aus der Chorionplatte mit extraembryonalem Mesoderm, Zytotrophoblast und Syncytiotrophoblast sowie der Nabelschnur, die mit Amnionepithel bedeckt sind. Der mütterliche Teil ist umgewandeltes Endometrium, in das fetale extravillöse Zytotrophoblastzellen einwandern. Somit findet hier ein wichtiger Kontakt von fetalen und mütterlichen Zellen statt, die einer besonderen Immuntoleranz bedürfen [131].

Zwischen fetalen und maternalen Teilen befindet sich der intervillöse Raum, der später über arrodierete endometriale Spiralarterien mit mütterlichem Blut gefüllt ist. Aus dem Chorion sprossen Zotten in den intervillösen Raum ein. Zunächst bestehen sie nur aus Trophoblast (Primärzotten), dann wandern ein Mesenchymkern (Sekundärzotten) und anschließend zusätzlich fetale Blutgefäße (Tertiärzotten) ein. Haftzotten sind mit der dezidualen Basalplatte verwachsen und sorgen so für die Haftung der Plazenta an der Dezidua [131].

Bis zum 4. Schwangerschaftsmonat teilen sich die Zytotrophoblastzellen mitotisch. Sie wandern unter anderem in die Spiralarterien des Endometriums ein und arrodieren sie. Dadurch füllt sich der intervillöse Raum mit mütterlichem Blut. Zugleich wird Endothel durch die Zytotrophoblastzellen ersetzt, wodurch ein Niederdrucksystem entsteht. Die Zytotrophoblastzellen an den Zotten verschmelzen allmählich zum Syncytiotrophoblast (Abbildung 3). Hierbei spielen unterschiedlichste Faktoren eine Rolle, wobei Gal-1 bei diesem Vorgang beteiligt zu sein scheint [27, 67].

Der Syncytiotrophoblast hat als vielkerniger Zellverbund im intervillösen Raum Kontakt zu maternalem Blut. Somit ist er ein wichtiger Bestandteil in der Erforschung der Galectine im Rahmen der feto-maternalen Toleranz [29, 64, 133].

Ab dem 5. Schwangerschaftsmonat nimmt der Zytotrophoblastzellanteil kontinuierlich ab, sodass am Ende der Schwangerschaft nur noch wenige Zytotrophoblastzellen vorhanden sind. Dies bringt Vorteile eines besseren Stoffaustausches und kürzerer Diffusionswege für das immer größer werdende Kind [131].



**Abbildung 3:** Schematische Zeichnung der Plazenta mit Terminalzotten ab dem 4. Schwangerschaftsmonat: Während des 4. Schwangerschaftsmonats verschwindet der Zytotrophoblast immer mehr, während er in der Basalplatte erhalten bleibt. Dort sind die Zytotrophoblastzellen zuvor in die Dezidua und das Myometrium sowie die Wand der Spiralarterien eingewandert.

(modifiziert aus: <http://www.embryology.ch/allemand/fplacenta/milleflles/milleflea2.html>; 01.03.2017)

Die beschriebenen Schichten bilden die Plazentaschranke. Hier findet kein direkter Blutaustausch statt. Die Versorgung und der Stoffaustausch des Kindes findet über Diffusion ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), erleichterte Diffusion (zum Beispiel Glucose über GLUT-1-Transporter), Pinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose (mütterliche IgG) statt [131].

## 2. Hormonproduktion in der Plazenta

Die meisten Hormone, die in der Plazenta produziert werden, dienen der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, inklusive Immunsuppression zur Toleranz des semiallogenen Keims, der Anpassung des Stoffwechsels der Mutter und Laktationsvorbereitung [131]. Die plazentare Hormonproduktion unterliegt im Gegensatz zu den meisten anderen endokrinen Drüsen keiner Rückkopplung mit anderen Drüsen.

Zu den wichtigsten Hormonen zählen das humane Choriongonadotropin (hCG), humane Plazentalactogen(hPL)/Somatomammotropin, Östrogen und Progesteron, und das Wachstumshormon GH-V [130, 131, 134].

## 3. Feto-maternale Toleranz

Der Fetus und seine Anteile in der Plazenta können durch das abweichende Erbgut und Oberflächenmarker als (Semi-)Allotransplantat bezeichnet werden [131]. Es werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert, die eine Abstoßung der Frucht vermeiden können [135-137]. Eine wichtige Rolle spielen T-Lymphozyten: Der Trophoblast entgeht einem Angriff dieser Immunzellen unter anderem durch die Expression von speziellen MHC-Proteinen wie HLA-G, um sich vor mütterlichen NK-Zellen zu schützen. Zusätzlich werden T<sub>reg</sub>-Zellen unter HLA-G-Einfluss im Thymus gebildet [138].

Auf humoraler Ebene sind zahlreiche Zytokine beschrieben, die eine inflammatorische Reaktion unterdrücken, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor (TNF) oder Interleukine [139, 140]. Ebenso vermindern Hormone, wie bereits einige oben genannt, das Risiko einer Abstoßung. Hier ist beispielsweise Progesteron zu nennen, welches auch prophylaktisch in der Schwangerschaft angewandt wird [141, 142].

Vor dem Hintergrund dieser unterschiedlichen Funktionen der Plazenta und der essentiellen Rolle in der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, hat die Plazenta durch Sekretion von Hormonen, Zytokinen und Induktion einer veränderten Immunzellreaktion auch eine systemische Wirkung auf den mütterlichen Organismus. Damit schafft die Plazenta ein spezielles immunologisches Milieu, in dem zahlreiche präzise aufeinander abgestimmte Prozesse erforderlich sind. Eine Störung in diesen Abläufen kann zur Pathogenese schwangerschaftsbedingter Erkrankungen führen [143]. Galectine als immunmodulatorische Lektine scheinen hier ebenfalls eine Rolle zu spielen [34, 50, 54, 62].

## C. Rolle der Galectine in der feto-maternalen Toleranz

### 1. Plazenta im ersten Trimenon

Die Plazenta bildet sich erst im Laufe des ersten Trimenons aus. Sie ist etwa ab der 12. Schwangerschaftswoche (SSW) voll funktionsfähig und kann die vollständige Progesteron-Synthese übernehmen. Trotzdem ist plazentares Gewebe durch die Invasion des Trophoblast und dezidualisierten Endometrium unmittelbar nach Beginn der Implantation auffindbar [144]. Kommt es in dieser Zeit zu Störungen der Trophoblast-Entwicklung, kann dies weitreichende Folgen für den weiteren Verlauf der Schwangerschaft haben. Dementsprechend kommt dem ersten Trimenon eine gewisse Schlüsselrolle zu: Bei einer Fehlanlage oder sonstigen embryonalen oder maternalen Fehlregulationen kann es direkt zu einem Abort und Verlust der Schwangerschaft kommen. Überdies liegt in dieser Zeit die Grundlage für viele Gestations-Erkrankungen wie beispielsweise der Präeklampsie oder dem HELLP-Syndrom, die im erst im dritten Trimenon schwerwiegende Komplikationen für Mutter und Kind hervorrufen [74, 145, 146].

In diesem Zeitraum spielen zahlreiche immunologische Faktoren eine Rolle, die eine Abstoßung des semiallogenen Fetus verhindern (s.o.). Hierzu gehören neben Signal-Proteinen wie zum Beispiel Interleukine und Zytokine, auch zelluläre Komponenten wie T<sub>reg</sub>-Zellen oder NK-Zellen [133, 147]. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wird einigen Galectinen eine Bedeutung in der feto-maternalen Toleranz zugeschrieben [4, 23, 33, 61, 148]. Eine Dysregulation in den Expressionsmechanismen wird als ein möglicher Faktor für frühe Schwangerschaftsaborte angenommen [83]. Jedoch ist auch die Kenntnis darüber wichtig, ab welchem Zeitpunkt es zu Veränderungen der Galectin-Expression kommt und wie diese sich im ersten Trimenon verhalten. Aufgrund dessen wurde mit der ersten hier vorliegenden Publikation eine systematische Evaluation der Galectin-Expression im ersten Trimenon durchgeführt [72].

Die Plazentaentwicklung ist von vielen Umbaumechanismen gekennzeichnet, die sich an den unterschiedlichen Anforderungen in der Schwangerschaft orientieren. Mit zunehmender Dauer der Schwangerschaft ist ein Verschwinden des Trophoblasten und dessen Umwandlung zu Syncytiotrophoblast zu beobachten. Das Phänomen der Syncytialisierung ist bereits im ersten Trimenon bekannt [27, 67]. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von Gal-1, -9, -10 und -12 in der Zellkultur nach 96h Inkubation anstieg [72]. Dies kann als Hinweis für Syncytium-Bildung gewertet werden. Besonders im Fall von Gal-1 konnte nun bei *In-Vitro*-Versuchen ein proportionaler Zusammenhang zwischen Gal-1 und Synzytium-Bildung in BeWo-Zellen festgestellt werden [27, 29, 67].

## 2. Gestationsdiabetes mellitus (GDM)

### Definition S3-Leitlinie Gestationsdiabetes Stand 2011:

*„Gestationsdiabetes mellitus (GDM, ICD-10: O24.4G) ist definiert als eine Glukosetoleranzstörung, die erstmals in der Schwangerschaft mit einem 75-g oralen Glukosetoleranztest (oGTT) unter standardisierten Bedingungen und qualitätsgesicherter Glukosemessung aus venösem Plasma diagnostiziert wird. Die Diagnose ist bereits mit einem erhöhten Glukosewert möglich.*

*Die diagnostischen Grenzwerte beruhen auf internationaler Konsensbildung durch Experten (IADPSG Consensus Panel 2010 [149])...“ [150]. Ebenso definiert die American Diabetes Association (ADA) GDM als erstmals aufgetretenen erhöhten Blutzuckerspiegel in der Schwangerschaft [151].*

Die aktuellen Diagnose- und Behandlungskriterien für Deutschland werden in der S3-Leitlinie für GDM festgelegt, derzeit wird eine Aktualisierung der Leitlinie erarbeitet [150].

Die Folgen von GDM sind vielfältig und meist mit vermehrten perinatalen Komplikationen verbunden. Hierzu gehören auf Seiten der Mutter ein erhöhtes Risiko für Amnioninfektionssyndrom, Polyhydramnion, Präeklampsie, Hypertonie und vorzeitigem Blasensprung (premature rupture of membranes/PROM) [134, 152-154].

Für den Fetus bestehen Risiken der plazentaren Insuffizienz, LGA (large for gestational age), Frühgeburtlichkeit oder diabetischer Embryo-Fetopathie, zu der die fetale Makrosomie, oder - bei frühem GDM - das kaudale Regressionssyndrom gehören [153]. Daraus folgen entsprechende peripartale Komplikationen wie Schulterdystokie oder Asphyxie, erhöhte Kaiserschnittraten, aber auch postpartale Hypoglykämie und höhere Inzidenzen für akutes Lungenversagen (Respiratory Distress Syndrome (RDS)) beim Neugeborenen [153, 155-157].

In einer Meta-Analyse konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Blut-Glucose-Wert und der Komplikationsrate gezeigt werden [156, 157].

Folgen des GDM wie fetale Makrosomie können bereits per Faktorenanalyse wie zum Beispiel von PAPP-A (Pregnancy-associated plasma protein A) frühzeitig korreliert werden [158, 159]. Meist wird jedoch die Diagnose des GDM in Deutschland erst durch den Screening-oGTT in der 25. - 28. SSW gestellt.

Obwohl GDM mit der Beendigung der Schwangerschaft meist vollständig ausheilt, haben Frauen, die an GDM litten, ein erhöhtes Lebenszeitrisiko an Diabetes mellitus Typ 2 oder kardiovaskulären Krankheiten zu erkranken [158, 160, 161]. Daher wird GDM auch als „Warnzeichen“ für die Notwendigkeit einer Lebensstiländerung gesehen. In einer Metaanalyse konnte eine postpartale Lebensstiländerung nach GDM das Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 oder zumindest eine pathologische Glukosetoleranz in manchen Studien vermindern [162].

Pathophysiologisch wird davon ausgegangen, dass GDM sich ähnlich entwickelt wie Diabetes mellitus Typ 2: die GDM-Patientinnen zeigen in der Schwangerschaft die ähnlichen Risikofaktoren wie Übergewicht/Adipositas, genetische Disposition, entsprechenden Lebensstil und Essgewohnheiten auf, wie potentielle Diabetes mellitus Typ 2-Patienten [150, 160, 161, 163].

Zusätzlich wird von einer epigenetischen Veränderung ausgegangen, die zu einem höheren Risiko führt, an GDM zu erkranken [164, 165]. Die pathogenetisch relevante Insulinresistenz ist mit Hypercholesterinämie und Hypertonie in der Schwangerschaft assoziiert [152, 160, 166].

Es ist bekannt, dass bereits in der normalen Schwangerschaft eine physiologische Insulinresistenz und daraus resultierende Hyperinsulinämie vorkommen [160, 167]. Eine Assoziation zwischen entzündlichen Faktoren wie TNF, IL-6 und CRP und Insulinresistenz konnte auch in normalen Schwangerschaften gezeigt werden [163, 168]. Bei schwangeren Frauen, die an GDM leiden, sind diese inflammatorischen Faktoren stärker erhöht als in normalen Schwangerschaften. Sie scheinen einen Einfluss auf die Entwicklung von verstärkter Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und resultierende Hyperglykämie zu haben [169-172].

Da Galectine in unterschiedlicher Art und Weise an Entzündungsabläufen, aber auch immunologischen Geschehen beteiligt sind, wird ihre Rolle bezüglich der Genese von GDM weiter erforscht. Aktuelle Erkenntnisse liegen vor allem für Gal-1 vor und lassen schließen, dass unter anderem eine Gal-1-Überexpression in der Plazenta im dritten Trimenon mit GDM assoziiert ist [51]. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde deshalb die veränderte Expression von plazentaspezifischem Gal-13 bei GDM in der Plazenta im dritten Trimenon mit Hilfe von Immunhistochemie und ELISA evaluiert. Dabei konnte eine erniedrigte Gal-13-Expression in Plazenten aus Schwangerschaften mit GDM festgestellt werden [88].



## D. Zielsetzung

Da Immunmodulation eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Schwangerschaft spielt, werden Galectine im Kontext der Schwangerschaft und der feto-maternalen Grenzzone immer intensiver beforscht [4, 34, 55, 61, 62]. Die Kenntnis der physiologischen oder pathologischen Expression der Galectine in der Plazenta könnte zu einem besseren Verständnis ihrer Rolle bei schwangerschaftsbedingten Erkrankungen führen und im weiteren Verlauf eine diagnostische oder eine therapeutische Relevanz besitzen.

Da die Grundlage für eine erfolgreiche intakte Schwangerschaft bezüglich der Plazenta vor allem im ersten Trimenon geschaffen wird, sollte die Expression einer großen Gruppe von Galectinen in normalen gesunden Plazentaprobe, gewonnen durch induzierten Abort, systematisch untersucht werden. Ziel war der Nachweis von Galectinen und die Ermittlung ihrer Expressionsstärke mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz. Eine Veränderung der Expressionsstärke im Rahmen der Syncytiumbildung wurde durch 96h-Zellkultur ohne Stimulation und PCR erforscht.

Im dritten Trimenon sind Galectine sowohl in gesunden Schwangerschaften als auch in placentaren Pathologien beschrieben [24, 30, 50, 51, 56, 63]. Galectine sind hier vor allem bei Pathologien, die mit einer strukturellen Dysfunktion der Plazenta assoziiert sind, beschrieben [49, 50].

Gal-1 konnte bereits im Zusammenhang mit der Schwangerschaftskomplikation GDM erforscht werden [51]. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass auch weitere „Prototype“-Galectine eine Rolle spielen könnten. Daher wurde Gal-13 als plazentaspezifisches Galectin aus derselben Gruppe herausgenommen, da es bereits in anderen Schwangerschafts-Komplikationen (Präeklampsie, HELLP) eine Rolle spielt [34, 49, 54].

Bedingt durch die späte Diagnose des GDM im zweiten beziehungsweise dritten Trimenon ist die Kohortenerhebung und Probenbeschaffung nur nach Diagnosestellung möglich. Daher wurden für die Studie Plazenten aus dem dritten Trimenon nach Geburt untersucht. Es wurden Proben aus gesunden Schwangerschaften (Kontrollen) mit GDM-Schwangerschaften verglichen.

Die Immunhistochemie wurde als Methode gewählt, weil mit ihr sowohl das Expressionsmuster der Zellen im normalen Zellverbund beurteilt als auch zusätzlich durch den IRS eine Bewertung der Expressionsstärke durchgeführt werden kann. Hierdurch sind sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen zur Expression im placentaren Gewebe möglich. Die Immunfluoreszenz wurde ergänzend eingesetzt, um eine Differenzierung der entsprechenden Zellarten im Zellverbund zu erreichen. Zur ergänzenden Untersuchung wurden Gal-13-Werte in Blut-Seren von mit GDM betroffenen Müttern zusätzlich per ELISA-Untersuchung mit den Gal-13-Expressionsdaten der Plazenta korreliert.

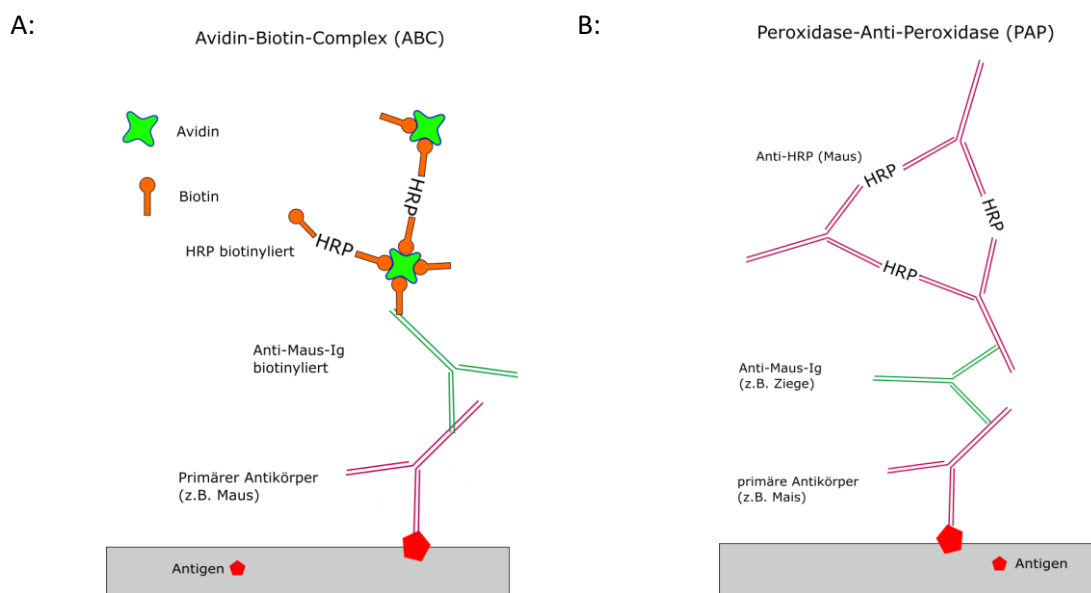
## E. Methodik

### 1. Immunhistochemie

Mit der Methode der Immunhistochemie können Expressionsmuster von Proteinen im Gewebeverbund sichtbar gemacht werden. Dies geschieht durch Einsatz von Primärantikörpern, die an das gesuchte Epitop binden. Durch verschiedene Methoden werden diese Primärantikörper sichtbar gemacht. Bei der direkten Methode sind die Primärantikörper mit einem Enzym oder Fluorogen markiert, welche nach Farbreaktion im Mikroskop direkt detektierbar sind. Meist wird jedoch die indirekte Methode durch Einsatz eines Sekundärantikörpers verwendet, der an den Fab-Teil des Primär-Antikörpers bindet [173]. Er löst, je nach Unterart und Detektionssystem, eine Enzymaktivierung oder Bindung eines weiteren markierten Antikörpers aus, die durch Farbreaktion im Mikroskop erkannt werden kann. Die Gegenfärbung wird mit Hämalaun durchgeführt, um entsprechende Strukturen wie Zellkerne zur Orientierung anzufärben.

Die häufigsten und in den vorliegenden Artikeln verwendeten Arten der Methoden zur Detektion und Verstärkung der Intensität und Spezifität sind:

- ABC-Methode (Avidin-Biotin-Enzym-Komplex; s. Abbildung 4A) [173]
- PAP-Methode (Peroxidase-Anti-Peroxidase Technik; s. Abbildung 4B) [173]



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der immunhistochemischen Detektionsmethoden (indirekte Methode).

(A): ABC-Methode (modifiziert aus [173])

(B): Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Methode (modifiziert aus [173])

HRP: Horseradish Peroxidase

**Auswertung:**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem semiquantitativen Immunreaktiven Score (IRS) bewertet. Er ist in der Pathologie besonders zur Diagnostik der Hormonsensitivität bei Mamma-Karzinom etabliert [174]. Der Score errechnet sich aus dem Produkt der Intensität (1-3 Punkte) und dem Anteil (1-4 Punkte) der positiven Zellen im Gesichtsfeld: **IRS= Intensität x Anteil**

<i>Punkte</i>	<i>Intensität</i>	<i>Anteil</i>
1	schwach positiv	0-10%
2	mittel positiv	11-50%
3	stark positiv	51-80%
4		81-100%

**Tabelle 1:** Bewertung der immunhistochemischen Färbung nach Remmele, 1986 [174]

Die Immunhistochemie mit IRS-Bewertung wurde für die vorliegenden Publikationen selbstständig durchgeführt. Die Methode wurde gewählt, um sowohl eine qualitative als auch quantitative Aussage über die Galectin-Expressionsmuster treffen zu können. Durch die Möglichkeit, im Mikroskop die einzelnen anatomischen Kompartimente zu erkennen, können Zelltypen bzw. Zellverbände in ihrer histologischen Umgebung beurteilt werden. Die Bewertung mit dem IRS ist etabliert. Eine subjektive, untersucherabhängige Komponente bei der Bewertung verschieden stark gefärbter Geweberegionen kann mit der Beurteilung durch zwei unabhängige Untersucher und deren Unkenntnis über die entsprechende Probe (Kontrolle vs. Probe) vermindert werden.

## 2. Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Epitope in Geweben oder Zellen ebenfalls mit Primärantikörpern belegt. Die daran bindenden Sekundärantikörper sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Deren Signal kann mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Durch unterschiedliche Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe können dadurch mehrere Antigene gleichzeitig in einem Gewebe beziehungsweise einer Zelle erkannt werden.

Meist wird eine zusätzliche Fluoreszenzfarbe für die Zellkerne zur Orientierung hinzugefügt, wie zum Beispiel der hier verwendete Farbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), der stark A-T-reiche Regionen der DNA bindet und im Fluoreszenzmikroskop blau erscheint.

In den vorliegenden Arbeiten wurde die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, um Zellen der Dezidua zu differenzieren: mütterliche deziduale Stromazellen und kindliche extravillöse Trophoblastzellen. Hierzu wurden als Marker für die extravillösen Trophoblastzellen Antikörper gegen Cytokeratin 7 (CK7) oder HLA-G verwendet [175, 176].

### 3. Polymerase-Ketten-Reaktion

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion, auch polymerase-chain-reaction (PCR) genannt, können zahlreiche Kopien einer ausgewählten Sequenz eines DNA-Abschnitts hergestellt werden. Dabei werden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte mit Primern markiert. Nach Denaturierung und Trennung des DNA-Doppelstrangs kann mithilfe einer Polymerase ab dem markierten DNA-Teil der Einzelstrang wieder vervollständigt werden. Durch ständige Wiederholung dieses Vorgangs werden zahlreiche Kopien des markierten Abschnitts erzeugt. Im Falle der quantitativen PCR (auch real-time-PCR genannt) werden diese Abschnitte zum Beispiel mit einem Fluorogen markiert. Dabei kann ein exponentieller Anstieg der Konzentration registriert werden und die Ausgangskonzentration des untersuchten DNA-Abschnittes genau bestimmt werden.

In diesem Kontext wird dies zur Diagnostik der Expressionsstärke eines Gens beziehungsweise eines DNA-Abschnitts, der für ein bestimmtes Protein kodiert, verwendet. Hierdurch kann eine quantitative Aussage über die Stärke der Expression des getesteten Gens getroffen werden.

In der Arbeit „Comparative analyses on expression of galectins1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells *in vitro*“ wurde die quantitative PCR zur vergleichenden Analyse aufgrund der Annahme eines Einflusses der Galectine auf die Syncytiumbildung im Trophoblasten durchgeführt. Die PCR der isolierten Trophoblastzellen wurde zum Entnahmezeitpunkt und nach 96h in Zellkultur ohne Stimulation durchgeführt.

### 4. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ELISA ist ein antikörperbasiertes Verfahren, das mittels einer enzymatischen Farbreaktion den quantitativen Nachweis eines bestimmten Proteins in einer komplexen Mischung anderer Bestandteile (zum Beispiel Blut) erbringen kann.

Dabei wird das Antigen auf einer Oberfläche direkt oder indirekt gebunden. Anschließend binden Primär- und/oder Sekundärantikörper, welche an Enzyme gekoppelt sind. Durch Substratzugabe kann die Enzymaktivität exakt gemessen und eine Antigenkonzentration sehr genau ermittelt werden. Daher wird ELISA für quantitative Proteinnachweise vor allem im Blutserum verwendet [177].

Im Artikel „Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies“ wurde ELISA zur Evaluation der Gal-13 Werte in Blut-Seren von Müttern mit GDM verwendet.

## F. Schlussfolgerungen und Ausblick

Im ersten vorliegenden Paper „Comparative analyses on expression of galectins 1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells *in vitro*“ wurde eine Expressionsanalyse für die Galectine 1-4, 7-10 und 12 in der gesunden Plazenta im ersten Trimenon durchgeführt. Hierbei konnten alle getesteten Galectine nachgewiesen werden und eine Beteiligung bei der Syncytiumbildung für Gal-1, -9, -10, -12 aufgrund erhöhter Expression nach 96h vermutet werden. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde bereits die Expressionsveränderung der Galectine in der Frühschwangerschaft bei spontanen oder rezidivierenden Aborten erforscht [83]. Um weitere Schlüsse bezüglich einer immunmodulatorischen Wirkung und Rolle der Galectine im Abortgeschehen oder gar einer möglichen (Früh-)Diagnostik zu ziehen, müssen zuerst die durchgeführten Studien ausgeweitet werden, da die vorliegende Arbeit nur wenige untersuchte Proben enthielt.

Die zweite Veröffentlichung „Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies“ zur Gal-13-Expression im dritten Trimenon bei GDM konnte durch immunhistochemische Färbungen und deren Bewertung eine erniedrigte Gal-13-Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe feststellen. Eine ELISA-Untersuchung erbrachte ebenso signifikant erniedrigte Gal-13-Werte in Blut-Seren von Frauen mit GDM im Vergleich zu gesunden Schwangeren. Da von einer Beeinflussung der Gal-13-Serumwerte durch eine Art Abschilferung in das mütterliche Blut ausgegangen wird, korreliert eine geringere Expression im Trophoblast möglicherweise mit niedrigeren Gal-13-Serumwerten [64].

Davon ausgehend wird vermutet, dass eine Galectin-Fehlregulation – je nach Untergruppe, Funktion und Expressionsort - zu einem Ungleichgewicht der Immuntoleranz mit erhöhter Komplikationsrate in der Schwangerschaft beitragen kann. Dies kann zur Entwicklung schwangerschaftsbedingter Erkrankungen führen, aber auch Faktor für die Entwicklung von Aborten sein [83]. Gal-1 wird deshalb bereits als prädiktiver Faktor für den Schwangerschaftserfolg vermutet [61]. Es bleibt abzuwarten, ob solche Ergebnisse für weitere Galectine auch in Bezug auf verschiedene Krankheitsbilder erreicht werden. Es wird an diagnostischen Methoden wie dem TRIC (trophoblast retrieval and isolation from the cervix) gearbeitet, womit Trophoblastzellen in der frühen Schwangerschaft ab der 5. SSW aus der Cervix uteri entnommen werden und auf Galectinexpression bezüglich dem Ausgang der Schwangerschaft getestet werden [93]. Auch in Bezug auf Gal-13 könnten vor allem die veränderten Blutserum-Werte auf neue diagnostische Möglichkeit hinweisen. Weitere Galectine sollten im Kontext des GDM ausführlicher untersucht werden.

## II. Publikationen

### A. „Comparative analyses on expression of galectins1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells *in vitro*“

Laura Unverdorben\*, Udo Jeschke\*, Laura Santoso, Simone Hofmann, Christina Kuhn, Petra Arck, Stefan Hutter

#### **Fundstelle:**

Histology and Histopathology 2016 Oct;31(10):1095-111.

DOI: 10.14670/HH-11-739

Epub 2016 Feb 22.

Comparative analyses on expression of galectins1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells in vitro.

Unverdorben L<sup>1</sup>, Jeschke U<sup>2</sup>, Santoso L<sup>1</sup>, Hofmann S<sup>1</sup>, Kuhn C<sup>1</sup>, Arck P<sup>3</sup>, Hutter S<sup>1</sup>.

#### Author information:

- <sup>1</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Ludwig Maximilians University of Munich, Munich, Germany
- <sup>2</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Ludwig Maximilians University of Munich, Munich, Germany. udo.jeschke@med.uni-muenchen.de.
- <sup>3</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, University of Hamburg, Hamburg, Germany.
- \* Contributed equally to this work

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26901464>

B. „Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies“

L. Unverdorben, R. Hüttenbrenner, J. Knabl, U. Jeschke, S. Hutter

**Fundstelle:**

Placenta. 2015 Feb;36(2):191-8

DOI: 10.1016/j.placenta.2014.11.019

Epub 2014 Dec 3.

Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies.

Unverdorben L<sup>1</sup>, Hüttenbrenner R<sup>1</sup>, Knabl J<sup>2</sup>, Jeschke U<sup>3</sup>, Hutter S<sup>1</sup>.

Author information:

<sup>1</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Ludwig Maximilians University of Munich, Maistraße 11, 80337 Munich, Germany.

<sup>2</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Klinik Hallerwiese, Diakonie Neuendettelsau, St.-Johannis-Mühlgasse 19, 90419 Nuremberg, Germany.

<sup>3</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Ludwig Maximilians University of Munich, Maistraße 11, 80337 Munich, Germany. Electronic address: udo.jeschke@med.uni-muenchen.de.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25499680>

### III. Zusammenfassung (Deutsch)

Galectine sind  $\beta$ -galactosid-bindende Lektine mit einer charakteristischen Aminosäure-Sequenz. Sie erkennen unterschiedliche gebundene Kohlenhydrate sowohl auf Zelloberflächen als auch in der extrazellulären Matrix [2, 38]. Bislang sind 19 Galectine bekannt, wovon 13 im menschlichen Körper exprimiert sind [4, 5]. Sie stellen eine relativ heterogene Gruppe der Lektine dar, die sehr unterschiedliche Expressionsmuster und Funktionsweisen in verschiedenen Geweben haben. Anhand ihrer molekularen Struktur werden sie in 3 Subgruppen („Prototype“, „Chimera-type“ und „Tandem-repeat-type“) gegliedert [1, 38]. Grundsätzlich wird der Familie der Galectine die übergreifende Funktion der Immunmodulation zugeschrieben, deren Bedeutung besonders im Rahmen der onkologischen und immunologischen Forschung erschlossen wird [1, 4, 13, 14, 18].

Erforscht werden die Galectine ebenso im Endometrium und der Plazenta bei Implantation beziehungsweise im Verlauf der Schwangerschaft [7, 8, 12, 13]. Im feto-maternalen Kontext der Plazenta wird vermutet, dass Galectine unter anderem eine Funktion in der Toleranz des mütterlichen Gewebes gegenüber dem semiallogenen Fetus haben [4].

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die Erforschung der Galectin-Expression in der Plazenta. Hierzu werden zwei Publikationen vorgelegt, welche sich mit der Thematik zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft befassen:

Die erste Veröffentlichung behandelt die systematische immunhistochemische Evaluation von 9 Galectinen im ersten Trimenon an gesunden Plazenten nach induziertem Abort [72].

Bei Störungen der Plazentaentwicklung im ersten Trimenon folgt oft eine Pathologie der Schwangerschaft: von Abort-Geschehen bis zur Präeklampsie oder HELLP-Syndrom. Da hier die Rolle der Galectine noch nicht geklärt ist, kann eine grundlegende Expressionsanalyse in der Plazenta die Basis für weitere Forschungen bieten. In der vorliegenden Arbeit „Comparative analyses on expression of galectins 1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells *in vitro*“ wurde die Galectin-Expression in der gesunden Plazenta des ersten Trimenons deskriptiv mittels Immunhistochemie erarbeitet. Anhand einer PCR-Analyse von isolierten Trophoblast-Zellen in einer 96h-Zellkultur ohne Stimulation wurde das Verhalten der Genexpression untersucht. Hierbei können durch Veränderung der Freisetzungstärke Hinweise auf eine Beteiligung der Galectin-Expression im Rahmen der Synzytium-Bildung abgeleitet werden.

Die zweite Veröffentlichung betrachtet speziell die Expression des plazentaspezifischen immunmodulatorischen Gal-13 in Plazenten aus dem dritten Trimenon bezüglich der Schwangerschaftskomplikation GDM versus gesunden Schwangerschaften.



In dem vorliegenden Artikel wurden Plazenten im dritten Trimenon nach Geburt aus Schwangerschaften mit GDM beziehungsweise aus gesunden Schwangerschaften auf die Gal-13-Expression mittels Immunhistochemie hin untersucht. Die Ergebnisse wurden in der vorliegenden Veröffentlichung „Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies“ publiziert [88]. Dabei konnte im Vergleich zu gesunden Schwangerschaften in der immunhistochemischen Färbung und Bewertung eine erniedrigte Gal-13-Expression sowohl im Syncytiotrophoblast als auch im Extravillösen Trophoblast in Fällen von GDM festgestellt werden. Die angeschlossene ELISA-Untersuchung erbrachte signifikant erniedrigte Gal-13-Werte in Blut-Seren von Frauen mit GDM. Eine Beeinflussung der Gal-13-Serumwerte wird durch eine Art Abschilferung von Gal-13 aus dem Trophoblasten in den intervillösen Raum und damit in das mütterliche Blut vermutet [86]. Dementsprechend korreliert eine geringere Expression im Trophoblast mit niedrigeren Gal-13-Serumwerten. Es konnte gezeigt werden, dass es möglicherweise durch die verminderte Gal-13-Expression zu einer Dysbalance in der Immuntoleranz kommt. Dies kann zu einer Inflammationskaskade beitragen, welche bei der GDM-Genese als eine von mehreren Einflussfaktoren vermutet wird.

In beiden Publikationen handelt es sich um Beschreibungen des Zustands der Galectinexpression in dem entsprechenden Trimenon der Schwangerschaft, um Eckdaten für weitere Untersuchungen zu erhalten. Es bedarf jedoch weiterer umfangreicherer Studien, um genauere Aussagen bezüglich des Einflusses der Galectine im Verlauf der Schwangerschaft und bei entsprechenden Schwangerschaftskomplikationen treffen zu können.

## IV. Zusammenfassung/Summary (English)

Galectins are  $\beta$ -galactosid-binding lectins with a characteristic amino acid sequence. They bind to different carbohydrates on the surface of cells as well as in extracellular matrix [2, 38]. By now, 19 galectins are known, 13 of them are expressed in human tissue [4, 5]. In general, galectins are a comparatively heterogeneous group of lectins with various expression patterns and functions in different tissues.

From their molecular structure, they are distinguished into three subgroups: proto-, chimera-, and tandem-type galectins [1, 38]. An immunomodulating function is known for the family of galectins [4, 18]. Their importance is becoming more apparent in the light of new findings, especially with their immunomodulating function in oncology or immunology [1, 13, 14].

Current research also includes galectin expression in the endometrium, in the early placenta after implantation and in later stages of pregnancy [7, 8, 12, 13]. Galectins could play an important role in the feto-maternal interface of the placenta possibly influencing the immunotolerance of maternal tissue against the semiallogeneous fetus [4].

In this thesis expression of galectins is examined in the placenta. For this purpose two publications are presented, which deal with this issue at different stages of pregnancy:

In the first publication systemic immunohistochemical expression of 9 galectins in the first trimester was evaluated in healthy placentas after induced abortion [72].

Pathologies like miscarriage, preeclampsia or HELLP-syndrome follow dysfunctions in placental development in the first trimester. As the role of galectins is not cleared yet, a basic analysis of galectin expression in healthy first trimester placentas was done for further investigations. The publication „Comparative analyses on expression of galectins 1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells *in vitro*“ shows a descriptive analysis of galectin expression in healthy placentas of the first trimester with immunohistochemistry. The variation of gene expression in healthy placentas in the first trimester was evaluated with PCR-analysis of isolated trophoblast-cells in 96h cell culture without stimulation. Changes in expression levels can be a sign for contribution of galectin-expression to syncytium-building of trophoblast cells.

The second publication deals with the expression of gal-13, which is immunomodulating and placentaspecific, in placentas of the third trimester in healthy pregnancies versus pregnancies affected with GDM.

In this study gal-13 expression in third trimester placentas from healthy pregnancies and pregnancies affected by GDM was examined after delivery by immunohistochemistry. Results were presented in the publication „Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies“ [88].

In immunohistochemistry analysis decreased gal-13 expression was found in the syncytiotrophoblast and in the extravillous trophoblast in cases of GDM in comparison to healthy placentas. The subsequent ELISA showed significantly lowered gal-13 levels in blood serum of pregnant women with GDM. A connection between gal-13 serum-levels and the level of expression in the trophoblast is assumed by previously described "shedding" as a kind of secretion of gal-13 by the trophoblast into the intervillous space and therefore maternal blood [86]. Consequently a lower expression of gal-13 in the trophoblast correlates with lower gal-13 serum levels. It was shown, that a lower expression of gal-13 might contribute to an imbalanced immunotolerance. Therefore an inflammatory cascade can be positively influenced, which is supposed to be one of several factors on GDM-pathogenesis. Both publications clearly describe the state of galectin expression in gestational progress in order to receive basic data for further investigations. There is need of further studies for evaluation of the role of galectins in the run of pregnancy and to identify any conclusions concerning altered galectin-expression in different complications in pregnancy.

## V. Literaturverzeichnis

1. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 29-41
2. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269: 20807-10
3. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 1999; 9: 979-84
4. Jeschke U, Hutter S, Heublein S, Vrekoussis T, Andergassen U, Unverdorben L, Papadakis G, Makrigiannakis A. Expression and function of galectins in the endometrium and at the human feto-maternal interface. *Placenta* 2013; 34: 863-72
5. Than NG, Romero R, Balogh A, Karpati E, Mastrolia SA, Staretz-Chacham O, Hahn S, Erez O, Papp Z, Kim CJ. Galectins: Double-edged Swords in the Cross-roads of Pregnancy Complications and Female Reproductive Tract Inflammation and Neoplasia. *J Pathol Transl Med* 2015; 49: 181-208
6. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 263-73
7. Bergemann C, Reimer T, Muller H, Hosel A, Briese V, Friese K, Jeschke U. Stimulation of hCG protein and mRNA levels in trophoblast tumour cells Jeg3 and BeWo by glycodelin A. *Anticancer Res* 2003; 23: 1107-13
8. Langbein S, Brade J, Badawi JK, Hatzinger M, Kaltner H, Lensch M, Specht K, Andre S, Brinck U, Alken P, Gabius HJ. Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance. *Histopathology* 2007; 51: 681-90
9. Nagy N, Bronckart Y, Camby I, Legendre H, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Van Ham P, Yeaton P, Pector JC, Zick Y, Salmon I, Danguy A, Kiss R, Gabius HJ. Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut* 2002; 50: 392-401
10. Caulet-Maugendre S, Birolleau S, Corbineau H, Bassen R, Desrues B, Bidon N, Delaval P, Ramee MP, Brichory F, Dazard L. Immunohistochemical expression of the intracellular component of galectin-8 in squamous cell metaplasia of the bronchial epithelium in neoplastic and benign processes. *Pathol Res Pract* 2001; 197: 797-801
11. Chabot S, Kashio Y, Seki M, Shirato Y, Nakamura K, Nishi N, Nakamura T, Matsumoto R, Hirashima M. Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology* 2002; 12: 111-8
12. Vladoiu MC, Labrie M, Letourneau M, Egesborg P, Gagne D, Billard E, Grosset AA, Doucet N, Chatenet D, St-Pierre Y. Design of a peptidic inhibitor that targets the dimer interface of a prototypic galectin. *Oncotarget* 2015; 6: 40970-80
13. Rabinovich GA, Conejo-Garcia JR. Shaping the Immune Landscape in Cancer by Galectin-Driven Regulatory Pathways. *J Mol Biol* 2016; 428: 3266-81
14. Enninga EA, Nevala WK, Holtan SG, Leontovich AA, Markovic SN. Galectin-9 modulates immunity by promoting Th2/M2 differentiation and impacts survival in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2016; 26: 429-41
15. Al-Ansari S, Zeebregts CJ, Slart RH, Peppelenbosch M, Tio RA. Galectins in atherosclerotic disease. *Trends Cardiovasc Med* 2009; 19: 164-9
16. Martinez-Martinez E, Calvier L, Fernandez-Celis A, Rousseau E, Jurado-Lopez R, Rossoni LV, Jaisser F, Zannad F, Rossignol P, Cachofeiro V, Lopez-Andres N. Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension. *Hypertension* 2015; 66: 767-75

17. Ge XN, Ha SG, Greenberg YG, Rao A, Bastan I, Blidner AG, Rao SP, Rabinovich GA, Sriramarao P. Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: E4837-46
18. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 274-84
19. Vasta GR. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Adv Exp Med Biol* 2012; 946: 21-36
20. Fitzgerald JS, Germeyer A, Huppertz B, Jeschke U, Knofler M, Moser G, Scholz C, Sonderegger S, Toth B, Markert UR. Governing the invasive trophoblast: current aspects on intra- and extracellular regulation. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 492-505
21. von Wolff M, Wang X, Gabius HJ, Strowitzki T. Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 189-94
22. Ahmad N, Gabius HJ, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology* 2004; 14: 817-25
23. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 2007; 13: 1450-7
24. Bozic M, Petronijevic M, Milenkovic S, Atanackovic J, Lazic J, Vicovac L. Galectin-1 and galectin-3 in the trophoblast of the gestational trophoblastic disease. *Placenta* 2004; 25: 797-802
25. Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. *Clin Immunol* 2012; 142: 107-16
26. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995; 92: 1213-7
27. Fischer I, Weber M, Kuhn C, Fitzgerald JS, Schulze S, Friese K, Walzel H, Markert UR, Jeschke U. Is galectin-1 a trigger for trophoblast cell fusion?: the MAP-kinase pathway and syncytium formation in trophoblast tumour cells BeWo. *Mol Hum Reprod* 2011; 17: 747-57
28. Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Barrientos G, Herse F, Thijssen VL, Weedon-Fekjaer SM, Schulz H, Wallukat G, Klapp BF, Nevers T, Sharma S, Staff AC, Dechend R, Blois SM. Interfering with Gal-1-mediated angiogenesis contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 11451-6
29. Hutter S, Morales-Prieto DM, Andergassen U, Tschakert L, Kuhn C, Hofmann S, Markert UR, Jeschke U. Gal-1 silenced trophoblast tumor cells (BeWo) show decreased syncytium formation and different miRNA production compared to non-target silenced BeWo cells. *Cell Adh Migr* 2016; 10: 28-38
30. Jeschke U, Mayr D, Schiessl B, Mylonas I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H. Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. *Placenta* 2007; 28: 1165-73
31. Ochieng J, Warfield P. Galectin-3 binding potentials of mouse tumor EHS and human placental laminins. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 402-6
32. Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, Hsu DK, Lukic ML. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res* 2012; 52: 100-10
33. Ramhorst RE, Giribaldi L, Fraccaroli L, Toscano MA, Stupirski JC, Romero MD, Durand ES, Rubinstein N, Blaschitz A, Sedlmayr P, Genti-Raimondi S, Fainboim L, Rabinovich GA. Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. *Glycobiology* 2012; 22: 1374-86

34. Schnabel A, Blois SM, Meint P, Freitag N, Ernst W, Barrientos G, Conrad ML, Rose M, Seelbach-Gobel B. Elevated systemic galectin-1 levels characterize HELLP syndrome. *J Reprod Immunol* 2016; 114: 38-43
35. Vicovac L, Jankovic M, Cuperlovic M. Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Hum Reprod* 1998; 13: 730-5
36. Yu LG, Andrews N, Zhao Q, McKean D, Williams JF, Connor LJ, Gerasimenko OV, Hilkens J, Hirabayashi J, Kasai K, Rhodes JM. Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion. *J Biol Chem* 2007; 282: 773-81
37. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 232-54
38. Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 1993; 3: 297-304
39. Than NG, Romero R, Goodman M, Weckle A, Xing J, Dong Z, Xu Y, Tarquini F, Szilagyi A, Gal P, Hou Z, Tarca AL, Kim CJ, Kim JS, Haidarian S, Uddin M, Bohn H, Benirschke K, Santolaya-Forgas J, Grossman LI, Erez O, Hassan SS, Zavodszky P, Papp Z, Wildman DE. A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 9731-6
40. Kaltner H, Solis D, Kopitz J, Lensch M, Lohr M, Manning JC, Murnseer M, Schnolzer M, Andre S, Saiz JL, Gabius HJ. Prototype chicken galectins revisited: characterization of a third protein with distinctive hydrodynamic behaviour and expression pattern in organs of adult animals. *Biochem J* 2008; 409: 591-9
41. Farmer JL, Burghardt RC, Jousan FD, Hansen PJ, Bazer FW, Spencer TE. Galectin 15 (LGALS15) functions in trophoblast migration and attachment. *FASEB J* 2008; 22: 548-60
42. Preston SJ, Beddoe T, Walkden-Brown S, Meeusen E, Piedrafita D. Galectin-11: A novel host mediator targeting specific stages of the gastrointestinal nematode parasite, *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 2015; 45: 791-6
43. Diehl-Seifert B, Uhlenbruck G, Geisert M, Zahn RK, Muller WE. Physicochemical and functional characterization of the polymerization process of the *Geodia cydonium* lectin. *Eur J Biochem* 1985; 147: 517-23
44. Gitt MA, Wiser MF, Leffler H, Herrmann J, Xia YR, Massa SM, Cooper DN, Lusic AJ, Barondes SH. Sequence and mapping of galectin-5, a beta-galactoside-binding lectin, found in rat erythrocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 5032-8
45. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; 19: 433-40
46. Paclik D, Werner L, Guckelberger O, Wiedenmann B, Sturm A. Galectins distinctively regulate central monocyte and macrophage function. *Cell Immunol* 2011; 271: 97-103
47. Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med (Berl)* 1998; 76: 402-12
48. Rabinovich GA, Toscano MA, Ilarregui JM, Rubinstein N. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj J* 2004; 19: 565-73
49. Blois SM, Barrientos G. Galectin signature in normal pregnancy and preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2014; 101-102: 127-34
50. Blois SM, Dechend R, Barrientos G, Staff AC. A potential pathophysiological role for galectins and the renin-angiotensin system in preeclampsia. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72: 39-50
51. Blois SM, Gueuvoghlian-Silva BY, Tirado-Gonzalez I, Torloni MR, Freitag N, Mattar R, Conrad ML, Unverdorben L, Barrientos G, Knabl J, Toldi G, Molvarec A, Rose M, Markert UR, Jeschke U, Daher S. Getting too sweet: galectin-1 dysregulation in gestational diabetes mellitus. *Mol Hum Reprod* 2014; 20: 644-9

52. Burger O, Pick E, Zwickel J, Klayman M, Meiri H, Slotky R, Mandel S, Rabinovitch L, Paltieli Y, Admon A, Gonen R. Placental protein 13 (PP-13): effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 2004; 25: 608-22
53. Chafetz I, Kuhnreich I, Sammar M, Tal Y, Gibor Y, Meiri H, Cuckle H, Wolf M. First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197: 35 e1-7
54. Than NG, Erez O, Wildman DE, Tarca AL, Edwin SS, Abbas A, Hotra J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan SS, Espinoza J, Papp Z, Romero R. Severe preeclampsia is characterized by increased placental expression of galectin-1. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21: 429-42
55. Than NG, Romero R, Kim CJ, McGowen MR, Papp Z, Wildman DE. Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 23-31
56. Hutter S, Martin N, von Schonfeldt V, Messner J, Kuhn C, Hofmann S, Andergassen U, Knabl J, Jeschke U. Galectin 2 (gal-2) expression is downregulated on protein and mRNA level in placentas of preeclamptic (PE) patients. *Placenta* 2015; 36: 438-45
57. Blechschmidt K, Mylonas I, Mayr D, Schiessl B, Schulze S, Becker KF, Jeschke U. Expression of E-cadherin and its repressor snail in placental tissue of normal, preeclamptic and HELLP pregnancies. *Virchows Arch* 2007; 450: 195-202
58. Abbott WM, Hounsell EF, Feizi T. Further studies of oligosaccharide recognition by the soluble 13 kDa lectin of bovine heart muscle. Ability to accommodate the blood-group-H and -B-related sequences. *Biochem J* 1988; 252: 283-7
59. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1673: 75-93
60. Jeschke U, Karsten U, Wiest I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H. Binding of galectin-1 (gal-1) to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen on trophoblast cells and inhibition of proliferation of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1 or an anti-TF antibody. *Histochem Cell Biol* 2006; 126: 437-44
61. Tirado-Gonzalez I, Freitag N, Barrientos G, Shaikly V, Nagaeva O, Strand M, Kjellberg L, Klapp BF, Mincheva-Nilsson L, Cohen M, Blois SM. Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2013; 19: 43-53
62. Conrad ML, Freitag N, Diessler ME, Hernandez R, Barrientos G, Rose M, Casas LA, Barbeito CG, Blois SM. Differential Spatiotemporal Patterns of Galectin Expression are a Hallmark of Endotheliochorial Placentation. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 317-25
63. Menkhorst E, Koga K, Van Sinderen M, Dimitriadis E. Galectin-7 serum levels are altered prior to the onset of pre-eclampsia. *Placenta* 2014; 35: 281-5
64. Than NG, Abdul Rahman O, Magenheimer R, Nagy B, Fule T, Hargitai B, Sammar M, Hupuczi P, Tarca AL, Szabo G, Kovalszky I, Meiri H, Sziller I, Rigo J, Jr., Romero R, Papp Z. Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch* 2008; 453: 387-400
65. Engelstaedter V, Heublein S, Schumacher AL, Lenhard M, Engelstaedter H, Andergassen U, Guenther-Biller M, Kuhn C, Rack B, Kupka M, Mayr D, Jeschke U. Mucin-1 and its relation to grade, stage and survival in ovarian carcinoma patients. *BMC Cancer* 2012; 12: 600
66. Jeschke U, Richter DU, Hammer A, Briese V, Friese K, Karsten U. Expression of the Thomsen-Friedenreich antigen and of its putative carrier protein mucin 1 in the human placenta and in trophoblast cells in vitro. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 219-26
67. Fischer I, Redel S, Hofmann S, Kuhn C, Friese K, Walzel H, Jeschke U. Stimulation of syncytium formation in vitro in human trophoblast cells by galectin-1. *Placenta* 2010; 31: 825-32
68. Locascio LE, Donoghue DJ. KIDs rule: regulatory phosphorylation of RTKs. *Trends Biochem Sci* 2013:

69. Schiessl B, Innes BA, Bulmer JN, Otun HA, Chadwick TJ, Robson SC, Lash GE. Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy. *Placenta* 2009; 30: 79-87
70. Fischer I, Schulze S, Kuhn C, Friese K, Walzel H, Markert UR, Jeschke U. Inhibition of RET and JAK2 signals and upregulation of VEGFR3 phosphorylation in vitro by galectin-1 in trophoblast tumor cells BeWo. *Placenta* 2009; 30: 1078-82
71. Georgiadis V, Stewart HJ, Pollard HJ, Tavsanoglu Y, Prasad R, Horwood J, Deltour L, Goldring K, Poirier F, Lawrence-Watt DJ. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn* 2007; 236: 1014-24
72. Unverdorben L, Jeschke U, Santoso L, Hofmann S, Kuhn C, Arck P, Hutter S. Comparative analyses on expression of galectins 1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells in vitro. *Histol Histopathol* 2016; 31: 1095-111
73. Sturm A, Lensch M, Andre S, Kaltner H, Wiedenmann B, Rosewicz S, Dignass AU, Gabius HJ. Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol* 2004; 173: 3825-37
74. Hutter S, Knabl J, Andergassen U, Hofmann S, Kuhn C, Mahner S, Arck P, Jeschke U. Placental Expression Patterns of Galectin-1, Galectin-2, Galectin-3 and Galectin-13 in Cases of Intrauterine Growth Restriction (IUGR). *Int J Mol Sci* 2016; 17: 523
75. Menkhorst EM, Gamage T, Cuman C, Kaitu'u-Lino TJ, Tong S, Dimitriadis E. Galectin-7 acts as an adhesion molecule during implantation and increased expression is associated with miscarriage. *Placenta* 2014; 35: 195-201
76. Evans J, Yap J, Gamage T, Salamonsen L, Dimitriadis E, Menkhorst E. Galectin-7 is important for normal uterine repair following menstruation. *Mol Hum Reprod* 2014; 20: 787-98
77. Jiang Y, Tian R, Yu S, Zhao YI, Chen Y, Li H, Qiao Y, Wu X. Clinical significance of galectin-7 in vulvar squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2015; 10: 3826-31
78. Dyer KD, Rosenberg HF. Eosinophil Charcot-Leyden crystal protein binds to beta-galactoside sugars. *Life Sci* 1996; 58: 2073-82
79. Dyer KD, Handen JS, Rosenberg HF. The genomic structure of the human Charcot-Leyden crystal protein gene is analogous to those of the galectin genes. *Genomics* 1997; 40: 217-21
80. Leonidas DD, Elbert BL, Zhou Z, Leffler H, Ackerman SJ, Acharya KR. Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure* 1995; 3: 1379-93
81. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, Richter C, Weingarten P, Warger T, Knop J, Mullner S, Wijdenes J, Schild H, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 2007; 110: 1550-8
82. Than NG, Sumegi B, Than GN, Berente Z, Bohn H. Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding human placental tissue protein 13 (PP13), a new lysophospholipase, homologue of human eosinophil Charcot-Leyden Crystal protein. *Placenta* 1999; 20: 703-10
83. Unverdorben L, Haufe T, Santoso L, Hofmann S, Jeschke U, Hutter S. Prototype and Chimera-Type Galectins in Placentas with Spontaneous and Recurrent Miscarriages. *Int J Mol Sci* 2016; 17
84. Bohn H, Kraus W, Winckler W. Purification and characterization of two new soluble placental tissue proteins (PP13 and PP17). *Oncodev Biol Med* 1983; 4: 343-50
85. Visegrady B, Than NG, Kilar F, Sumegi B, Than GN, Bohn H. Homology modelling and molecular dynamics studies of human placental tissue protein 13 (galectin-13). *Protein Eng* 2001; 14: 875-80
86. Kliman HJ, Sammar M, Grimpel YI, Lynch SK, Milano KM, Pick E, Bejar J, Arad A, Lee JJ, Meiri H, Gonen R. Placental protein 13 and decidual zones of necrosis: an immunologic diversion that may be linked to preeclampsia. *Reprod Sci* 2012; 19: 16-30
87. Boronkai A, Bellyei S, Szigeti A, Pozsgai E, Bognar Z, Sumegi B, Gallyas F, Jr. Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by galectin-13 overexpression via activation of Ask-1-p38-MAP



- kinase and JNK/SAPK pathways and suppression of Akt and ERK1/2 activation in U-937 human macrophage cells. *Eur J Cell Biol* 2009; 88: 753-63
88. Unverdorben L, Huttenbrenner R, Knabl J, Jeschke U, Hutter S. Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies. *Placenta* 2015; 36: 191-8
  89. Dunphy JL, Barcham GJ, Bischof RJ, Young AR, Nash A, Meeusen EN. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. *J Biol Chem* 2002; 277: 14916-24
  90. Stierstorfer B, Kaltner H, Neumuller C, Sinowatz F, Gabius HJ. Temporal and spatial regulation of expression of two galectins during kidney development of the chicken. *Histochem J* 2000; 32: 325-36
  91. French AT, Knight PA, Smith WD, Brown JK, Craig NM, Pate JA, Miller HR, Pemberton AD. Up-regulation of intelectin in sheep after infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 2008; 38: 467-75
  92. Ackerman SJ, Corrette SE, Rosenberg HF, Bennett JC, Mastrianni DM, Nicholson-Weller A, Weller PF, Chin DT, Tenen DG. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. *J Immunol* 1993; 150: 456-68
  93. Fritz R, Kohan-Ghadr HR, Bolnick JM, Bolnick AD, Kilburn BA, Diamond MP, Drewlo S, Armant DR. Noninvasive detection of trophoblast protein signatures linked to early pregnancy loss using trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC). *Fertil Steril* 2015; 104: 339-46 e4
  94. Than NG, Romero R, Xu Y, Erez O, Xu Z, Bhatti G, Leavitt R, Chung TH, El-Azzamy H, LaJeunesse C, Wang B, Balogh A, Szalai G, Land S, Dong Z, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Krispin M, Kim CJ, Tarca AL, Papp Z, Bohn H. Evolutionary origins of the placental expression of chromosome 19 cluster galectins and their complex dysregulation in preeclampsia. *Placenta* 2014; 35: 855-65
  95. Orazizadeh M, Khorsandi L, Saki G. Immunohistochemical assessment of galectin-3 during pre-implantation in mouse endometrium. *Iran J Reprod Med* 2013; 11: 119-26
  96. Glinsky VV, Glinsky GV, Rittenhouse-Olson K, Huflejt ME, Glinskii OV, Deutscher SL, Quinn TP. The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer Res* 2001; 61: 4851-7
  97. Lehr JE, Pienta KJ. Preferential adhesion of prostate cancer cells to a human bone marrow endothelial cell line. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 118-23
  98. Senapati S, Das S, Batra SK. Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. *Trends Biochem Sci* 2010; 35: 236-45
  99. Mori Y, Akita K, Yashiro M, Sawada T, Hirakawa K, Murata T, Nakada H. Binding of Galectin-3, a beta-Galactoside-binding Lectin, to MUC1 Protein Enhances Phosphorylation of Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) and Akt, Promoting Tumor Cell Malignancy. *J Biol Chem* 2015; 290: 26125-40
  100. Zhao Q, Barclay M, Hilkens J, Guo X, Barrow H, Rhodes JM, Yu LG. Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol Cancer* 2010; 9: 154
  101. Troncoso MF, Elola MT, Croci DO, Rabinovich GA. Integrating structure and function of 'tandem-repeat' galectins. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4: 864-87
  102. Hutter S, Knabl J, Andergassen U, Mayr D, Hofmann S, Kuhn C, Mahner S, Arck P, Jeschke U. Fetal gender specific expression of tandem-repeat galectins in placental tissue from normally progressed human pregnancies and intrauterine growth restriction (IUGR). *Placenta* 2015; 36: 1352-61
  103. Ideo H, Seko A, Yamashita K. Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and carcinoembryonic antigen in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 4730-7

104. Ideo H, Seko A, Yamashita K. Recognition mechanism of galectin-4 for cholesterol 3-sulfate. *J Biol Chem* 2007; 282: 21081-9
105. Nishi N, Shoji H, Seki M, Itoh A, Miyanaka H, Yuube K, Hirashima M, Nakamura T. Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM. *Glycobiology* 2003; 13: 755-63
106. Zick Y, Eisenstein M, Goren RA, Hadari YR, Levy Y, Ronen D. Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj J* 2004; 19: 517-26
107. Cattaneo V, Tribulatti MV, Carabelli J, Carestia A, Schattner M, Campetella O. Galectin-8 elicits pro-inflammatory activities in the endothelium. *Glycobiology* 2014; 24: 966-73
108. Bidon-Wagner N, Le Pennec JP. Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconj J* 2004; 19: 557-63
109. Henno S, Brichory F, Langanay T, Desrues B, Bidon N, Delaval P, Ramee MP, Dazord L, Caulet-Maugendre S. Expression of Po66-CBP, a galectin-8, in different types of primary and secondary broncho-pulmonary tumors. *Oncol Rep* 2002; 9: 177-80
110. Danguy A, Rorive S, Decaestecker C, Bronckart Y, Kaltner H, Hadari YR, Goren R, Zich Y, Petein M, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Immunohistochemical profile of galectin-8 expression in benign and malignant tumors of epithelial, mesenchymatous and adipous origins, and of the nervous system. *Histol Histopathol* 2001; 16: 861-8
111. Kolundzic N, Bojic-Trbojevic Z, Radojcic L, Petronijevic M, Vicovac L. Galectin-8 is expressed by villous and extravillous trophoblast of the human placenta. *Placenta* 2011; 32: 909-11
112. Popovici RM, Krause MS, Germeyer A, Strowitzki T, von Wolff M. Galectin-9: a new endometrial epithelial marker for the mid- and late-secretory and decidual phases in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6170-6
113. Kasamatsu A, Uzawa K, Shimada K, Shiiba M, Otsuka Y, Seki N, Abiko Y, Tanzawa H. Elevation of galectin-9 as an inflammatory response in the periodontal ligament cells exposed to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 397-408
114. Irie A, Yamauchi A, Kontani K, Kihara M, Liu D, Shirato Y, Seki M, Nishi N, Nakamura T, Yokomise H, Hirashima M. Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2962-8
115. Dai SY, Nakagawa R, Itoh A, Murakami H, Kashio Y, Abe H, Katoh S, Kontani K, Kihara M, Zhang SL, Hata T, Nakamura T, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2005; 175: 2974-81
116. Ishikawa A, Imaizumi T, Yoshida H, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Satoh K. Double-stranded RNA enhances the expression of galectin-9 in vascular endothelial cells. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 410-4
117. Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, Nakamura T, Hirashima M. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol* 2003; 170: 3631-6
118. Imaizumi T, Kumagai M, Nishi N, Hirashima M, Hatakeyama M, Tamo W, Yoshida H, Nakamura T, Okumura K, Satoh K. 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits IFN-gamma-induced galectin-9 expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131: 57-61
119. Saita N, Goto E, Yamamoto T, Cho I, Tsumori K, Kohrogi H, Maruo K, Ono T, Takeya M, Kashio Y, Nakamura K, Hirashima M. Association of galectin-9 with eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 42-50
120. Imaizumi T, Kumagai M, Sasaki N, Kurotaki H, Mori F, Seki M, Nishi N, Fujimoto K, Tanji K, Shibata T, Tamo W, Matsumiya T, Yoshida H, Cui XF, Takanashi S, Hanada K, Okumura K, Yagihashi S, Wakabayashi K, Nakamura T, Hirashima M, Satoh K. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 486-91

121. Asakura H, Kashio Y, Nakamura K, Seki M, Dai S, Shirato Y, Abedin MJ, Yoshida N, Nishi N, Imaizumi T, Saita N, Toyama Y, Takashima H, Nakamura T, Ohkawa M, Hirashima M. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9. *J Immunol* 2002; 169: 5912-8
122. Seki M, Oomizu S, Sakata KM, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, Ito K, Takeshita K, Niki T, Saita N, Nishi N, Yamauchi A, Katoh S, Matsukawa A, Kuchroo V, Hirashima M. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 2008; 127: 78-88
123. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005; 6: 1245-52
124. Wang F, He W, Yuan J, Wu K, Zhou H, Zhang W, Chen ZK. Activation of Tim-3-Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts. *Transpl Immunol* 2008; 19: 12-9
125. Meggyes M, Miko E, Polgar B, Bogar B, Farkas B, Illes Z, Szereday L. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8+ T cells throughout pregnancy: TIM-3/galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PLoS One* 2014; 9: e92371
126. Hotta K, Funahashi T, Matsukawa Y, Takahashi M, Nishizawa H, Kishida K, Matsuda M, Kuriyama H, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Bodkin NL, Hansen BC, Matsuzawa Y. Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity. *J Biol Chem* 2001; 276: 34089-97
127. Yang RY, Hsu DK, Yu L, Ni J, Liu FT. Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily. *J Biol Chem* 2001; 276: 20252-60
128. Baum LG. Burn control, an adipocyte-specific function for galectin-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 18575-6
129. Yang RY, Yu L, Graham JL, Hsu DK, Lloyd KC, Havel PJ, Liu FT. Ablation of a galectin preferentially expressed in adipocytes increases lipolysis, reduces adiposity, and improves insulin sensitivity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 18696-701
130. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 3., vollst. überarb. Aufl. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009
131. Welsch U, Deller T. Lehrbuch Histologie. In: Elsevier, Urban & Fischer; 2010
132. Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider KM, Schultze-Mosgau A, Weiss JM. Gynäkologie und Geburtshilfe. In: . ed: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007
133. Gupta SK, Malhotra SS, Malik A, Verma S, Chaudhary P. Cell Signaling Pathways Involved During Invasion and Syncytialization of Trophoblast Cells. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 361-71
134. Gätje R. Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe. 2., aktualisierte Aufl. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2015
135. Kim CJ, Romero R, Chaemsathong P, Kim JS. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213: S53-69
136. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 23-33
137. Betz AG. Immunology: Tolerating pregnancy. *Nature* 2012; 490: 47-8
138. Robertson SA, Moldenhauer LM. Immunological determinants of implantation success. *Int J Dev Biol* 2014; 58: 205-17
139. Zhang C, Deng X, Zhang X, Pan Z, Zhao W, Zhang Y, Li J, Xiao F, Wu H, Tan H, Guo P, Yang X. Association between Serum TNF-alpha Levels and Recurrent Spontaneous Miscarriage: A Meta-analysis. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 86-93
140. Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L, Delima MG. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2003; 58: 69-77

141. Saccone G, Schoen C, Franasiak JM, Scott RT, Jr., Berghella V. Supplementation with progestogens in the first trimester of pregnancy to prevent miscarriage in women with unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Fertil Steril* 2017; 107: 430-8 e3
142. Dodd JM, Jones L, Flenady V, Cincotta R, Crowther CA. Prenatal administration of progesterone for preventing preterm birth in women considered to be at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2013: CD004947
143. Lash GE, Ernerudh J. Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage. *J Reprod Immunol* 2015; 108: 83-9
144. Moser G, Weiss G, Gauster M, Sundl M, Huppertz B. Evidence from the very beginning: endoglandular trophoblasts penetrate and replace uterine glands in situ and in vitro. *Hum Reprod* 2015; 30: 2747-57
145. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; 308: 1592-4
146. Naicker T, Khedun SM, Moodley J, Pijnenborg R. Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82: 722-9
147. Hsu P, Nanan RK. Innate and adaptive immune interactions at the fetal-maternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia. *Front Immunol* 2014; 5: 125
148. Than NG, Pick E, Bellyei S, Szigeti A, Burger O, Berente Z, Janaky T, Boronkai A, Kliman H, Meiri H, Bohn H, Than GN, Sumegi B. Functional analyses of placental protein 13/galectin-13. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1065-78
149. Diabetes IAO, Pregnancy Study Groups Consensus P, Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, Dyer AR, Leiva A, Hod M, Kitzmiller JL, Lowe LP, McIntyre HD, Oats JJ, Omori Y, Schmidt MI. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010; 33: 676-82
150. Deutsche Diabetes-Gesellschaft (DDG) DGfGuGD. S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus. 2011:
151. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009; 32 Suppl 1: S62-7
152. Bryson CL, Ioannou GN, Rulyak SJ, Critchlow C. Association between gestational diabetes and pregnancy-induced hypertension. *Am J Epidemiol* 2003; 158: 1148-53
153. Schneider S, Hoelt B, Freerksen N, Fischer B, Roehrig S, Yamamoto S, Maul H. Neonatal complications and risk factors among women with gestational diabetes mellitus. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011; 90: 231-7
154. Catalano PM, McIntyre HD, Cruickshank JK, McCance DR, Dyer AR, Metzger BE, Lowe LP, Trimble ER, Coustan DR, Hadden DR, Persson B, Hod M, Oats JJ, Group HSCR. The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: associations of GDM and obesity with pregnancy outcomes. *Diabetes Care* 2012; 35: 780-6
155. Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet* 2009; 373: 1789-97
156. Farrar D, Simmonds M, Bryant M, Sheldon TA, Tuffnell D, Golder S, Dunne F, Lawlor DA. Hyperglycaemia and risk of adverse perinatal outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2016; 354: i4694
157. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008; 358: 1991-2002
158. Ijas H, Morin-Papunen L, Keranen AK, Bloigu R, Ruokonen A, Puukka K, Ebeling T, Raudaskoski T, Vaarasmaki M. Pre-pregnancy overweight overtakes gestational diabetes as a risk factor for subsequent metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 2013; 169: 605-11

159. Kuc S, Wortelboer EJ, Koster MP, de Valk HW, Schielen PC, Visser GH. Prediction of macrosomia at birth in type-1 and 2 diabetic pregnancies with biomarkers of early placentation. *BJOG* 2011; 118: 748-54
160. Seely EW, Solomon CG. Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2393-8
161. Ali S, Dornhorst A. Diabetes in pregnancy: health risks and management. *Postgrad Med J* 2011; 87: 417-27
162. Guo J, Chen JL, Whittemore R, Whitaker E. Postpartum Lifestyle Interventions to Prevent Type 2 Diabetes Among Women with History of Gestational Diabetes: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *J Womens Health (Larchmt)* 2016; 25: 38-49
163. Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace AM, Greer IA, Sattar N. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4231-7
164. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, Schmidt L, Damm P. Overweight and the metabolic syndrome in adult offspring of women with diet-treated gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2464-70
165. Knabl J, Hiden U, Huttenbrenner R, Riedel C, Hutter S, Kirn V, Gunthner-Biller M, Desoye G, Kainer F, Jeschke U. GDM Alters Expression of Placental Estrogen Receptor alpha in a Cell Type and Gender-Specific Manner. *Reprod Sci* 2015; 22: 1488-95
166. Solomon CG, Carroll JS, Okamura K, Graves SW, Seely EW. Higher cholesterol and insulin levels in pregnancy are associated with increased risk for pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens* 1999; 12: 276-82
167. Sattar N, Greer IA, Rumley A, Stewart G, Shepherd J, Packard CJ, Lowe GD. A longitudinal study of the relationships between haemostatic, lipid, and oestradiol changes during normal human pregnancy. *Thromb Haemost* 1999; 81: 71-5
168. Walsh JM, McGowan CA, Byrne JA, Rath A, McAuliffe FM. The association between TNF-alpha and insulin resistance in euglycemic women. *Cytokine* 2013; 64: 208-12
169. Miehle K, Stepan H, Fasshauer M. Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76: 2-11
170. Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Hauguel-de Mouzon S. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* 2003; 52: 2951-8
171. Siwetz M, Blaschitz A, El-Heliebi A, Hiden U, Desoye G, Huppertz B, Gauster M. TNF-alpha alters the inflammatory secretion profile of human first trimester placenta. *Lab Invest* 2016; 96: 428-38
172. Chiba H, Fukui A, Fuchinoue K, Funamizu A, Tanaka K, Mizunuma H. Expression of Natural Cytotoxicity Receptors on and Intracellular Cytokine Production by NK Cells in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 529-38
173. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie: Urban und Fischer; 2000*
174. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987; 8: 138-40
175. Maldonado-Estrada J, Menu E, Roques P, Barre-Sinoussi F, Chaouat G. Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2004; 286: 21-34
176. Ziegelmueller B, Vattai A, Kost B, Kuhn C, Hofmann S, Bayer B, Toth B, Jeschke U, Ditsch N. Expression of Thyroid Hormone Receptors in Villous Trophoblasts and Decidual Tissue at Protein and mRNA Levels Is Downregulated in Spontaneous and Recurrent Miscarriages. *J Histochem Cytochem* 2015; 63: 511-23
177. Luttmann W. *Der Experimentator: Immunologie. 4., vollst. überarb. und korr. Aufl. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer Berlin Heidelberg; 2014*

## VI. Anhang

### A. Abbildungen

**Abbildung 1:** Einteilung der menschlichen Galectine nach struktureller Architektur –  
modifiziert aus: Jeschke et.al 2013 [4]

Seite 2

**Abbildung 2:** möglicher vereinfachter Signaltransduktionsweg von Gal-1 in Trophoblastzellen im BeWo-Chorioncarcinom-Zellmodell:

Gal-1 bindet direkt oder über Thomsen-Friedenreich-Antigen an Membranproteinen und führt zu einer reduzierten Phosphorylierung der RTK „RET“. Hierdurch wird der MEK1/2/ERK1/2 Signaltransduktionsweg über JAK2 inhibiert. Dieser Weg betrifft ebenso STAT3 [70]. Eine Inhibition dieses Signaltransduktionsweges führt ebenso zur Inhibition der Syncytiumformierung [67]. Gal-1 hemmt auch die Phosphorylierung von Akt-3 und GSK-3 $\beta$ . Dies könnte eine bessere Bindung des Transkriptionsfaktors Elk1 zu seinen spezifischen Bindungspartnern vermitteln [70]. Zusätzlich kommt es zur Inhibition der Phosphorylierung von Beta-Catenin durch GSK-3 $\beta$  Kinaseaktivität, welche von Gal-1 inhibiert wird [27, 67]. Gal-1 stimuliert auch die Phosphorylierung von VEGFR3 an der Zellmembran, welches unter anderem über den MEK1/2/ERK1/2 Signalweg reguliert wird. (Abbildung modifiziert aus [27]).

Seite 3

**Abbildung 3:** Schematische Zeichnung der Plazenta mit Terminalzotten ab dem 4. Schwangerschaftsmonat: Während des 4. Schwangerschaftsmonats verschwindet der Zytotrophoblast immer mehr, während er in der Basalplatte erhalten bleibt. Dort sind die Zytotrophoblastzellen zuvor in die Dezidua und das Myometrium sowie die Wand der Spiralarterien eingewandert.

(modifiziert aus: <http://www.embryology.ch/allemand/fplacenta/milleflles/millefllea2.html>;  
01.03.2017)

Seite 8

**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der immunhistochemischen Detektionsmethoden (indirekte Methode).

(A): ABC-Methode (modifiziert aus [173])

(B): Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Methode (modifiziert aus [173])

HRP: Horseradish Peroxidase

Seite 14

### B. Tabellen

**Tabelle 1:** Bewertung der immunhistochemischen Färbung nach Remmele, 1986 [174]

Seite 15

## C. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
ADA	American Diabetes Association
CD	Cluster of Differentiation
CEA	carcino-embryonic antigen
CK7	Cytokeratin-7
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRD	carbohydrate-recognition domain
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonuclein-acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinases
EVT	extravillöser Trophoblast
Gal	Galectin
GDM	gestational diabetes mellitus
GH	growth hormone = Wachstumshormon
GLUT	Glucose-Transporter
GSK	Glykogensynthase-Kinase
HCG	humanes Choriongonadotropin
HELLP-Syndrom	Haemolysis (hämolytische Anämie); Elevated Liver enzyme levels (erhöhte Leberwerte), Low Platelet count (Thrombozytopenie)
HLA-G	human leukocyte antigen G
HPL	humanes Plazentalctogen
HRP	Horseradish Peroxidase
IADPSG	International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRS	Immunoreaktiver Score
IUGR	intrauterine growth restriction
JAK	Januskinase
MEK	Methyl-Ethyl Keton
MHC	Major Histocompatibility Complex
MUC-1	Mucin-1
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
oGTT	oraler Glucose-Toleranztest
PAP-Methode	Peroxidase-anti-Peroxidase Methode
PAPP-A	Pregnancy-associated plasma protein A
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase-Ketten-Reaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PP-13	Placental-Protein 13

PROM	premature rupture of membranes
RA	recurrent abortion
RDS	respiratory distress syndrome
RET	ret proto-oncogene
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SPA	spontaneous abortion
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TF-Antigen	Thomsen-Friedenreich-Antigen
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIM	T-cell immunoglobulin and mucin domain
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T <sub>reg</sub> -Zellen	T-regulative Zellen
TRIC	trophoblast retrieval and isolation from the cervix
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VT/HVT	(humaner) villöser trophoblast
ZONE	zones of necrosis
ZT	Zytotrophoblast



## D. Publikationsliste

[Prototype and Chimera-Type Galectins in Placentas with Spontaneous and Recurrent Miscarriages.](#)

**Unverdorben L**, Haufe T, Santoso L, Hofmann S, Jeschke U, Hutter S.  
Int J Mol Sci. 2016 Apr 28;17(5). pii: E644. doi: 10.3390/ijms17050644.

[Comparative analyses on expression of galectins1-4, 7-10 and 12 in first trimester placenta, decidua and isolated trophoblast cells in vitro.](#)

**Unverdorben L**, Jeschke U, Santoso L, Hofmann S, Kuhn C, Arck P, Hutter S.  
Histol Histopathol. 2016 Oct;31(10):1095-111. doi: 10.14670/HH-11-739.

[Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies.](#)

**Unverdorben L**, Hüttenbrenner R, Knabl J, Jeschke U, Hutter S.  
Placenta. 2015 Feb;36(2):191-8. doi: 10.1016/j.placenta.2014.11.019. Epub 2014 Dec 3.

[Getting too sweet: galectin-1 dysregulation in gestational diabetes mellitus.](#)

Blois SM, Gueuvoghlian-Silva BY, Tirado-González I, Torloni MR, Freitag N, Mattar R, Conrad ML, **Unverdorben L**, Barrientos G, Knabl J, Toldi G, Molvarec A, Rose M, Markert UR, Jeschke U, Daher S.  
Mol Hum Reprod. 2014 Jul;20(7):644-9. doi: 10.1093/molehr/gau021. Epub 2014 Mar 17.

[Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future.](#)

Barrientos G, Freitag N, Tirado-González I, **Unverdorben L**, Jeschke U, Thijssen VL, Blois SM.  
Hum Reprod Update. 2014 Mar-Apr;20(2):175-93. doi: 10.1093/humupd/dmt040. Epub 2013 Sep 27.  
Review.

[Expression and function of galectins in the endometrium and at the human feto-maternal interface.](#)

Jeschke U, Hutter S, Heublein S, Vrekoussis T, Andergassen U, **Unverdorben L**, Papadakis G, Makrigiannakis A.  
Placenta. 2013 Oct;34(10):863-72. doi: 10.1016/j.placenta.2013.07.005. Epub 2013 Jul 30. Review.

## VII. Eidesstattliche Versicherung

Laura Christina Unverdorben

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Systematische Untersuchung zur plazentaren Expression der humanen Galectine im ersten Trimenon und bei Gestationsdiabetes“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

Altötting, 28.6.18

Laura Unverdorben

## VIII. Danksagung

Diese Arbeit entstand im Immunhistochemie-Labor in der Frauenklinik der LMU München, Campus Innenstadt. Ich möchte mich für das immer gute Arbeitsklima bedanken.

Im Besonderen danken möchte ich:

- Herrn Prof. Udo Jeschke für die Betreuung der Arbeit, Überlassung der Themenstellung und Hilfe bei den Veröffentlichungen durch seine wertvollen Vorschläge und jegliche Unterstützung in allen Stadien und Belangen dieser Doktorarbeit.
- PD Dr. med. Stefan Hutter für die gute Betreuung, Anregungen und Ratschläge zu den Versuchsreihen und den Publikationen.
- Dem Team aus dem Immunhistochemie-Labor der Frauenklinik der LMU Maistraße München, insbesondere Frau Christina Kuhn und Frau Simone Hofmann danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Laborarbeit.
- Allen weiteren Co-Autoren der Veröffentlichungen danke ich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Petra Arck, Julia Knabl, Rebecca Hüttenbrenner und Laura Setiawan (geb. Santoso).
- Laurent Soussanna und Almut Hefter für die Korrektur des Englischen.
- Dr. med. dent. Lothar Schmeißer für die fortwährende Unterstützung und hilfreichen Anregungen.
- Meiner gesamten Familie danke ich von ganzem Herzen für die allzeitige Unterstützung. Insbesondere meinen Eltern für die Ermöglichung des Medizinstudiums, Förderung und mentalen Beistand, sowie meiner Schwester Pia für die vielen Tipps und einen immer wertvollen Rat.