

**Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. G. Emons)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Expression humaner Angiogenesefaktoren in der
Plazenta präeklampsischer Patientinnen**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Bettina Antonia Nowak (geb. Buff)
aus
Koblenz**

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Brück

Referent: Prof. Dr. Carsten Gründker

Ko-Referentin: Prof. Dr. Elisabeth Zeisberg

Drittreferentin: Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Expression humaner Angiogenesefaktoren in der Plazenta präeklampscher Patientinnen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 01.08.2019

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Präeklampsie	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	3
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	4
1.2 Zielsetzung	8
2 Material	9
2.1 Geräte	9
2.2 Verbrauchsmaterialien	9
2.3 Chemikalien	10
2.4 Lösungen und Puffer	10
2.5 Biologisches Material	10
2.6 Enzyme	11
2.7 Oligonukleotide	11
2.8 Antikörper	12
2.9 Kommerzielle Reaktionssysteme	12
2.10 Software	12
3 Methoden	13
3.1 Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen	13
3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem Plazentagewebe	15
3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren	16
3.4 Expressionsanalyse von Angiogenesefaktoren mittels Microarray	17

3.5	Reverse Transkription	20
3.6	PCR-Amplifikation	21
	3.6.1 Housekeeping-Gen L7	21
	3.6.2 Reaktionsbedingungen für PCR	22
	3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese	23
	3.6.4 Auswertung der RT-PCR-Daten	24
3.7	Immunhistochemie	24
	3.7.1 Auswertung der Immunhistochemie	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Ergebnis des Angiogenese-Gen-Array	26
4.2	Gegenüberstellung von Kontrolle und SGA	35
	4.2.1 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 1	35
	4.2.2 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 2	36
	4.2.3 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 3	37
	4.2.4 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 4	38
	4.2.5 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 5	39
	4.2.6 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 6	40
	4.2.7 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 7	41
	4.2.8 Übersicht Gene Präeklampsiegruppe	42
4.3	Ergebnisse PCR	45
	4.3.1 Angiomotin	45
	4.3.2 Angiopoietin 2	46
	4.3.3 Endoglin	47
	4.3.4 FLT1 - vascular endothelial growth factor receptor 1	48
	4.3.5 Thrombospondin1	49
	4.3.6 Vascular endothelial growth factor	50
4.4	Ergebnisse Immunhistochemie	51
	4.4.1 Angiomotin	52
	4.4.2 Angiopoietin 2	52
	4.4.3 Endoglin	53

4.4.4	FLT1 - vascular endothelial growth factor receptor 1	54
4.4.5	Thrombospondin1	54
4.4.6	Vascular endothelial growth factor	55
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	55
5	Diskussion	57
5.1	Angiomotin	57
5.2	Angiopoietin 2	58
5.3	Endoglin	60
5.4	FLT1 - vascular endothelial growth factor receptor 1	61
5.5	Thrombospondin 1	62
5.6	Vascular endothelial growth factor	63
6	Zusammenfassung	67
7	Anhang	69
7.1	Human Angiogenesis Gene Array – Gentabelle	69
8	Literaturverzeichnis	72

Abkürzungen

A.	Arterie
A	Adenin
Aa	Arteriae
AGL	Agarose-Gel-Laufpuffer
Ala	Alanin
ABS	Angiomotin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANG2	Angiopoietin2
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMI	Body-Mass-Index
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
bp	Basenpaare
C	Cystein
CD105	Endoglin
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CTG	Kardiotokographie, engl. <i>cardiotocography</i>
DIG/ DIC	disseminierte intravasale Gerinnung, engl. <i>disseminated intravascular coagulation</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENG	Endoglin
ETOH	Ethanol
FLT1	<i>fms-like tyrosine kinase 1</i>

sFLT1	<i>soluble fms-like tyrosine kinase 1</i>
G	Glycin
HELLP	<i>haemolysis elevated liver enzyme levels low platelet count</i>
HLA	humane Leukozytenantigene
IRDS	Atemnotsyndrom des Frühgeborenen, engl. <i>infant respiratory distress syndrome</i>
IVH	intraventrikuläre Hirnblutung
kDA	Kilodalton
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin-like receptors</i>
KO	Kontrolle
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NTP-Mix	Nucleosidtriphosphat-Mix
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pH	Säuregrad
PGF	<i>placental growth factor</i>
PLGF	<i>placental growth factor</i>
Primer s	<i>primer sense</i>
Primer as	<i>primer antisense</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
ROP	Frühgeborenen-Retinopathie, engl. <i>retinopathy of prematurity</i>
RR	Blutdruckmessung nach Riva-Rocci
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>

SGA	<i>small for gestational age</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Threonin
Taq	thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF	<i>transforming growth factor</i>
THBS1	Thrombospondin 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
sVEGFR-1	<i>soluble vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Präeklampsie

Präeklampsie ist eine schwangerschaftsassozierte Erkrankung, die ab der 20. SSW auftritt. Sie zeichnet sich durch zwei Kardinalsymptome aus:

Eine De-novo-Hypertonie $> 140/90$ mmHg und eine Proteinausscheidung im Harn > 300 mg/24 h (Prakash et al. 2010).

Grundsätzlich lässt sich die Erkrankung in eine Form mit frühem Beginn (< 34 Wochen) und eine mit spätem Beginn unterteilen. Bei letzterer treten die Symptome erst um den Entbindungstermin auf. Zwar tritt die Präeklampsie mit frühem Beginn mit unter 20% aller Fälle deutlich seltener auf als die späte Variante, jedoch ist sie mit schwereren Verläufen und einer erhöhten Komplikationsrate für Mutter und Kind vergesellschaftet. Darum steht die Pathogenese der frühen Präeklampsie im Mittelpunkt aktueller Forschung (Herzog et al. 2017; Huppertz 2008).

Der klinische Befund kann sich als maternales Syndrom oder als fetales Syndrom manifestieren. Zu den Symptomen des maternalen Syndroms zählen neben erhöhtem Blutdruck auch epigastrische Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen, zentralnervöse Störungen wie Kopfschmerzen und visuelle Störungen bis hin zur Eklampsie, die sich in generalisierten tonisch-klonischen Anfällen äußert.

Aufgrund einer erhöhten kapillaren Permeabilität kommt es zu Proteinurie und peripheren Ödemen. In schweren Fällen sind Aszites, Pleura- und Perikardergüsse die Folge. Fibrinolyse und Hämolyse können zu Nierenversagen, disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) und erhöhter Blutungsneigung führen. Darüber hinaus stellt der Zustand nach Präeklampsie einen Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen dar (Steegeers et al. 2010).

Das fetale Syndrom zeichnet sich durch pathologische Dopplerwerte (Aa. uterinae), Oligohydramnion, Wachstumsrestriktion und vorzeitige Plazentalösung bis hin zu intrauterinem Fruchttod aus (Magee et al. 2014). Da die Entbindung auch heute noch die einzige kausale Therapie der Präeklampsie darstellt, kommt es nicht selten zu einer indizierten Frühgeburt.

Die Frühgeburtlichkeit führt zu einer erhöhten perinatalen Morbidität der Kinder durch Krankheitsbilder wie z.B. das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen (IRDS), die bronchopulmonale Dysplasie (BPD), Hirnblutung (IVH), nekrotisierende Enterokolitis (NEC) oder Netzhauterkrankungen (ROP) (Bos et al. 2013; Hallman 2012).

Die Vielzahl der betroffenen Organsysteme macht das klinische Bild dieser Multior-ganerkrankung äußerst komplex und klinisch oft schwer zu erfassen.

Auch der Verlauf der Klinik kann in Ausprägung und Labor derart wechselhaft sein, dass eine umfassende Definition dieses Syndroms kompliziert ist.

Ebenso ist es unmöglich, eine Vorhersage bezüglich der Organmanifestation zu treffen. In einem Fall kann die arterielle Hypertonie dominieren, während in einem anderen Fall darüber hinaus eine Leber- oder Nierenbeteiligung vorherrscht.

Die Komplexität spiegelt sich auch darin wider, dass es keine einheitliche Definition des Krankheitsbildes durch die Fachgesellschaften gibt. Eine Zusammenfassung der Symptome, die bei Präeklampsie auftreten können, zeigt Abbildung 1.

Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschungen bleibt die Präeklampsie weltweit eine der führenden Ursachen perinataler Morbidität und Mortalität für Mutter und Kind. Ihre Ätiologie ist weiterhin unklar (Steegers et al. 2010; Chen et al. 2014).

De-novo-Hypertonie ab der 20. SSW und Neuauftreten eines oder mehrerer der folgenden Symptome:

- Proteinurie ≥ 300 mg/ 24 h
- Kreatinin $\geq 0,9$ g/l oder Oligurie < 500 ml/ 24 h
- Leberbeteiligung: Transaminasenerhöhung, persistierende Oberbauchschmerzen
- Lungenödem / Zyanose
- Hämatolog. Störungen: Thrombozytopenie, Hämolyse, DIG
- Neurologische Symptome: starke Kopfschmerzen, Hyperreflexie, visuelle Störungen
- Fetales Untergewicht für Gestationsalter (SGA: *small for gestational age*)

Abbildung 1: Symptome, die im Zusammenhang mit Präeklampsie auftreten können (Magee et al. 2014).

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Präeklampsie betrifft 10% aller Geburten weltweit. In Deutschland lag die Prävalenz der Präeklampsie im Jahr 2006 bei 2,31%. Damit zählt diese Erkrankung zu den häufigsten medizinischen Komplikationen während der Schwangerschaft (Robillard 2002; Schneider et al. 2011).

Verschiedene mütterliche Faktoren erhöhen das Risiko für die Entstehung einer Präeklampsie. Zu diesen zählen unter anderem Nulliparität, Adipositas, Diabetes mellitus, Hypertonie, Mehrlingsschwangerschaften sowie nur kurzzeitige Exposition mit den Spermien des zukünftigen Vaters (Predoi et al. 2015; Wen et al. 2004; Caritis et al. 1998; Einarsson et al. 2003) (siehe Abb. 2).

- Nulliparität
- Alter > 40 Jahre
- Schwangerschaft mit assistierter Reproduktion
- Schwangerschaftsintervall > 7 Jahre
- Präeklampsie in der Familienanamnese
- Frauen, die SGA geboren wurden
- Adipositas
- Mehrlingsschwangerschaft
- Präeklampsie in vorheriger Schwangerschaft
- Fetale Wachstumsrestriktion, Plazentalösung, intrauteriner Fruchttod
- Vorbestehende medizinisch- genetische Beschwerden
- Chronische Hypertonie
- Chronische Nierenerkrankung
- Diabetes mellitus
- Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom
- Faktor-V-Leiden- Mutation

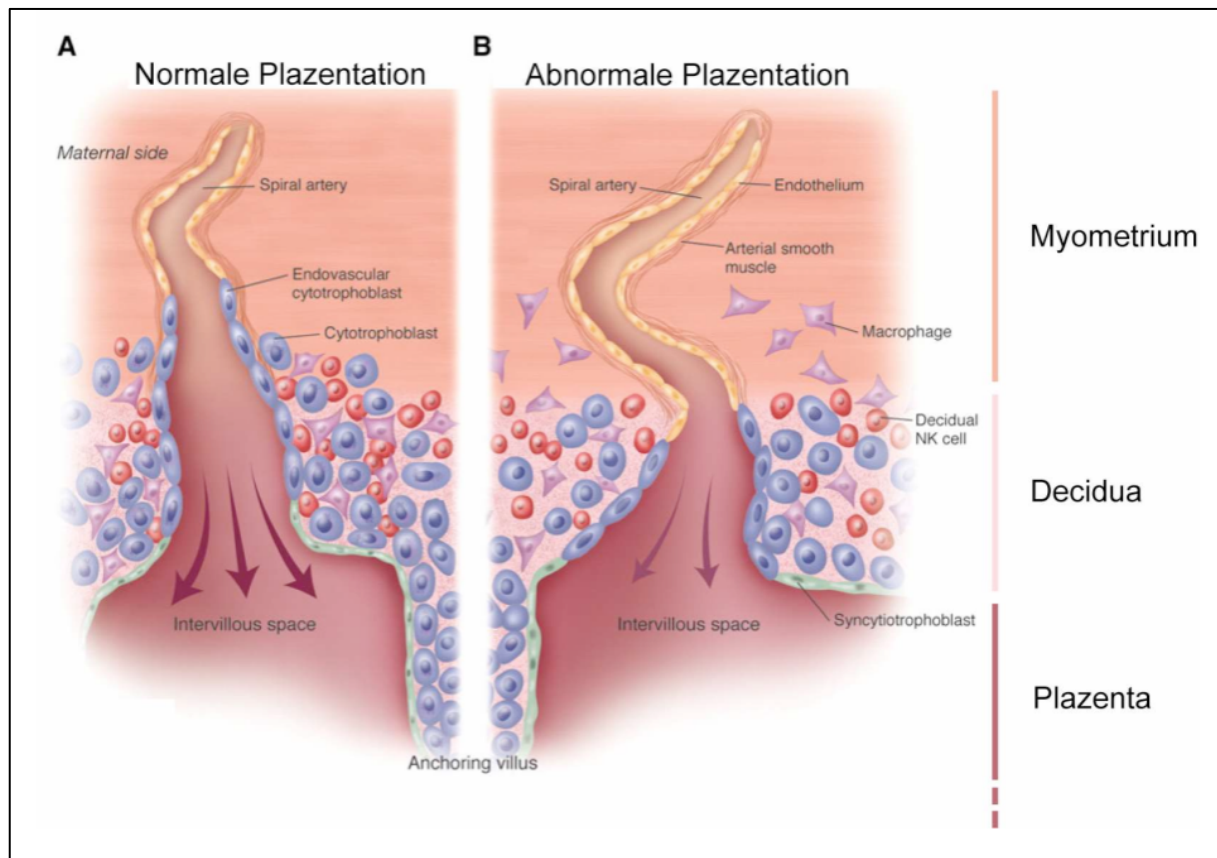
Abbildung 2: Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie (Predoi et al. 2015; Wen et al. 2004; Caritis et al. 1998; Einarsson et al. 2003).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Präeklampsie ist eine Erkrankung, die ausschließlich während der Schwangerschaft auftritt. Zentrales Organ ist pathophysiologisch die Plazenta. Dies wird durch die Tatsache bekräftigt, dass es nur bei Vorhandensein einer Plazenta zum Auftreten einer Präeklampsie kommt und die Beschwerden erst nach vollständiger Entfernung sämtlichen plazentaren Gewebes sistieren (Redman und Sargent 2003; Al-Jameil et al. 2014; Matsuo et al. 2007). So vielschichtig die Klinik der Präeklampsie ist, so zahlreich sind die Hypothesen zu ihrer Entstehung.

Eine dieser Hypothesen beschreibt die gestörte Trophoblasteninvasion im Rahmen der Plazentation als Ursache für die Entwicklung der Präeklampsie (Al-Jameil et al. 2014). Durch einen proliferativen Reiz der Stammzellen des Trophoblasten an der uterinen Basalmembran, der Haftstelle der Zotten, wachsen die extravillösen Trophoblastzellen tief in die Dezidua hinein. Parallel dringen villöse Trophoblastzellen in die Arterien und Venen der Dezidua ein und verteilen sich, das Endothel verdrängend, an der Innenwand der Gefäße. Die Wandstruktur der Gefäße, die das Endstromgebiet der A. uterina bilden, wird umfassend umgebaut. Endothelzellen werden durch Trophoblastzellen ersetzt. Muskuläre Strukturen wie auch die *Elastica interna* werden aufgelöst. Durch diese Vorgänge entstehen aus den englumigen Spiralarterien des Uterus während der Schwangerschaft großkalibrige Gefäße. Es kommt zur Transformation des uteroplazentaren Strombetts in ein System niedrigen Widerstands, niedrigen Drucks und hoher Durchflussrate. Bei Schwangerschaften mit Präeklampsie liegt eine inadäquate Plazentation vor. Gefäßveränderungen der Spiralarterien treten hier nur im Bereich der Dezidua auf. Die myometrialen Anteile der Spiralarterien zeigen weiterhin ihren muskuloelastischen Aufbau und reagieren dementsprechend auf hormonelle Einflüsse, d. h. ihre Vasomotorik unterliegt immer noch der maternalen Kontrolle, ein Umbau in ein Hochkapazitätsgefäß niedrigen Widerstands bleibt aus (siehe Abb. 3). Wahrscheinlich kommt es durch eine Hemmung der endovaskulären Trophoblastmigration zu einem gestörten Gefäßumbau während der Plazentation. Diese pathologischen Veränderungen könnten dazu führen, dass die

von der fetoplazentaren Einheit in der fortgeschrittenen Schwangerschaft benötigte gesteigerte Blutversorgung unzureichend ist. Und sie könnten ursächlich für den erniedrigten uteroplazentaren Blutfluss sein, der in den meisten Fällen von Präeklampsie nachgewiesen werden konnte (Naicker et al. 2003, Kaufmann et al. 2003, Fisher 2015).



From Redman CW, Sargent IL. Science, 2005 Jun 10; 308(5728):1592-4. Reprinted with permission from AAAS.

Abbildung 3: Veränderte Plazentation bei Präeklampsie (Redman und Sargent 2005).

A: Nicht kontraktionsfähige Spiralarterie und hoher Blutfluss aufgrund des Umbaus der Spiralarterienwand durch einwandernde Trophoblasten.

B: Verminderte Trophoblasteninvasion bei Präeklampsie, dadurch gestörte Umgestaltung der Spiralarterien und abnormale Plazentation. Durch die Möglichkeit zur Kontraktion Mangelversorgung des Feten.

Eine weitere Hypothese beschreibt eine immunologische Unverträglichkeit, bei der es zu einer gesteigerten inflammatorischen Antwort kommt und somit das Risiko für die Entstehung einer Präeklampsie erhöht ist (Moffett und Hiby 2007).

Damit eine Schwangerschaft entstehen kann, ist es wichtig, dass sich eine Toleranz der maternalen Immunzellen gegenüber dem semiallogenetischen embryonalen Ge-

webe ausbildet. Dazu kommt es unter anderem durch das Fehlen der von Trophoblasten exprimierten humanen Leukozytenantigene HLA-A und HLA-B sowie Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC). Dadurch kann die Plazenta nicht vom mütterlichen Immunsystem erkannt werden. Außerdem exprimiert der Trophoblast eine besondere Kombination von HLA-C-, HLA-G- und HLA-E-Molekülen, die ihm dabei hilft, einen Angriff des Immunsystems wirksam zu verhindern.

So bindet HLA-G an Rezeptoren zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen und verhindert, dass diese Zellyse induzieren. HLA-C ist der dominante Ligand für KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*), einen Rezeptor der NK-Zellen. Bei Präeklampsie scheint es zu einer gestörten Interaktion von KIR mit HLA-C zu kommen, die sich nachteilig auf die Trophoblasteninvasion auswirkt (James et al. 2010; Hiby et al. 2004).

Unterstützt wird die Hypothese der pathologischen Immunantwort durch die Ergebnisse einer Studie, in der eine höhere Präeklampsierate in einem Patientinnenkollektiv nachgewiesen werden konnte, in dem bis zur Konzeption mit Barrieremethoden verhütet wurde. Hier geht man davon aus, dass die Ursache in einer zu kurzen paternalen Antigenexposition über die Vaginalschleimhaut dazu führt, dass sich keine Immuntoleranz gegenüber paternalen HLA ausbilden kann (Saftlas et al. 2014). Auch das erhöhte Präeklampsierisiko für Erstgravidae unterstreicht diese Hypothese.

Der protektive Effekt langfristiger Spermienexposition mit dem gleichen Partner zeigt sich in einem erniedrigten Präeklampsierisiko (Trupin et al. 1996; Saftlas et al. 2003).

Die multiplen Symptome der Präeklampsie, die sich je nach betroffenem Organsystem ergeben können, lassen sich durch eine endotheliale Dysfunktion erklären. Das Endothel ist die Zellschicht, die das Innere von Blutgefäßen auskleidet. Bei einer endothelialen Dysfunktion handelt es sich um eine Schädigung dieser Schicht mit entsprechenden Funktionsstörungen wie der Gefäßweitenregulation oder der Permeabilität. Die endotheliale Dysfunktion als Grundlage des klinischen Bildes der Präeklampsie kann verschiedene Ursachen haben.

Das unzureichende Eindringen des Trophoblasten in die Dezidua führt zu oxidativem Stress mit verstärkter Freisetzung von Syncytiotrophoblastfragmenten in den mütterlichen Kreislauf und trägt so zur Dysfunktion des Endothels bei (Huppertz 2008).

Ebenso ist die erhöhte Prädisposition für eine Präeklampsie bei vorbestehenden Erkrankungen wie chronischen Infekten, Hyperhomozysteinämie und angeborenen Thrombophilien auf eine erhöhte Verletzbarkeit des maternalen Endothels zurückzuführen (Ness und Roberts 1996). Außerdem fördert die endotheliale Dysfunktion die prokoagulatorische Aktivierung des Gerinnungssystems (Dusse et al. 2013).

Neben diesen Faktoren scheint auch das Mißverhältnis plazentarer Wachstumsfaktoren an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt zu sein. Pro- und antiangiogene Proteine spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Präeklampsie. Um die Versorgung des Feten mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherzustellen, ist er auf eine angemessene Blutzufuhr angewiesen. Damit sich während der Schwangerschaft ein Gefäßnetz im Rahmen der Plazentation ausbilden kann, wirken pro- und antiangiogenetische Faktoren synergistisch. Eine wichtige Bedeutung haben in diesem Zusammenhang die Proteine aus der Gruppe der VEGF (vascular endothelial growth factor) und PLGF (placental-like growth factor). Soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) ist ein von der Plazenta exprimiertes Protein. Es bindet an VEGF und PLGF. Erhöhte Level dieses Proteins im maternalen Kreislauf führen zu reduzierten Leveln von freiem VEGF und PLGF mit resultierender endothelialer Dysfunktion. sFlt-1-Werte im maternalen Serum und in der Plazenta sind in Schwangerschaften mit Präeklampsie im Vergleich zu komplikationslosen Schwangerschaften erhöht. Die Höhe des sFlt-1-Levels korreliert dabei mit dem Schweregrad der Erkrankung. Ersttrimester-PLGF-Level sind in Schwangerschaften, die im Verlauf eine Präeklampsie entwickeln, und bei Schwangerschaften mit fetaler Wachstumsretardierung erniedrigt, während die sFlt-Level sich nicht von den Kontrollen unterscheiden.

Diese Daten zeigen, dass deziduale Angiogenesefaktoren, insbesondere PLGF, wesentlich für die frühe Plazentaentwicklung sind. Die spätere Beteiligung von sFlt ist

als fetales Rettungssignal zu werten, welches die maternale Reaktion steuert, nämlich den Grad der mütterlichen Hypertonie. Durch diese Dysbalance pro- und antiangiogener Faktoren ist die Entwicklung der Gefäße und die Etablierung des uteroplazentaren Kreislaufs gestört. Obwohl die grundlegende Bedeutung des Ungleichgewichts der Wachstumsfaktoren bei der Pathogenese der Präeklampsie allgemein anerkannt wird, konnte bisher nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob es sich bei diesen pathologischen Veränderungen um Ursache oder Wirkung der Präeklampsie handelt (Levine et al. 2006; Levine et al. 2004; Ramma und Ahmed 2011).

Die Diagnose dysregulierter Angiogenesefaktoren vor Manifestation der Erkrankung bietet einen vielversprechenden Ansatz bei der Erforschung prädiktiver Biomarker.

Die Existenz dieser biochemischen Marker würde nicht nur die Selektion von Risikopatientinnen ermöglichen, sondern darüber hinaus die Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes beschleunigen. Die Suche nach prädiktiven Markern und Therapien im Rahmen der Angiogenese ist daher von besonderem klinischem Interesse.

1.2 Zielsetzung

Die Ätiologie der Präeklampsie ist bis heute unklar. Eine entscheidende Rolle spielt die endotheliale Dysfunktion, die als Ursache der Organmanifestationen gilt. Als Auslöser wird unter anderem die Dysbalance zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren angesehen. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung dysregulierter Angiogenesefaktoren in den Plazenten von Frauen mit Präeklampsie im Vergleich zu Frauen mit physiologisch verlaufenden Schwangerschaften. Dazu wurde im Sinne einer Pilotstudie zunächst ein Angiogenese-Gen-Array mit der aus den Plazenten gewonnenen mRNA durchgeführt. Drei Gene aus den ausschließlich in den Plazenten mit Präeklampsie-regulierten Genen sowie drei frei bestimmte Gene wurden mit der Polymerase-Kettenreaktion und der Immunhistochemischen Färbung weitergehend untersucht. Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die Ergebnisse reproduzierbar sind, ob sich je nach molekularbiologischer Methode Unterschiede im Expressionsmuster ergeben und ob sich Abweichungen zwischen den beiden Gruppen zeigen.

2 Material

2.1 Geräte

Modell	Hersteller
Cycler T 3000 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Elektrophoresekammer, DNA	OWL Separation Systems (Portsmouth, USA)
Magnetrührer MR3000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Mikroskop Othoplan	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
Mikrowaage M2P, elektronisch	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Mini Centrifuge	LMS (Brigachtal, Deutschland)
MS 1 Minishaker	IKA (Staufen, Deutschland)
Photometer (BioPhotometer 6131)	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Spektralphotometer (Biophotometer)	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
UV-Transilluminator	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein (Zürich, Schweiz)
Waage Kern 440-47	Kern (Balingen, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Holding (Hanau, Deutschland)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien (Einmalartikel) dieser Arbeit wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Biozym (Hessisch Oldenburg), Greiner Bio-One (Frickhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder PAA (Cölbe) bezogen. Dabei entsprachen die Chemikalien dem höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsgrad.

2.4 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit autoklaviertem Aqua bidest. hergestellt.

DNA-Ladepuffer (10x)	50% (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (w/v) Xylencyanol
Elektrophoresepuffer (10x)	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Ethidiumbromidbad	0,007% Ethidiumbromid, 100% Aqua bidest.
TBE	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.5 Biologisches Material

Bei dem verwendeten biologischen Material handelte es sich um humane Plazentaprobe.

2.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I recombinant, RNase-free	Roche (Mannheim, Deutschland)
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Taq DANN Polymerase	Roche (Mannheim, Deutschland)
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega (Mannheim, Deutschland)

2.7 Oligonukleotide

Die für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Zielgen	Primersequenz (5`-3`) Sense und Antisense
L7	AGA TGT ACA GAA CTG AAA TTC ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA
ABS	CAC TCT TCC AGC CTT CCT TCC CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT T
ANG	GGA CAA TTA TTC AGC GAC GTG GAG CGA ATA GCC TGA GCC TT
ENG	CAC TAG CCA GGT CTC GAA GG CTG AGG ACC AGA AGC ACC TC
FLT1	TTG GGA CTG TGG GAA GAA AC TTC AAT AAA CAG CGT GTC GC
THBS1	TTG TCT TTG GAA CCA CAC CA CTG GAC AGC TCA TCA CAG GA
VEGF	AAG GAG GAG GGC AGA ATC AT ATC TGC ATG GTG ATG TTG GA

2.8 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers verwendet, Abcam (Cambridge, UK).

Antikörper	Beschreibung
Angiomotin	Polyclonal, Kaninchen
Angiopoietin2	Polyclonal, Kaninchen
Endoglin	Polyclonal, Kaninchen
FLT1	Monoclonal, Kaninchen
Thrombospondin	Monoclonal, Maus
VEGF	Monoclonal, Maus

2.9 Kommerzielle Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Hersteller
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Histostain® Bulk Kit	Invitrogen (Camarillo, USA)
AEC+High Sensitivity	Dako (Hamburg, Deutschland)
Substrate Chromogen	Dako (Hamburg, Deutschland)
Human Angiogenesis Gene Array	SuperArray Bioscience (Frederick, USA)

2.10 Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism® (Version 4.0)	Olympus (Hamburg, Deutschland)
BioDoc Analyze 2.1	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Kodak Digital Science 1 D Image Analyse Software (Version 2.0.3)	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Microsoft® Office 2003	Microsoft Corporation (Unterschleißheim, Deutschland)

3 Methoden

3.1 Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen

Der Ethikantrag 11/6/07 wurde am 30.07.2007 von der Ethik-Kommission der Universität Göttingen bewilligt.

Die Plazentaprobe wurden von 2008 bis 2009 gewonnen und aufbereitet.

Die schwangeren Frauen gaben nach einem Aufklärungsgespräch über die Studie ihr schriftliches Einverständnis zur weiteren Analyse der Plazenten.

Die Studiengruppe setzte sich aus sieben Proben von Frauen mit Frühgeburtlichkeit, bedingt durch Präeklampsie/SGA, mit einer Schwangerschaftsdauer von 26+5 SSW bis 33+1 SSW zusammen. Als Kontrolle dienten die Proben von 4 Frauen mit Frühgeburt aus dem sogenannten nicht-präeklampischen Formenkreis mit einer Schwangerschaftsdauer von 27+2 bis 33+0 SSW und eine Probe einer Frau mit termingerechter Entbindung. Genauere Angaben über die Studiengruppen sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Daten der Studienteilnehmerinnen und Neugeborenen.

Patientin Gruppe	1 Prä- eklampsie	2 Prä- eklampsie	3 Prä- eklampsie	4 Prä- eklampsie	5 Prä- eklampsie	6 Prä- eklampsie	7 Prä- eklampsie	8 KO	9 KO	10 KO	11 KO	12 KO
Alter (Jahre)	23	34	25	32	36	19	32	29	19	31	27	30
SSW bei Geburt	28+4	29+3	26+5	33+1	33+0	30+5	31+2	32+1	27+2	31+0	33+0	41+0
Indikation Schwangerschaftsbeendigung	schwere Prä-eklampsie	schwere Prä-eklampsie	HELLP-Syndrom, Plazenta-insuffizienz	Plazenta-insuffizienz	fetale Wachstumsretardierung, path. CTG	schwere Prä-eklampsie	Plazenta-insuffizienz, path. CTG	beginnend. Zervixinsuffizienz	Zervixinsuffizienz	path. CTG	vorz. Plazentalösung	Spontanpartus
Größe Kind (cm)	37	34	34	37	44	40	39	40 (Drillinge)	37	40 (Gemini)	43	52
Geburtsgewicht (g)	1020	1150	700	980	1660	1180	1195	1800	950	1400	2155	3470
Perzentile (postpartal)	10.	10.	7.	< 3.	23.	5.	3.	50.	25.	25.	50.	50.
RR bei Aufnahme (mmHg)	175/110	160/95	140/80	110/80	135/80	150/90	120/60	125/75	115/65	110/70	125/80	--
Kreatinin (mg/dl) 0,55-1,02	0,9	0,61	0,53	0,75	0,55	0,72	0,58	0,59	0,37	0,62	0,46	--
Protein (g/dl) 6,6-8,3	5,1	6,0	5,0	6,3	6,5	5,2	---	6,3	---	--	5,3	--
Haptoglobin (g/dl) 0,45-2,05	1,08	1,33	0,26	---	0,66	0,14	---	---	---	0,86	1,16	--
Thrombozyten	---	297	116	183	334	154	194	399	---	163	306	--
AST (U/l) <31	35	26	384	21	14	94	25	17	23	52	26	--
ALT (U/l) <34	55	25	436	16	6	65	18	8	8	119	27	--

Tabelle 2: Mittelwerte \pm Standardabweichung klinischer Parameter in der Präeklampsiegruppe und der Kontrollgruppe.

	Präeklampsie	Kontrolle
Alter (Jahre)	28,71 \pm 6,37	26,5 \pm 5,26
SSW bei Geburt	30,29 \pm 2,42	30,86 \pm 2,55
Größe Kind (cm)	37,86 \pm 3,53	39,86 \pm 3,34
Geburtsgewicht (g)	1126,43 \pm 290,81	1530,71 \pm 416,14
Blutdruckwerte bei Aufnahme (mmHg)		
Systolisch	141,43 \pm 22,49	118,75 \pm 7,5
Diastolisch	85 \pm 15,55	72,5 \pm 6,45
Kreatinin (mg/dl)	0,67 \pm 0,12	0,51 \pm 0,12
Harnsäure (mg/dl)	5,75 \pm 1,08	----
Protein (g/dl)	5,68 \pm 0,66	----
Haptoglobin (g/l)	0,69 \pm 0,51	----
Thrombozyten	213 \pm 84,67	289,33 \pm 118,88
AST (U/l)	85,57 \pm 134,29	29,5 \pm 15,46
ALT (U/l)	88,71 \pm 154,65	40,5 \pm 53,09

3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem Plazentagewebe

Von den 12 zu untersuchenden Plazenten wurden jeweils ca. 1 cm³ große Stücke in 10 ml MEM-Medium verbracht. In einer Petrischale wurden die Chorionzotten abgeschabt. Das Gewebe wurde anschließend auf zwei Röhrchen aufgeteilt und zur Lyse jeweils mit 1ml RLT-Puffer und 10 μ l Mercaptoethanol versetzt. Mithilfe des Rneasy® Mini Kit (QIAGEN) wurde die RNA isoliert. Die Isolation beruht auf der Bindung von negativ geladenen Nukleinsäuren an Glasfaseroberflächen von Silicagel-Säulen in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie 1979). Für RNA sind die Bindungsbedingungen optimiert. Es wurde gemäß den Angaben des Protokolls des Herstellers gehandelt. Die Zellsuspension wurde für

10 min bei 13.000 upm zentrifugiert. Anschließend wurden pro Probe 2 Cups mit je 600 µl Lysat und 600 µl 70%igem Ethanol angesetzt. Das Mischen erfolgte durch Pipettieren. Dann wurde das Lysat auf ein Rneasy *spin column* gegeben und für 30 sec bei 13000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zwei Proben zu einer zusammengefasst. Nach dem Waschen der Proben mit 700 µl RW1-Puffer erfolgte erneut die Zentrifugation bei 13000 upm für 1 min. Nun wurde die Säule auf ein neues 2 ml Tube ohne Deckel gesetzt und zwei mal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und für 1 min bei 13000 upm zentrifugiert. Wieder wurde die Säule auf ein neues 2 ml Tube ohne Deckel gesetzt und für 1 min bei 13000 upm zentrifugiert. Dieses mal jedoch ohne die Zugabe von RPE-Puffer. Es folgte das Überführen der Säule auf ein E-Cup mit Deckel. Die RNA wurde mithilfe von 30 µl Aqua bidest eluiert und anschließend für 3 min ruhig stehen gelassen. Danach schloss sich die Zentrifugation für 1 min bei 13.000 upm an. Dann wurde die RNA auf Eis gestellt und ihre Konzentration mithilfe des Photometers bestimmt. Zur Bestimmung der mRNA-Konzentration wurden 7 µl Probe mit 63 µl Ampuwa versetzt.

3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Im ultravioletten Licht haben Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260nm ihr Absorptionsmaximum. Ein Indikator für die Reinheit der DNA bzw. RNA ist die Breite des Maximums. Diese wird durch den Quotient der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt (Glaser 1995). Verunreinigungen der Probe können durch die Verhältnisbildung verschiedener Absorptionswerte erkannt werden. Durch eine Amplitude in der Absorptionskurve bei 280 nm machen sich beispielsweise Proteinverunreinigungen bemerkbar. Die Bestimmung der Absorption erfolgte im Spektralphotometer (Biophotometer, Eppendorf). Es wurden 1-cm-Quarzküvetten (Quarzglas Suprasil, Hellma) mit 70 µl Gesamtvolumen beschickt und gegen Ampuwa (steriles H₂O, Fresenius Kabi) bestimmt.

3.4 Expressionsanalyse von Angiogenesefaktoren mittels Microarray

Die Analyse der Expression von Angiogenesefaktoren in den Plazentaprobe erfolgte unter Anwendung des Human Angiogenesis Gene Array (GEArray Q Series) von SuperArray, USA. Mit Microarrays lassen sich die messenger RNA-Mengen (mRNA) bestimmter Gene in Geweben nachweisen, und erlauben die parallele Analyse mehrerer Gene (Petrik 2006). Tabelle 3 zeigt den in dieser Arbeit verwendeten Gene Array. Der verwendete Human Angiogenesis Gene Array (GEArray Q Series) zeigt Gene auf, die in die biologischen Prozesse der Angiogenese involviert sind (siehe hierzu auch Gentabelle im Anhang). Dabei handelt es sich unter anderem um Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Chemokine, Cytokine, Matrix und Adhäsionsmoleküle, Proteasen und ihre Inhibitoren und Transkriptionsfaktoren (Copyright © 2000-2010 SABiosciences, a QIAGEN company). Die Erstellung und Biotinylierung der cDNA für die Gene Array Untersuchung wurde mit dem GEArray™ Q series Kit der Firma SuperArray Bioscience nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

3 µg Gesamt-RNA

3 µl Genspezifischer GEPrimer Mix (Puffer A)

10 µl RNase-freies Wasser

Der Reaktionsansatz wurde für 3 min auf 70 °C erhitzt und anschließend für 2 min auf 42 °C erhitzt. Für jede RNA-Probe wurden 10 µl Master-Labelingmix benötigt.

Zusammensetzung:

4 µl GE labeling Puffer (BN)

2 µl Biotin-16-dUTP 1mM

1 µl Rnase Inhibitor 40 U/µl

1 µl Reverse Transkriptase

2 µl H₂O

Für die Labeling Reaktion wurde der Labelingmix für 2 min auf 42 °C erhitzt.

Zum Reaktionsansatz wurden 10 µl zu jeder Probe addiert und für 90 min bei 42 °C inkubiert. 1 µl wurde für die Sondenkontrolle gewonnen. Die Sonde wurde in 750 µl Hy-Puffer überführt und bei 60 °C über Nacht hybridisiert. Zur Hybridisierung wurden die Membranen mit 3 ml vorgewärmter (60 °C) GEAhyb Hy-Lösung mit 100 µg/ml Salmon Sperm DNA (ss-DNA) für 1-2 h bei 60 °C hybridisiert. Anfeuchten der Membran mit 5 ml Aqua dest. . Ersetzen der Prähybridisierungslösung durch einen vorgewärmten (60 °C) Mix aus biotinylierter cDNA und 750 µl GEAhyb-Hybridisierungslösung. Weitere Inkubation bei 60 °C für 1-2 h. Anschließend Waschen der Membranen bei 60 °C 2 x 15 min mit 5 ml vorgewärmtem Waschpuffer I (2 x SSC, 1% SDS) und 2 x 15 min mit ca. 5 ml vorgewärmtem Waschpuffer II (0,1 x SSC, 0,5% SDS).

Die Sondenkontrolle erfolgte nach folgendem Schema:

1 µl nicht denaturierte Sonde zu 19µl 1x Agarose-Gel-Laufpuffer AGL geben (1:20),

aus 1:20 3 µl entnehmen und in 9 µl AGL-Puffer geben (1:80),

aus 1:80 3 µl entnehmen und in 9 µl AGL-Puffer geben (1:320),

aus 1:320 3 µl entnehmen und in 9 µl AGL-Puffer geben (1:1280),

aus 1:1280 3 µl entnehmen und in 9 µl AGL-Puffer geben (1:1520),

es wurden jeweils 1 µl von jeder Verdünnung auf HyBong nylon membrane aufgetragen und ca. 10 min lufttrocknen gelassen. Zum Nachweis der hybridisierten cDNA wurde das Chemiluminescent Detection GEArray Kit (D-01) Biomol nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membranen wurden für 40 min mit 2 ml GEA-Blockierungspuffer Q inkubiert. Dann Inkubation mit 2 ml Puffer F plus Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase (1:8000) für 10 min Nach weiteren Waschvorgängen mit 10 ml TBE-Puffer erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem Substrat. Die hervorgerufene Chemilumineszenz wurde radiographisch detektiert und anschließend mit dem Programm KD1 von Kodak bearbeitet und ausgewertet.

Tabelle 3: Angiogenesis Gene Array.

ADAMTS1 1	ADAMTS8 2	ANG 3	ANGPT1 4	ANGPT2 5	CD36 6	CDH5 7	CHGA 8
CSF3 9	EDG1 10	EFNA2 11	EFNA5 12	EFNB2 13	EGF 14	EGFR 15	ENG 16
EPHB4 17	ERBB2 18	ETS1 19	F2 20	FGF1 21	FGF2 22	FGF4 23	FGF6 24
FGF7 25	FGFR1 26	FGFR2 27	FGFR3 28	FGFR4 29	FIGF 30	FLK1 31	FLT1 32
FN1 33	GRO1 34	HGF 35	HIF1A 36	HPSE 37	ID1 38	ID3 39	IFNA1 40
IFNB1 41	IFNG 42	IGF1 43	IL10 44	IL12A 45	IL8 46	ITGA5 47	ITGAV 48
ITGB3 49	AMOT 50	COL18A1 51	MADH1 52	MDK 53	MMP2 54	MMP9 55	MSR1 56
NOS3 57	NRP1 58	PDGFA 59	PDGF-BB 60	PDGFRA 61	PDGFRB 62	PECAM1 63	PF4 64
PGF 65	PLAU 66	PRL 67	PTGS1 68	PTGS2 69	PTN 70	RSN 71	SCYA2 72
SERPINB5 73	SERPINF1 74	SPARC 75	SPP1 76	TEK 77	TGFA 78	TGFB1 79	TGFB2 80
TGFB3 81	TGFBR1 82	TGFBR2 83	TGFBR3 84	THBS1 85	THBS2 86	THBS3 87	THBS4 88
TIE 89	TIMP1 90	TIMP2 91	TNFA 92	TNFSF15 93	VEGF 94	VEGFB 95	VEGFC 96
PUC18 97	PUC18 98	PUC18 99	Blank 100	Blank 101	Blank 102	GAPD 103	GAPD 104
PPIA 105	PPIA 106	PPIA 107	PPIA 108	RPL13A 109	RPL13A 110	ACTB 111	ACTB 112

Tabelle 4: Untersuchte Angiogenesefaktoren.

Symbol	Beschreibung	Gen
THBS1	Homo sapiens thrombospondin 1	TSP-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor	VEGF
ANGPT2	Homo sapiens angiopoietin-2 mRNA	Angiopoietin-2
ENG	Homo sapiens endoglin	Endoglin
FLT1	Homo sapiens vascular endothelial growth factor receptor mRNA	FLT1
ABS / AMOT	Homo sapiens angiostatin binding protein 1 mRNA	Angiomotin

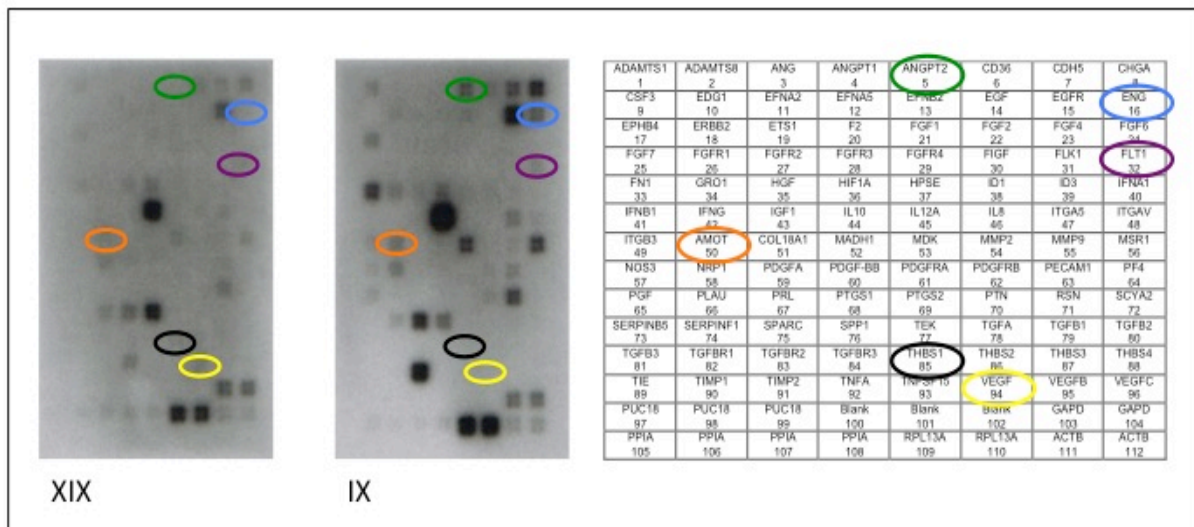


Abbildung 4: XIX Microarray Kontrollgruppe. IX Microarray Präeklampsiegruppe.
Rechte Seite: Untersuchte Gene farbig markiert.

3.5 Reverse Transkription

Bei der Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wird die mRNA der zu untersuchenden Zellen in copy DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Umschreiben in einen komplementären Strang geschieht mittels des Enzyms Reverse Transkriptase. Zum *Priming* wurden Oligo-dT-Primer verwendet. Primer stellen den Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme dar.

Der DNase I Verdau und die cDNA-Synthese wurden mit dem SuperScript™ Preamplifikations Kit (Invitrogen) vorgenommen. Um eine Kontamination der Gesamt-RNA auszuschließen, fand zunächst eine Inkubation mit den Enzymen RNasin und DNase I statt.

Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

RNA	1 µg
DNase I	1 µl
RNasin	1 µl

Der Ansatz wurde mit Ampuwa auf 14 µl aufgefüllt. Es folgte die Inkubation für 30 min bei 37 °C im Thermocycler mit anschließender Denaturierung bei 70 °C für 10 min. Danach wurden die Proben bei 4 °C gekühlt. Die Oligo-dT-Primer (Roche) binden spezifisch an die Poly-(A)-Sequenz der RNA. Die gleichzeitige Zugabe der

Reversen Transkriptase (SuperScript, Invitrogen) in Anwesenheit von dNTPs bewirken das Umschreiben in die entsprechenden DNA-Moleküle.

Folgende Reagenzien bilden den Reaktionsansatz:

Oligo-(dT)15 Primer	8,0 µl
dNTPs (10mM)	4,0 µl
5xRT-Puffer	8,0 µl
0,1 M DTT	4,0 µl
SuperScript (200 U/µl)	2,0 µl

Die Reagenzien wurden als Master-Mix angesetzt. Jeweils 26 µl des Master-Mixes wurden zur Probe gegeben. Anschließend wurde alles im Thermocycler für 60 min bei 37 °C inkubiert und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Um eine für die PCR einsetzbare cDNA Verdünnung zu erzielen, wurden 10 µl cDNA mit 30 µl Ampuwa zu einem 1:4 Ansatz verdünnt. Anschließend erfolgte die Lagerung der Proben bei -20 °C.

3.6 PCR-Amplifikation

Durch die Polymerase-Kettenreaktion können spezifische DNA-Sequenzen in vitro amplifiziert werden. Dazu wird zunächst ein DNA-Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur auf 90 °C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf die gewünschte Annealing-Temperatur kommt es zum Anheften der Oligonucleotid-Primer. Durch das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase erfolgt anschließend die Elongation und damit die Komplementierung der beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang. Da die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den folgenden Zyklus dienen, kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Moleküle.

3.6.1 Housekeeping-Gen L7

Im Gegensatz zu regulierten Genen sind Housekeeping-Gene gekennzeichnet durch eine Exprimierung unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen.

Mit der RT-PCR für L7, welches ein ribosomales Protein kodiert, soll gezeigt werden, dass die gewonnenen cDNA-Proben voll funktionsfähig und äquivalent eingesetzt sind. Da die Transkription von L7 keinen deutlichen Änderungen unterliegt, dient dessen Amplifikation als Kontrolle. Die L7 Primer (MWG Biotech) flankieren ein 378 bp Fragment.

3.6.2 Reaktionsbedingungen für PCR

Der Reaktionsansatz für die PCR war für alle Gene gleich.

Der Ansatz enthielt die folgenden Reagenzien:

Steriles H ₂ O	11,1 µl
Primer s	0,3 µl
Primer as	0,3 µl
10 x PCR Puffer	1,5 µl
NTP Mix	1,2 µl
Taq-Polymerase	0,075 µl
cDNA	0,6 µl

Zu 14,4 µl Mastermix wurden jeweils 0,6 µl cDNA hinzugefügt. Dies wurde pro Probe in einem 0,5 ml Tube (Eppendorf) angesetzt. Anschließend fand die Genamplifikation unter den primerspezifischen Bedingungen im Thermocycler statt (siehe Tab. 5).

Um Verunreinigungen der Proben auszuschließen, lief bei jeder PCR eine Negativkontrolle mit. In diesem Fall wurden die 0,6 µl cDNA durch Ampuwa ersetzt.

Tabelle 5: PCR-Zyklusbedingungen.

Primer	Produkt	Zyklen	Denaturierung	1 Zyklus			Ende der Amplifizierung	
L7	357 bp	23	94°C 120sec	94°C 30sec	54°C 60sec	72°C 60sec	72°C 10min	4°C ∞
ABS	500 bp	21		94°C 60sec	60°C 60sec	72°C 60sec		
ANG2	448 bp	32		94°C 60sec	57°C 60sec	72°C 60sec		
THBS1	187 bp	32		94°C 60sec		72°C 60sec		
FLT	535 bp	35		94°C 60sec	56°C 60sec	72°C 60sec		
VEGF	226 bp	33		94°C 60sec	63°C 60sec	72°C 60sec		
ENG	165 bp	27		94°C 60sec	62°C 60sec	72°C 60sec		

3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese beruht auf der Bestimmung und dem Vergleich von nach Größe aufgetrennten Nukleinsäure-Strängen. Die Agarose fungiert dabei als Sieb für die DNA-Moleküle. Das elektrische Feld dient dazu, die Nukleinsäure-Moleküle durch das Gel zu ziehen. Kleinere DNA-Moleküle wandern dabei schneller durch die Gelporen als größere. In diesem Fall erfolgte die Auftrennung der amplifizierten DNA -Fragmente in einem 1,5%igen Agarose-Gel.

Dazu wurden Agarose und TBE-Puffer vermischt und aufgekocht. Anschließend wurde das noch flüssige Gel zum Aushärten in eine Gelkammer gegossen. Die Geltaschen bildeten sich durch einen eingesteckten Kamm, der nach dem Aushärten des Gels entfernt wurde. Als Laufpuffer diente TBE- Puffer. Bevor die Gelkammern mit den Proben beschickt wurden, mussten diese mit DNA-Ladepuffer versetzt

werden, der als Farbstoffmarker dient. Hierfür wurden 10 µl Probe mit 2 µl 10 x DNA-Ladepuffer gemischt und jeweils 10 µl in die Geltaschen gegeben um die Lauffront verfolgen zu können. Das Abschätzen der Laufstrecke ermöglicht der im Ladepuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau. Um später die Größe der Banden bestimmen zu können wurden zusätzlich 5 µl eines 100 bp-DNA-Ladder (Invitrogen) aufgetragen. Diese enthält DNA-Fragmente definierter Größe. Die elektrische Auftrennung erfolgte bei 88 V für ca 50 min. Um die Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend für 25 min in ein Ethidiumbromidbad gelegt. Da Ethidiumbromid zwischen den Basen der DNA interkaliert, wird es unter UV-Licht erkennbar. So waren die Banden auf dem UV-Transilluminator (Biometra) bei 312 nm wahrnehmbar. Die Ergebnisse wurden mit einer Polaroidkamera fotodokumentiert und mithilfe der BioDocAnalyse 2.1 Software (Biometra) ausgewertet.

3.6.4 Auswertung der RT-PCR-Daten

Alle RT-PCRs wurden pro zu untersuchendem Gen dreimal wiederholt. Die Auswertung der Banden erfolgte mit der Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3, Kodak). Dabei wurde die Expression der Gene durch den Quotient von jeweiligem Gen zu L7 bestimmt.

3.7 Immunhistochemie

Zunächst mussten die von den Plazentaparaffinblöcken gewonnen Paraffinschnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden sie zunächst zweimal für fünf Minuten in ein Xylolbad und zweimal für fünf Minuten in ein Propanolbad getaucht. Daran schloss sich das Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe wie folgt an:

2 x 5 min 96% ETOH

2 x 5 min 70% ETOH

1 x 5 min dem. H₂O

Anschließend wurden die Schnitte in Citratpuffer zweimal für fünf Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Spülen mit Wasser wurden die Schnitte für 20-30 Minuten in einer Dunkelkammer mit 10%ig. Wasserstoffperoxid-Lösung (20 ml H₂O₂+ 180 ml H₂O) versetzt. Nach dem Spülen in Wasser für zweimal fünf Minuten erfolgte die Behandlung der Schnitte mit dem Zymed Histostain Kit. Dazu wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer 15 Minuten mit Blocking Solution benetzt. Nach Entfernen der Blocking solution wurde der erste Antikörper aufgetragen. Inkubation der Schnitte mit Primärantikörper 1:250 und Lagerung in der feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht.

Am nächsten Tag Waschen der Schnitte im Färbegestell dreimal für fünf Minuten in PBS. Inkubation für 20 Minuten mit dem Zweitantikörper. Erneut Waschen 3 x 5 min in PBS. Inkubation für 10 Minuten mit Streptavidin-Peroxidase Zymed Kit Lösung. Erneut Waschen 3 x 5 min in PBS. Abschließend Färbung der Schnitte mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol).

3.7.1 Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der immunzytochemisch behandelten Gewebsschnitte erfolgte unter dem Mikroskop Othoplan und dem Mikroskop (IX51) mithilfe der Software analySIS getIT von Olympus.

Die Färbeintensität wurde dabei wie folgt bewertet:

Staining intensity:

0 = no staining reaction

1 = weak staining reaction

2 = moderate staining reaction

3 = strong staining reaction

(Gründker et al. 2004)

Die Auswertung wurde von 2 Personen unabhängig voneinander durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnis des Angiogenese-Gen-Array

In dieser Arbeit wurden auf Grundlage der aus 12 Plazenten gewonnenen mRNA Angiogenese-Gen-Arrays durchgeführt. Diese Methode ermöglichte die parallele Untersuchung von 96 Genen, die in den Prozess der Angiogenese involviert sind.

Die Plazenten stammten aus sieben Schwangerschaften mit (Präeklampsiegruppe) und fünf Plazenten ohne Präeklampsie (Kontrollgruppe). Für die Kontrollgruppe wurden vier Schwangerschaften mit vergleichbar frühem Entbindungszeitpunkt ausgewählt sowie eine mit termingerechter Entbindung. Bei Mehrlingsschwangerschaften ist das Risiko für eine Frühgeburt u. a. durch eine Zervixinsuffizienz oder einen vorzeitigen Blasensprung erhöht (Strauss 2006). Dementsprechend stammen zwei Plazenten in der Kontrollgruppe aus Mehrlingsschwangerschaften. In der Präeklampsiegruppe zeigten drei Patientinnen eine typische Präeklampsie. Eine Patientin zeigte Symptome aus dem präeklampsischen Formenkreis. Zu diesem zählt neben der Präeklampsie die schwangerschaftsinduzierte Hypertonie, die Eklampsie, das HELLP-Syndrom, die chronische Hypertonie und die Pfropfgestose. Drei weitere Patientinnen wurden aufgrund sehr untergewichtiger Kinder für das Gestationsalter (SGA = *small for gestational age*) ausgewählt in Kombination mit einer Plazentainsuffizienz und/oder einem pathologischem CTG. Abbildung 5 zeigt die Expressionsmuster der einzelnen Plazenten der Kontrollgruppe. Es fällt auf, dass Plazenta 8 und Plazenta 12 Ausreißer darstellen, da Anzahl und Intensität der exprimierten Gene im Vergleich zu den anderen Plazenten herabreguliert zu sein scheinen. Die Expressionsprofile der Plazenten 9, 10 und 11 wirken auf den ersten Blick homogen.

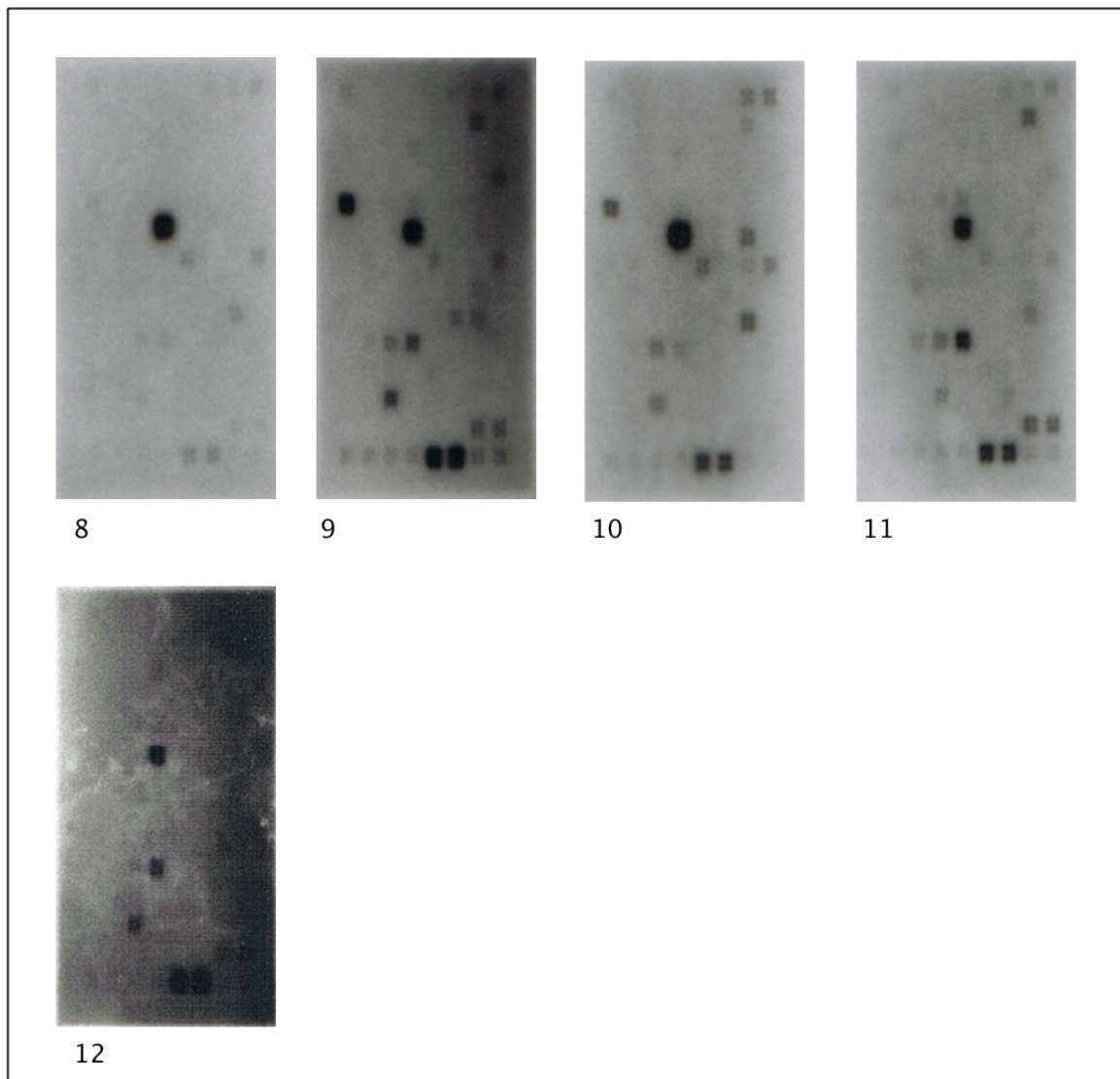


Abbildung 5: Ergebnis des Gen-Array in der Kontrollgruppe

In Tabelle 6 wird die Expressionsintensität der einzelnen Gene pro Plazenta in der Kontrollgruppe entsprechend ihrer Färbereaktion (*stainig reaction*) detailliert dargestellt.

Tabelle 6: Expressionsstärke der Gene der Kontrolle. 0 = no staining reaction, 1 = weak staining reaction, 2 = moderate staining reaction, 3 = strong staining reaction, x = Housekeeping-Gen/ Negativkontrolle in der Kontrollgruppe. Zuordnung der Gene siehe Tabelle 3 Gene Array in Material und Methoden.

Gen	KO 8	KO 9	KO 10	KO 11	KO 12
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	1	1	2	1	0
8	1	2	2	1	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	2	1	2	0
16	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	1
21	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0
32	0	1	0	0	0
33	0	3	3	0	0
34	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0
44	3	3	3	3	3
45	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0
47	0	0	3	0	0
48	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0
53	2	1	3	0	0
54	0	0	0	0	0
55	0	0	1	0	0
56	2	1	2	0	0

Gen	KO 8	KO 9	KO 10	KO 11	KO 12
57	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0
66	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0
70	0	1	0	0	0
71	2	1	3	1	1
72	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0
74	0	0	0	0	0
75	1	1	2	2	0
76	1	2	1	3	2
77	0	0	0	0	0
78	0	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
81	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0
83	0	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0
86	0	0	0	0	0
87	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
91	1	2	2	1	2
92	0	0	0	0	0
93	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	0
95	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0
97	x	x	x	x	x
98	x	x	x	x	x
99	x	x	x	x	x
100	x	x	x	x	x
101	x	x	x	x	x
102	x	x	x	x	x
103	x	x	x	x	x
104	x	x	x	x	x
105	x	x	x	x	x
106	x	x	x	x	x
107	x	x	x	x	x
108	x	x	x	x	x
109	x	x	x	x	x
110	x	x	x	x	x
111	x	x	x	x	x
112	x	x	x	x	x

Plazenta 8 zeigt fünf schwach exprimierte Gene. Drei Gene sind moderat und ein Gen ist stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 8 neun von 96 Genen reguliert.

Plazenta 9 zeigt sieben schwach exprimierte Gene. Vier Gene sind moderat und zwei Gene sind stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 9 dreizehn von 96 Genen reguliert.

Plazenta 10 zeigt drei schwach exprimierte Gene. Fünf Gene sind moderat und fünf Gene sind stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 10 dreizehn von 96 Genen reguliert.

Plazenta 11 zeigt vier schwach exprimierte Gene. Zwei Gene sind moderat und zwei Gene sind stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 11 acht Gene von 96 reguliert.

Plazenta 12 zeigt zwei schwach exprimierte Gene. Zwei Gene sind moderat und ein Gen ist stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 12 fünf von 96 Genen reguliert.

Vergleicht man anhand dieser Auflistung die Anzahl der exprimierten Gene und lässt die Intensität außer Acht, dann sind in Plazenta 11 und Plazenta 12 die wenigsten Gene mit acht bzw. fünf reguliert.

Vergleicht man die Microarrays der Plazenten der Kontrollgruppe miteinander, fällt auf, dass sie hinsichtlich der Anzahl der schwach, moderat und stark exprimierten Gene stark variieren. Es liegt keine homogene Gruppe vor (siehe Abb. 6).

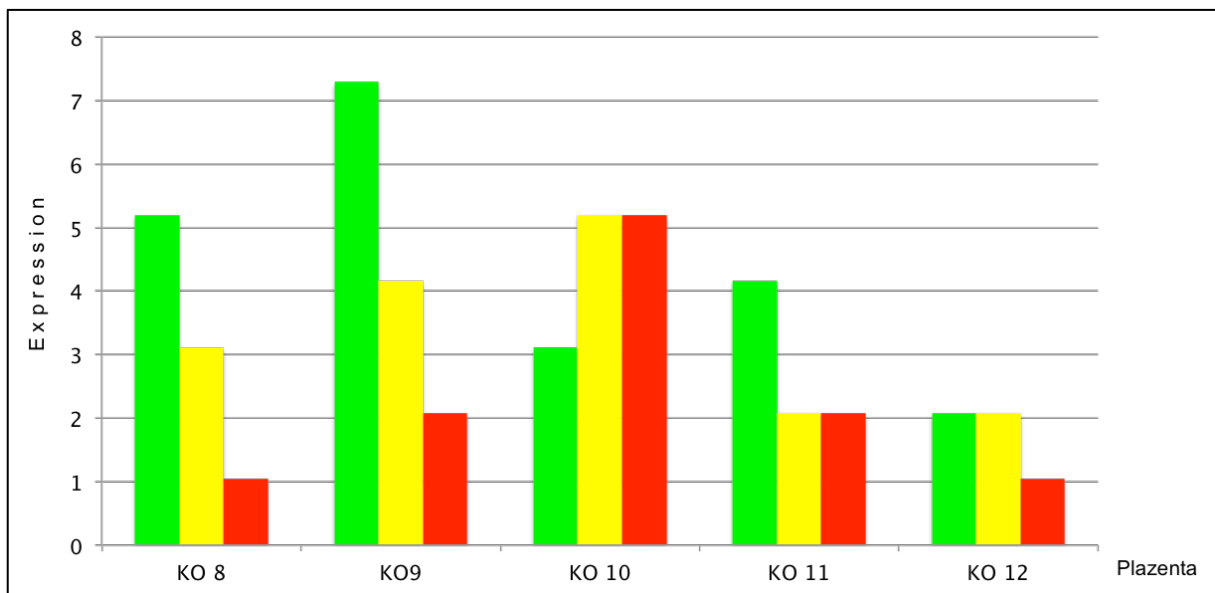


Abbildung 6: Genexpression Kontrollgruppe. Grün = weak staining reaction, gelb = moderate staining reaction, rot = strong staining reaction.

Andeutungsweise lassen sich vergleichbare Muster wiederfinden. So zeigen Kontrolle 8 und Kontrolle 9 in der Abstufung der Expressionsstärke ein ähnliches Profil. Die Färbereaktion ist jeweils schwach, hier grün dargestellt, am häufigsten vertreten, gefolgt von moderater und starker Färbung. Auch in den Kontrollen 10 und 11 gibt es Übereinstimmungen. Hier sind moderate und starke Färbung jeweils im gleichen Maße exprimiert. In Kontrolle 12 hingegen sind schwache und moderate Expression gleich oft vertreten. In Kontrolle 10 zeigten sich die meisten stark exprimierten Gene. In Kontrolle 8 und 12 sind am wenigsten stark exprimierte Gene zu finden.

Abbildung 7 zeigt die Expressionsmuster der einzelnen Plazenten der Präeklampsiegruppe.

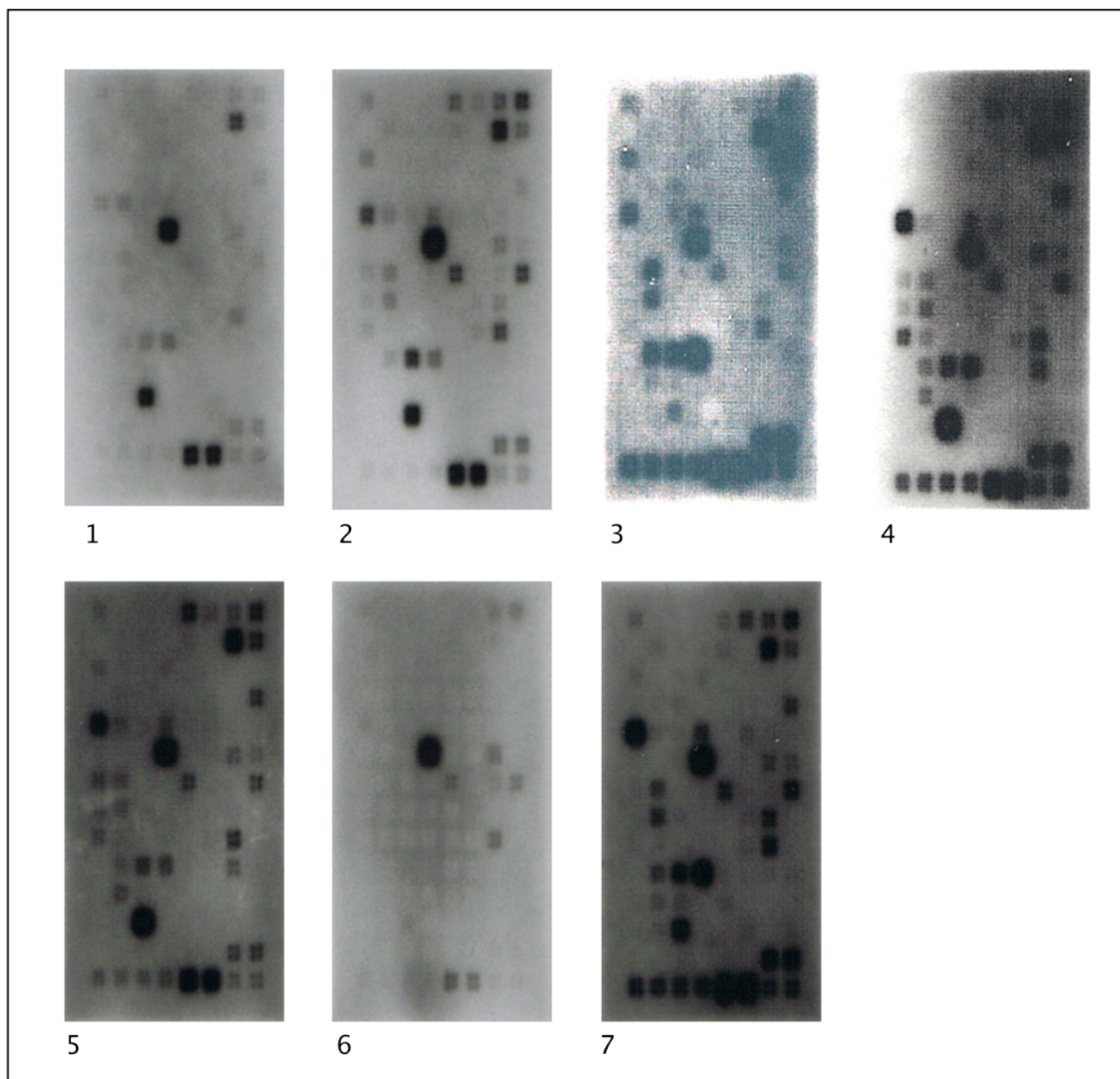


Abbildung 7: Ergebnis des Gen-Arrays in der Präeklampsiegruppe.

Es fällt auf, dass Plazenta 1 und Plazenta 6 Ausreißer darstellen, da Anzahl und Intensität der exprimierten Gene im Vergleich mit den anderen Plazenten herabreguliert zu sein scheinen. Die Expressionsprofile der Plazenten 3, 4, 5 und 7 wirken auf den ersten Blick homogen.

In Tabelle 7 wird die Expressionsintensität der einzelnen Gene pro Plazenta in der Präeklampsiegruppe entsprechend ihrer *stainig reaction* nochmals genauer aufgeschlüsselt.

Tabelle 7: Expressionsstärke der Gene der Präeklampsiegruppe. 0 = no staining reaction, 1 = weak staining reaction, 2 = moderate staining reaction, 3 = strong staining reaction, x = House-keeping-Gen/ Negativkontrolle in der Kontrollgruppe. Zuordnung der Gene siehe Tabelle 3 Gene Array in Material und Methoden.

Gen	SGA 1	SGA 2	SGA 3	SGA 4	SGA 5	SGA 6	SGA 7
1	0	0	1	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	2	2	0	1
6	0	1	1	1	1	0	2
7	0	1	0	1	1	1	2
8	1	2	2	2	2	2	3
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	2	2	3	3	3	0	3
16	0	1	0	3	2	0	2
17	0	0	2	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	3	2	0	2
33	1	2	3	3	3	0	3
34	1	0	0	0	0	0	0
35	0	0	1	0	0	0	0
36	0	1	2	2	1	0	2
37	0	0	0	1	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	1
39	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	1	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0
44	3	3	3	3	3	3	3
45	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0
47	0	1	0	2	1	2	1
48	0	0	1	0	1	0	1
49	0	0	0	1	1	0	0
50	0	1	3	1	1	0	2
51	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0
53	0	2	2	2	2	2	2
54	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	1	0
56	0	2	2	2	2	2	2

Gen	SGA 1	SGA 2	SGA 3	SGA 4	SGA 5	SGA 6	SGA 7
57	0	0	0	1	1	0	0
58	0	1	2	1	1	0	2
59	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	1	0	0	0	2
64	0	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	1	1	0	0
66	0	0	0	1	0	0	0
67	0	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	1	0	0	0	0
71	1	2	2	3	2	2	2
72	0	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0
74	0	0	3	1	1	0	2
75	1	2	3	2	2	0	3
76	1	1	3	3	2	0	3
77	0	0	0	0	0	0	0
78	0	0	0	0	0	0	0
79	0	0	0	2	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0
81	0	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	1	0	0	1
83	0	0	0	0	0	0	1
84	0	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0	0	0
86	0	0	0	0	0	0	0
87	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0
91	3	3	2	3	3	0	3
92	0	0	0	0	0	0	0
93	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	0	0	0
95	0	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0	0	0
97	x	x	x	x	x	x	x
98	x	x	x	x	x	x	x
99	x	x	x	x	x	x	x
100	x	x	x	x	x	x	x
101	x	x	x	x	x	x	x
102	x	x	x	x	x	x	x
103	x	x	x	x	x	x	x
104	x	x	x	x	x	x	x
105	x	x	x	x	x	x	x
106	x	x	x	x	x	x	x
107	x	x	x	x	x	x	x
108	x	x	x	x	x	x	x
109	x	x	x	x	x	x	x
110	x	x	x	x	x	x	x
111	x	x	x	x	x	x	x
112	x	x	x	x	x	x	x

Plazenta 1 zeigt sechs schwach exprimierte Gene. Ein Gen ist moderat und zwei Gene sind stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 1 neun von 96 Genen reguliert.

Plazenta 2 zeigt neun schwach exprimierte Gene. Sieben Gene sind moderat und zwei Gene sind stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 2 achtzehn von 96 Genen reguliert.

Plazenta 3 zeigt sechs schwach exprimierte Gene. Acht Gene sind moderat und sieben Gene sind stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 3 einundzwanzig von 96 Genen reguliert.

Plazenta 4 zeigt zwölf schwach exprimierte Gene. Acht Gene sind moderat und acht Gene sind stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 4 achtundzwanzig von 96 Genen reguliert.

Plazenta 5 zeigt elf schwach exprimierte Gene. Neun Gene sind moderat und vier Gene sind stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 5 vierundzwanzig von 96 Genen reguliert.

Plazenta 6 zeigt zwei schwach exprimierte Gene. Fünf Gene sind moderat und ein Gen ist stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 6 acht von 96 Genen reguliert.

Plazenta 7 zeigt sieben schwach exprimierte Gene. Zwölf Gene sind moderat und sieben Gene sind stark exprimiert. Insgesamt sind somit in Plazenta 7 sechsundzwanzig von 96 Genen reguliert.

Vergleicht man anhand dieser Auflistung die Anzahl der exprimierten Gene und lässt die Intensität außer Acht, dann sind in Plazenta 1 und Plazenta 6 die wenigsten Gene reguliert.

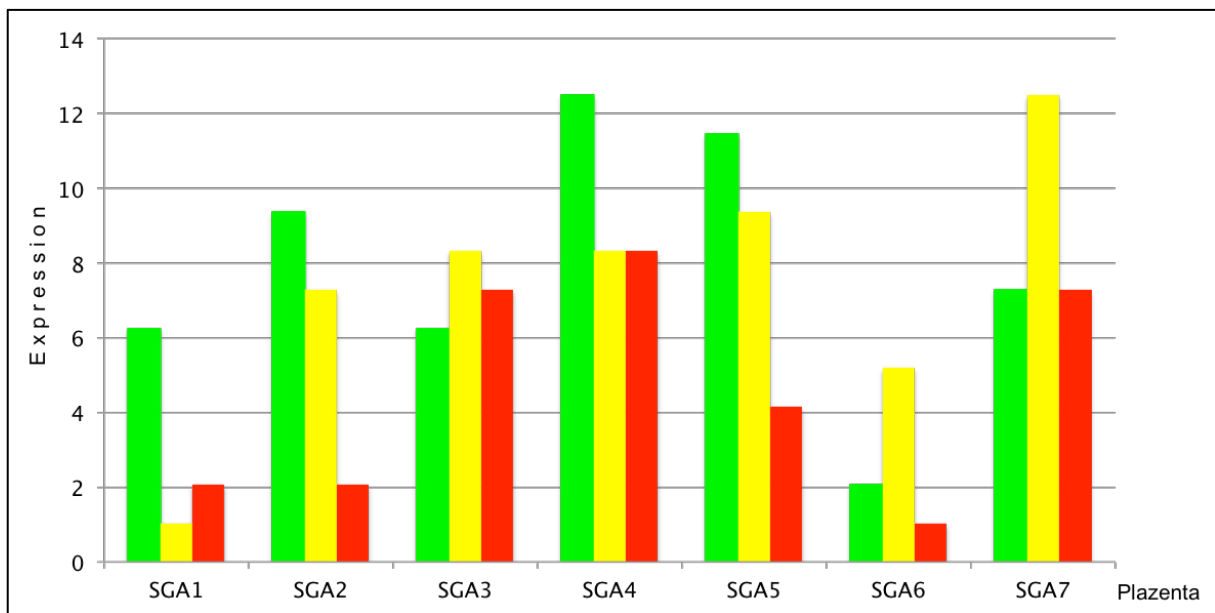


Abbildung 8: Genexpression Präeklampsiegruppe. Grün = weak staining reaction, gelb = moderate staining reaction, rot = strong staining reaction.

Vergleicht man die Microarrays der Plazenten der Präeklampsiegruppe miteinander fällt auf, dass die Expressionswerte stark variieren. Auch hier liegt kein homogenes Expressionsmuster vor. Ähnliche Expressionsprofile zeigen SGA 2 und SGA 5 mit jeweils absteigend häufig exprimierten Genen. Insbesondere in den Plazenten 3, 4, 5 und 7 sieht man eine höhere Anzahl stark exprimierter Angiogenesefaktoren. In den Plazenten 1 und 6 der Präeklampsiegruppe ist die angiogene Aktivität insgesamt am schwächsten.

Vergleicht man die Genarrays der Kontrollgruppe mit denen der Präeklampsiegruppe, fällt insgesamt eine höhere angiogene Aktivität in der Präeklampsiegruppe auf.

Weiterhin wirken die Expressionsmuster in der Kontrollgruppe homogener als in der Präeklampsiegruppe.

Dadurch, dass weder in der Kontroll- noch in der Präeklampsiegruppe ein vergleichbares Expressionsmuster vorliegt, ist ein direkter Vergleich der beiden Gruppen nicht möglich. In 71% der Plazenten (5 von 7) der Präeklampsiegruppe ist die Expression angiogeneseregulierender Gene stärker ausgeprägt als in den Plazenten der Kontrollgruppe. So konnte bei den Plazenten 2, 3, 4, 5 und 7 der Präeklampsiegruppe bei einer Vielzahl von Angiogenesegenen eine stärkere Expression nachgewiesen

werden. Nur bei zwei Plazenten der Präeklampsiegruppe (1 und 6) zeigte sich eine zur Kontrollgruppe vergleichbare bis verminderte Expression von Angiogenesegenen. In keiner der Kontrollplazenten konnte jedoch eine so starke Expression von angiogeneseregulierenden Genen nachgewiesen werden wie in den Plazenten 3, 4 und 7 der Präeklampsiegruppe.

Da eine umfassende Gegenüberstellung aller Präeklampsie- und Kontrollplazenten als nicht sinnvoll erachtet wurde, wurde Plazenta 11 der Kontrollgruppe als repräsentative Kontrolle ausgewählt. Bei Kontrolle 11 kam es in der 33. Schwangerschaftswoche aufgrund einer vorzeitigen Plazentalösung zur Entbindung. Das Geburtsgewicht des Kindes lag mit 2155 g auf der 50. Perzentile. Blutdruck, Haptoglobin, Thrombozytenanzahl sowie Leberwerte befanden sich im Normbereich.

Kreatinin und Protein waren leicht erniedrigt. Dabei gilt ein erniedrigtes Kreatinin als nicht pathologisch. Ebenso ist der erniedrigte Proteinwert als nicht pathologisch zu werten, da es während einer Schwangerschaft durch das erhöhte Blutvolumen zu einer Pseudohypoproteinämie kommen kann. Aufgrund dieser Werte war Kontrolle 11 am besten zur Gegenüberstellung geeignet.

4.2 Gegenüberstellung von Kontrolle und SGA

4.2.1 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 1

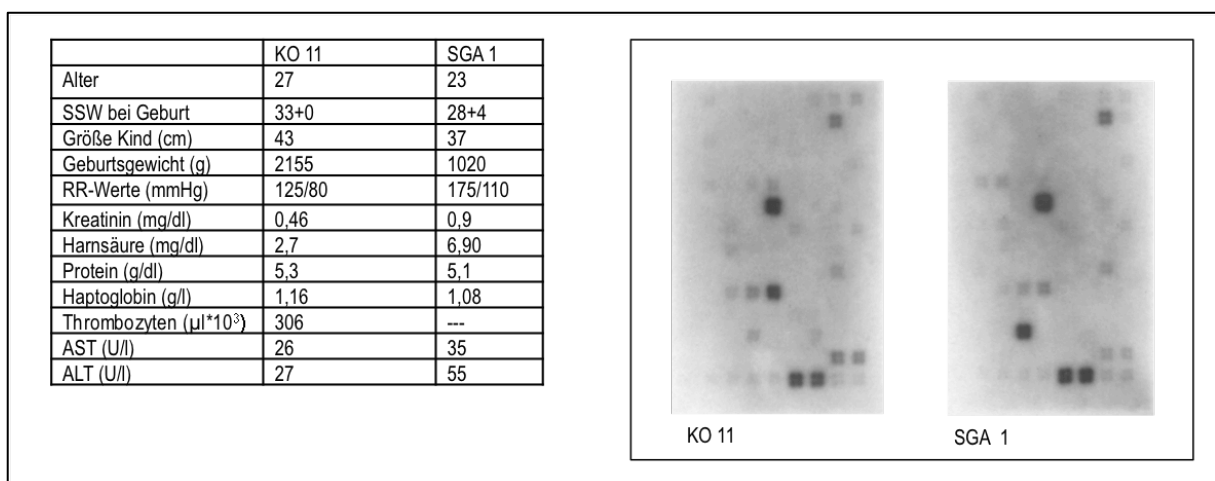


Abbildung 9: Gegenüberstellung der Plazenten Kontrolle 11 und SGA 1. Linke Seite: Auflistung der klinischen Parameter. Rechte Seite: Gen-Array.

Das Geburtsgewicht des Kindes der SGA-Plazenta 1 liegt mit 1020 g im Bereich der 25. Perzentile. Der Blutdruck der Mutter ist mit 175/110 mmHg deutlich erhöht, ebenso wie der Leberparameter ALT mit 55 U/l erhöht ist. Indikation zur Schwangerschaftsbeendigung war eine schwere Präeklampsie.

Lässt man diejenigen Gene unberücksichtigt, die auch in der Kontrollgruppe exprimiert sind, dann wurde in der SGA-Plazenta 1 das Gen GRO1 exprimiert.

1	2	3	4
CHGA (8)	RPL13A (109-110)	IL10 (44)	
HIF1A (36)	FN1 (33)		
MSR1 (56)	ITGA5 (47)		
MDK (53)	FLT1 (32)		
RSN (71)	PTN (70)		
TIMP2 (91)			
CDH5 (7)			
SPP1 (76)			
SPARC (75)			
EGFR (15)			
MMP9 (55)			
ADAMTS1(1)			
FGF1 (21)			
PECAM1 (63)			
PPIA (105-108)			
ACTB (111-112)			
GAPD (103-104)			

1	2	3	4
CHGA (8)	EGFR (15)	RPL13A (110)	IL10 (44)
FN1 (33)		RPL13A (109)	
GRO1 (34)		TIMP2 (91)	
RSN (71)			
SPP1 (76)			
SPARC (75)			
GAPD (103)			

Abbildung 10: Auswertung Gen-Array. Tabelle links: Alle in den Kontrollen regulierte Gene. Tabelle rechts: In Plazenta SGA 1 regulierte Gene. Bewertung der Expressionsstärke von 1 bis 4.

4.2.2 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 2

	KO 11	SGA 2
Alter	27	34
SSW bei Geburt	33+0	29+3
Größe Kind (cm)	43	34
Geburtsgewicht (g)	2155	1150
RR-Werte (mmHg)	125/80	160/95
Kreatinin (mg/dl)	0,46	0,61
Harnsäure (mg/dl)	2,7	6,6
Protein (g/dl)	5,3	6
Haptoglobin (g/l)	1,16	1,33
Thrombozyten ($\mu\text{l} \cdot 10^3$)	306	297
AST (U/l)	26	26
ALT (U/l)	27	25

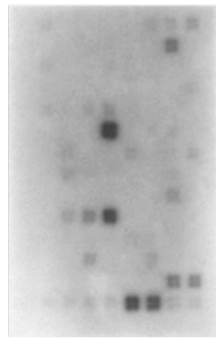
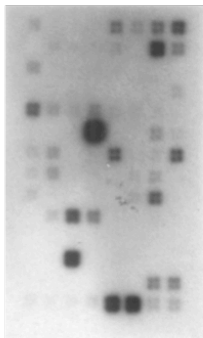



Abbildung 11: Gegenüberstellung der Plazenten Kontrolle 11 und SGA 2. Linke Seite: Auflistung der klinischen Parameter. Rechte Seite: Gen-Array.

Das Geburtsgewicht des Kindes der SGA-Plazenta 2 liegt mit 1150 g im Bereich der 23. Perzentile. Der Blutdruck der Mutter ist mit 160/95 mmHg erhöht. Indikation zur Schwangerschaftsbeendigung war eine schwere Präeklampsie.

Auf den ersten Blick fällt im Gen-Array von SGA 2 die hohe Anzahl exprimierter Gene auf. Lässt man diejenigen Gene unberücksichtigt, die auch in der Kontrollgruppe exprimiert sind, dann wurden in der SGA-Plazenta 2 die Gene ANGPT2, CD36, ENG, AMOT und NRP1 exprimiert.

1	2	3	4
CHGA (8)	RPL13A (109-110)	IL10 (44)	
HIF1A (36)	FN1 (33)		
MSR1 (56)	ITGA5 (47)		
MDK (53)	FLT1 (32)		
RSN (71)	PTN (70)		
TIMP2 (91)			
CDH5 (7)			
SPP1 (76)			
SPARC (75)			
EGFR (15)			
MMP9 (55)			
ADAMTS1(1)			
FGF1 (21)			
PECAM1 (63)			
PPIA (105-108)			
ACTB (111-112)			
GAPD (103-104)			

1	2	3	4
ANGPT2 (5)	CHGA (8)	TIMP2 (91)	IL10 (44)
CD36 (6)	EGFR (15)	RPL13A (110)	
CDH5 (7)	FN1 (33)	RPL13A (109)	
ENG (16)	MDK (53)		
HIF1A (36)	MSR1 (56)		
ITGA5 (47)	RSN (71)		
AMOT (50)	SPARC (75)		
NRP1 (58)			
SPP1 (76)			
GAPD (103)			
GAPD (104)			

Abbildung 12: Auswertung Gen-Array. Tabelle links: Alle in den Kontrollen regulierte Gene. Tabelle rechts: In Plazenta SGA 2 regulierte Gene. Bewertung der Expressionsstärke von 1 bis 4.

4.2.3 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 3

	KO 11	SGA 3
Alter	27	25
SSW bei Geburt	33+0	26+5
Größe Kind (cm)	43	34
Geburtsgewicht (g)	2155	700
RR-Werte (mmHg)	125/80	140/80
Kreatinin (mg/dl)	0,46	0,6
Harnsäure (mg/dl)	2,7	4,7
Protein (g/dl)	5,3	5
Haptoglobin (g/l)	1,16	0,26
Thrombozyten ($\mu\text{l} \cdot 10^3$)	306	116
AST (U/l)	26	384
ALT (U/l)	27	436

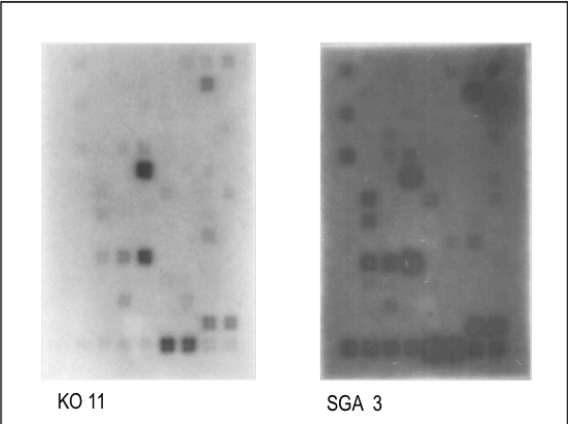


Abbildung 13: Gegenüberstellung der Plazenten Kontrolle 11 und SGA 3. Linke Seite: Auflistung der klinischen Parameter. Rechte Seite: Gen-Array.

Das Geburtsgewicht des Kindes der SGA-Plazenta 3 liegt mit 700 g im Bereich der 10. Perzentile. Die Leberparameter der Mutter sind mit AST 384 U/l und ALT 436 U/l stark erhöht, die Thrombozyten sind mit 116 000 / μ l erniedrigt. Indikation zur Schwangerschaftsbeendigung waren HELLP-Syndrom und Plazentainsuffizienz.

Lässt man diejenigen Gene unberücksichtigt, die auch in der Kontrollgruppe exprimiert sind, dann wurden in der SGA-Plazenta 3 die Gene CD36, HGF, ITGAV, EPHB4, NRP1, AMOT, SERPINF1 exprimiert.

1	2	3	4
CHGA (8)	RPL13A (109-110)	IL10 (44)	
HIF1A (36)	FN1 (33)		
MSR1 (56)	ITGA5 (47)		
MDK (53)	FLT1 (32)		
RSN (71)	PTN (70)		
TIMP2 (91)			
CDH5 (7)			
SPP1 (76)			
SPARC (75)			
EGFR (15)			
MMP9 (55)			
ADAMTS1(1)			
FGF1 (21)			
PECAM1 (63)			
PPIA (105-108)			
ACTB (111-112)			
GAPD (103-104)			

1	2	3	4
ADAMTS1 (1)	CHGA (8)	FN1 (33)	EGFR (15)
CD36 (6)	EPHB4 (17)	AMOT (50)	IL10 (44)
HGF (35)	HIF1A (36)	SERPINF1 (74)	SPP1 (76)
ITGAV (48)	MDK (53)	SPARC (75)	GAPD (103)
PTN (70)	MSR1 (56)	PPIA (105-108)	GAPD (104)
PECAM1 (63)	NRP1 (58)	ACTB (111-112)	RPL13A (110)
	RSN (71)		RPL13A (109)
	TIMP2 (91)		

Abbildung 14: Auswertung Gen-Array. Tabelle links: Alle in den Kontrollen regulierte Gene. Tabelle rechts: In Plazenta SGA 3 regulierte Gene. Bewertung der Expressionsstärke von 1 bis 4.

4.2.4 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 4

	KO 11	SGA 4
Alter	27	32
SSW bei Geburt	33+0	33+1
Größe Kind (cm)	43	37
Geburtsgewicht (g)	2155	980
RR-Werte (mmHg)	125/80	110/80
Kreatinin (mg/dl)	0,46	---
Harnsäure (mg/dl)	2,7	4,8
Protein (g/dl)	5,3	6,3
Haptoglobin (g/l)	1,16	---
Thrombozyten (μ l*10 ³)	306	183
AST (U/l)	26	21
ALT (U/l)	27	16

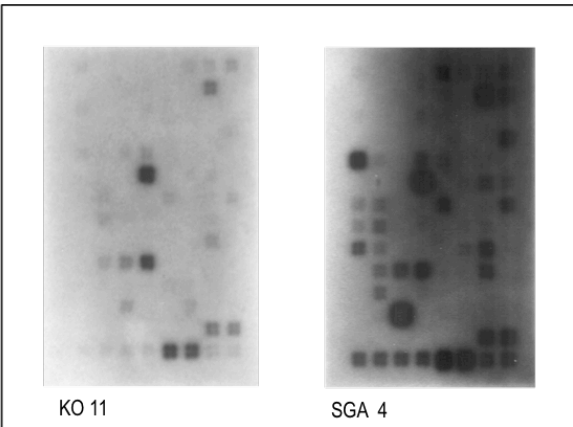


Abbildung 15: Gegenüberstellung der Plazenten Kontrolle 11 und SGA 4. Linke Seite: Auflistung der klinischen Parameter. Rechte Seite: Gen-Array.

Das Geburtsgewicht des Kindes der SGA-Plazenta 4 liegt mit 980 g unterhalb der 3. Perzentile. Indikation zur Schwangerschaftsbeendigung war eine Plazentainsuffizienz. Lässt man diejenigen Gene unberücksichtigt, die auch in der Kontrollgruppe exprimiert sind, dann wurden in der SGA-Plazenta 4 die Gene CD36, HPSE, IFNA1, ITGB3, AMOT, NOS3, NRP1, PGF, PLAU, SERPINF1, TGFBR1, ANGPT2, TGFBR1, ENG exprimiert.

1	2	3	4
CHGA (8)	RPL13A (109-110)	IL10 (44)	
HIF1A (36)	FN1 (33)		
MSR1 (56)	ITGA5 (47)		
MDK (53)	FLT1 (32)		
RSN (71)	PTN (70)		
TIMP2 (91)			
CDH5 (7)			
SPP1 (76)			
SPARC (75)			
EGFR (15)			
MMP9 (55)			
ADAMTS1(1)			
FGF1 (21)			
PECAM1 (63)			
PPIA (105-108)			
ACTB (111-112)			
GAPD (103-104)			

1	2	3	4
CD36 (6)	ANGPT2 (5)	ENG (16)	IL10 (44)
CDH5 (7)	CHGA (8)	FLT1 (32)	TIMP2 (91)
HPSE (37)	HIF1A (36)	FN1 (33)	EGFR (16)
IFNA1 (40)	ITGA5 (47)	RSN (71)	RPL13A (110)
ITGB3 (49)	MSR1 (56)	GAPD (103)	RPL (109)
AMOT (50)	MDK (53)	GAPD (104)	
NOS3 (57)	PPIA (105-108)	SPP1 (76)	
NRP1 (58)	ACTB (111/112)		
PGF (65)	TGFBR1 (79)		
PLAU (66)	SPARC (75)		
SERPINF1(74)			
TGFBR1 (82)			

Abbildung 16: Auswertung Gen-Array. Tabelle links: Alle in den Kontrollen regulierte Gene. Tabelle rechts: In Plazenta SGA 4 regulierte Gene. Bewertung der Expressionsstärke von 1 bis 4.

4.2.5 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 5

	KO 11	SGA 5
Alter	27	36
SSW bei Geburt	33+0	33+0
Größe Kind (cm)	43	44
Geburtsgewicht (g)	2155	1660
RR-Werte (mmHg)	125/80	135/80
Kreatinin (mg/dl)	0,46	0,55
Harnsäure (mg/dl)	2,7	4,8
Protein (g/dl)	5,3	6,5
Haptoglobin (g/l)	1,16	0,66
Thrombozyten ($\mu\text{l} \cdot 10^3$)	306	334
AST (U/l)	26	14
ALT (U/l)	27	6

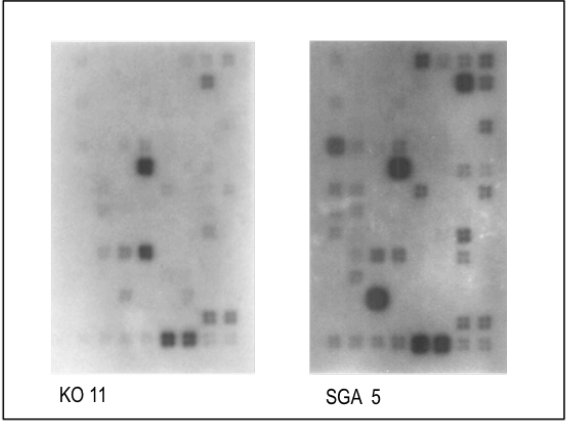


Abbildung 17: Gegenüberstellung der Plazenten Kontrolle 11 und SGA 5. Linke Seite: Auflistung der klinischen Parameter. Rechte Seite: Gen-Array.

Das Geburtsgewicht des Kindes der SGA-Plazenta 5 liegt mit 1660 g im Bereich der 10. Perzentile. Indikation zur Schwangerschaftsbeendigung war ein pathologisches CTG und eine fetale Wachstumsretardierung.

Lässt man diejenigen Gene unberücksichtigt, die auch in der Kontrollgruppe exprimiert sind, dann wurden in der SGA-Plazenta 5 die Gene CD36, ITGAV, ITGB3, AMOT, NOS3, NRP1, PGF, SERPINF1, ANGPT2, ENG exprimiert.

1	2	3	4
CHGA (8)	RPL13A (109-110)	IL10 (44)	
HIF1A (36)	FN1 (33)		
MSR1 (56)	ITGA5 (47)		
MDK (53)	FLT1 (32)		
RSN (71)	PTN (70)		
TIMP2 (91)			
CDH5 (7)			
SPP1 (76)			
SPARC (75)			
EGFR (15)			
MMP9 (55)			
ADAMTS1(1)			
FGF1 (21)			
PECAM1 (63)			
PPIA (105-108)			
ACTB (111-112)			
GAPD (103-104)			

1	2	3	4
CD36 (6)	ANGPT2 (5)	FN1 (33)	IL10 (44)
CDH5 (7)	CHGA (8)		EGFR (15)
HIF1A (36)	ENG (16)		TIMP2 (91)
ITGA5 (47)	FLT1 (32)		RPL13A (110)
ITGAV (48)	MDK (53)		RPL13A (109)
ITGB3 (49)	MSR1 (56)		
AMOT (50)	RSN (71)		
NOS3 (57)	SPARC (75)		
NRP1 (58)	SPP1 (76)		
PGF (65)	GAPD (103)		
SERPINF1 (74)	GAPD (104)		
PPIA (105-108)			
ACTB (111-112)			

Abbildung 18: Auswertung Gen-Array. Tabelle links: Alle in den Kontrollen regulierte Gene. Tabelle rechts: In Plazenta SGA 5 regulierte Gene. Bewertung der Expressionsstärke von 1 bis 4.

4.2.6 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 6

	KO 11	SGA 6
Alter	27	19
SSW bei Geburt	33+0	30+5
Größe Kind (cm)	43	40
Geburtsgewicht (g)	2155	1180
RR-Werte (mmHg)	125/80	150/90
Kreatinin (mg/dl)	0,46	0,72
Harnsäure (mg/dl)	2,7	6,7
Protein (g/dl)	5,3	5,2
Haptoglobin (g/l)	1,16	0,14
Thrombozyten ($\mu\text{l} \cdot 10^3$)	306	154
AST (U/l)	26	94
ALT (U/l)	27	65

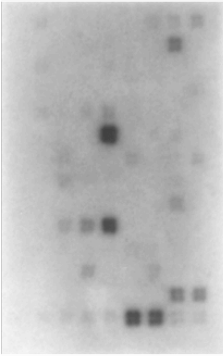
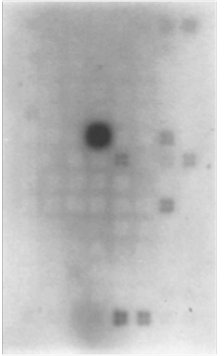



Abbildung 19: Gegenüberstellung der Plazenten Kontrolle 11 und SGA 6. Linke Seite: Auflistung der klinischen Parameter. Rechte Seite: Gen-Array.

Das Geburtsgewicht des Kindes der SGA-Plazenta 6 liegt mit 1180 g im Bereich der 5. Perzentile. Der Blutdruck der Mutter ist mit 150/90 mmHg erhöht, ebenso wie die Leberparameter AST mit 94 U/l und ALT mit 65 U/l erhöht sind. Indikation zur Schwangerschaftsbeendigung war eine schwere Präeklampsie.

Trotz des klinischen Bildes zeigten sich im Gen-Array keine Gene, die ausschließlich in der SGA-Gruppe exprimiert wurden.

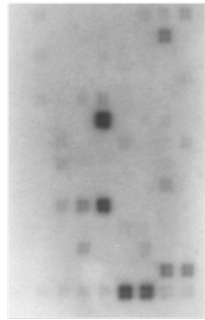
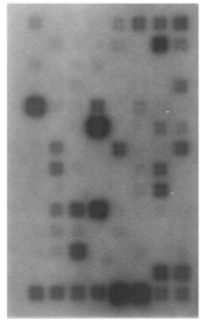
1	2	3	4
CHGA (8)	RPL13A (109-110)	IL10 (44)	
HIF1A (36)	FN1 (33)		
MSR1 (56)	ITGA5 (47)		
MDK (53)	FLT1 (32)		
RSN (71)	PTN (70)		
TIMP2 (91)			
CDH5 (7)			
SPP1 (76)			
SPARC (75)			
EGFR (15)			
MMP9 (55)			
ADAMTS1(1)			
FGF1 (21)			
PECAM1 (63)			
PPIA (105-108)			
ACTB (111-112)			
GAPD (103-104)			

1	2	3	4
	CHGA (8)		IL10 (44)
	CDH5 (7)		
	ITGA5 (47)		
	MDK (53)		
	MSR1 (56)		
	RSN (71)		
	RPL13A (110)		
	RPL13A (109)		

Abbildung 20: Auswertung Gen-Array. Tabelle links: Alle in den Kontrollen regulierte Gene. Tabelle rechts: In Plazenta SGA 6 regulierte Gene. Bewertung der Expressionsstärke von 1 bis 4.

4.2.7 Gegenüberstellung Kontrolle 11 und SGA 7

	KO 11	SGA 7
Alter	27	32
SSW bei Geburt	33+0	31+2
Größe Kind (cm)	43	39
Geburtsgewicht (g)	2155	1195
RR (mmHg)	125/80	120/60
Kreatinin (mg/dl)	0,46	0,58
Harnsäure (mg/dl)	2,7	---
Protein (g/dl)	5,3	---
Haptoglobin (g/l)	1,16	---
Thrombozyten ($\mu\text{l} \cdot 10^3$)	306	194
AST (U/l)	26	25
ALT (U/l)	27	18

KO 11
SGA 7

Abbildung 21: Gegenüberstellung der Plazenten Kontrolle 11 und SGA 7.

Linke Seite: Auflistung der klinischen Parameter. Rechte Seite: Gen-Array.

Das Geburtsgewicht des Kindes der SGA-Plazenta 7 liegt mit 1195 g im Bereich der 3. Perzentile. Indikation zur Schwangerschaftsbeendigung war ein pathologisches CTG und eine Plazentainsuffizienz. Lässt man diejenigen Gene unberücksichtigt, die auch in der Kontrollgruppe exprimiert sind, dann wurden in der SGA-Plazenta 7 die Gene ANGPT2, ID1, ITGAV, TGFBR1, TGFBR2, CD36, ENG, AMOT, NRP1, SERPINF1 exprimiert.

1	2	3	4
CHGA (8)	RPL13A (109-110)	IL10 (44)	
HIF1A (36)	FN1 (33)		
MSR1 (56)	ITGA5 (47)		
MDK (53)	FLT1 (32)		
RSN (71)	PTN (70)		
TIMP2 (91)			
CDH5 (7)			
SPP1 (76)			
SPARC (75)			
EGFR (15)			
MMP9 (55)			
ADAMTS1(1)			
FGF1 (21)			
PECAM1 (63)			
PPIA (105-108)			
ACTB (111-112)			
GAPD (103-104)			

1	2	3	4
ADAMTS1 (1)	CD36 (6)	CHGA (8)	IL10 (44)
ANGPT2 (5)	CDH5 (7)	EGFR (15)	FN1 (33)
ID1 (38)	ENG (16)	SPARC (75)	SPP1 (76)
ITGA5 (47)	FLT1 (32)	TIMP2 (91)	RPL13A (110)
ITGAV (48)	HIF1A (36)	GAPD (103)	RPL13A (109)
TGFBR1 (82)	AMOT (50)	GAPD (104)	
TGFBR2 (83)	MDK (53)		
	MSR1 (56)		
	NRP1 (58)		
	PECAM1 (63)		
	RSN (71)		
	SERPINF1 (4)		
	PPIA (105-108)		
	ACTB (111-112)		

Abbildung 22: Auswertung Gen-Array. Tabelle links: Alle in den Kontrollen regulierte Gene. Tabelle rechts: In Plazenta SGA 7 regulierte Gene. Bewertung der Expressionsstärke von 1 bis 4.

4.2.8 Übersicht Gene Präeklampsiegruppe

Eine Auflistung aller Gene, die ausschließlich in der Präeklampsiegruppe exprimiert wurden zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Ausschließlich in der Präeklampsiegruppe exprimierte Gene.

Mit * markierte Gene waren nur in einer Plazenta exprimiert.

Symbol	Beschreibung	Gen	Funktion
ANGPT2	Homo sapiens angiopoietin-2-mRNA	Angiopoietin-2	Antiangiogen
AMOT	Homo sapiens angiostatin binding protein1 mRNA	Angiomotin	Angiogenese
ENG	Homo sapiens endoglin	Endoglin	Antiangiogen
ADAMTS1	A disintegrin-like and metalloprotease(reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif	Meth 1	antiangiogenic activity

CD36	Homo sapiens CD36 anti-gen(collagen type I receptor, thrombospondin receptor)	CD36	Thrombospondin Re-zeptor Antiangiogen
HIF1A	Homo sapiens hypoxia-inducible factor1, alpha sub-unit	HIF1A	cellular and systemic responses to hypoxia
ITGAV	Integrin, alpha V	Integrin aV	Zellmigration
ITGB3	Integrin, beta 3	Integrin b3	Zellmigration
NOS3	Nitric oxide synthase 38endothelial cell)	NOS3	Regulation vaskulärer Homöostase
NRP1	Homo sapiens neuropilin1	neuropilin 1	Angiogenese
PECAM1	Homo sapiens plate-let/endothelial cell adhesion molecule	CD31	Proangiogen und pro-inflammatorisch
PGF	Homo sapiens placental growth factor,	PIGF	Angiogenese
SERPINF1	Pigment epithelium-derived factor	PEDF	Antiangiogenese
TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor I	ALK-5	Tumorwachstum
EPHB4	Homo sapiens EphB4	Ephrin B4	Tumorwachstum
GRO1*	GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	GROa/MGSA	Angiogenese
HGF*	Hepatocyte growth fac-tor(hepapoietin A; scatter factor)	HGF	Angiogenese
HPSE*	Homo sapiens heparanase mRNA	Heparanases	Angiogenese
ID1*	DNA-binding protein inhibitor IC-1	ID1	Zellproliferation
IFNA1*	Homo sapiens interferon, alpha 1	IFNA1	Antiproliferation
PLAU*	Plasminogen activator, uro-kinase	uPA	Metastasierung
TGFB1*	Transforming growth factor, beta 1	TGFb1	Zellwachstum
TGFBR2*	Transforming growth factor, beta receptor II	TGFbR2	Tumorsuppressor

Aus den ausschließlich in der Präeklampsiegruppe hochregulierten Genen wurden Angiopoietin-2, Angiomotin und Endoglin aufgrund ihrer wiederholten Expression ausgewählt. FLT1 wurde auch in einer Kontrollplazenta exprimiert, jedoch aufgrund der aktuellen Literatur in die weitere Analyse einbezogen. Obwohl THBS1 und VEGF

im Gen-Array keine auffällige Regulation zeigten wurden sie aus wissenschaftlichem Interesse zusätzlich untersucht.

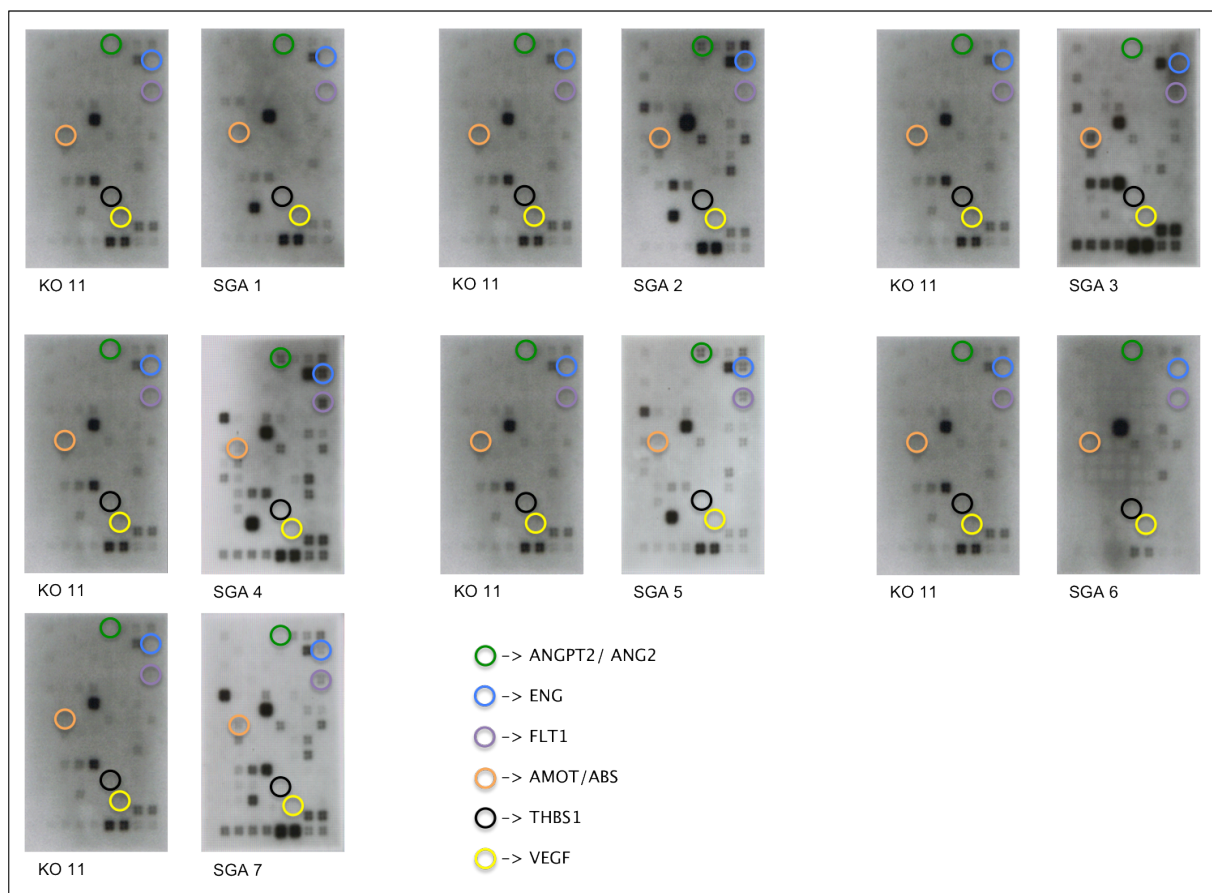


Abbildung 23: Gegenüberstellung Angiogenese Gen-Array Kontrolle 11 und den Plazenten der Präeklampsiegruppe (SGA 1-7).

Tabelle 9 zeigt die Expressionsstärke der Gene in den jeweiligen Plazenten.

Tabelle 9. Plazentaspezifische Expression der Angiogenesefaktoren. Expressionsstärke: - = nicht exprimiert, + = schwach exprimiert, ++ = moderat exprimiert, +++ = stark exprimiert

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SGA	SGA	SGA	SGA	SGA	SGA	SGA	KO	KO	KO	KO	KO
ABS	-	+	+++	+	+	-	++	-	-	-	-	-
ANG2	-	+	-	++	++	-	+	-	-	-	-	-
ENG	-	+	-	+++	++	-	++	-	-	-	-	-
FLT1	-	-	-	+++	++	-	++	-	+	-	-	-
THBS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VEGF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.3 Ergebnisse PCR

Die ausgewählten Gene ABS, ANG2, ENG, FLT1 und THBS1, wurden auf DNA - Ebene mittels PCR untersucht. Nach Auswertung der Gelelektrophorese wurde die Expressionsstärke anhand eines Säulendiagramms im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt.

4.3.1 ABS - Angiotin

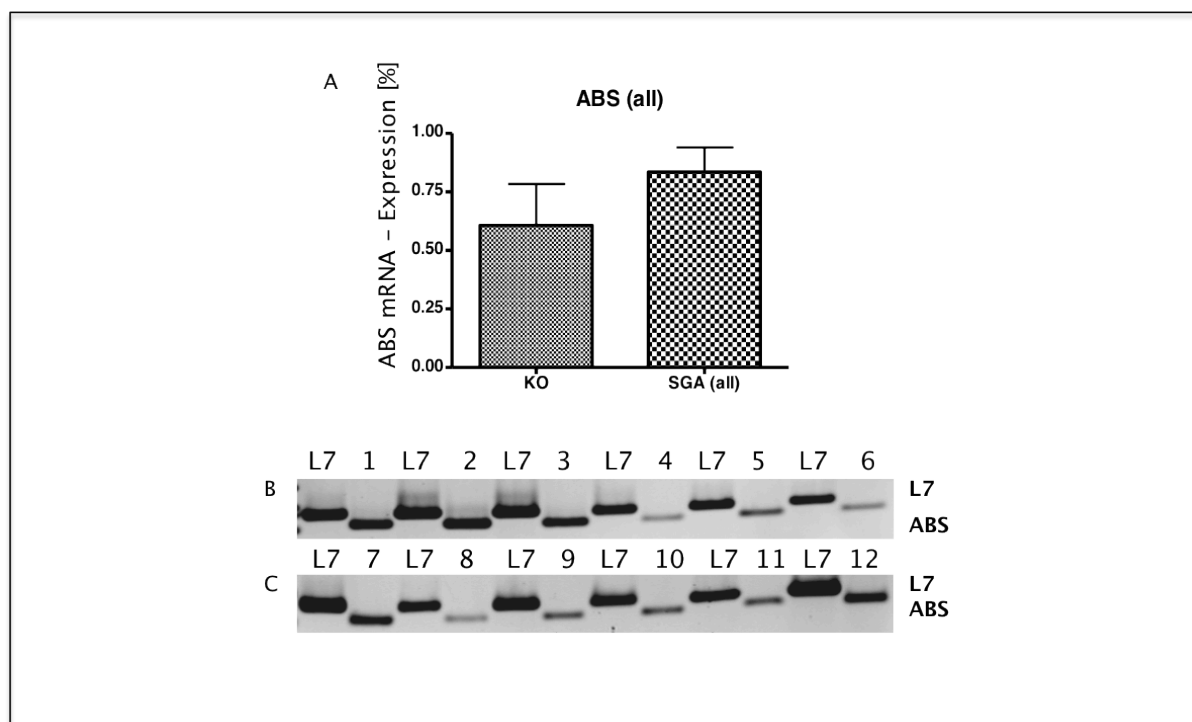


Abbildung 24: Analyse von Angiotin.

A: Expression von Kontrolle und Präeklampsiegruppe.

B/C: Gelelektrophorese Proben 1-12 jeweils mit Housekeeping-Gen L7. Zuordnung: 1 = SGA 4, 2 = SGA 7, 3 = SGA 2, 4 = SGA 6, 5 = SGA 1, 6 = SGA 5, 7 = SGA 3, 8 = KO 11, 9 = KO 12, 10 = KO 9, 11 = KO 8, 12 = KO 10.

In der PCR war für ABS in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Expression wahrnehmbar. Besonders deutlich war die Expression der Banden 1, 2, 3, 7 und 12. Diese entsprechen den Plazenten SGA 4, SGA 7, SGA 2, SGA 3 und KO 10. Im Gen-Array zeigte sich in diesen SGA-Plazenten ebenfalls eine erhöhte Angiotin-Expression. Auffällig ist, dass in der Plazenta 10 der Kontrollgruppe in der PCR eine relativ starke Expression sichtbar war, die sich so nicht im Gen-Array feststellen ließ.

4.3.2 ANG2 - Angiopoietin 2

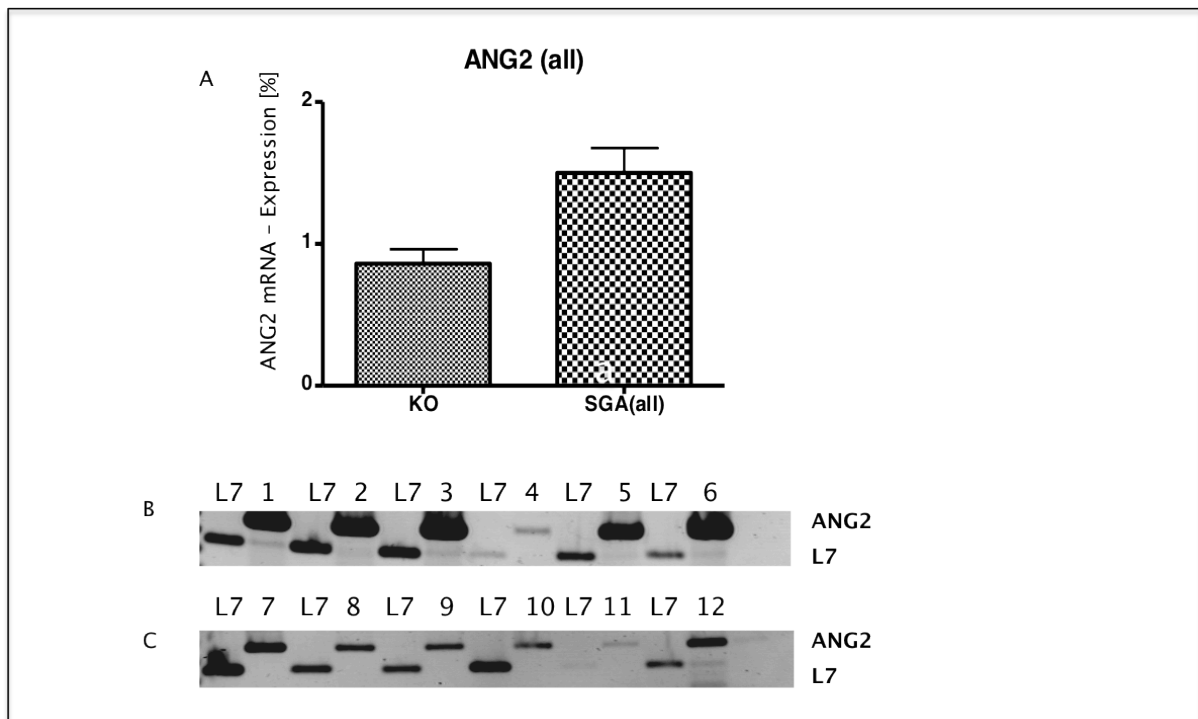


Abbildung 25: Analyse von Angiopoietin 2.

A: Expression von Kontrolle und Präeklampsiegruppe.

B/C: Gelelektrophorese Proben 1-12 jeweils mit Housekeeping-Gen L7. Zuordnung: 1 = SGA 4, 2 = SGA 7, 3 = SGA 2, 4 = SGA 6, 5 = SGA 1, 6 = SGA 5, 7 = SGA 3, 8 = KO 11, 9 = KO 12, 10 = KO 9, 11 = KO 8, 12 = KO10.

In der PCR trat für ANG2 in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Expression auf. Besonders deutlich war die Expression der Banden 1, 2, 3, 5 und 6. Diese entsprechen den Plazenten SGA 4, SGA 7, SGA 2, SGA 1 und SGA 5. Im Gen Array zeigte sich in den SGA-Plazenten 2, 4, 5 und 7 eine erhöhte Expression. Hier liegt also eine Abweichung in Bezug auf Plazenta 1 vor, die im Gen-Array keine Expression aufwies.

4.3.3 ENG - Endoglin

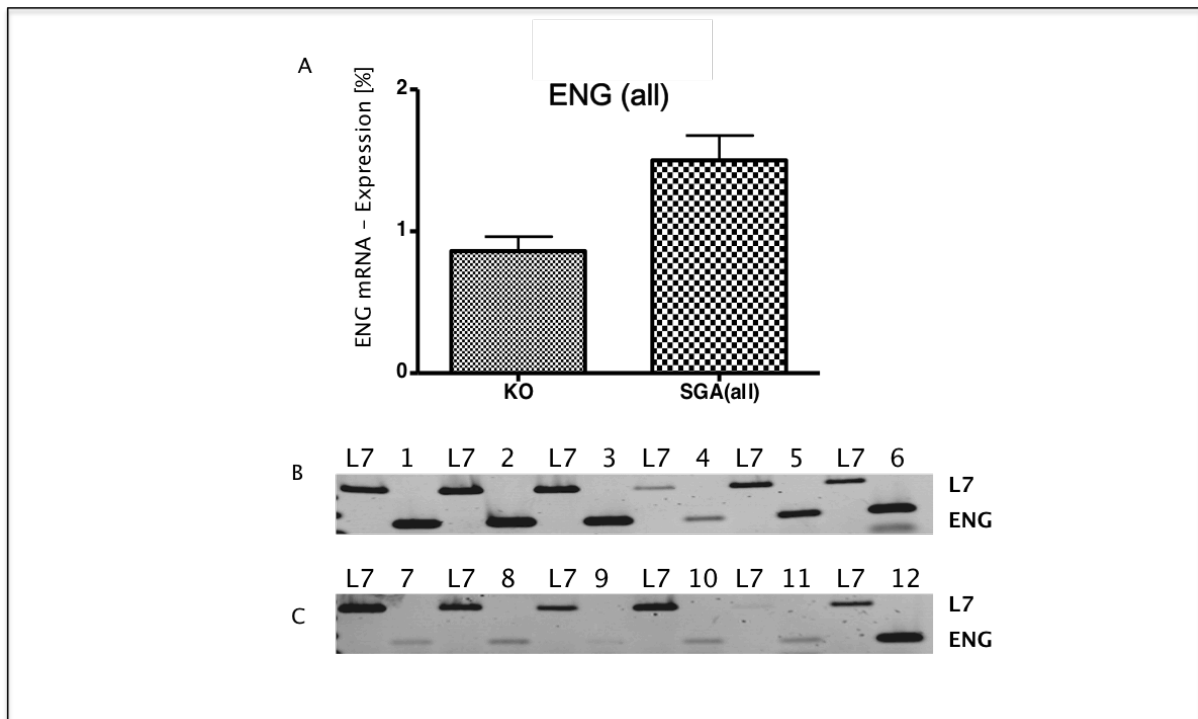


Abbildung 26: Analyse von Endoglin.

A: Expression von Kontrolle und Präeklampsiegruppe.

B/C: Gelelektrophorese Proben 1-12 jeweils mit Housekeeping-Gen L7. Zuordnung: 1 = SGA 4, 2 = SGA 7, 3 = SGA 2, 4 = SGA 6, 5 = SGA 1, 6 = SGA 5, 7 = SGA 3, 8 = KO 11, 9 = KO 12, 10 = KO 9, 11 = KO 8, 12 = KO 10.

In der PCR wurde für ENG in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Expression deutlich. Besonders stark war die Expression der Banden 1, 2, 3, 5, 6 und 12. Diese entsprechen den Plazenten SGA 4, SGA 7, SGA 2, SGA 1, SGA 5 und KO 10. Im Gen-Array zeigte sich in den SGA-Plazenten 2, 4, 5 und 7 auch eine erhöhte Expression, ebenso wie bei KO 10.

4.3.4 FLT1 - VEGF-Rezeptor 1

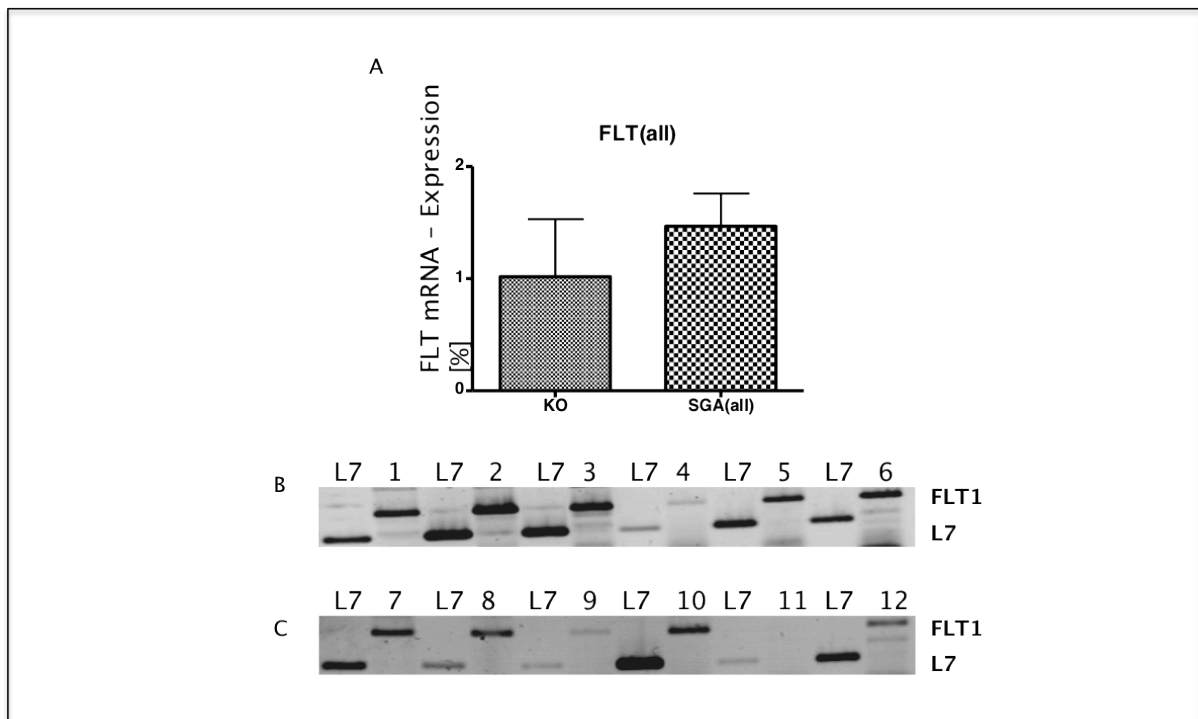


Abbildung 27: Analyse von FLT1.

A: Expression von Kontrolle und Präeklampsiegruppe.

B/C: Gelelektrophorese Proben 1-12 jeweils mit Housekeeping-Gen L7. Zuordnung: 1 = SGA 4, 2 = SGA 7, 3 = SGA 2, 4 = SGA 6, 5 = SGA 1, 6 = SGA 5, 7 = SGA 3, 8 = KO 11, 9 = KO 12, 10 = KO 9, 11 = KO 8, 12 = KO10.

In der PCR war für FLT1 in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Expression wahrnehmbar. Besonders deutlich war die Expression der Banden 1, 2, 3, 5, 6, 7 und 10. Diese entsprechen den Plazenten SGA 4, SGA 7, SGA 2, SGA 1, SGA 5, SGA 3 und KO 9. Im Gen-Array zeigte sich eine Expression in den SGA-Plazenten 4, 5 und 7 sowie in der KO 9.

4.3.5 THBS1 - Thrombospondin 1

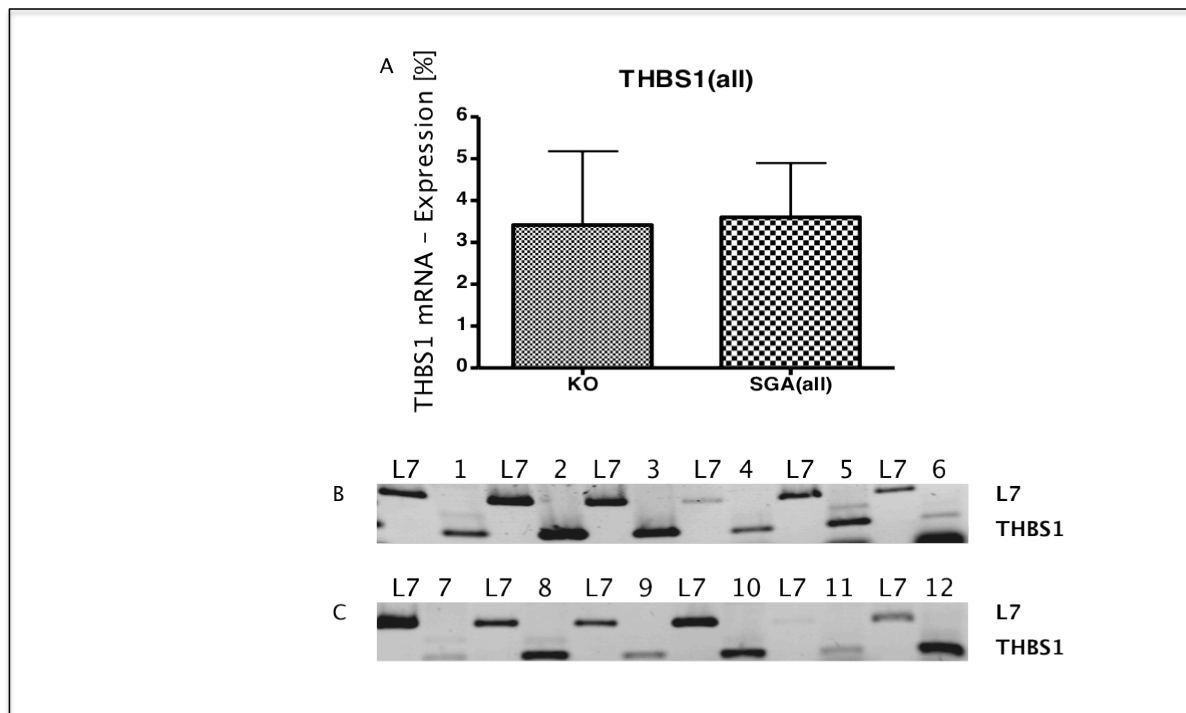


Abbildung 28: Analyse von Thrombospondin 1.

A: Expression von Kontrolle und Präeklampsiegruppe.

B/C: Gelelektrophorese Proben 1-12 jeweils mit Housekeeping-Gen L7. Zuordnung: 1 = SGA 4, 2 = SGA 7, 3 = SGA 2, 4 = SGA 6, 5 = SGA 1, 6 = SGA 5, 7 = SGA 3, 8 = KO 11, 9 = KO 12, 10 = KO 9, 11 = KO 8, 12 = KO10.

In der PCR trat für THBS1 in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrolle eine minimal höhere Expression auf. Besonders deutlich war die Expression der Banden 2, 3, 6, 8, 10 und 12. Diese entsprechen den Plazenten SGA 7, SGA 2, SGA 5, KO 11, KO 9 und KO 10. Im Gen-Array zeigte sich keine Expression dieses Gens in sämtlichen Plazenten.

4.3.6 VEGF - vascular endothelial growth factor

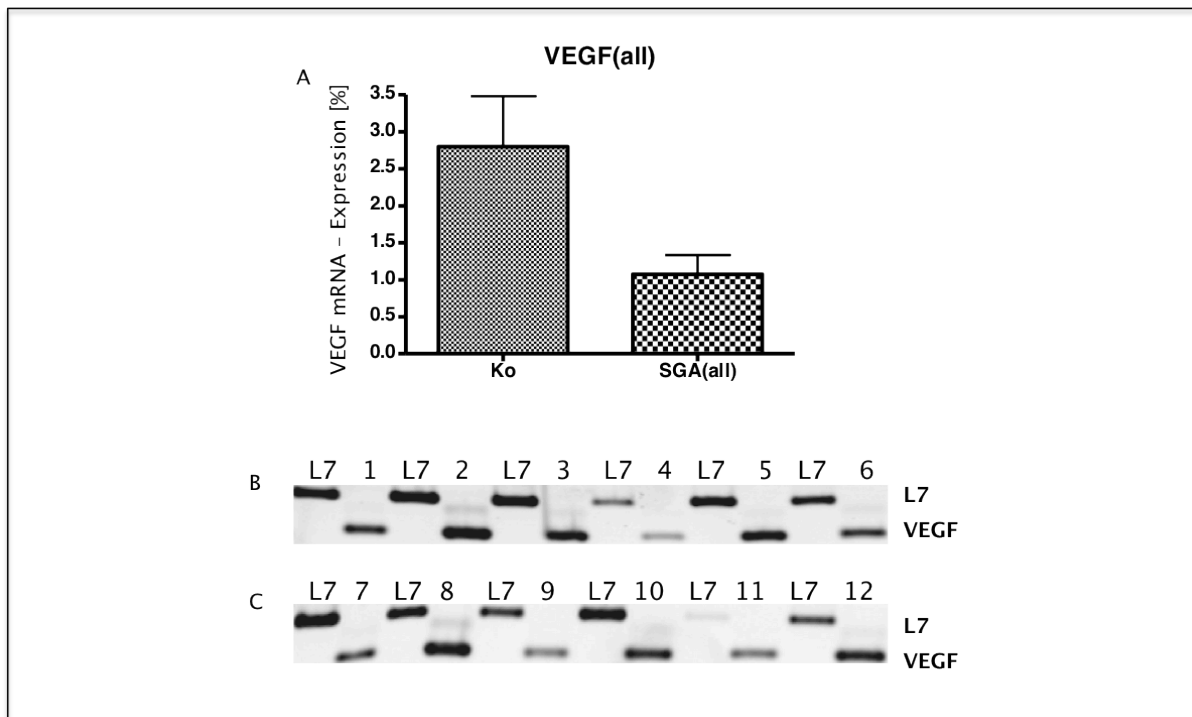


Abbildung 29: Analyse von VEGF.

A: Expression von Kontrolle und Präeklampsiegruppe.

B/C: Gelelektrophorese Proben 1-12 jeweils mit Housekeeping-Gen L7. Zuordnung: 1 = SGA 4, 2 = SGA 7, 3 = SGA 2, 4 = SGA 6, 5 = SGA 1, 6 = SGA 5, 7 = SGA 3, 8 = KO 11, 9 = KO 12, 10 = KO 9, 11 = KO 8, 12 = KO10.

In der PCR wurde für VEGF in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrolle eine niedrigere Expression deutlich. Besonders stark war die Expression der Banden 2, 3, 5, 8 und 12. Diese entsprechen den Plazenten SGA 7, SGA 2, SGA 1, KO 11 und KO 10. Im Gen-Array zeigte sich keine Expression dieses Gens in sämtlichen Plazenten.

4.4 Ergebnisse Immunhistochemie

Die abschließende Untersuchung bestand in der Analyse der Expression auf Proteinebene. Dazu wurde eine genspezifische Färbung des Plazentagewebes durchgeführt. Die Färbeintensität (Staining intensity) wurde von zwei Personen unabhängig voneinander bewertet. Eine Übersicht der Färbung mit Gegenüberstellung der Präeklampsie- und Kontrollgruppe zeigt Abbildung 30.

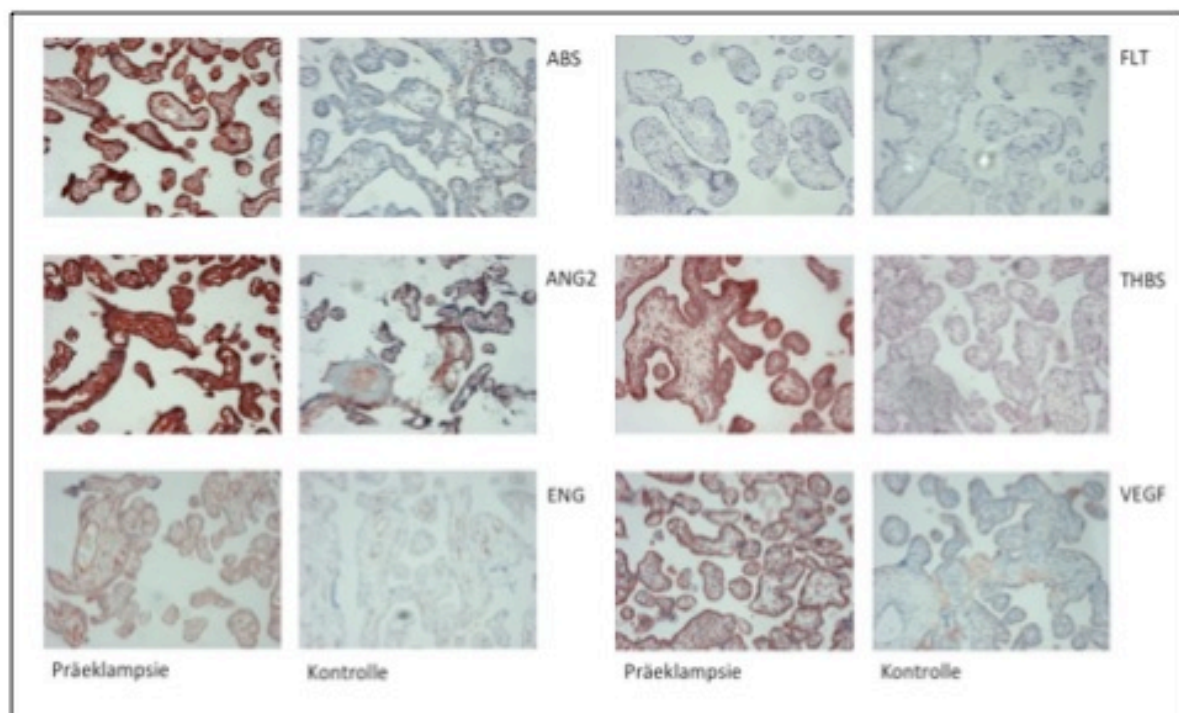


Abbildung 30: Gegenüberstellung Immunhistochemie Präeklampsie- und Kontrollgruppe.

Insgesamt fällt eine stärkere Färbeintensität in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die genaue Auswertung wird nachfolgend aufgeführt.

4.4.1 ABS - Angiotin

Tabelle 10: Auswertung Immunhistochemie Angiotin.

	ABS	A	B	Mittelwert	total
1	SGA	3	3	3	2,07
2	SGA	2	2	2	
3	SGA	2	2	2	
4	SGA	2	2	2	
5	SGA	2	2	2	
6	SGA	2	2	2	
7	SGA	1	2	1,5	
8	KO	3	3	3	1,2
9	KO	1	1	1	
10	KO	0	0	0	
11	KO	1	1	1	
12	KO	1	1	1	

Die Immunhistochemie zeigte für Angiotin eine starke Expression in den Plazenten 1 und 8, eine mittlere in den Plazenten 2 bis 7 und eine schwache Expression in den Plazenten 9, 11 und 12. Keine Expression zeigte sich in Plazenta 10. Insgesamt ist die Expression in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert. Damit zeigt sich auf allen untersuchten Ebenen eine stärkere Expression in der Präeklampsiegruppe.

4.4.2 ANG2 - Angiotin 2

Tabelle 11: Auswertung Immunhistochemie Angiotin 2.

	ANG2	A	B	Mittelwert	total
1	SGA	3	3	3	2,42
2	SGA	3	3	3	
3	SGA	2	2	2	
4	SGA	2	3	2,5	
5	SGA	2	1	1,5	
6	SGA	2	2	2	
7	SGA	3	3	3	
8	KO	3	3	3	2
9	KO	1	1	1	
10	KO	2	2	2	
11	KO	2	3	2,5	
12	KO	2	1	1,5	

Die Immunhistochemie zeigte für Angiotensin II eine starke Expression in den Plazenten 1, 2, 4, 7, 8 und 11, eine mittlere in den Plazenten 3, 5, 6, 10 und 12 und eine schwache Expression in Plazenta 9. Insgesamt ist die Expression in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert. Damit zeigt sich auf allen untersuchten Ebenen eine stärkere Expression in der Präeklampsiegruppe.

4.4.3 ENG - Endoglin

Tabelle 12: Auswertung Immunhistochemie Endoglin.

	ENG	A	B	Mittelwert	total
1	SGA	1	1	1	1,07
2	SGA	2	1	1,5	
3	SGA	1	1	1	
4	SGA	1	1	1	
5	SGA	1	1	1	
6	SGA	1	0	0,5	
7	SGA	1	2	1,5	
8	KO	1	0	0,5	0,8
9	KO	1	1	1	
10	KO	1	1	1	
11	KO	1	1	1	
12	KO	1	0	0,5	

Die Immunhistochemie zeigte für Endoglin die stärkste Expression in den Plazenten 2 und 7, eine schwache Expression zeigten die übrigen Plazenten 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 und 12. Insgesamt ist die Expression in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert. Damit zeigt sich auf allen untersuchten Ebenen eine stärkere Expression in der Präeklampsiegruppe.

4.4.4 FLT1 - VEGF-Rezeptor 1

Tabelle 13: Auswertung Immunhistochemie FLT1.

	FLT1	A	B	Mittelwert	total
1	SGA	1	0	0,5	0,42
2	SGA	0	0	0	
3	SGA	1	1	1	
4	SGA	0	0	0	
5	SGA	1	1	1	
6	SGA	1	0	0,5	
7	SGA	0	0	0	
8	KO	0	0	0	0,3
9	KO	0	0	0	
10	KO	1	1	1	
11	KO	1	0	0,5	
12	KO	0	0	0	

Die Immunhistochemie zeigte für FLT1 die stärkste Expression in den Plazenten 3, 5 und 10, eine schwache Expression zeigten die Plazenten 1, 6 und 11. Insgesamt ist die Expression in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe minimal hochreguliert. Damit zeigt sich auf allen untersuchten Ebenen die gleiche Tendenz einer stärkeren Expression in der Präeklampsiegruppe.

4.4.5 THBS1 - Thrombospondin 1

Tabelle 14: Auswertung Immunhistochemie THBS1.

	THBS1	A	B	Mittelwert	total
1	SGA	2	1	1,5	1,5
2	SGA	1	0	0,5	
3	SGA	2	2	2	
4	SGA	3	3	3	
5	SGA	1	1	1	
6	SGA	1	1	1	
7	SGA	1	2	1,5	
8	KO	2	2	2	1,5
9	KO	2	1	1,5	
10	KO	1	1	1	
11	KO	1	1	1	
12	KO	2	2	2	

Die Immunhistochemie zeigte für Thrombospondin1 eine starke Expression in Plazenta 4, eine mittlere in den Plazenten 1, 3, 7, 8, 9, 12 und eine schwache Expression in den Plazenten 2, 5, 6, 10 und 11. Insgesamt ist das Gen in beiden Gruppen nahezu gleich stark exprimiert. Somit zeigt sich die gleiche Tendenz wie in der PCR.

4.4.6 VEGF - vascular endothelial growth factor

Tabelle 15: Auswertung Immunhistochemie VEGF.

	VEGF	A	B	Mittelwert	total
1	SGA	2	2	2	1,28
2	SGA	2	2	2	
3	SGA	2	2	2	
4	SGA	1	0	0,5	
5	SGA	1	1	1	
6	SGA	0	0	0	
7	SGA	1	2	1,5	
8	KO	2	1	1,5	1,3
9	KO	1	1	1	
10	KO	1	1	1	
11	KO	1	1	1	
12	KO	2	2	2	

Die Immunhistochemie zeigte für VEGF eine mittlere Expression in den Plazenten 1, 2, 3, 7, 8 und 12 und eine schwache Expression in den Plazenten 4, 5, 9, 10 und 11. Insgesamt ist die Expression in beiden Gruppen fast gleich stark. In der PCR zeigte sich eine deutlich stärkere Expression in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Präeklampsiegruppe

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse aus Gen-Array, PCR und Immunhistochemie schematisch zusammengefasst. Dabei zeigte sich für ABS, ANG2 und ENG die gleiche Tendenz der Regulation auf allen drei Ebenen. Für FLT1 wiederholte sich die Hochregulation ebenfalls auf allen Ebenen. Für THBS1 zeigte sich kein Unterschied in der Regulation zwischen der Präeklampsiegruppe und der Kontrollgruppe.

VEGF zeigte in der PCR im Vergleich zur Kontrollgruppe eine niedrigere Expression in der Präeklampsiegruppe. In der Immunhistochemie zeigte sich ein minimaler Unterschied in der Regulation mit leicht stärkerer Expression in der Kontrollgruppe.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse von Gen-Array, PCR und Immunhistochemie. Pfeile geben Regulierung in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

	Gen-Array	PCR	Immunhistochemie
ABS	↑	↑	↑
ANG2	↑	↑	↑
ENG	↑	↑	↑
FLT1	↑	↑	↑
THBS1	↔	↔	↔
VEGF	↔	↓	↔

5 Diskussion

Grundlage dieser Arbeit bildet die Hypothese, dass bei Präeklampsie ein Missverhältnis zwischen proangiogenen und antiangiogenen Faktoren besteht (Masoura et al. 2014; Verlohren et al. 2012). Vor diesem Hintergrund wurde die angiogene Aktivität im Sinne einer präliminären Studie in sieben Plazenten aus Schwangerschaften mit Präeklampsie mit der angiogenen Aktivität in fünf Plazenten aus normalen Schwangerschaften vergleichend untersucht. Dazu wurde ein Angiogenese-Gen-Array durchgeführt, welcher die parallele Analyse von 96 Angiogenesefaktoren erlaubte. Hier zeigten sich mehrere Gene, welche ausschließlich in der Präeklampsiegruppe hochreguliert waren. Aus diesen wurden Angiomotin, Angiopoietin 2 und Endoglin ausgewählt. Zusätzlich wurden FLT1 als möglicher Screeningmarker, VEGF als wichtiger Angiogenesefaktor und Thrombospondin als Angiogeneseinhibitor im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Anschließend wurden die Ergebnisse auf DNA- und Proteinebene mithilfe der molekularbiologischen Methoden der PCR und der immunhistochemischen Färbung verifiziert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für jedes Gen hinsichtlich des aktuellen Standes der Wissenschaft, der Hypothese und eventueller Unterschiede dargestellt und eingeordnet.

5.1 Angiomotin

Angiomotin oder auch Angiostatin-binding-protein ist ein an der Angiogenese beteiligtes Protein, welches zur Motin Familie gehört (Matsumoto et al. 2012). Angiomotin beeinflusst durch die Hemmung von Angiostatin die Migration und Gefäßbildung von Endothelzellen. In vivo wird Angiomotin in den Endothelzellen der Kapillaren sowie in größeren Gefäßen der humanen Plazenta exprimiert. Angiomotin konnte immunhistochemisch in Cytotrophoblasten nachgewiesen werden. Einem Zelltyp, der sich durch seine Fähigkeit auszeichnet, in das Endometrium einzudringen und ein vorübergehendes Kreislaufsystem in der frühen Embryogenese zu bilden. Die Expression von Angiomotin in Endothelzellen führte zu einer vermehrten Zellmigration, die

auf einen stimulatorischen Effekt von Angiomotin auf die Zellmotilität schließen lässt (Troyanovsky et al. 2001, Dunk et al. 2000). Zu Angiomotin gibt es bisher nur vereinzelte Untersuchungen im Zusammenhang mit Präeklampsie. Interessant ist das Zusammenspiel von Angiomotin mit Angiostatin. Angiostatin ist ein Angiogeneseinhibitor. In vitro wurde gezeigt, dass es die Migration von Endothelzellen sowie deren Proliferation und Gefäßausbildung hemmt. Weiterhin konnte deutlich gemacht werden, dass die Behandlung mit Angiostatin die Migration und Gefäßbildung in Angiomotin-exprimierenden Zellen hemmt, aber nicht in Kontrollzellen. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Angiostatin die Zellmigration hemmt, indem es die Angiomotinaktivität beeinträchtigt (Troyanovsky et al. 2001). Zusammengefasst führt die wechselseitige Beeinflussung von Angiostatin und Angiomotin zu einer stärkeren Hemmung des Endothelzellwachstums, als unter alleiniger Wirkung von Angiostatin.

In fünf der sieben Präeklampsie-Plazenten war Angiomotin im Microarray exprimiert. In der PCR zeigte sich für Angiomotin eine höhere Expression in der Präeklampsiegruppe als in der Kontrollgruppe. Immunhistochemisch war eine stärkere Färbung für Angiomotin in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten für Angiomotin auf allen Ebenen eine höhere Expression bei Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Unter der Annahme, dass sich die endotheliale Dysfunktion bereits zu Beginn der Schwangerschaft durch eine gestörte Trophoblasteninvasion ausbildet, könnte es sich bei den erhöhten Werten von Angiomotin in der Plazenta um eine Art Gegenregulationsmechanismus handeln, um besagten antiangiogenen Zustand auszugleichen. In Bezug auf die Wechselwirkung von Angiomotin und Angiostatin ist die Untersuchung von Angiostatin ein vielversprechender Ansatz für weiterführende Untersuchungen.

5.2 Angiopoietin 2

Angiopoietin 2 gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. VEGFs und Angiopoietine arbeiten zusammen um Wachstum, Stabilisierung und Rückbildung von Gefäßen zu

kontrollieren. ANG2 fungiert als natürlicher Antagonist von ANG1, was zur Auflockerung der stützenden Zellmatrix und Destabilisierung bestehender Gefäße führt. In Gegenwart von VEGF ermöglicht dies eine weitere Stimulation endothelialer Zellproliferation und Migration, die die Angiogenese fördert. In Abwesenheit von VEGF blockiert ANG2 die Rekrutierung periendothelialer Zellen, woraus sich eine Destabilisierung und Regression von Blutgefäßen ergibt (Hurliman et al. 2010). Das Angiopoietin/ Tie- System agiert als gefäßspezifisches Ligand/ Rezeptor-System, um die Lebensdauer von Endothelzellen und die Gefäßreifung zu kontrollieren.

Die Angiopoietinfamilie besteht aus 4 Liganden (Angiopoietin 1, Angiopoietin 2 und Angiopoietin-3/4) und 2 zugehörigen Tyrosinekinaserezeptoren (Tie1 und Tie2).

Angiopoietin 1 und Angiopoietin 2 binden mit ähnlicher Affinität als Liganden spezifisch an den Rezeptor Tie2. Eine Tie2-Aktivierung begünstigt Gefäßaufbau und -reifung. Ang-2 wird von Endothelzellen produziert und wirkt wie ein autokriner Antagonist der Ang-1 vermittelten Tie2-Aktivierung. Dadurch bereitet Ang-2 das Gefäßendothel auf die Wirkung exogener Zytokine vor und induziert in höheren Konzentrationen eine Gefäßdestabilisierung (Thomas und Augustin 2009). Bei nur unzureichendem angiogenem Anreiz verursacht Ang-2 die Apoptose von Endothelzellen und eine Gefäßregression (Maisonpierre et al. 1997). Während einer normalen Schwangerschaft nimmt die Expression von Ang-1 normalerweise zu, während die Expression von Ang-2 abnimmt (Geva et al. 2002). Dazu passen die Ergebnisse einer Studie, bei der gezeigt wurde, dass erhöhte maternale Serumkonzentrationen von Ang-2 einer Präeklampsie vorausgehen (Leinonen et al. 2010). Weiterhin konnte in aktuellen Studien gezeigt werden, dass es bei der Präeklampsie sowohl zu einem Anstieg der plazentaren Angiopoietin-2 mRNA-Expression als auch zu einer Erhöhung der Plasma-Angiopoietin-2-Protein-Level mütterlicherseits kommt (Han et al. 2012; Kappou et al. 2015).

Im Microarray der vorliegenden Arbeit zeigte sich in vier der sieben SGA - Plazenten eine Expression für Angiopoietin2, wohingegen in der Kontrollgruppe keine Expression nachweisbar war. In der PCR zeigte sich für ANG2 eine höhere mRNA-

Expression in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gleiche Tendenz ließ sich in der immunhistochemischen Färbung bestätigen, in der sich eine leicht stärkere Färbung in der Präeklampsiegruppe zeigte.

Somit fügen sich die Ergebnisse in das Bild der aktuellen Forschungen ein.

Ob sie jedoch nur den pathologischen Zustand widerspiegeln, der bei Präeklampsie herrscht oder Teil der Pathophysiologie sind, muss weiter untersucht werden.

5.3 Endoglin

Endoglin (CD105) ist ein integrales Membranglycoprotein, welches mit hoher Affinität den *transforming growth factor beta 1* (TGF beta 1) bindet (St-Jacques et al. 1994). Dabei handelt es sich wiederum um ein multifunktionales Zytokin, welches in der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Überleben oder Apoptose vieler Zellen involviert ist. TGF-beta Rezeptoren agieren über multiple intrazelluläre Signalwege. Über TGF-beta können Signalwege angestoßen werden, die letztendlich auch zur Induktion von Angiogenese führen (Kaminska et al. 2005).

In aktuellen Studien kommt Endoglin bei Präeklampsie als prädiktiver Faktor eine bedeutende Rolle zu. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Endoglin Serumkonzentration im zweiten Trimenon und der Entwicklung einer Präeklampsie nachgewiesen werden (Lambert-Messerlian et al. 2014). Desweiteren konnte in immunhistochemischen Untersuchungen in schwerwiegenden Fällen von Präeklampsie eine hohe Expression von Endoglin im Synzytiotrophoblast und in extravillösen Zytotrophoblastzellen nachgewiesen werden (Shchyogolev et al. 2012).

Endoglin wurde im Microarray nur in der Präeklampsiegruppe exprimiert.

In der PCR zeigte sich zusätzlich zur Expression in der Präeklampsiegruppe eine Expression in einer Plazenta der Kontrollgruppe.

In der Immunhistochemie zeigte das Ergebnis eine leicht stärkere Expression der Präeklampsiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

In der Zusammenfassung aller Ergebnisse zeigte sich eine höhere Expression in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Tendenz der Ergebnisse stimmt mit der aktuellen Literatur für die Serumkonzentrationen überein, in der sich eine Hochregulation der Genexpression von Endoglin feststellen ließ (Bell und Conley 2011; Sitras et al. 2009).

Da die Unterschiede in den Plazenten nur geringfügig ausgeprägt waren, sollte die Untersuchung einer größeren Kohorte erfolgen.

5.4 FLT1 - vascular endothelial growth factor receptor 1

sFlt-1 ist eine gekürzte Splicevariante des membrangebundenen Flt-1. Es zirkuliert im Serum wo es u. a. an VEGF bindet (Kar 2014). Bei Flt-1 handelt es sich um einen Rezeptor des vascular endothelial growth factor (VEGF) und dem strukturell ähnlichen placenta growth factor (PlGF-1) (Terman et al. 1994). VEGF-A reguliert die Angiogenese und Gefäßpermeabilität unter anderem durch Aktivierung von Flt-1 (Shibuya 2011). Multiple Transkriptionsvarianten, die verschiedene Isoformen kodieren, wurden für dieses Gen gefunden. Die Isoformen beinhalten eine vollständige transmembranäre Rezeptor-Isoform und verkürzte lösliche Isoformen. Die löslichen Isoformen sind mit der Entstehung von Präeklampsie assoziiert (Stutfeld und Ballmer-Hofer 2009).

Die Synthese der proangiogenen Faktoren VEGF und FLT1 findet in den Trophoblastzellen statt. VEGF bindet in der Trophoblastmembran an FLT1 (auch VEGF-Rezeptor genannt) und aktiviert die Angiogenese. Hypoxie induziert die Produktion einer löslichen Splice-Variante von FLT1, das sog. sFLT1. Durch die Bindung von VEGF an diese lösliche Rezeptorform dominieren die antiangiogenen Faktoren im mütterlichen Blut, was zur endothelialen Dysfunktion führt (Verlohren et al. 2012).

Aktuelle Studien haben einen Zusammenhang zwischen erhöhten sFLT-1 Konzentrationen im maternalen Serum und Präeklampsie zeigen können. Das sFlt-1 Level beginnt ca. 5 Wochen vor Auftreten der Präeklampsie, zu steigen und bleibt im Vergleich zu nicht betroffenen Frauen erhöht. Das sFlt-1 Level steht in direkter Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung. Flt-1 ist bei Präeklampsie hochreguliert (Nishizawa et al. 2011). Bei Frauen mit einem hohen Präeklampsierisiko konnten er-

höhte Serumspiegel an sFlt-1 nachgewiesen werden (Hanita et al. 2014). Die Konzentrationen im mütterlichen Blut der löslichen Faktoren *fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1) und *soluble endoglin* (sEng) steigen an. Diese löslichen Rezeptoren können VEGF und PlGF binden und zu einer Abnahme dieser Faktoren im mütterlichen Kreislauf führen. Im mütterlichen Gewebe kann dies wiederum zur endothelialen Dysfunktion führen (Foidart et al. 2009) FLT-1 wurde im Microarray in der Präeklampsiegruppe etwas stärker als in der Kontrollgruppe exprimiert. In der PCR zeigte sich eine Hochregulation von FLT-1 in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Immunhistochemie zeigte sich eine leicht stärkere Färbung in der Präeklampsiegruppe. Insgesamt zeigte sich auf allen untersuchten Ebenen eine Hochregulation in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse stimmen somit weitgehend mit den Ergebnissen der aktuellen Literatur überein.

5.5 Thrombospondin 1

Thrombospondin ist ein prothrombotischer und antiangiogener Faktor, der in der Plazenta exprimiert wird (Andraweera et al. 2011; Hawighorst et al. 2002).

Die Datenlage im Zusammenhang von Thrombospondin 1 und Präeklampsie ist sehr gering. In einer aktuellen Studie konnte in einer immunhistochemischen Untersuchung von Plazentagewebe von präeklampsischen und normotensiven Frauen eine stärkere Anfärbung für Thrombospondin 1 nachgewiesen werden (Ayaz et al. 2014).

Thrombospondin wurde als potenter antiangiogener Faktor zur weiteren Analyse in diese Arbeit einbezogen.

Im Microarray zeigte sich keine Regulation von THBS1 in den untersuchten Plazenten. In der PCR ergab sich kein Unterschied in der Regulation, und auch in der Immunhistochemie war kein Unterschied in der Färbeintensität feststellbar. Insgesamt waren die Expressionsmuster zu inhomogen, um eine eindeutige Tendenz in der Regulation zu erkennen.

Im Kontext eines Ungleichgewichts von pro- und antiangiogenen Faktoren liegt es nahe, dass auch Thrombospondin 1 als potenter antiangiogener Faktor möglicherweise eine Rolle in der Pathophysiologie der Präeklampsie spielt. Dementsprechend sollte Thrombospondin 1 in weiteren Studien untersucht werden

5.6 VEGF - Vascular endothelial growth factor

Bei VEGF handelt es sich um ein Heparin-bindendes Glykoprotein, welches einen der bedeutendsten proangiogenen Faktoren darstellt (Lohela et al. 2009).

VEGF ist ein angiogener Faktor, der Vaskulogenese, Angiogenese und die Aufrechterhaltung des Gefäßsystems während der Embryogenese und in Erwachsenen reguliert. Studien haben gezeigt, dass die Beeinträchtigung der vaskulären Homöostase durch Blockierung von VEGF-A zu einer endothelialen Dysfunktion führen kann (Ylä-Herttuala et al. 2007). Eine aktuelle Studie, untersuchte die Serumkonzentration von Faktoren, die im Zusammenhang mit der plazentaren Angiogenese stehen bei präeklampsischen und normotensiven Schwangeren. Sie zeigte für VEGF bei Frauen mit Präeklampsie zwar niedrigere Serumlevel als in der normotensiven Gruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz (Mundim et al. 2015). In einer weiteren Studie konnten bei Patientinnen mit Präeklampsie signifikant niedrigere Serumkonzentrationen an VEGF im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Außerdem zeigte VEGF eine signifikante negative Korrelation mit systolischem und diastolischem Blutdruck (Saha et al. 2013).

In dieser Arbeit konnte in der Präeklampsiegruppe durch die Microarray-Untersuchung kein Expressionsunterschied von Vascular endothelial growth factor im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ergab die PCR eine niedrigere Regulation von VEGF in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Expressionsanalyse mithilfe der Immunhistochemie zeigte eine minimal höhere Expression in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Präeklampsiegruppe.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine erhöhte angiogene Aktivität in den Plazenten der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für Angiotin, ANG2, ENG und FLT1 spiegelten sich die Ergebnisse des Genarray auch in der PCR und Immunhistochemie wider. Das Expressionsmuster in der PCR von VEGF mit einer niedrigeren Regulation in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe passt mutmaßlich zur Dysbalance zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren. Für THBS1 blieben die Ergebnisse auf allen untersuchten Ebenen unspezifisch. Im Ganzen stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen der aktuellen Wissenschaft überein. So konnten mehrere Studien Unterschiede in den Serumkonzentrationen von Wachstumsfaktoren bei Schwangeren mit Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren nachweisen (Nanjo et al. 2017; Levine et al. 2006; Levine et al. 2004)

Obwohl die angiogene Aktivität in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht zu sein scheint, korrelieren die Ergebnisse innerhalb der Präeklampsiegruppe nicht mit dem klinischen Bild. So war die Indikation zur Schwangerschaftsbeendigung in drei Fällen mit schwerer Präeklampsie angegeben worden (siehe Tab.1, Patientinnen 1, 2 und 6). In Abbildung 8 sind es gerade diese Plazenten, die eine im Vergleich zu den anderen Plazenten dieser Gruppe geringere angiogene Aktivität aufweisen. Eine hinreichende Erklärung dafür konnte bislang nicht gefunden werden, sie bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Bei der Auswahl der Patientinnen sollte die Schwangerschaftswoche ungefähr übereinstimmen. Daraus ergab sich jedoch eine sehr inhomogene Zusammensetzung der Kontrollgruppe, zu der auch eine Gemini- und eine Drillingsschwangerschaft zählten. Die unterschiedlichen Expressionsmuster beider Gruppen erschwerten die Auswahl eines Kontroll-Gen-Array. Zur Veranschaulichung war KO 11 am besten geeignet (siehe Tabelle 8 Material und Methoden), da es sich hier um einen weitgehend physiologischen Schwangerschaftsverlauf handelte und eine ausreichende Dokumentation der Laborwerte gegeben war.

Auch die ausgewählten Untersuchungsmethoden weisen ihre Fehler auf. Bei Studien mit großen Replikanzahlen kann das Auftreten von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen im Microarray statistisch abgeschätzt werden (Pounds und Morris 2003). Bei sehr kleinem Untersuchungskollektiv, wie es in dieser Arbeit der Fall ist, ist dies nicht möglich. Hier wurden die Ergebnisse anschließend mit der Methode der PCR validiert. Für die drei Gene Angiotensin, Angiotensinogenase-2 und Endoglin die auf Grundlage des Genarray ausgewählt wurden, konnte das Ergebnis in der PCR wiederholt und damit bestätigt werden. Bei der PCR handelt es sich zwar um eine nicht sehr aufwendige, aber dennoch sensitive Methode. Allein aus der Vielzahl der verwendeten Reagenzien und Substrate ergibt sich eine gewisse Fehlerquote. „Die häufigsten Probleme bei Durchführung einer PCR sind keine Produktbildung, unspezifische Nebenprodukte und Kontaminationen“ (Weigand 2008).

Die immunhistochemische Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, die zunächst entparaffiniert werden mussten. Die Qualität der Färbung hängt von vielen Bedingungen ab, unter anderem Enzym- und Substratkonzentration, pH-Wert, Temperatur etc. Obwohl die Auswertung der immunhistochemischen Färbung unter standardisierten Bedingungen und dadurch so objektiv wie möglich ablaufen sollte, ist es nicht möglich, subjektive Einflüsse zu verhindern.

Kritisch zu werten ist auch die Plazenta als Probenmaterial. So lässt die Untersuchung der Plazenta keine Rückschlüsse darüber zu, ob es sich bei den funktionellen und morphologischen Veränderungen um Ursache oder Wirkung der Präeklampsie handelt. Außerdem stellt die Plazenta gewissermaßen ein Endprodukt eines sich während der Schwangerschaft entwickelnden Krankheitsbildes dar.

Da es um die Erforschung eines prädiktiven Markers geht, der eine Diagnostik idealerweise noch vor dem Auftreten klinischer Symptome ermöglicht, muss auch das Probenmaterial einfach zu gewinnen sein, beispielsweise aus dem Blut der Schwangeren.

In dieser Arbeit ließ sich kein einzelnes Schlüsselgen identifizieren. Andeutungsweise zeigte sich eine höhere angiogene Aktivität in der Präeklampsiegruppe. Es scheint

also eine Vielzahl von Genen in diesen multifaktoriellen Prozess involviert zu sein. Aus der Brustkrebstherapie kennen wir bereits genomische Tests, mit deren Hilfe sich Vorhersagen zu Tumoraggressivität und dem voraussichtlichen Nutzen einer Chemotherapie ableiten lassen. Eine Übertragung dieses Modells in die Präeklampsieforschung würde eine genauere und individuellere Risikoabschätzung ermöglichen.

Fasst man zusammen, so lassen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit keine Aussage zu einzelnen Genen und deren Rolle bei der Präeklampsie zu. In geringem Maße lässt sich eine erhöhte Expression von angiogenen Faktoren in Plazenten von Schwangeren mit Präeklampsie beobachten.

Die Ergebnisse der PCR und der Immunhistochemie zeigen keine einheitliche Korrelation untereinander oder zu den Daten des Microarrays.

6 Zusammenfassung

Bei der Präeklampsie handelt es sich um eine Erkrankung, die während der Schwangerschaft ab der 20. SSW auftreten kann. Sie ist gekennzeichnet durch die Kardinalsymptome Hypertonie $> 140/90$ mmHg und Proteinurie > 300 mg/24 h.

Da die Präeklampsie zahlreiche Organsysteme betreffen kann, kann eine Vielzahl weiterer Symptome auftreten. Den Endpunkt der Erkrankung stellt die Eklampsie dar, die sich in generalisierten tonisch-klonischen Anfällen äußert. Einzige kausale Therapie ist die Entbindung. Trotz intensiver Forschung bleibt die Ätiologie dieser Erkrankung weiterhin unklar. Grundlage des klinischen Bildes ist die endotheliale Dysfunktion, die zahlreiche Auslöser haben kann. Viele Untersuchungen legen ein Missverhältnis zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren als eine der möglichen Ursachen nahe. Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung dysregulierter Angiogenesefaktoren in den Plazenten von Frauen mit Präeklampsie.

In der vorliegenden Arbeit konnten drei Angiogenesefaktoren anhand eines Angiogenese Gen-Arrays identifiziert werden, die in sieben Plazenten von Frauen mit Präeklampsie im Vergleich zu fünf Plazenten von Frauen ohne Präeklampsie hochreguliert waren. Dabei handelte es sich um Angiotensin II, Angiopoietin-2 und Endoglin. Außerdem wurden die Faktoren FLT1 (*vascular endothelial growth factor receptor 1*), Thrombospondin und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) in die weitere Analyse miteinbezogen. Anschließend wurde die Regulation der genannten Gene mithilfe der molekularbiologischen Methoden PCR und immunhistochemische Färbung verifiziert.

Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser Arbeit keine eindeutige Aussage zu einzelnen Genen und deren Rolle in der Präeklampsie zu. Nur andeutungsweise zeigte sich eine höhere Expression einzelner Gene in der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um eine Signifikanz zu ermitteln ist die Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs notwendig. Des Weiteren muss die Plazenta als Untersuchungsmaterial kritisch in Hinblick auf die Erforschung eines prädiktiven Biomarkers beurteilt werden. Hier wäre die Analyse der Faktoren in einem leichter zu gewinnen-

den Probenmaterial, beispielsweise im Blut, zweckmäßiger. Zusätzlich ergäbe sich gegebenenfalls die Möglichkeit einer frühzeitigeren Diagnose einer Erkrankung, deren Pathogenese sich mutmaßlich schon sehr früh, nämlich während der Plazentation entwickelt. Obwohl das Ursache-Wirkungsprinzip der Angiogenesefaktoren unklar bleibt, ist deren Bedeutung als diagnostischer Marker für die Früherkennung unumstritten.

Diese Arbeit ist Grundlage für weiterführende Untersuchungen auf dem Wege der Entwicklung neuer Diagnose- und Therapiestrategien.

7 Anhang

7.1 Human Angiogenesis Gene Array - Gentabelle

GEArray Q Series Human Angiogenesis Gene Array

HS-009 gene table

Position	UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name
1	Hs.8230	AF060152	ADAMTS1	A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	Meth 1
2	Hs.271605	NM_007037	ADAMTS8	Homo sapiens a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 mo	Meth 2
3	Hs.332764	M11567	ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	Angiogenin
4	Hs.2463	NM_001146	ANGPT1	Human angiotensinogen-converting enzyme 1 mRNA	Angiotensinogen 1
5	Hs.115181	NM_001147	ANGPT2	Homo sapiens angiotensinogen-converting enzyme 2 mRNA	Angiotensinogen-2
6	Hs.75613	NM_000072	CD36	Homo sapiens CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)	CD36
7	Hs.76206	X59796	CDH5	Cadherin 5, VE-cadherin (vascular epithelium)	Cadherin
8	Hs.172216	NM_001275	CHGA	Homo sapiens chromogranin A (parathyroid secretory protein 1) (precursor for vasostatin)	Vasostatin
9	Hs.2233	X03438	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	G-CSF
10	Hs.154210	NM_001400	EDG1	Homo sapiens endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor	EDG1
11	Hs.158306	NM_001405	EFNA2	Homo sapiens ephrin-A2	Ephrin A2
12	Hs.37142	NM_001962	EFNA5	Homo sapiens ephrin-A5	Ephrin A receptor
13	Hs.30942	NM_004093	EFNB2	Homo sapiens ephrin-B2	Ephrin B2
14	Hs.2230	X04571	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)	EGF
15	Hs.77432	X00588	EGFR	Epidermal growth factor receptor	EGFR
16	Hs.76753	NM_000118	ENG	Homo sapiens endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	Endoglin
17	Hs.155227	XM_005008	EPHB4	Homo sapiens EphB4	Ephrin B4
18	Hs.323910	m11730	ERBB2	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	erb-2
19	Hs.297939	L16510	ETS1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	c-ets1
20	Hs.76530	J00307	F2	Human prothrombin (phi1-3 clone)	Prothrombin kringle-1
21	Hs.75297	X51943	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	FGF1
22	Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	FGF2
23	Hs.1755	J02986	FGF4	Fibroblast growth factor 4 (heparinsecretory transforming protein 1, Kaposi sarcoma oncogene)	FGF-4 (Hst)
24	Hs.166015	NM_020996	FGF6	Fibroblast growth factor 6	FGF6/HST-2
25	Hs.164568	NM_002009	FGF7	Fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)	SERPINH1
26	Hs.748	M34185	FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	FLG
27	Hs.278581	M55614	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2	Bek/KGFR
28	Hs.1420	M64347	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)	FGFR3
29	Hs.165950	L03840	FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4	FGFR4
30	Hs.11392	D89630	FIGF	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	VEGF-D
31	Hs.12337	AF035121	FLK1	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	KDR
32	Hs.138671	NM_002019	FLT1	Homo sapiens vascular endothelial growth factor receptor mRNA (Fms-related tyrosine kinase 1)	FLT1
33	Hs.287820	X02761	FN1	Fibronectin 1	Fibronectin-1
34	Hs.789	X12510	GRO1	GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	GROa/MGSA
35	Hs.809	X57574	HGF	Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A; scatter factor)	HGF
36	Hs.197540	NM_001530	HIF1A	Homo sapiens hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF1A
37	Hs.44227	AF084467	HPSE	Homo sapiens heparanase mRNA	Heparanases

GEArray Q Series Human Angiogenesis Gene Array

Position	UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name
38	Hs.75424	D13889	ID1	DNA-binding protein inhibitor ID-1	ID1
39	Hs.76884	X66924	ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	ID3
40	Hs.37026	NM_024013	IFNA1	Homo sapiens interferon, alpha 1	IFNA1
41	Hs.93177	M28622	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFN-b1
42	Hs.856	X13274	IFNG	Interferon, gamma	IFN-r
43	Hs.85112	M27544	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF-1
44	Hs.193717	M57627	IL10	Interleukin 10	IL-10
45	Hs.673	M65271	IL12A	Interleukin 12A, p35	IL-12A
46	Hs.624	M17017	IL8	Interleukin 8	IL-8
47	Hs.149609	X06256	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	Integrin a5
48	Hs.295726	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	Integrin aV
49	Hs.87149	J02703	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	Integrin b3
50	Hs.9271	AF286598	AMOT (KIAA1071)	KIAA1071 protein, Homo sapiens angiostatin binding protein 1 mRNA, internal fragment of plasminogen.	angiomin
51	Hs.78409	NM_016214	COL18A1 (LOC51695)	Homo sapiens type XVIII collagen (LOC51695)	Endostatin
52	Hs.79067	NM_005900	MADH1	Homo sapiens MAD (mothers against decapentaplegic, Drosophila) homolog 1 (MADH1, Human chromosome 4)	Smads
53	Hs.82045	NM_002391	MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	Midkine
54	Hs.111301	J03210	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kD gelatinase, 72kD type IV collagenase)	Gelatinase A
55	Hs.151738	J05070	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kD gelatinase, 92kD type IV collagenase)	Gelatinase B
56	Hs.49	NM_002445	MSR1	Homo sapiens macrophage scavenger receptor 1	SR-A
57	Hs.166373	NM_000603	NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	NOS3
58	Hs.69285	NM_003873	NRP1	Homo sapiens neuropilin 1	neuropilin 1
59	Hs.37040	X06374	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGF a
60	Hs.135631	X63966	PDGF-BB	Platelet-derived growth factor-BB	PDGF b
61	Hs.74615	M21574	PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	PDGFRa
62	Hs.76144	NM_002609	PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	PDGFRb
63	Hs.78146	NM_000442	PECAM1	Homo sapiens platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	CD31
64	Hs.81564	NM_002819	PF4	Platelet factor 4	PF-4
65	Hs.2894	NM_002632	PGF	Homo sapiens placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein	PlGF
66	Hs.77274	D00244	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	uPA
67	Hs.1905	M29386	PRL	Prolactin	PRL
68	Hs.88474	NM_000962	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX-1
69	Hs.196384	NM_000963	PTGS2	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	Cox-2
70	Hs.44	X52946	PTN	Pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	Pleiotrophin
71	Hs.31638	NM_002956	RSN	Homo sapiens restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)	Restin
72	Hs.303649	X14768	SCYA2	Small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1, homologous to mouse S1q-1e)	SCYA2
73	Hs.55279	NM_002639	SERPINB5	Protease inhibitor 5 that has been shown to function as tumor suppressor in breast and prostate cancer	Maspin
74	Hs.173594	M90439	SERPINF1	Pigment epithelium-derived factor	PEDF
75	Hs.111779	NM_003118	SPARC	Homo sapiens secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC
76	Hs.313	M83248	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	Osteopontin

GEMArray Q Series Human Angiogenesis Gene Array

Position	UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name
77	Hs.89640	NM 000459	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)	Tie-2
78	Hs.170009	NM 003236	TGFA	Transforming growth factor, alpha	TGF-a
79	Hs.1103	X02812	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	TGFB1
80	Hs.169300	M19154	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	TGF b2
81	Hs.2025	NM 003239	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3	TGF b3
82	Hs.220	L11695	TGFR1	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kD)	ALK-5
83	Hs.82028	D50683	TGFR2	Transforming growth factor, beta receptor II (70-80kD)	TGFR2
84	Hs.342874	NM 003243	TGFR3	Transforming growth factor, beta receptor III	TGFR3
85	Hs.87409	NM 003246	THBS1	Homo sapiens thrombospondin 1	TSP-1
86	Hs.108623	L12350	THBS2	Human thrombospondin 2 mRNA	TSP-2
87	Hs.169875	L38969	THBS3	Homo sapiens thrombospondin 3 gene	TSP-3
88	Hs.75774	NM 003248	THBS4	H.sapiens thrombospondin-4	TSP-4
89	Hs.78824	NM 005424	TIE	Homo sapiens tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains	Tie-1
90	Hs.5831	NM 003254	TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	TIMP1
91	Hs.325495	NM 003255	TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP2
92	Hs.241570	X01394	TNFA	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNF-a
93	Hs.241382	NM 005118	TNFSF15	Homo sapiens vascular endothelial cell growth inhibitor (VEGI) mRNA	VEGI
94	Hs.73793	M32977	VEGF	Vascular endothelial growth factor	VEGF
95	Hs.78781	U48801	VEGFB	Vascular endothelial growth factor B	VEGF-B
96	Hs.79141	X94216	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	VEGF-C
97	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
98	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
99	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
100	Blank	Blank	Blank	Blank	0
101	Blank	Blank	Blank	Blank	0
102	Blank	Blank	Blank	Blank	0
103	Hs.189476	M33197	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
104	Hs.189476	M33197	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
105	Hs.342389	NM 021130	PPIA	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A	cyclophilin A
106	Hs.342389	NM 021130	PPIA	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A	cyclophilin A
107	Hs.342389	NM 021130	PPIA	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A	cyclophilin A
108	Hs.342389	NM 021130	PPIA	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A	cyclophilin A
109	Hs.119122	NM 012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a (23 Kda highly basic protein)	RPL13A
110	Hs.119122	NM 012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a (23 Kda highly basic protein)	RPL13A
111	Hs.288061	X00351	ACTB	Beta Actin	b-actin
112	Hs.288061	X00351	ACTB	Beta Actin	b-actin

8 Literaturverzeichnis

- Al-Jameil N, Aziz Khan F, Fareed Khan M, Tabassum H (2014): A Brief Overview of Preeclampsia. *J Clin Med Res* 6, 1–7
- Andraweera PH, Dekker GA, Thompson SD, North RA, McCowan LM, Roberts CT (2011): A functional variant in the thrombospondin-1 gene and the risk of small for gestational age infants. *J Thromb Haemost* 9, 2221-2228
- Ayaz E, Nergiz Y, Tunik S, Yalinkaya A (2014): The comparison of endogenous angiogenesis inhibitors in normotensive and preeclamptic placentas: an immunohistochemical study. *Hypertens Pregnancy* 33, 61-71
- Bell MJ, Conley YP (2011): A systematic review of endoglin gene expression in preeclampsia. *Biol Res Nurs* 15, 129-136
- Bos AF, Van Braeckel KN, Hitzert MM, Tanis JC, Roze E (2013): Development of fine motor skills in preterm infants. *Dev Med Child Neurol* 55, 1-4
- Caritis S, Sibai B, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E, VanDorsten P, Landon M, Paul R, Miodovnik M (1998): Low-dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med* 338, 701-705
- Chen CW, Jaffe IZ, Karumanchi SA (2014): Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 101, 579-586
- Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A (2000): Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol* 156, 2185-2199
- Dusse LM, Alpoim PN, Lwaleed BA, de Sousa LP, Carvalho Md, Gomes KB (2013): Is there a link between endothelial dysfunction, coagulation activation and nitric oxide synthesis in preeclampsia? *Clin Chim Acta* 415, 226-229
- Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO (2003): Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 188, 1241-1243
- Fisher SJ (2015): Why is placentation abnormal in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol* 213, 115-122

- Foidart JM, Schaaps JP, Chantraine F, Munaut C, Lorquet S (2009):
Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in pre-eclampsia--a step forward but not the definitive answer. *J Reprod Immunol* 82, 106-111
- Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB (2002):
Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4213-4224
- Glasel JA (1995): Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/ 280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 18, 62-63
- Gründker C, Schlotawa L, Viereck V, Eicke N, Horst A, Kairies B, Emons G (2004):
Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol* 151, 141-149
- Hallman M (2012): Premature birth and diseases in premature infants: common genetic background? *J Matern Fetal Neonatal Med* 25, 21-24
- Han SY, Jun JK, Lee CH, Park JS, Syn HC (2012): Angiopoietin-2: a promising indicator for the occurrence of severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 31, 189-199
- Hanita O, Alia NN, Zaleha AM, Nor Azlin MI (2014): Serum soluble FMS-like tyrosine kinase 1 and placental growth factor concentration as predictors of preeclampsia in high risk pregnant women. *Malays J Pathol* 36, 19-26
- Hawighorst T, Oura H, Streit M, Janes L, Nguyen L, Brown LF, Oliver G, Jackson DG, Detmar M (2002): Thrombospondin-1 selectively inhibits early-stage carcinogenesis and angiogenesis but not tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in transgenic mice. *Oncogene* 21, 7945-7956
- Herzog EM, Eggink AJ, Reijnierse A, Kerkhof MA, De Krijger RR, Roks AJ, Reiss IK, Nigg AL, Eilers PH, Steegers EA (2017): Impact of early- and late-onset preeclampsia on features of placental and newborn vascular health. *Placenta* 49, 72-79

- Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Resman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A (2004): Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 200, 957-965
- Huppertz B (2008): Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 51, 970-975
- Hurliman AK, Speroff L, Stouffer RL, Patton PE, Lee A, Molskness TA (2010): Changes in circulating levels and ratios of angiopoietins during pregnancy but not during the menstrual cycle and controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 93, 1493-1499
- James JL, Whitley GS, Cartwright JE (2010): Pre-eclampsia: fitting together the placental, immune and cardiovascular pieces. *J Pathol* 221, 363-378
- Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M (2005): TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol* 52, 329-337
- Kappou D, Sifakis S, Konstantinidou A, Papantoniou N, Spandidos DA (2015): Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy (Review). *Exp Ther Med* 9, 1091-1096
- Kar M (2014): Role of biomarkers in early detection of preeclampsia. *J Clin Diagn Res* 8, BE01-04
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B (2003): Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69, 1-7
- Lambert-Messerlian G, Eklund EE, Chien EK, Rosene-Montella K, Neveux LM, Haddow HR, Palomaki GE (2014): Use of first or second trimester serum markers, or both, to predict preeclampsia. *Pregnancy Hypertens* 4, 271-278
- Leinonen E, Wathén KA, Alfthan H, Ylikorkala O, Andersson S, Stenman UH, Vuorela P (2010): Maternal serum angiopoietin-1 and -2 and tie-2 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 126-133
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH (2004): Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 350, 672-683

- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R (2006): Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 355, 992-1005
- Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K (2009): VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 21, 154-165
- Magee LA, Pels A, Helewa M, Rey E, von Dadelszen P (2014): Diagnosis, evaluation and management of the hypertensive disorders of pregnancy: executive summary. *J Obstet Gynaecol Can* 36, 575-576
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60
- Masoura S, Kalogiannidis I, Makedou K, Theodoridis T, Koiou K, Gerou S, Athanasiadis A, Agorastos T (2014): Biomarkers of endothelial dysfunction in preeclampsia and neonatal morbidity: a case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 175, 119-123
- Matsumoto H, Fukui E, Yoshizawa M, Sato E, Daikoku T (2012): Differential expression of the motin family in the peri-implantation mouse uterus and their hormonal regulation. *J Reprod Dev* 58, 649-653
- Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M, Sun CC, Kimura T, Baschat AA (2007): Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. *Am J Perinatol* 24, 257-266
- Moffett A, Hiby SE (2007): How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta* 28, 51-56
- Mundim GJ, Paschoini MC, Araujo Júnior E, Da Silva Costa F, Rodrigues Júnior V (2015): Assessment of angiogenesis modulators in pregnant women with pre-eclampsia: a case-control study. *Arch Gynecol Obstet* 293, 369-375
- Naicker T, Khedun SM, Moodley J, Pijnenborg R (2003): Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82, 722-729

- Nanjo S, Minami S, Mizoguchi M, Yamamoto M, Yahata T, Toujima S, Shiro M, Kobayashi A, Muragaki Y, Ino K (2017): Levels of serum circulating angiogenic factors within 1 week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with pre-eclampsia, gestational hypertension, and/or fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol Res* 43, 1805-1814
- Ness RB, Roberts JM (1996): Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol* 175, 1365-1370
- Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Kato T, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y (2011): Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 107
- Petrik J (2006): Diagnostic applications of microarrays. *Transfus Med* 16, 233-247
- Pounds S, Morris SW (2003): Estimating the occurrence of false positives and false negatives in microarray studies by approximating and partitioning the empirical distribution of p-values. *Bioinformatics* 19, 1236-1242
- Prakash J, Vohra R, Pandey LK, Niwas SS, Behura SK, Singh U (2010): Spectrum of kidney diseases in patients with preeclampsia-eclampsia. *J Assoc Physicians India* 58, 543-546
- Predoi CG, Grigoriu C, Vladescu R, Mihart AE (2015): Placental damages in pre-eclampsia - from ultrasound images to histopathological findings. *J Med Life* 8, 62-65
- Ramma W, Ahmed A (2011): Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans* 39, 1619-1627
- Redman CW, Sargent IL (2003): Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response-a review. *Placenta* 24, 21-27
- Redman CW, Sargent IL (2005): Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 308, 1592-1594
- Robillard PY (2002): Interest in preeclampsia for researchers in reproduction. *J Reprod Immunol* 53, 279-287

- Saftlas AF, Levine RJ, Klebanoff MA, Martz KL, Ewell MG, Morris CD, Sibai BM (2003): Abortion, changed paternity, and risk of preeclampsia in nulliparous women. *Am J Epidemiol* 157, 1108-1114
- Saftlas AF, Rubenstein L, Prater K, Harland KK, Field E, Triche EW (2014): Cumulative exposure to paternal seminal fluid prior to conception and subsequent risk of preeclampsia. *J Reprod Immunol* 101, 104-110
- Saha T, Halder M, Das A, Das SK (2013): Role of nitric oxide, angiogenic growth factors and biochemical analysis in preeclampsia. *Indian J Biochem Biophys* 50, 462-466
- Schneider S, Freerksen N, Maul H, Roehrig S, Fischer B, Hoefft B (2011): Risk groups and maternal-neonatal complications of preeclampsia--current results from the national German Perinatal Quality Registry. *J Perinat Med* 39, 257-265
- Shchyogolev AI, Dubova EA, Pavlova KA, Lyapin VM, Sukhikh GT (2012): Expression of antiangiogenic factors in the placental structures in preeclampsia. *Bull Exp Biol Med* 154, 287-291
- Shibuya M (2011): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer* 2, 1097-1105
- Sitras V, Paulssen RH, Grønnaas H, Leirvik J, Hanssen TA, Vårtun A, Acharya G (2009): Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta* 30, 424-433
- Steegers EA, von Dadelszen P, Duvékot JJ, Pijnenborg R (2010): Pre-eclampsia. *Lancet* 376, 631-644
- St-Jacques S, Forte M, Lye SJ, Letarte M (1994): Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* 51, 405-413
- Strauss A: *Geburtshilfe Basics*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006
- Stuttfield E, Ballmer-Hofer K (2009): Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 61, 915-922

- Terman B, Khandke L, Dougher-Vermazan M, Maglione D, Lassam NJ, Gospodarowicz D, Persico MG, Böhlen P, Eisinger M (1994): VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. *Growth Factors* 11, 187-195
- Thomas M, Augustin HG (2009): The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12, 125-137
- Troyanovsky B, Levchenko T, Månsson G, Matvijenko O, Holmgren L (2001): Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol* 152, 1247-1254
- Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B (1996): Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology* 7, 240-244
- Verlohren S, Stepan H, Dechend R (2012): Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)* 122, 43-52
- Vogelstein B, Gillespie D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 615-619
- Weigand N: Multiplex Polymerasekettenreaktion mit fluoreszenzoptischer Produktdetektion durch den Einsatz von Primern mit „primerintegrierten Reportersequenzen“. Med. Diss. Gießen 2008
- Wen SW, Demissie K, Yang Q, Walker MC (2004): Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 191, 254-258
- Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J (2007): Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 49, 1015-1026

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die durch ihre fachliche und persönliche Kompetenz zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich den Müttern für die Bereitstellung der Plazenten danken, die damit diese Studie erst ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Carsten Gründker, der es mir ermöglicht hat, einen Einblick in wissenschaftliches Arbeiten zu erlangen und durch seine unentwegte Hilfsbereitschaft und Unterstützung, seine ausgeglichene Art und seine konstruktive Hilfe zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn PD Dr. med. T. Hawighorst danke ich für die Vergabe des Themas. Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Günter Emons für die Möglichkeit, diese Arbeit im Labor für Molekulare Gynäkologie der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Carsten Gründker durchführen zu können.

Für ihre stete Unterstützung und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor möchte ich mich besonders bei Frau Sonja Blume, Frau Renate Dietrich, Frau Kathrin Eckhardt, Herrn Matthias Läsche und Frau Hiltrud Schulz bedanken. Insbesondere bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Antje Schubert, die mir bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden immer kompetent und geduldig zur Seite stand.