

Der Einfluss von Seren von Präeklampsie-Patientinnen auf den JAK-STAT-Signalweg in trophoblastären Zellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Christiane Graul, geb. Willenberg
geboren am 12.09.1986 in Erfurt

Gutachter

1. apl. Prof. Dr. Udo Markert, Jena
2. PD Dr. Uta-Christina Hipler, Jena
3. Prof. Dr. Udo Jeschke, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.07.2019

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ALAT	Alanin-Aminotransferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2 (intrazellulärer antiapoptotischer Faktor)
BMI	Body-Mass-Index
CD	Cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
CLB	Zellysepuffer
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CSF	Colony stimulating factor
CT-1	Cardiotrophin-1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal growth factor
EPO	Erythropoetin
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Sorter
Fas	Oberflächenantigen
Fas-L	Fas-Ligand
Fas-R	Fas-Rezeptor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GF	Growth Factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GSS	Gesund-Schwangeren-Serum
GTP	Guanintriphosphat
Grb-2	Growth-factor-receptor-bound

HCG	Human chorionic gonadotropin
HELLP	Hemolysis, high elevated liver enzymes, low platelets
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLDME-cells	Human lung-derived microvascular endothelial cells
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSC	Hepatic stellate cells
HTR-8/SVneo	Zelllinie (Extravillöse Trophoblastzellen mit simian virus 40 large T-Antigen)
IDO	Indoleamin 2,3-Dioxygenase
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IFN- γ	Interferon- γ
IL-6	Interleukin-6
IUGR	Intrauterine growth restriction
JAK	Januskinase
JEG3	Chorionkarzinomzelllinie
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
kDa	Kilo-Dalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
M	Mittelwert
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAPK	Mitogen-activated protein-Kinase
MEK1/2	MAP-Kinase-Kinase
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger-RNA
miRNA	microRNA
MT-MMP	Membrangebundene Matrix-Metalloproteinasen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGF	Nerve growth factor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSS	Nicht-Schwangeren-Serum

OFPAE-cells	Ovine fetal placental artery endothelial cells
OSM	Oncostatin M
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAPP-A	Plazentares Protein A
PBS	Phosphate Buffered Saline
p.c.	post conceptionem
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Präeklampsie
PES	Präeklampsie-Serum
PI	Propidium-Iodid
PIAs	Protein Inhibitor of Activated STATs
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIGF	Placenta Growth Factor
PP-13	Plazentaprotein 13
PS	Phosphatidylserin
R	Korrelationskoeffizient nach Pearson
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodesylsulfat
s-Flt 1	Fms-like Tyrosinkinase 1
SHP-1	SH2-containing phosphatase
SOCS	Suppressors of cytokine signaling
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	Signal-transducers and activators of transcription
STBEV	Extrazelluläre Synzytiotrophoblastvesikel
TBS	Tris Bufferd Saline
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylenediamin
TGF	Transforming growth factor
TH-Zellen	T-Helferzellen
TIMP	Tissue inhibitor matrixmetalloproteinase

TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thyreoperoxidase
uNK-Zellen	Uterine Natürliche Killerzellen
uPA	Serin-Proteinase-Urokinase
V	Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	II
Inhaltsverzeichnis	VI
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Entwicklung des Embryo, der Eihäute und der Plazenta	3
2.1.1 Trophoblastpopulationen	6
2.1.2 Trophoblasten ähneln Tumorzellen.....	6
2.1.3 Regulierung der Trophoblastinvasion	7
2.2 Das Immunsystem des Menschen	8
2.2.1 MHC-Moleküle	8
2.2.2 Zellen der angeborenen Abwehr.....	9
2.2.3 Zellen der erworbenen Abwehr.....	9
2.2.4 Humorale Bestandteile der angeborenen Abwehr	10
2.2.5 Antikörper – humorale Bestandteile der erworbenen Abwehrreaktion	10
2.2.6 Der Ablauf der Immunantwort	10
2.2.7 Das Immunsystem der Plazenta und des Embryos	11
2.3 Apoptose und deren Bedeutung	12
2.4 Der Wachstumsfaktor LIF – Leukemia Inhibitory Factor	14
2.4.1 LIF und seine Bedeutung für die Implantation	14
2.5 Der JAK-STAT-Signalweg	15
2.5.1 Die Janus-Kinasen (JAKs).....	16
2.5.2 Die STAT-Moleküle.....	17
2.5.2.1 STAT3 und seine Funktionen	18
2.5.3 Die Regulierung des JAK-STAT-Signalweges	20
2.6. Der MAPK-Signalweg	20
2.6.1. Der ERK1/2-Signalweg	22
2.6.2 Die Bedeutung der MAP-Kinasen für die embryonale Entwicklung.....	23
2.7 Präeklampsie	23
2.7.1 Definition und Symptome.....	23
2.7.2 Risikofaktoren und mögliche Folgen	24
2.7.3 Pathogenese.....	25
2.7.4 Formen der Präeklampsie.....	30
2.7.5 Diagnostik	30
2.7.6 Screening.....	31
2.7.7 Prävention und Behandlung.....	32
3 Ziele der Arbeit	35
4 Methoden	36
4.1 Die JEG3-Zelllinie	36
4.1.1 Zellkultur von JEG3-Zellen.....	36
4.1.2 Zählen der Zellen	37
4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	37
4.2 Gewinnung der Präeklampsie-Proben	38

4.2.1	Kultivierung auf Mikrotiter-Kulturplatten	39
4.3	Proteinisolation	39
4.3.1	Herstellung von Zelllysaten	39
4.3.2	Bradford-Proteinbestimmung	39
4.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
4.4.1	Hintergrund	40
4.4.2	Durchführung	41
4.5	Western Blot	42
4.5.1	Durchführung	42
4.5.2	Immundetektion	42
4.6	Bestimmung der metabolischen Aktivität als Maß für Proliferation	
	mittels MTT-Test	43
4.6.1	Hintergrund	43
4.6.2	Durchführung	44
4.7	Apoptose-Assay mittels Annexin V via Durchflusszytometrie	45
4.7.1	Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	45
4.7.2	Apoptose-Assay	45
4.7.2.1	Durchführung	46
4.8	Statistische Auswertung	47
5	Ergebnisse	48
5.1	Ergebnisse des Proliferationsassays	48
5.1.1	Proliferationsassay mit 5.000 JEG3-Zellen	49
5.1.2	Proliferationsassay mit 10.000 JEG3-Zellen	54
5.1.3	Proliferationsassay mit 20.000 JEG3-Zellen	59
5.2	Ergebnisse des Apoptose-Assays mittels Annexin V via	
	Durchflusszytometrie	64
5.2.1	Apoptose-Assay mit Gesund-Schwangerem-Serum und	
	Präeklampsie-Serum	64
5.3	Ergebnisse des Western Blots für p-STAT3	66
5.4	Ergebnisse des Western Blots für p-ERK1	70
5.5	Ergebnisse des Western Blot für p-ERK2	73
6	Diskussion	76
6.1	Diskussion der Verwendung von JEG3-Zellen als Modell für humane . Trophoblastzellen	76
6.2	Diskussion des Einflusses von humanem Serum auf die	
	Proliferationsrate von JEG3-Zellen	77
6.3	Diskussion des Einflusses von humanem Serum auf die Apoptoserate von JEG3-Zellen	79
6.4	Diskussion des Einflusses von PE-Serum auf die Phosphorylierung von STAT3 in JEG3-Zellen	81
6.5	Diskussion des Einflusses von PE-Serum auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in JEG3-Zellen	84
6.6	Diskussion der Methodik und Durchführung des p-STAT3- und	
	p-ERK1/2-Western Blots	85
6.7	Diskussion des Zusammenhangs zwischen p-STAT3- und p-ERK1/2- . Expression und Pathogenese der Präeklampsie	86
7	Schlussfolgerungen und Ausblick	91

8 Quellen- und Literaturverzeichnis	93
9 Anhang	106
Verwendete Geräte und Materialien	106
Zusammensetzungen von Puffern, Lösungen und Gelen	107
Abbildungsverzeichnis	112
Tabellenverzeichnis	114
Danksagung.....	115
Ehrenwörtliche Erklärung.....	116
Lebenslauf.....	117

1 Zusammenfassung

Einleitung

In den letzten Jahren wurden enorme Fortschritte in der Grundlagenforschung der Präeklampsie erzielt. So existiert mit dem sFlt-1/PlGF-Quotienten mittlerweile ein verlässlicher Diagnostik-Marker besonders in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft. Dennoch bleibt die genaue Pathogenese der Erkrankung ungeklärt. Um mögliche Screening-Marker in der Früherkennung der Präeklampsie entwickeln und damit eine frühzeitige Therapie einleiten zu können, bedarf es des Verständnisses der molekularen Entstehungsmechanismen der Erkrankung.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von Serum von Präeklampsie-Patientinnen, der Einfachheit im Folgenden als „Präeklampsieserum“ bezeichnet, auf die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 in trophoblastären Zellen untersucht werden, um einen kleinen Baustein in der weiteren Erforschung der molekularen Mechanismen der Präeklampsie beizutragen. Trophoblastäre Zellen umfassen alle Zellarten, welche ein ähnliches Zellwachstum wie die embryonalen Trophoblastzellen aufweisen – so z. B. JEG3-Zellen.

Anstoß für die Arbeit war eine Studie von Mahameed et al., in welcher gezeigt wurde, dass das Zellwachstum in trophoblastären Zellen um 6 % sank, wenn man diese mit Serum von Präeklampsie-Patientinnen versetzte (Mahameed et al. 2005).

Methodik

Sowohl der JAK-STAT- als auch der MAPK-Kinase-Weg wird von Zytokinen genutzt, welche die Trophoblastentwicklung steuern (Mudgett et al. 2000).

Die Ergebnisse von Mahameed aufgreifend, untersuchten wir, wie sich die Phosphorylierung von STAT3 (p-STAT3) und ERK 1/2 (p-ERK1/2) durch die Inkubation mit humanem Serum veränderte. Hierbei wurde der Fokus auf den Vergleich des Einflusses bei Verwendung von Serum von Nicht-Schwangeren, gesunden Schwangeren und Präeklampsie-Patientinnen gelegt.

Zur Analyse verwendeten wir JEG3-Zellen und ermittelten die Proteinexpression mittels Western Blot. JEG3-Zellen sind Chorionkarzinom-Zellen, welche ähnliche Wachstumseigenschaften wie humane Trophoblastzellen besitzen und so als Modell zur Erforschung fetaler und uteriner Zellinteraktionen der Plazenta dienen.

Weiterhin wurde mittels Proliferations- und Apoptoseassay der Einfluss von humanem Serum auf das Wachstumsverhalten von JEG3-Zellen allgemein untersucht.

Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von STAT3 von der Stimulation mit dem Wachstumsfaktor LIF abhängt. Eine Phosphorylierung von ERK1/2 findet im Gegensatz dazu sowohl bei Stimulierung der Zellkulturen mit LIF als auch ohne Stimulierung statt.

Bei Inkubation der JEG3-Zellen mit Präeklampsie-Serum zeigte sich eine höhere LIF-vermittelte Phosphorylierungsintensität von STAT3 und auch ERK1/2 gegenüber der Inkubation mit Normal-Schwangeren- oder Gesund-Schwangeren-Serum. Die Phosphorylierungsintensität beider Proteine bei Inkubation mit Gesund-Schwangeren-Serum war niedriger als bei Inkubation mit Nicht-Schwangeren- oder Präeklampsie-Serum. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Es ließ sich kein Unterschied im Proliferations- und Apoptoseverhalten der JEG3-Zellen darstellen, wenn diese mit steigender Serumkonzentration unterschiedlicher Probandinnen versetzt wurden, unabhängig davon, ob es sich um Serum gesunder oder an Präeklampsie-erkrankter Schwangerer handelte.

Schlussfolgerung

Entgegen unserer Hypothese, dass bei Versetzen der Trophoblastzellen mit Präeklampsieserum die Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2 als Maß für die Trophoblasteninvasion reduziert werden würde, zeigte sich eine erhöhte Proteinexpression gegenüber der Inkubation mit Normal-Schwangerem-Serum. Wir können jedoch sagen, dass STAT3 und ERK1/2 in JEG3-Zellen durch Präeklampsieserum beeinflusst werden und mögliche zukünftige Diagnostikmarker der Erkrankung darstellen könnten.

Es ist notwendig, weitere Studien mit veränderten Versuchsbedingungen durchzuführen, um die vorliegenden Ergebnisse zu unterstützen, zum Beispiel durch Verwendung höherer Serumkonzentrationen und anderer trophoblastärer Zellen sowie primärer Plazentazellen. Ebenso sollte der spezifische Einfluss verschiedener weiterer für die Plazentation wichtiger Zytokine neben LIF wie z. B. IL-6, IGF2 oder HGF in den jeweiligen Seren untersucht werden.

2 Einleitung

2.1 Entwicklung des Embryo, der Eihäute und der Plazenta

In einem meist regelmäßigen 28-Tage-Zyklus reift eine befruchtungsfähige Eizelle in den Ovarien heran. Der Zyklus unterliegt der hormonellen Steuerung durch Gonadotropine, FSH und LH. In der Zyklusmitte kommt es zur Ovulation einer Oozyte, welche in den Eileiter gelangt (France 1981).

Die Befruchtung der Eizelle durch ein eindringendes Spermium findet in der Regel im ampullären Teil der Tube statt. Eine befruchtete Eizelle wird als Zygote bezeichnet. 30 Stunden nach der Befruchtung erfolgt die erste mitotische Teilung in zwei Tochterzellen (Blastomeren). Diese durchlaufen weitere Mitosen, dabei werden die Zellen nach jeder Furchungsteilung kleiner. Wahrscheinlich sind die Zellen bis zum 8-Zell-Stadium noch omnipotent. Nach der dritten Furchungsteilung verstärken die Blastomeren ihre Haftung untereinander über gap junctions, vermittelt durch E-Cadherin (Fleming et al. 2001), es grenzt sich eine „inner cell mass“ ab. Am dritten Tag nach der Befruchtung wird der Keim als Morula bezeichnet und befindet sich in einem 16-Zell-Stadium. Es erfolgt der Eintritt in das Uteruslumen (Sadler 1998) (Abb. 1).

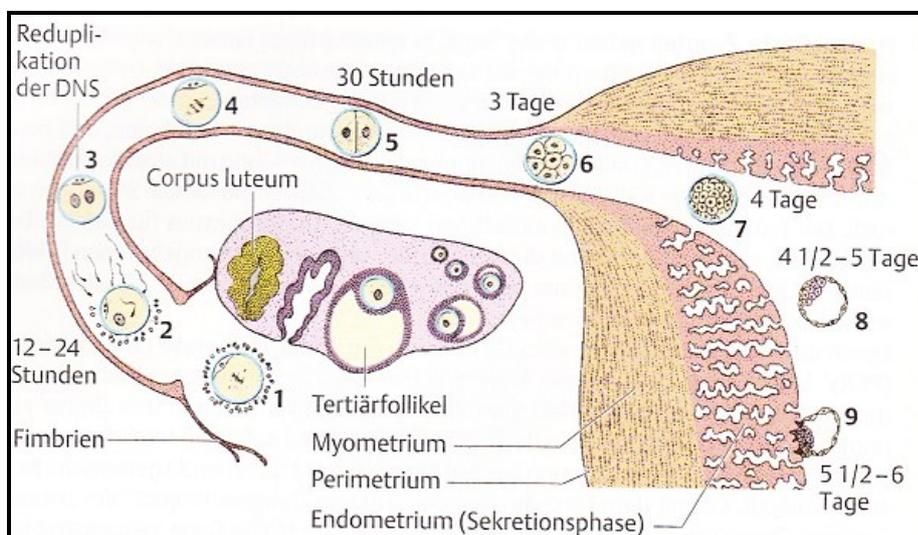


Abb. 1: Tubenwanderung einer befruchteten Eizelle in der ersten Woche (Sadler 1998)

Innerhalb der Morula entsteht durch Wassereinlagerung ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum – die Blastozystenöhle. Aus der Morula entwickelt sich die Blastozyste, bestehend aus zwei Zelltypen: Aus der inneren Zellmasse entsteht der Embryo

(Embryoblast), aus den äußeren, epithelialen Zellen gehen die Eihäute und die Plazenta (Trophoblast) hervor (Watson 1992).

Die Uterusschleimhaut besteht jetzt aus drei Schichten: der Zona compacta, der Zona spongiosa und der Zona basalis.

Nach Auflösung der die Blastozyste umgebenden Zona pellucida legt sich diese an die Endometriumwand an. Der Embryoblast kommt auf einer Seite zu liegen, der Trophoblast flacht ab und bildet die Wand der Blastozyste. Am fünften bis sechsten Tag nach der Ovulation nistet sich die Blastozyste mit ihrem embryonalen Pol in das Interstitium der Zona compacta der Uterusschleimhaut direkt unter dem Epithel ein. Der Trophoblast differenziert sich in zwei Schichten: den inneren Zytotrophoblasten, welcher aus einkernigen Zellen besteht und die Trophoblast-Stammzellpopulation bildet, und den äußeren Synzytiotrophoblasten, bestehend aus vielkernigen Zellverbänden ohne klare Zellgrenzen. Diese Differenzierung findet bereits vor dem Eindringen in die Dezidua statt und wird wahrscheinlich durch die Adhäsion getriggert (Armant 2005).

Die Blastozyste sezerniert Human chorionic gonadotropin (HCG) und stimuliert damit das Corpus luteum im Ovar. Das Corpus luteum entwickelt sich zum Corpus luteum graviditatis und produziert Progesteron. Progesteron wirkt immunosuppressiv an der fetomaternalen Kontaktfläche, schützt dadurch den Fetus vor unerwünschten immunologischen Angriffen und unterstützt so die Schwangerschaftsentwicklung (Szekeres-Bartho et al. 2005).

Am achten Entwicklungstag bildet sich aus dem Embryoblasten eine zweiblättrige Keimscheibe, bestehend aus dem Ektoderm und dem Entoderm.

Am neunten Entwicklungstag hat sich der Trophoblast besonders am embryonalen Pol verändert: die Vakuolen im Synzytiotrophoblasten fließen zusammen und bilden ein lakunäres System. Um die Implantationsstelle finden sich mütterliche Kapillaren, welche gestaut werden und Sinuside formieren.

Die Zytotrophoblastzellen differenzieren in zwei unterschiedliche, jeweils hoch spezialisierte Chorionzotten: in frei bewegliche (floating villi) und in verankernde Zotten (anchoring villi). Die beweglichen Zotten vereinigen sich zum Synzytiotrophoblasten, welcher eine Barriere zwischen maternalen und fetalen Zellen bildet und einen Gas- und Nährstoffaustausch zwischen Mutter und Kind ermöglicht (Huppertz und Gauster 2011). Der Synzytiotrophoblast unterliegt einem ständigen Zell-Turnover.

In den Verankerungszotten wandern die Synzytiotrophoblastzellen tief in das Endometrium ein und zerstören das Endothel der Sinuside. Durch den Eintritt von mütterlichem Blut in die Lakunen entsteht nun der uteroplazentare Kreislauf. Die zu Beginn der Entwicklung bestehende histiotrophe Ernährung (durch den Zerfall von Deziduazellen) wandelt sich so in eine hämatotrophe.

Ab dem 13. Entwicklungstag entstehen Primärzotten durch das Einwachsen des Zytotrophoblasten in Synzytiumtrabekel. Durch einwachsendes Mesenchym wandeln sich diese in Sekundärzotten um. Am Ende der dritten Woche differenzieren sich Mesodermzellen im Zottenkern zu Blutzellen und Kapillaren. Die Tertiärzotten entstehen und damit beginnt die embryonale Blutzirkulation (Kingdom und Kaufmann 1999) (Abb. 2).

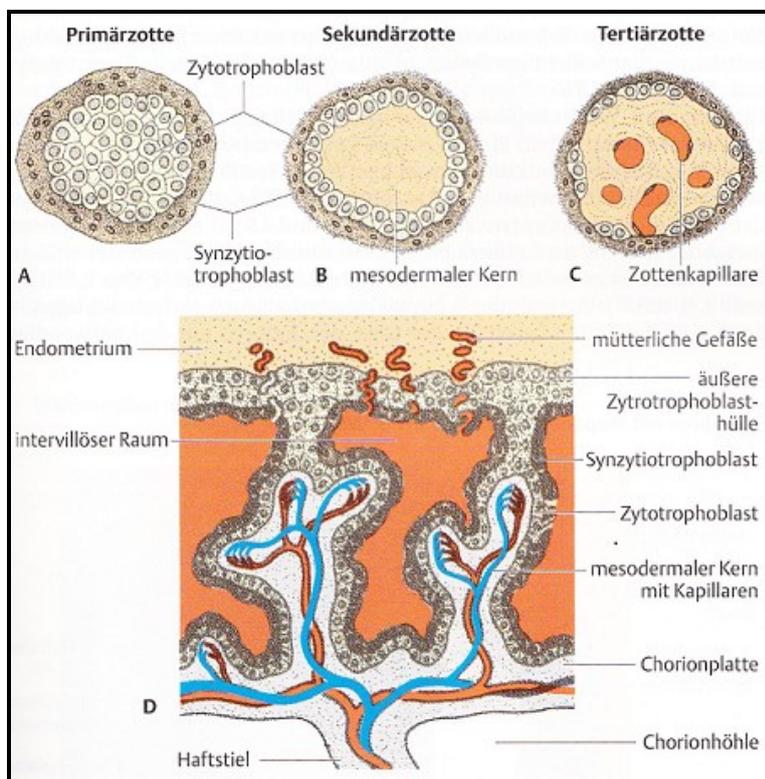


Abb. 2: Die Entwicklung von Primär- zu Tertiärzotten (Sadler 1998)

Um den 13. Tag p.c. entsteht das Mesoderm zwischen Ekto- und Entoderm als drittes Keimblatt.

Die vierte bis achte Entwicklungswoche wird als Embryonalperiode bezeichnet, in dieser Zeit findet die Organogenese aus den drei Keimblättern statt.

Die Wachstumsphase vom dritten Monat bis zur Geburt bezeichnet man als Fetalperiode, in der es zum Größenwachstum und zur Ausreifung der Organsysteme kommt (Sadler 1998).

2.1.1 Trophoblastpopulationen

Es existieren nach Lokalisation unterschieden zwei Arten von Trophoblastzellen: der villöse und der extravillöse Trophoblast.

Der villöse Trophoblast umfasst die Synzytiotrophoblastzellen, welche aus dem villösen Zytotrophoblasten entstehen und die Grenzfläche zwischen fetaler Plazenta und maternalem Blut darstellen.

Der extravillöse Trophoblast stellt eine heterogene Zellpopulation dar. Zu diesem zählt man den Zytotrophoblast der Zellkolumnen und des Trophoblastschilds, welcher große Mengen extrazellulärer Matrix sezerniert; den interstitiellen Trophoblasten, welcher in das endometriale Stroma einwandert; den endovaskulären Trophoblasten, der in das Lumen der Spiralarterien und Endothel der Gefäße migriert; den Trophoblasten des Chorion laeve, der mit Zellen der Decidua parietalis interagiert sowie den deportierten Trophoblasten, welcher Synzytiotrophoblastbestandteile umfasst, die in das mütterliche Blut gelangen (Dudenhausen 2003).

2.1.2 Trophoblasten ähneln Tumorzellen

Normalerweise können Zellen einer Gewebeart nicht in das Epithel eines anderen Gewebes eindringen. Trophoblastzellen bilden eine Ausnahme, indem sie als genetisch fremdes Material in die maternale Dezidua einwachsen (Hohn und Denker 2002). Die Implantation kann nur geschehen, wenn der Trophoblast den Zustand der Invasivität und das Endometrium den der Rezeptivität erlangen. Bei der Interaktion kommt es zur Destabilisierung der apikalen Polarität, welche eine Einnistung ermöglicht (Denker 1993).

Das Trophoblastenwachstum ähnelt dem invasiven Wachstum von Tumorzellen. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass Trophoblastzellen zeitlich und örtlich kontrolliert hauptsächlich im ersten Trimenon und in die Dezidua wachsen (Kliman 1993, Murray und Lessey 1999, Bischof und Campana 2000). Weiterhin bleiben Trophoblast-Zellen gut differenziert, maligne Zellen entdifferenzieren jedoch häufig (Fitzgerald et al. 2005a).

Ähnlich wie Tumorzellen sezernieren Trophoblastzellen Proteasen (z. B. Matrix-Metalloproteinasen), die in den Extrazellularraum gelangen und das umliegende Gewebe beeinflussen (Fitzgerald et al. 2008).

2.1.3 Regulierung der Trophoblastinvasion

Zytokine sind Mediatoren, welche Wachstum und Entwicklung von Zellen steuern. Sie werden von Immunzellen produziert und reguliert und interagieren mittels spezieller Rezeptoren. Man unterscheidet fünf Hauptgruppen: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. Viele Zytokine haben ähnliche Funktionen und nutzen gleiche Rezeptoren, aber unterschiedliche Zellsignalwege (Salamonsen et al. 2007).

Verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Prozesse der Trophoblastenmigration (z. B. EGF, IGF-2, HGF), der Proliferation (z. B. Leptin, HGF, GM-CSF) und der Invasion (z. B. LIF) (Fitzgerald et al. 2005a).

Wichtig für die Trophoblastenmigration sind die Integrine, welche die Anlagerung fetaler Zellen an die extrazelluläre Matrix (EZM) steuern (Kuhn und Eble 1994). Integrine sind eine Familie heterodimerer Transmembran-Glykoproteine. Sie binden extrazellulär an die EZM und intrazellulär an Adapterproteine, die sie mit dem Zytoskelett und Signalproteinen verbinden (Giancotti und Ruoslahti 1999).

Die EZM besteht hauptsächlich aus Kollagen, Fibronectin und Laminin. Trophoblastzellen können Fibronectin synthetisieren und somit ihr Wachstum selbst regulieren (Burrows et al. 1993).

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) modulieren als Zink-abhängige Kollagenasen den Aufbau der Extrazellulären Matrix. Sie können Basalmembranen und interstitielle Matrix enzymatisch abbauen (Staun-Ram und Shalev 2005) und werden in der Dezidua vom Trophoblasten sezerniert. Bisher wurden 21 MMP identifiziert (Nagase und Woessner 1999). Sie lassen sich in vier Gruppen unterteilen: Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), Kollagenasen (MMP-1, -8 und -13), Stromelysine (MMP-3, -7, -10, -11 und -12) sowie MMPs mit Transmembrandomäne (MMP-14, -15, -16 und -17). Besonders wichtig im Implantationsprozess sind die MMP-2 und -9, welche Kollagen Typ IV abbauen. Kontrolliert werden diese durch TIMPs (tissue inhibitors of MMPs), welche einerseits von Trophoblastzellen, andererseits von Deziduazellen abgegeben werden. Dadurch erfolgt sowohl eine maternale als auch eine fetale Kontrolle der Degradation der EZM. So werden zum Beispiel Serin-Proteinase-Urokinase (uPA)

und PAI-1 durch den extravillösen Zytotrophoblasten sezerniert (Andreasen et al. 1997). Plazentazellen produzieren uPA und verschiedene MMPs: Gelatinase A und B (Bischof et al. 1995), Kollagenase (Librach et al. 1991), Stromelysin (Maquoi et al. 1997) und MT-MMP (Bjorn et al. 1997). Um diese Proteinase zu kontrollieren, produzieren Trophoblastzellen Inhibitoren der MMPs: TIMP 1, 2 und 3 und PAI-1 und -2 (Feinberg et al. 1989).

2.2 Das Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen umfasst die angeborene, unspezifische und die erworbene, spezifische Immunabwehr. Es dient der Abwehr körperfremder Organismen bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen.

Die unspezifische Abwehr stellt die erste, schnelle Immunantwort gegenüber Antigenen dar. Sie umfasst humorale Mediatoren wie Lysozym, Komplement und Akute-Phase-Proteine sowie zelluläre Mediatoren wie NK-Zellen, Phagozyten und γ/δ -T-Zellen (Koenderman et al. 2014).

Die Induktion der spezifischen Immunantwort bedarf zunächst der genauen Erkennung von Erregern und damit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Bei erneutem Erregerkontakt kann so eine spezifische, beschleunigte Rekrutierung von Abwehrzellen erfolgen. Humorale Mediatoren sind Antikörper, welche nach erstmaligem Kontakt mit Erregern spezifisch gebildet werden. Die zellulären Mediatoren umfassen die α/β -T-Zellen.

Das Immunsystem besteht aus primär (Knochenmark und Thymus) und sekundär (Milz, Lymphknoten und Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe – MALT) lymphatischen Organen.

In den primär lymphatischen Organen werden die Zellen des Immunsystems gebildet. Im Knochenmark entstehen und reifen B-Lymphozyten. T-Lymphozyten entstehen ebenfalls im Knochenmark, reifen jedoch im Thymus (Rezzani et al. 2008). In sekundär lymphatischen Organen werden Antigene gegenüber naiven Lymphozyten präsentiert und so die Reifung zu Effektorzellen und die Entstehung einer spezifischen Immunantwort induziert (Nolte 1979).

2.2.1 MHC-Moleküle

MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) werden als zelleigene Proteine an der Zelloberfläche exprimiert. MHC-Klasse-I-Moleküle finden sich auf fast allen

kernhaltigen Zellen. Sie sind wichtig für die T-Zell-vermittelte Immunantwort. MHC-Klasse-II-Moleküle werden durch immunologisch wichtige Zellen exprimiert und von CD4+-T-Lymphozyten erkannt (Watts und Powis 1999).

2.2.2 Zellen der angeborenen Abwehr

Makrophagen entstehen aus Monozyten und leben im Gewebe. Sie haben die Fähigkeit körperfremde Substanzen zu erkennen und zu phagozytieren. Sie können diese abtöten oder als antigenpräsentierende Zelle über MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche darstellen, um so Zellen der adaptiven Immunabwehr zu aktivieren.

Natürliche Killerzellen zählen zu den Lymphozyten. Sie tragen keine antigenspezifischen Rezeptoren. Erkrankt eine Zelle, kann ihre zelltypische MHC-I-Rezeptor-Präsentation verändert werden. Die NK-Zellen erkennen fehlerhafte MHC-I-Komplexe auf infizierten Zellen (Sepúlveda und Puente 2000).

Dendritische Zellen wandern in das Parenchym von Organen ein, sie haben eine sehr starke phagozytierende Aktivität. Sie präsentieren Antigene auf ihrer Oberfläche und stimulieren eine spezifische Antwort von T-Lymphozyten (Clark et al. 2000). Sie können das Gewebe verlassen und über die Lymphe in regionale Lymphknoten gelangen.

2.2.3 Zellen der erworbenen Abwehr

B-Lymphozyten können bestimmte Antigene binden und durch Zytokine aktiviert werden, welche von T-Helferzellen ausgeschüttet werden. Sie können sich daraufhin in Gedächtniszellen oder Plasmazellen, die Antikörper freisetzen, umwandeln (McHeyzer-Williams et al. 2006). Sie benötigen keine Präsentation von Antigenen durch andere Immunzellen.

T-Lymphozyten tragen einen T-Zell-Rezeptor, mit dem sie Antigene erkennen können. Sie bedürfen jedoch der Präsentation der Antigene über MHC-Moleküle (Sette et al. 1991).

Bei den T-Zellen werden T-Helferzellen, regulatorische T-Zellen und zytotoxische T-Zellen unterschieden. T-Helferzellen tragen das CD4-Protein an ihrer Oberfläche und erkennen Antigene über MHC-II-Komplexe. Ihre Aktivierung führt zur Ausschüttung von Zytokinen, TH1-Helferzellen verstärken die Immunantwort, TH2-Zellen stimulieren die Produktion von Antikörpern.

Regulatorische T-Zellen tragen den CD4+-Rezeptor und andere Oberflächenmoleküle (CD25 etc.). Sie modulieren die Immunreaktion und sind zuständig für die Selbsttoleranz des Organismus (Suzuki et al. 2010).

Zytotoxische T-Zellen sind mit einem CD8+-Rezeptor ausgestattet. Sie erkennen Antigene über MHC-I-Komplexe, welche ihnen präsentiert werden. Über Ausschüttung zytotoxischer Substanzen töten sie Erreger (Andersen et al. 2006).

2.2.4 Humorale Bestandteile der angeborenen Abwehr

Das Komplementsystem besteht aus vielen unterschiedlichen Proteinen. Durch die Aktivierung eines Komplements wird das nächste aktiviert – dies bezeichnet man als Komplementkaskade. Die Aktivierung führt zur Erkennung von Antigen-Antikörper-Komplexen und deren Neutralisierung, zur Opsonierung von Antigenen, zur Steigerung der Gefäßpermeabilität und Chemotaxis sowie zur Zellmembranzerstörung (Mayer 1972).

2.2.5 Antikörper – humorale Bestandteile der erworbenen Abwehrreaktion

Antikörper haben verschiedene Aufgaben. Sie binden an Antigene und können diese dadurch für Phagozyten markieren (Opsonierung). Weiterhin kann über den Antigen-Antikörperkomplex das Komplementsystem aktiviert oder durch Bildung eines großen Komplexes der Erreger unschädlich gemacht werden (Dunkelberger und Song 2010).

2.2.6 Der Ablauf der Immunantwort

Dringt ein Erreger in den Organismus ein, erfolgt zunächst die Aktivierung der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr. Antigenpräsentierende Zellen wie z. B. Makrophagen phagozytieren körperfremde Zellen und können Bestandteile dieser auf ihrer Oberfläche präsentieren. Zellen der spezifischen Immunabwehr erkennen diese Bestandteile (den Haan et al. 2014). Entweder werden die Antigene nun direkt phagozytiert oder durch Ausschüttung zytotoxischer Substanzen abgetötet. Oder es beginnt die Produktion spezifischer Antikörper, die an die Erreger binden und diese so markieren. Nach der ersten Infektion entstehen Gedächtniszellen, die bei erneutem Erregerkontakt sofort spezifische Antikörper bilden können (Hof 2005).

2.2.7 Das Immunsystem der Plazenta und des Embryos

Embryonale Zellen stellen durch ihren semi-allogenen Charakter potenzielle Antigene für die maternalen Deziduaellen dar. Dennoch kommt es bei der Implantation des Embryos nicht zur Abstoßung. Das Immunsystem der Plazenta toleriert die körperfremden Zellen.

Auf fetalen Zellen kommen keine polymorphen HLA-A und -B sowie keine MHC-Klasse-II-Moleküle vor. Trophoblastzellen exprimieren stattdessen HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-G, -E, -F). Diese sind oligomorph, kommen also nur in 10 bis 20 Varianten vor (Heinrichs und Orr 1990). Eine besondere Rolle spielt HLA-G. Es ist nur auf Trophoblasten, verschiedenen Tumorzellen und einigen Lymphozyten zu finden. Es kann als lösliches sHLA-G in der gesamten Plazenta sowie fetalem und mütterlichen Blut nachgewiesen werden. Als membrangebundenes HLA-G wird es auf extravillösen Zytotrophoblastzellen, im embryonalen Endothelium der Chorionzotten, im Amnionepithel, im Thymus und auf einigen Karzinomzellen (Lymphomen, Melanomen) exprimiert (Ellis 1990). Diese MHC-Ausstattung schützt die embryonalen Zellen vor einem Angriff des mütterlichen Immunsystems.

Die Immunzellen der Dezidua des 1. Trimenons sind zu 80 % uNK-Zellen (Ritson und Bulmer 1987), sie kontrollieren die Zytotrophoblastinvasion in das mütterliche Gewebe durch ihre zytotoxische Aktivität und die Ausschüttung von Zytokinen. Weiterhin kommen auch CD4⁺-T-Helferzellen und CD8⁺-zytotoxische T-Zellen vor. Antigen-spezifische T- und B-Lymphozyten treten jedoch während der Schwangerschaft im Uterus in sehr geringer Anzahl auf, stattdessen überwiegen Komponenten der natürlichen Immunität wie Makrophagen und NK-Zellen (Dietl et al. 1992).

Das TH1/TH2-Verhältnis verschiebt sich in Richtung der TH2-Zellen (Dealtry et al. 2000). Es werden vermehrt antiinflammatorische Zytokine (wie IL-10) ausgeschüttet. Die TH1-Zytokine hemmen wahrscheinlich die Plazentaentwicklung, während TH2-Zytokine (IL-4, IL-10) der Plazentaentwicklung dienen (Rieger et al. 2001).

Progesteron inhibiert inflammatorische Zytokine (z. B. TNF- α), es verstärkt dagegen die Produktion antiinflammatorischer Zytokine.

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 verstärkt die HLA-G-Synthese in Trophoblastzellen und führt zu Veränderungen in der Expression von Genen in maternalen Lymphozyten. Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) vermindert die Lymphozytenproliferation (Wichers und Maes 2004).

Auch im präimplantierten Embryo werden bereits immunregulatorische Substanzen während der Wanderung ins Uteruslumen produziert. Diese bereiten das Endometrium auf die bevorstehende Implantation vor und hemmen Effektorzellen des maternalen Immunsystems. Es wird eine TH2-Antwort induziert, sodass die maternale Dezidua der Blastozyste gegenüber tolerant wird. Durch die sHLA-G-Expression des Embryos kann dieser vor der zytotoxischen Reaktion der maternalen NK-Zellen geschützt werden (Fuzzi et al. 2002).

Die Sekretion von IFN- γ begünstigt die Anlagerung der Blastozyste an das Endometrium (Hill 1992).

2.3 Apoptose und deren Bedeutung

Der Untergang von Zellen kann auf zwei Wegen erfolgen: durch Nekrose und durch Apoptose.

Die Nekrose geschieht unvorhergesehen und führt zum unmittelbaren Zelltod. Durch chemische oder physikalische Noxen kondensiert die Kernsubstanz. Die Zelle und ihre Organellen schwellen durch Wasser- und Ioneneinstrom an bis sie schließlich durch Membranschädigung zerplatzen. Dadurch werden die Zellinhaltsstoffe in den Extrazellularraum freigesetzt, was zur direkten Schädigung der Umgebung führt. Dieser Prozess lockt Phagozyten an und es folgt eine Inflammation (Majno und Joris 1995).

Die Apoptose dagegen ist ein physiologischer, geregelter Prozess zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Zellbildung und Zelluntergang. Sie wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet (Kerr et al. 1972). Das Wort Apoptose stammt aus dem Griechischen, „apo“ bedeutet „ab, weg“, „ptosis“ heißt „Senkung“. Bekommt eine Zelle das Signal zur Apoptose verdichtet sich ihr Chromatin und wird durch spezifische DNAsen zerkleinert. Die Zellen mit ihren Organellen schrumpfen, es entstehen apoptotic bodies. Diese werden durch Nachbarzellen und Makrophagen phagozytiert und dadurch geregelt, ohne Entzündung, abgebaut (Häcker 2000).

Der Apoptose kommen wichtige regulatorische Funktionen in der Mitose und damit der Zellentwicklung zu (Elmore 2007).

Der Zellzyklus einer kernhaltigen Zelle beginnt und endet mit der Mitose (Abb. 3). Nach erfolgter Mitose treten proliferierende Zellen in die G1-Phase ein. Die Zelle wächst.

Durch verschiedene Wachstumsfaktoren (z. B. PDGF; EGF etc.) können Zellen in die S-Phase (Synthesephase) übergehen. Es erfolgt die DNA-Replikation nach welcher der tetraploide Chromosomensatz vorliegt. In der G2-Phase werden RNA-Moleküle und zellteilungsspezifische Proteine synthetisiert, um die folgende Mitose einzuleiten. Der Zellzyklus schließt mit der nächsten Mitose ab. Aus einer Zelle entstehen so zwei identische Tochterzellen (Park und Koff 2001).

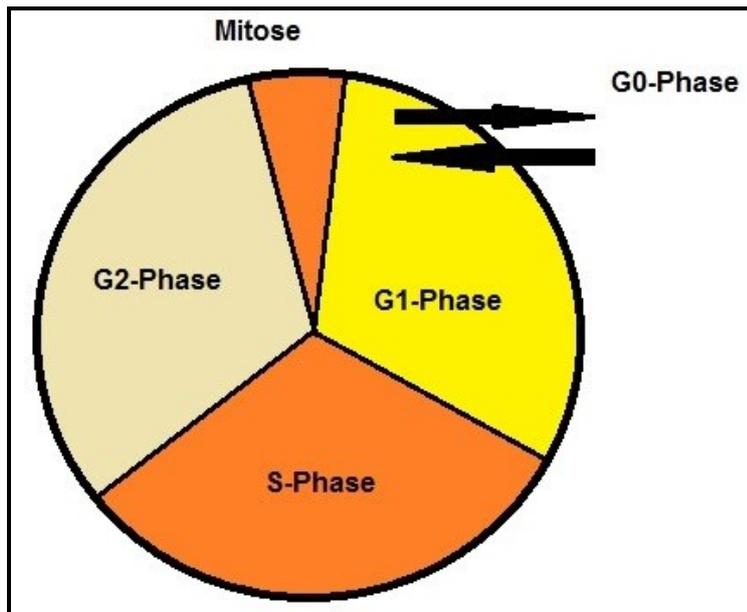


Abb. 3: Der Zellzyklus eukaryoter Zellen (Löffler 2003)

Zellen in der G0- oder G1-Phase sind proliferationsfähig, können jedoch alternativ in Apoptose übergehen, wenn sie funktionslos oder geschädigt sind.

Apoptose spielt in vielen Prozessen des Körpers eine wichtige Rolle: in der Embryonalentwicklung ermöglicht sie die Formgebung des Körpers und der Organe, sie führt zur Selektion von Keimzellen mit geschädigtem genetischen Material, ist wichtig in Geweben, die sich ständig erneuern (z. B. die Schleimhaut des Darms oder der Gebärmutter), verhindert die Entstehung von Autoantigenen und eliminiert Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen.

Der Apoptoseprozess unterliegt zahlreichen Regulationsmechanismen, unter denen die Caspasen die wichtigste Gruppe darstellt. Caspasen sind Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum, welche Proteine spezifisch nach der Aminosäure Aspartat schneiden (Alnemri 1997).

Nicht nur in der Entwicklung des Embryos nimmt die Apoptose eine wichtige Stellung ein. Auch über den gesamten Schwangerschaftsverlauf spielt sie eine zentrale Rolle

in der Plazenta, besonders im ersten und dritten Trimenon. In der Frühschwangerschaft wird der Fas-Ligand durch invadierende Synzytiotrophoblasten vermehrt exprimiert. Er interagiert mit dem Fas-Rezeptor auf endometrialen Stromazellen, führt zu deren Apoptose und damit zur Einwanderung der Trophoblastzellen in die Uterusschleimhaut (Uckan et al. 1997). Die Empfindlichkeit der invadierenden Trophoblastzellen gegenüber apoptotischen Stimuli wird dagegen durch das antiapoptotische Protein Bcl-2 vermindert, sie überleben (Kim et al. 1995).

Im dritten Trimester dagegen sind die Apoptoseraten von Trophoblast- und von Plazentazellen gesteigert. Dies scheint für die Beendigung der Schwangerschaft und Einleitung der Geburt wichtig zu sein (Reed 1994).

2.4 Der Wachstumsfaktor LIF – Leukemia Inhibitory Factor

Viele verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Plazentation. Wie bereits erwähnt sind IL-1 und EGF für die Anlagerung der Blastozyste an das Uterusepithel wichtig (Sharkey 1998). GM-CSF und HGF regulieren die Proliferation der Trophoblastzellen, IGF-2, EGF und HGF die Migration (Fitzgerald et al. 2005a).

LIF ist ein Zytokin der IL-6-Familie, welches einen wichtigen Mediator für die Plazentation, Invasion, Migration und Proliferation von Trophoblastzellen darstellt (Stewart und Cullinan 1997). Als Glykopeptid bestehend aus 179 Aminosäuren kommt es in freier, aktiver Form oder an Proteine der EZM gebunden vor. Erstmals beschrieben wurde es als Induktor der Makrophagendifferenzierung in der myeloischen Leukämie-Zelllinie M1 (Tomida et al. 1984).

2.4.1 LIF und seine Bedeutung für die Implantation

LIF wird in hohen Konzentrationen an der maternal-fetalen Kontaktfläche durch das Endometrium in der sekretorischen/postovulatorischen Zyklusphase sowie durch die Plazenta exprimiert (Cullinan et al. 1996). In mehreren Studien wurde beobachtet, dass LIF essentiell für die Fertilität ist. So zeigte sich, dass LIF in Endometriumbiopsien von infertilen Frauen reduziert ist (Tsai et al. 2000).

IL-11 und LIF regulieren die Adhäsion der äußeren Zellreihe der Blastozyste (Trophektoderm) an das luminale Endometriumepithel sowie die Proteinexpression der extrazellulären Matrix. Sie erhöhen die Adhäsion primärer humaner

Endometrium-Epithelialzellen an Fibronektin und Kollagen IV (Marwood et al. 2009). LIF kann sowohl die Proliferation von Trophoblast-Zellen als auch von Chorionkarzinom-Zellen fördern (Fitzgerald et al. 2008).

LIF-Rezeptoren finden sich auf dem villösen und extravillösen Zytotrophoblasten (Kojima et al. 1995).

Das Signal von LIF wird in der Trophoblastzelle via STAT3 übertragen, aktiviert dadurch Invasivitäts-beeinflussende Proteasen und Protease-Inhibitoren und ist essentiell für eine erfolgreiche Implantation (Poehlmann et al. 2005). Es reguliert die Expression von Caspase-4 herauf und die von TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)-1 herab (Fitzgerald et al. 2005b).

2.5 Der JAK-STAT-Signalweg

Der JAK-STAT-Signalweg wird von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren genutzt, um eine Information vom Zelläußeren in den Zellkern zu transportieren (Abb. 4).

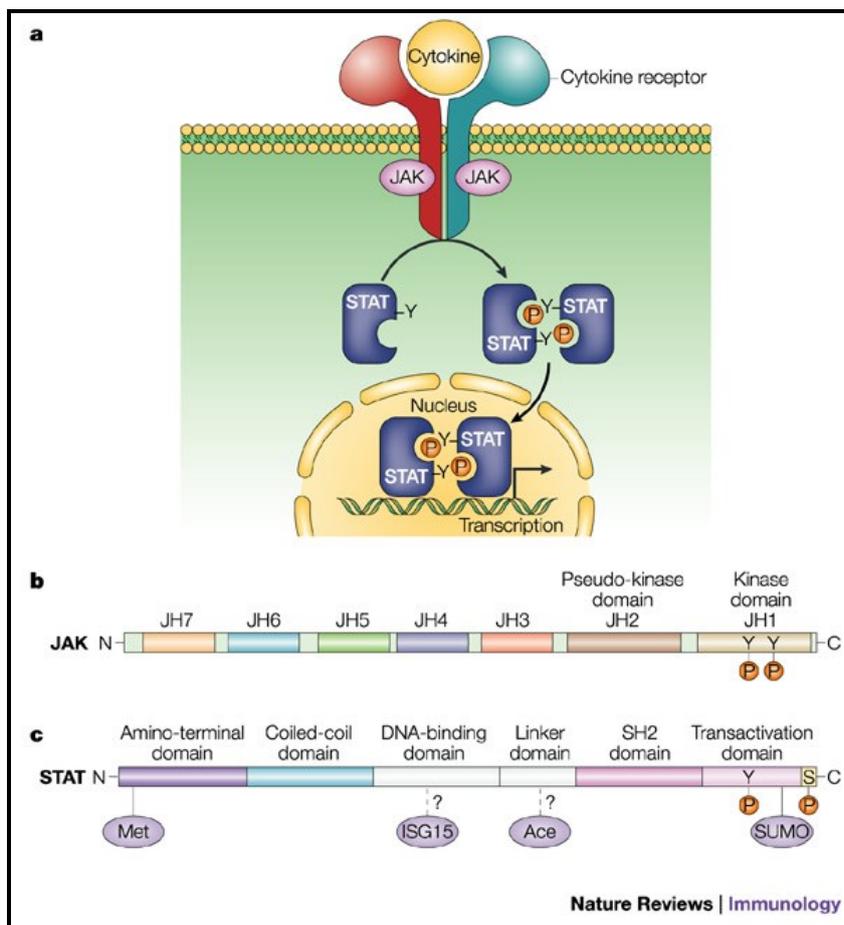


Abb. 3: Darstellung des JAK-STAT-Signalwegs (Shuai und Liu 2003)

Durch Bindung eines Zytokins an einen Membranrezeptor der GH-Rezeptorfamilie wird die Struktur des Rezeptors verändert. Zwei Rezeptoren vereinigen sich durch eine Homo- oder Heterodimerbildung über das Transmembranprotein gp130. Dadurch binden Tyrosinkinasen der JAK-Familie an den Rezeptor, welcher so phosphoryliert wird (Ihle et al. 1997). Das wiederum aktiviert STAT-Moleküle im Zytoplasma, welche an den Rezeptor über SH-2-Domänen andocken und phosphoryliert werden. Die STAT-Moleküle dissoziieren vom Rezeptor ab und bilden Dimere, welche in den Zellkern translozieren. Hier aktivieren sie durch Anlagerung an spezifische DNA-Sequenzen die Transkription von Genen (Leonard und O'Shea 1998).

Durch den JAK-STAT-Signalweg kann eine schnelle transkriptionelle Autoregulation von Zielgenen erfolgen, da sich die Schaltermoleküle (STATs) bereits im Zytoplasma befinden und nicht erst durch Biosynthese hergestellt werden müssen.

Außer den STAT-Molekülen können auch Ras, PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und Phospholipase C phosphoryliert werden, um Signale in den Kern zu vermitteln.

Es gibt auch Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität (z. B. EGF-Rezeptor, PDGF-Rezeptor), die STAT-Proteine direkt ohne Zwischenschaltung von JAKs phosphorylieren.

Weiterhin existieren zytoplasmatische Tyrosinkinasen, welche selbst STATs aktivieren können (z. B. Src und Abl) (Bowman et al. 2000).

Den JAK-STAT-Weg nutzen Typ I- (IFN α/β) und Typ II (INF γ)-Interferone sowie alle Zytokine, deren Rezeptoren zur Zytokin-Rezeptor-Superfamilie gehören. Dazu gehören Kurzketten-Zytokine (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-7, IL-9, IL-13 und IL-15) und Langketten-Zytokine (IL-6, IL-11, OSM, CNTF, CT-1, Wachstumshormone, Prolaktin, Erythropoetin und Thrombopoetin) (Leonard und O'Shea 1998).

Viele Zytokine, die eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung spielen, wirken über diesen Signalweg, so zum Beispiel HCG, IL-6, IL-11, GM-CSF und auch LIF (Fitzgerald et al. 2008).

2.5.1 Die Janus-Kinasen (JAKs)

Janus-Kinasen sind relativ lange Kinasen von 1150 Aminosäuren. Sie besitzen zwei Domänen: eine Tandem-Kinase-Domäne (hintereinandergeschaltete Kinasen) und eine Pseudokinase-Domäne, welche enzymatisch nicht aktiv ist. Diese Eigenschaft

brachte ihnen die Bezeichnung als Janus-Kinase ein, benannt nach dem doppelgesichtigen, römischen Gott Janus.

Es existieren vier verschiedene JAKs – während JAK1, JAK2 und TYK2 ubiquitär exprimiert werden, hat JAK3 eine begrenzte und regulierte Gewebeexpression. JAK3 kommt konstitutionell in hohen Spiegeln in NK-Zellen und Thymozyten vor und ist induzierbar in T-Zellen, B-Zellen, myeloiden Zellen, glatten Muskelzellen und dem Endothel (Leonard und O'Shea 1998).

Die Janus-Kinasen bestehen aus sieben JH-Regionen (JH1-JH7), wobei nur die Funktion der JH1-Domäne als Tyrosin-Kinase-Domäne gut verstanden ist.

Die JH-2-Domäne besitzt eine Pseudokinase-Funktion, sie hat die gleichen Subdomänen wie eine echte Tyrosinkinase, jedoch einen veränderten Aufbau und dadurch keine katalytische Aktivität. Wahrscheinlich reguliert diese Domäne die JAK-Katalyse-Funktion oder bildet eine Bindungsstelle für andere Signalmoleküle wie STATs (Leonard und O'Shea 1998).

Die Terminierung der JAK-Signale ist noch nicht gut verstanden. Es könnte sein, dass eine SH2-assoziierte Tyrosin-Phosphatase (SHP-1) die JAK-Phosphorylierung reguliert.

Die Signalwege können durch Regulationsmoleküle wie „Protein Inhibitor of Activated STATs“ (PIAS) und „suppressors of cytokine signaling“ (SOCS) (Hilton 1999) negativ beeinflusst werden.

2.5.2 Die STAT-Moleküle

STATs (signal transducers and activators of transcription) besitzen eine Doppelrolle: sie wirken einerseits als Signalmolekül und andererseits als Schaltermolekül für die Aktivierung der Transkription von Zielgenen (Darnell 1997). Sie können abhängig vom Liganden, vom STAT-Protein, von der Zellart und vom Zellstadium Promotoren oder auch Inhibitoren des zellulären Wachstums sein. Die Aktivierung von STATs resultiert in der Expression von Genen, die kritische zelluläre Funktionen kontrollieren (wie Zellproliferation, Überleben, Differenzierung und Entwicklung) sowie von Genen, die spezielle Zellfunktionen (wie Immunantworten) steuern (Bowman et al. 2000).

Es existieren sieben bekannte STAT-Proteinen in Säugern: STAT1, -2, -3, -4, -5A, -5B und -6. Die Phosphorylierung erfolgt am Tyrosin- oder Serinrest.

STATs können Homo- oder Heterodimere bilden durch bivalente Bindungen zwischen der SH2-Domäne eines STAT-Moleküls und phosphoryliertem Tyrosin

eines anderen, wodurch die Haftung der Moleküle verstärkt wird. Die SH2-Domänen unterscheiden sich in den verschiedenen STAT-Molekülen, sodass diese unterschiedliche phosphorylierte Bereiche erkennen (Leonard und O'Shea 1998).

Manche Zytokin-Rezeptor-Ketten haben nur eine STAT-Bindungsstelle (z. B. IFNGR-1- oder IL-7-Rezeptor). Andere besitzen mehrere Bindungsstellen (z. B. IL-2R, IL-4R oder gp130), wodurch die Möglichkeit besteht, dass zwei STAT-Moleküle gleichzeitig aktiviert werden können und dadurch ihre Dimerisierung erleichtert wird.

Die Kernaktivierung der STATs ist noch nicht ausreichend geklärt. Es ist unklar, ob STATs allein in den Kern eintreten oder in Verbindung mit Chaperonen. Es ist möglich, dass im Kern mehrere Kooperationspartner mit demselben STAT interagieren, sodass diese in die Aktivierung verschiedener Gene in verschiedenen Zelltypen oder Aktivierungsstadien involviert sind (Leonard und O'Shea 1998).

Die Kenntnisse über spezielle Funktionen der Aktivierung der jeweiligen STAT-Familie konnten durch Experimente mit Knockout-Mäusen gewonnen werden (Akira 1999).

STAT1-defiziente Mäuse sind beeinflusst in ihrer Antwort auf Interferone, sie sind anfällig für bakterielle und virale Infektionen (Durbin et al. 1996).

Fehlen STAT2 und STAT3 kommt es zu embryonaler Letalität (Takeda et al. 1997).

Versuche mit Mäusen ohne STAT3 in Keratinozyten konnten darlegen, dass dieses Molekül wichtig ist für die Zellwanderung, z. B. bei der Wundheilung (Sano et al. 1999).

Experimente mit STAT4- (Kaplan et al. 1996) oder STAT6-Knockout-Mäusen (Shimoda et al. 1996) zeigten, dass die von diesen Molekülen aktivierten Gene nötig sind für die IL-12- oder IL-4-induzierte Proliferation aktivierter T-Lymphozyten.

STAT5A-Knockout führt zu Defekten in der Brustdrüsenentwicklung und der Laktation während der Schwangerschaft (Liu et al. 1997).

STAT5A- und -5B-defiziente weibliche Mäuse sind infertil. STAT5A- und STAT5B-Defekte bei beiden Geschlechtern führen zu einer fehlerhaften Immunreaktion (Teglund et al. 1998).

2.5.2.1 STAT3 und seine Funktionen

STAT3 kommt in drei bis vier Isoformen vor, welche sich in der Länge des COOH-Endes unterscheiden (STAT3A 90kDa, STAT3B 83kDa, STAT3C 72kDa, STAT3D).

Es ist in viele verschiedene physiologische Prozesse involviert und scheint gegensätzliche Antworten hervorzurufen (Levy und Lee 2002).

STAT3 ist in die postnatale Interaktion zwischen dem Epithel und dem mesenchymalen Kompartiment involviert, STAT3-defiziente Mäuse bekommen Hautulzera und zeigen einen spärlichen Haarwuchs. Im Thymus führt ein STAT3-Defekt zu einer altersabhängigen Thymushypoplasie sowie zu einer Hypersensitivität gegenüber Stress bei jüngeren Mäusen (Sano et al. 2001).

STAT3 scheint einem acute phase response factor zu entsprechen und wird durch IL-6, IFN- γ , G-CSF, IGF-1, LIF, IL-10, IL-12, EPO, IL-3, GM-CSF und TPO aktiviert. Ohne STAT3 ist die Akut-Phase-Antwort reduziert (Levy und Lee 2002). IL-6 sichert über die STAT3-Aktivierung die Überlebensfähigkeit von T-Lymphozyten (Heinrich et al. 1998).

In Monozyten und Neutrophilen induziert ein STAT3-Defekt eine überschießende inflammatorische Antwort (Riley et al. 1999).

Bei einem STAT3-Defekt erfährt die Brustdrüse eine verspätete Mammainvolution (Chapman et al. 1999).

In Tumorzellen, in durch Onkogene transformierten Zellen und in Zellkulturen aus Tumoren wurden STAT1, -3 und -5 nachgewiesen. Der Zellumbau durch fehlerhafte STAT3-Aktivität in Tumorzellen wird durch die Hochregulierung von Genen, die den Zellzyklus stimulieren (Cyclin D1, c-myc) und von Genen, welche die Apoptose verhindern (bclxL, mcl-1, Survivin), gesteuert (Bromberg et al. 1999, Shen et al. 2001).

Abweichende STAT3-Aktivität gilt als essentiell für das Verhalten neoplastischer Zellen und somit für die Malignität von Tumorzellen (Bowman et al. 2000). Multiple-Myelom-Zellen, die wachstumsfaktorunabhängig geworden sind, zeigen eine konstitutionelle Aktivierung von STAT3, die sie gegen Apoptose schützt (Catlett-Falcone et al. 1999). Auch bei verschiedenen Formen von Kopf-Hals-Karzinomen wurde aktiviertes STAT3 gefunden (Grandis et al. 1998).

Außerdem spielt es eine zentrale Rolle in den Signalwegen, welche die Plazentation modulieren (Fitzgerald et al. 2005a). Homozygote STAT3-defiziente Mäuseembryonen degenerieren schnell an Tag 6,5 bis 7,5 der Embryogenese kurz nach der Blastozystenimplantation (Takeda et al. 1997).

STAT3-mRNA ist in maternalem und extraembryonalem Gewebe während der frühen Postimplantationphase zu finden. Weiterhin kommt aktiviertes STAT3 an Tag 4,5 bis

9,5 in der Dezidua-Schwellung des viszeralen Entoderms vor, was wichtig für die frühe Implantationsphase ist (Duncan et al. 1997).

2.5.3 Die Regulierung des JAK-STAT-Signalweges

Es existieren mindestens drei Proteinfamilien, welche den JAK-STAT-Signalweg inhibieren: Supressors of cytokine signaling (SOCS), Protein inhibitors of activated STATs (PIAS) und SH2-containing phosphatase (SHP-1) (Hilton 1999).

STAT-Moleküle aktivieren im Zellkern nicht nur Gene, welche Zytokin-Funktionen modulieren, sondern ebenso Gene, welche SOCS-Proteine produzieren und damit zur Limitierung der STAT-Aktivität und der Zytokin-Aktivierung führen.

SHP-1 inhibiert STATs in einem Rückkopplungsmechanismus, schneller als SOCS. SHP-1 katalysiert die Dephosphorylierung von Tyrosinresten der Kinasen und reduziert so ihre katalytische Aktivität.

PIAS agieren mehr als Puffer, sie regulieren die Anzahl an aktivierten STAT-Molekülen. PIAS interagieren mit STATs und verhindern dadurch deren Interaktion mit der DNA, entweder durch direkte Bindung oder dadurch, dass sie die Dimerisierung von STAT-Molekülen unterbinden. PIAs kommen konstitutiv im Zellplasma vor, sie werden nicht durch Zytokinaktivierung produziert.

Auch die STAT3-Aktivität in Trophoblastzellen könnte durch Inhibitoren wie SOCS oder PIAs gesteuert werden (Hilton 1999).

Die Dysregulation von STAT3-Aktivität könnte pathologische Prozesse wie fehlerhafte Plazentation, Präeklampsie oder Neoplasien wie Chorionkarzinome hervorrufen (Tarrade et al. 2002).

Die Regulierung und Inhibition der STAT3-Aktivität, insbesondere die Zerstörung der STAT3-STAT3-Dimerisierung ist Gegenstand zahlreicher aktueller Studien. Da STAT3 als wichtiger Modulator von Onkogenen gilt, könnte die Inhibition eine Grundlage für neue Chemotherapeutika geben (Fletcher et al. 2009).

2.6. Der MAPK-Signalweg

Sowohl der JAK-STAT- als auch der MAPK-Kinase-Signalweg wird von Zytokinen genutzt, welche die Trophoblastentwicklung steuern (Mudgett et al. 2000).

MAP-Kinasen (mitogen-activated protein) sind kleine Proteinkinasen (36.000 – 44.000 Da), welche an Serin- und Threonin-Resten phosphorylieren. Sie selbst werden durch Phosphorylierung an zwei Stellen – einem Tyrosin- und einem

Threonin-Rest aktiviert. Bei der MAP-2K führt bereits die Phosphorylierung eines Restes zur Aktivierung.

Die MAP-Kinasen (MAP-K) werden in vier Hauptgruppen aufgeteilt:

1. Die extracellular signal-regulated kinases mit den Isoformen ERK-1 und -2 werden über Mitogene aktiviert (Raf → MEK1/2 → ERK1/2) und beeinflussen Zellwachstum und -differenzierung.
2. Die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase, aktiviert über Stress, Tumornekrosefaktoren oder Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 (MLKs/TAK/ASK1 → MKK 3/6 → p38/ MAPK- α/β), führt zu Entzündung oder Apoptose.
3. Stress oder UV-Licht aktiviert die c-Jun-N-terminalen Kinasen JNK (MLKs/ASK-1/MEKK-1/4 → MKK-4/7 → SAPK/JNK-1/2/3) und bedingt ebenso Apoptose, Wachstum und Differenzierung (Knofler et al. 2005).
4. Die Big-mitogen activated kinase 1 (ERK 5) ist in verschiedenen Geweben zu finden und wird durch unterschiedliche extrazelluläre Stimuli wie Zellstress und Wachstumsfaktoren aktiviert, um Zellproliferation und -differenzierung zu regulieren. ERK5 spielt eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären Entwicklung und der vaskulären Integrität und scheint die Angiogenese in Tumorgewebe zu beeinflussen (Nithianandarajah-Jones et al. 2012).

Der MAPK-Signalweg reguliert verschiedene Zellaktivitäten wie Mitose, Metabolismus, Motilität, Migration, Überleben, Apoptose und Differenzierung. Die Aktivierung der MAPKs erfolgt durch Bindung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit Wachstumsfaktoren, Interaktion von Integrinen mit EZM oder der Rekrutierung von GTP-Bindungsproteinen wie Ras/Rho (Lewis et al. 1998).

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen phosphorylieren Tyrosin-Reste an der Rezeptorinnenseite – ähnlich wie JAKs. Das zieht verschiedene Signalproteine wie Grb-2-(growth-factor-receptor-bound) Adapterprotein oder SH2-Domänen von Tyrosinphosphaten (SHP2) an. Diese binden an weitere Proteine, welche eine monomere GTPase (Ras) aktivieren. Dadurch wird eine Kettenreaktion ausgelöst, bei welcher MAP-Kinasen nacheinander die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP-3K), die MAP-Kinase-Kinase (MAP-2K) und die MAP-Kinase (MAP-K) phosphorylieren. Es kann immer auch mehr als eine Kaskade der MAP-Kinasen aktiviert werden (Segger und Krebs 1995).

Durch ihre Aktivierung kumulieren sie im Zellkern und phosphorylieren und aktivieren Transkriptionsfaktoren, welche in Zellaktivierung und –differenzierung eingreifen (Seger und Krebs 1995).

2.6.1. Der ERK1/2-Signalweg

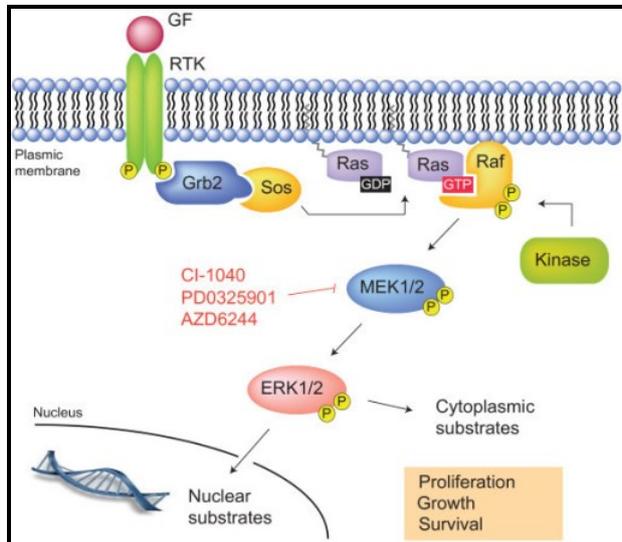


Abb. 4: Darstellung des ERK1/2-Signalwegs (Frémin und Meloche 2010)
 GF: Growth Factor, RTK: Receptor Tyrosin Kinase

Die am besten analysierte MAPK-Signalkaskade ist der ERK1/2-Signalweg (Abb. 5). Growth factor activated receptor tyrosine-Kinasen übertragen ihr Signal via Ligand auf die Zellmembran. Hier wird Ras-Protein über seine GTP-Bindungsstelle gebunden. Die Aktivierung wird durch Adapterproteine mit SH2-Domäne (z. B. Grb2) und guanine-nucleotide exchange factors (z. B. SOS) beeinflusst.

Ras führt zur Stimulierung von Raf an der Membran. Aktiviertes Raf phosphoryliert und aktiviert MEK1 und MEK2, welche dann wiederum ERK1 und ERK2 durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosin-Resten aktivieren (McKay und Morrison 2007). ERK gelangt in den Zellkern und reguliert hier verschiedene Transkriptionsfaktoren (z. B. MYC, Fos, CREB) (Davis 1995).

ERK1 (43 kDa) und 2 (41 kDa) werden ubiquitär exprimiert, jedoch in unterschiedlicher Menge in verschiedenen Geweben. In vielen Immunzellen ist ERK 2 dominant, in neuroendokrinen Zellen ist der Anteil der Proteine etwa gleich hoch. Sie werden durch verschiedenste Liganden aktiviert, in Fibroblasten z. B. durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Stress oder G-Protein-gekoppelte Proteine (Pearson et al. 2001).

2.6.2 Die Bedeutung der MAP-Kinasen für die embryonale Entwicklung

Knockout-Modelle verschiedener MAPK-Signalweg-Komponenten haben zu der Annahme geführt, dass dieser Weg wichtig für die Entwicklung der Plazenta ist. So zeigten z. B. MEKK3, p38 und ERK5-Knockout-Mäuse fehlerhafte Angiogenese und Plazentaentwicklung, die zu embryonaler Letalität führten (Mudgett et al. 2000).

Neben der Rolle bei der Trophoblastfusion sind ERKs wichtig für die Trophoblastinvasion, das Signal wird über Wachstumsfaktoren übertragen (McKinnon et al. 2001). Unter anderem wird die Trophoblastenmotilität und –invasion über HGF und EGF via ERK1/2 vermittelt (Qiu et al. 2004, Cartwright et al. 2002). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass LIF die Proliferation von HTR8/SVneo, einer extravillösen Trophoblastzelllinie, über die Phosphorylierung von ERK1/2 induziert (Prakash et al. 2011).

Es existieren „Crosstalks“ zwischen den MAPK- und JAK/STAT-Signalwegen. SOCS3 zum Beispiel (als Inhibitor des JAK/STAT-Signalwegs) bindet und inaktiviert Ras-GAP, einen Negativregulator von Ras, und aktiviert so den Ras/MAPK-Signalweg (Rawlings et al. 2004).

In anderen Zellsystemen jedoch wird durch verstärkte MAPK-Aktivierung die Transkriptionsaktivität von STATs erhöht (Plaza-Menacho et al. 2007).

LIF triggert die Phosphorylierung sowohl des JAK/STAT- als auch des MAPK-Signalweges unabhängig voneinander innerhalb weniger Minuten. ERK1/2 unterdrückt die STAT3-Phosphorylierung und ist ein Antagonist der STAT3-DNA-Bindungsplätze im Zellkern. Beide Signalwege scheinen unterschiedliche Funktionen zu haben. STAT3 induziert die Trophoblastinvasion, ERK1/2 führt zur JEG3-Proliferation und ist ein Negativ-Regulator von STAT3 (Morales-Prieto et al. 2013).

2.7 Präeklampsie

2.7.1 Definition und Symptome

In 5 bis 7 % aller Schwangerschaften tritt eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung auf (Axt-Fliedner 2004). Dazu zählen die präexistierende Hypertonie, die Pufekklampsie, der schwangerschaftsinduzierte Hypertonus und die Präeklampsie (PE) (Helewa et al. 1997).

Eine Präeklampsie kann sich ab der 20. Schwangerschaftswoche entwickeln und einhergehen mit folgenden Symptomen: Hypertonie (Blutdruckerhöhung von

15 mmHg diastolisch und 30 mmHg systolisch, mittlerer arterieller Blutdruck größer 140/90 mmHg), Proteinurie ($> 0,3$ g/l in 24h) und Ödemen besonders an nicht abhängigen Körperpartien (Gesicht, Hände). Sie tritt bei 4,6 % aller Schwangerschaften weltweit auf (Abalos et al. 2013).

Die schwere Form der Präeklampsie beinhaltet zusätzlich Nierenfunktionseinschränkungen (Kreatinin $\geq 0,9$ g/l oder Oligurie < 500 ml/24h), Leberbeteiligung (erhöhte Transaminasen, Oberbauchschmerzen), Thrombozytopenie, Hämolyse, zentralnervöse Störungen wie Kopfschmerzen, Ohrensausen und Schwindelgefühl, Visusstörungen, Übelkeit und Erbrechen, motorische Unruhe und eventuell Bewusstseinsstörungen (Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy, 2013). Diese Symptome sind das Prodromalstadium des eklamptischen Anfalls, welcher sich durch tonisch-klonische Krämpfe äußert.

In 5-8 % der Erkrankungsfälle schreitet die Präeklampsie in ein HELLP-Syndrom fort („Hemolysis, high elevated liver enzymes, low platelets“). Hierbei handelt es sich um die hepatische Manifestation hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen mit folgenden möglichen Symptomen: Oberbauchschmerzen, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Es zeigen sich charakteristische Laborveränderungen, welche dem Krankheitsbild seinen Namen gaben: Abfall des Hämoglobin- und Haptoglobinwertes sowie Anstieg des LDH als Zeichen der Hämolyse, Erhöhung der Leberwerte (ASAT/ALAT) und erniedrigte Thrombozytenwerte (Weinstein 1982). Das HELLP-Syndrom kann auch unabhängig von einer PE auftreten.

2.7.2 Risikofaktoren und mögliche Folgen

Das Krankheitsbild der Präeklampsie tritt bei bis zu 10 % der Schwangerschaften von Erstgebärenden auf.

Verschiedene Faktoren prädisponieren für die Entstehung einer Präeklampsie: Präeklampsie in einer vorangegangenen Schwangerschaft, genetische Faktoren (Mutter oder Großmutter mit Präeklampsie (Chesley et al. 1968)), thrombophile Gerinnungsstörungen (wie Antiphospholipid-Syndrom), Zwillingsschwangerschaften, niedriger sozialer Status, Primiparität, chronische Erkrankungen, die zu Gefäßveränderungen führen (wie Hypertonie, Adipositas – BMI $\geq 26,1$, Diabetes mellitus), ein kurzes Intervall zwischen den Schwangerschaften sowie ein mütterliches Alter unter 20 und über 35 Jahren (Duckitt und Harrington 2005).

Die Präeklampsie kann assoziiert sein mit schweren maternalen Folgen wie vorzeitiger Plazentalösung, Leberhämatom oder -ruptur, disseminierter intravasaler Koagulation, Apoplex, Lungenödem oder Herzversagen (Martin et al. 1999). Die Erkrankung ist verantwortlich für 10-15 % aller mütterlichen Todesfälle (Duley 2009). Weiterhin ist sie eine der Hauptursachen für fetale Mortalität, was vor allem auf die iatrogene Frühgeburtlichkeit zurückzuführen ist.

Fetale Schäden können sich durch Verminderung des Fruchtwassers und unzureichende plazentare Sauerstoffversorgung entwickeln und sich in Form der intrauterinen Wachstumsretardierung oder Frühgeburtlichkeit mit hoher Mortalität äußern (Sibai et al. 2005). Es existieren Subtypen, welche mit oder ohne IUGR auftreten (Vatten und Skjaerven 2004).

2.7.3 Pathogenese

Die Pathogenese der Präeklampsie ist noch immer unklar. Jedoch sind in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte in der Erforschung der Erkrankung erzielt worden.

Es existieren verschiedene Hypothesen zum Entstehungsmechanismus:

Neigung zu Vasospasmus:

Es wird vermutet, dass Präeklampsie-Patientinnen eine erhöhte Empfindlichkeit der Tunica media der Gefäße gegenüber vasokonstriktorischer Substanzen besitzen. In Schwangerschaften mit Präeklampsie fand man eine erhöhte Sensitivität gegenüber Vasopressoren (Wienhard et al. 2002). So konnte eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Angiotensin II (vasokonstriktorisches) beschrieben werden (Granger et al. 2001), was zu einer Hochregulation des Bradykinin(B2)-Rezeptors führt. Dadurch kommt es zur Heterodimerisation des B2-Rezeptors mit dem Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptor (AT1), was wiederum in einer erhöhten Ansprechbarkeit von Angiotensin II resultiert (AbdAlla et al. 2001).

Eikosanoide:

Es finden sich erhöhte Thromboxanwerte bei PE-Schwangeren, was ebenso zu einer verstärkten Vasokonstriktion und Thrombozytenaggregation führen kann (Zygmunt 2002).

Systemische endotheliale Dysfunktion:

Die Symptome der PE lassen sich als Antwort auf eine generalisierte endotheliale Dysfunktion erklären (Redman et al. 1999): arterielle Hypertonie als Resultat eines gestörten vaskulären Tonus oder Proteinurie und Ödeme durch erhöhte Gefäßpermeabilität.

Laborchemisch zeigt sich die endotheliale Dysfunktion durch erhöhte Konzentrationen von Fibronectin, FaktorVIII-Antigen und Thrombomodulin (Friedman et al. 1995), erniedrigte Vasodilatoren (NO, Prostacyclin) und erhöhte Vasokonstriktoren (Endothelin, Thromboxane) sowie erhöhte Reaktionsfähigkeit auf Angiotensin II (Granger et al. 2001).

VEGF (Vascular endothelial growth factor) und PlGF (Placental growth factor) sind wichtige Angiogenesefaktoren der adäquaten plazentaren Gefäßentwicklung (Ferrara et al. 2003). Sie werden vom Synzytiotrophoblasten sezerniert, VEGF zusätzlich vom Zytotrophoblasten und vom villösen Stroma. Die Wirkung entfalten beide Faktoren über Bindung an VEGF-1- (FLT-1, „fms-like tyrosine kinase“) und VEGF-2-Rezeptoren (KDR, „kinase domain receptor“) (Shibuya et al. 1990). Der VEGF-1-Rezeptor verhindert die Bindung der Angiogenesefaktoren an den Hauptrezeptor VEGF-2 und unterbindet so ihre angiogenen Effekte (Mac Gabhann und Popel 2004). Als lösliche Form liegt er als fms-like Tyrosinkinase 1 sFlt-1 vor. sFlt bindet VEGF und PlGF und entzieht diese so dem Endothel.

Bei einer Präeklampsie zeigt sich eine deutliche Verschiebung des Gleichgewichts zwischen angiogenen und antiangiogenen Faktoren. Die antiangiogenen Faktoren überwiegen (Schlembach 2003).

Die Bestimmung des sFlt (erhöht) und des plazentaren Wachstumsfaktors PlGF (erniedrigt) sowie des sFlt-1/PlGF-Quotienten (erhöht) aus dem peripheren mütterlichen Blut kann zur Früherkennung der Präeklampsie in der zweiten Schwangerschaftshälfte genutzt werden (Maynard et al. 2003).

Endoglin (Eng) ist ein Co-Rezeptor des TGF β („transforming growth factor“) und wird auf der Zellmembran des vaskulären Endothels und Synzytiotrophoblasten exprimiert. Die lösliche Form von Eng, sEng, ist ein anti-angiogenes Protein, welches bei präeklampsischen Frauen in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden konnte. Daraus könnte eine vermehrte Bindung von TGF resultieren und als eine

anti-angiogene Wirkung durch Blockierung der Aktivierung von eNOS und einer Vasodilatation erklärt werden (Venkatesha et al. 2006).

sEng ist im Serum von Präeklampsie-Schwangeren zwei bis drei Monate vor dem Auftreten klinischer Symptome erhöht. Ein erhöhtes Level von sEng gemeinsam mit einer erhöhten sFlt-1/PIGF-Ratio dient ab dem 2. Trimenon als guter Marker für das Auftreten einer Präeklampsie (Levine et al. 2004).

Immunologische Faktoren:

In der Frühschwangerschaft finden sich Antikörper gegen fetale Leukozyten-Antigene, welche im weiteren Verlauf unterdrückt werden. Bei PE-Schwangeren könnten diese Antikörper fortbestehen (Axt-Fliedner 2004).

Eine weitere Hypothese besagt, dass eine PE durch eine überschießende Aktivierung des maternalen Komplementsystems verursacht sein kann, möglicherweise als Reaktion auf die paternalen Antigene. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine Komplementaktivierung durch Dysregulation von Angiogenesefaktoren Fehlgeburten und Wachstumsretardierung hervorrufen kann (Girardi et al. 2006).

In einer weiter zurückliegenden Studie dagegen wurde vermutet, dass die Exposition mit paternalen/fetalen Antigenen vor einer PE schützt (Klonoff-Cohen et al. 1989). Nullipara und Frauen, die die Partner zwischen den Schwangerschaften wechselten, lange Intervalle zwischen Schwangerschaften hatten oder eine Verhütung mittels mechanischer Kontrazeption betrieben, hatten ein erhöhtes Risiko, eine PE zu entwickeln, möglicherweise aufgrund des reduzierten Kontakts mit paternalen Antigenen (Klonoff-Cohen et al. 1989).

Extravillöse Trophoblast (EVT)-Zellen exprimieren eine unübliche Kombination von HLA-I-Antigenen: HLA-C, HLA-E und HLA-G. NK-Zellen treten in der maternalen Dezidua mit den EVT-Zellen über verschiedene Rezeptoren (CD94, KIR, ILT) in Kontakt (Loke und King 2000). Durch diese Interaktion wird die Implantation kontrolliert. Bei einer PE wird vermutet, dass NK-Zellen eine erhöhte Aktivität aufweisen. Einen definitiven Nachweis für diese Theorie gibt es nicht. In einem systematischen Review von Saftlas et al. konnte kein Nachweis einer bestimmten HLA-Kombination erbracht werden, welcher zu einer PE führen könnte (Saftlas et al. 2005).

Abnormales Remodeling der Spiralarterien:

Die Plazentaentwicklung verläuft normalerweise in zwei Phasen: bis zum Ende des ersten Trimenons dringt der Trophoblast in die mütterliche Dezidua bis zur Grenze des Myometriums ein. In der Invasionsphase eröffnen die Trophoblastzellen die mütterlichen Spiralarterien und dadurch gelangt Blut in die intervillösen Räume. Das Remodeling der Arterien hängt vom extravillösen Zytotrophoblasten ab. Die Spiralarterien verlieren durch den Umbau ihre glatten Muskelzellen und dilatieren (Hirano et al. 2002). Dadurch entstehen Gefäße mit hoher Kapazität, geringem Widerstand und erhöhter Permeabilität. Es wird angenommen, dass es bei unzureichender Dilatation der Arterien zu einer Hypoperfusion und damit zu einer intrauterinen Mangelentwicklung des Fetus kommt. Zytotrophoblastzellen infiltrieren den dezidualen Anteil der Spiralarterien, können jedoch nur unzureichend in das myometriale Segment eindringen (Roberts und Redman 1993, Meekins et al. 1994). Lange Zeit war man der Meinung, dass diese gestörte Invasion des extravillösen Trophoblasten in die maternalen Spiralarterien Ursache der Präeklampsie sei (Sibai et al. 2005). Dies ist jedoch eher als Ursache der IUGR anzunehmen. Nur circa ein Drittel der PE-Patientinnen zeigen einen erhöhten uterinen Widerstand.

Inflammation/Apoptose:

Aus den Zytotrophoblastzellen entsteht durch Fusion der Synzytiotrophoblast. Er unterliegt einem ständigen Zell-Turnover. Es werden also ständig neue Zellbestandteile in den Synzytiotrophoblasten aufgenommen und alte Substanzen abgebaut. Durch Apoptose entstehen Synzytialknoten (ähnlich wie apoptotic bodies), welche von der apikalen Membran abgeschnürt werden und so in den mütterlichen Kreislauf gelangen, um dort abgebaut zu werden. Sie sind im venösen System des Uterus und im Kapillarsystem der Lungen des maternalen Kreislaufs nachweisbar. Diese Synzytialknoten besitzen eine dicke Membran, setzen daher keine trophoblastären Zellsubstanzen im mütterlichen Blut frei und erzeugen keine Entzündungsreaktion. Sie werden in der Lunge von Makrophagen phagozytiert. Kleinere subzelluläre Bestandteile und zellfreie Moleküle werden von geschädigten Trophoblastzellen durch Aponekrose freigesetzt (Abb. 6). Bei regelrechter Entsorgung bleibt dies für die Mutter folgenlos. Bei Überschreitung des Schutzmechanismus kann jedoch das mütterliche Endothel geschädigt werden und

freigesetzte Trophoblastbestandteile können zu einer Entzündungsreaktion und damit zur Entstehung einer PE führen (Allaire et al. 2000).

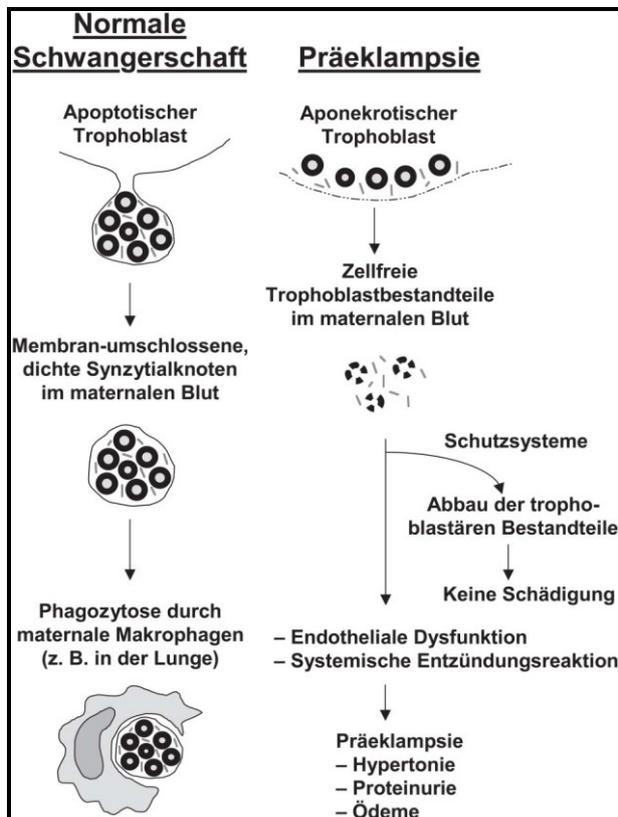


Abb. 5: Entstehung der PE durch Aponekrose (Huppertz 2005).

Man nimmt an, dass bei der Entstehung einer Präeklampsie mit IUGR sowohl Proliferation als auch Fusion von Zytotrophoblastzellen und damit reaktiv die Apoptose des Synzytiotrophoblasten gesteigert sind (Huppertz und Kingdom 2004, Lyall und Myatt 2002). Immunhistochemisch ließ sich eine höhere Anzahl apoptotischer Zellkerne im villösen Trophoblasten nachweisen (Axt et al. 1999).

Durch höhere Proliferationsraten wird mehr Material im Synzytiotrophoblast aufgenommen, daher muss entsprechend mehr über Apoptose abgebaut werden, um eine Homöostase zu erreichen. Eine erhöhte Apoptoserate des Synzytiotrophoblasten kann also eine mögliche Ursache der Entstehung der Präeklampsie darstellen (Gauster et al. 2009).

Verschiedene aktuelle Studien beschäftigen sich mit der Messung dieser extrazellulären Synzytiotrophoblast-Vesikel (STBEV), welche von der Plazenta abgegeben werden (Gohner et al. 2015). STBEV binden an Monozyten und werden von diesen aufgenommen, stimulieren die Produktion von proinflammatorischen

Zytokinen, aktivieren Neutrophile und inhibieren die endotheliale Zellproliferation sowie die Relaxation von Blutgefäßen. Weiterhin triggern sie die Thrombin-Freisetzung und wirken dadurch antiangiogen (Tannetta et al. 2013).

2.7.4 Formen der Präeklampsie

Die frühe Form („early onset preeclampsia“) entwickelt sich vor der 34. Schwangerschaftswoche und ist assoziiert mit einem abnormalen Doppler der A. uterina, einer fetalen Minderentwicklung sowie einem ungünstigen maternalen und neonatalen Outcome. Sie tritt in bis zu 10 % aller Präeklampsie-Fälle auf (Cunningham und Lindheimer 1992).

Die späte und auch häufigere Form („late onset preeclampsia“) zeichnet sich durch ein Auftreten nach der 34. Schwangerschaftswoche bei meist normalem oder leicht erhöhtem uterinen Widerstandsindex aus. Das fetale Outcome ist besser als bei der frühen Form. Sie tritt häufiger bei Patientinnen mit hohem BMI auf (Valensise et al. 2008).

In ca. 5 % aller Fälle wird eine PE erst postpartal, normalerweise innerhalb von 48 Stunden nach Geburt, diagnostiziert (Al-Safi et al. 2011).

2.7.5 Diagnostik

Jede Schwangere, welche eine neu aufgetretene Hypertonie und Proteinurie oder Zeichen einer End-Organ-Dysfunktion (Thrombozyten < 100.000 Gpt/ml, doppelt erhöhtes Serum-Kreatinin, erhöhte Transaminasen) nach der 20. SSW entwickelt, sollte einer PE-Diagnostik zugeführt werden (Magee et al. 2014).

Eine ausführliche Anamnese und Untersuchung sollten zur Beurteilung folgender Symptome erfolgen: starke Kopfschmerzen, Sehstörungen (wie Skotome, Photophobie, vorübergehende Blindheit), Oberbauch- oder Magenschmerzen, Übelkeit/Erbrechen, Dyspnoe und neurologischer Status.

Folgende Laborparameter sind zu erheben: Thrombozytenzahl, Serum-Kreatinin, Transaminasen, Haptoglobin und LDH. Weiterhin sollte eine Ultraschalluntersuchung mit Bestimmung des fetalen Schätzwichts und der Fruchtwassermenge sowie eine fetale und maternale Dopplermessung durchgeführt werden.

2.7.6 Screening

Derzeit existiert noch kein effektives Präeklampsie-Screening. Ideal wäre es, einen Biomarker zu finden, welcher einfach getestet werden könnte und im ersten Trimenon nachweisbar wäre, damit Behandlungsstrategien angewendet werden können, welche eine normale Plazentation ermöglichen würden.

Die aktuellen Methoden zur Bestimmung möglicher Präeklampsie-Risiko-Schwangerschaften im ersten Trimester beinhaltet die Anamnese, die Blutdruckmessung und die Doppleruntersuchung der Aa. uterinae. Neuere Untersuchungen gehen dahin, zusätzlich PIGF und plazentares Protein A (PAPP-A) im Rahmen des Ersttrimesterscreenings (11.-14. SSW) zu bestimmen, um Patientinnen mit einem erhöhten PE-Risiko identifizieren zu können. Bei diesen Patientinnen kann versucht werden, mittels einer ASS-Gabe einem frühen Erkrankungsbeginn vorzubeugen. Die Effektivität der ASS-Gabe im ersten Trimenon wird derzeit kontrovers diskutiert, da einheitliche Ergebnisse noch Inhalt aktueller Studien sind (Tannetta et al. 2015). Erwiesen ist jedoch, dass Patientinnen mit einem erhöhten Risiko einer intensivierten präpartalen Überwachung zugeführt werden sollen.

Vorteil der Dopplersonographie im zweiten Trimester ist die einfache Durchführbarkeit mit hohem negativem Vorhersagewert. So kann bei unauffälliger uteriner Durchblutung eine Präeklampsie zu 97 % ausgeschlossen werden. Die Aa. uterinae präeklampsischer Frauen zeigen zwischen der 16. und 18. SSW signifikant häufiger einen reduzierten diastolischen Fluss (Campbell et al. 1986). Laut WHO-Studie von 2004 ist der positive prädiktive Wert der Doppleruntersuchung jedoch nicht hoch genug, um als generelles Routinescreening anerkannt zu werden.

Der positive Vorhersagewert eines pathologischen Dopplers (erhöhter Flusswiderstand in den Aa. uterinae mit „notch“) kann durch die zusätzliche Bestimmung des sFlt-1/PIGF-Quotienten (> 85) von 30 % auf 70 % gesteigert werden (Stepan et al. 2007). Auch bei einer IUGR werden erhöhte sFlt-1/PIGF-Quotienten gemessen.

Bei erhöhten sFlt-1/PIGF-Quotienten und klinischem Verdacht auf eine Präeklampsie kann eine gute Vorhersagegenauigkeit für den Schwangerschaftsausgang im dritten Trimester gestellt werden. In der Frühschwangerschaft ergeben sich jedoch keine eindeutigen Ergebnisse für einen positiven Vorhersagewert des sFlt-1/PIGF-Quotienten (Verloren et al. 2012). Obwohl der sFlt-1/PIGF-Quotient in die deutschen

Leitlinien eingearbeitet wurde und mittlerweile zur Diagnostik der PE angewendet wird, herrscht noch kein einheitlicher Konsens, wie und vor allem wann dieser Marker einzusetzen ist.

Patientinnen mit später Präeklampsie zeigten erniedrigte Konzentrationen der Angiogenesefaktoren VEGF und PlGF, welche bereits zu Beginn des 2. Trimesters gemessen werden konnten (Carty et al. 2008).

Weiterhin konnten erhöhte Endoglin Spiegel bei Patientinnen mit „early-onset-Präeklampsie“ bereits in der 17.-20. Schwangerschaftswoche gefunden werden (Levine et al. 2006).

Ein erfolgversprechender früher Marker scheint PP-13 (Plazentaprotein 13) zu sein, erniedrigte Konzentrationen ließen sich bereits bei Frauen in der 11.-13. (Burger et al. 2004) bzw. 9.-12. Schwangerschaftswoche (Chafetz et al. 2007) messen, wenn Frauen im weiteren Schwangerschaftsverlauf eine Präeklampsie entwickelten.

2.7.7 Prävention und Behandlung

Aufgrund der bisher noch nicht hinreichend erforschten Ursache der Erkrankung ist eine primäre Prävention zurzeit nicht möglich.

Eine sekundäre Prävention durch Calcium und Aspirin zeigt einen Nutzen durch die Gabe von niedrigen Calcium-Dosen zur Behandlung von Patientinnen mit einem sehr hohen Risiko eine frühe, schwere Form der Präeklampsie zu entwickeln. Veränderungen des Lebensstils durch Ernährungsberatung (wenig Salz, Protein- und Energie-Ergänzung, Gabe von Antioxidantien wie Vitamin C und E) oder Bewegung haben unzureichende Ergebnisse gezeigt und ließen sich nicht für den klinischen Alltag nutzen (Hofmeyr et al. 2006, Askie et al. 2007).

Das Management der Präeklampsie ist abhängig von der Schwere der Erkrankung. Leichtere Formen können konservativ behandelt werden. Laut aktuellen S1-Leitlinien ist bei milder Präeklampsie eine ambulante Betreuung mit Blutdruck-, Labor-, Gewichts-, CTG- und Dopplerkontrollen notwendig. Eine medikamentöse Therapie mit Dihydralazin (37–75 mg tgl) und/ oder β -Blockern (75 mg tgl.) sowie Magnesium ist zu erwägen. Bei Verschlechterung der Symptome ist die sofortige Einweisung in eine Klinik unumgänglich.

Patientinnen mit einem erhöhten Präeklampsierisiko (präexistenter Hypertonus, Nierenerkrankungen, PE/HELLP in vorherigen Schwangerschaften, positive

Familienanamnese, Diabetes mellitus, Adipositas) sollten über das erhöhte Risiko aufgeklärt werden. Wichtig sind regelmäßige Blutdruckkontrollen, eine Diätberatung und Doppleruntersuchungen in der 28.-30. SSW.

Bei schwerer Präeklampsie unter der 34. SSW sollte eine Prolongierung der Schwangerschaft durch intravenöse antihypertensive und antikonvulsive Therapie versucht werden. Eine Lungenreifeinduktion mit 2x12 mg Betamethason innerhalb von 24 Stunden sowie eine Bilanzierung sind notwendig.

Bei Lungenödem, Herzinsuffizienz oder Verschlechterung der Nierenwerte sollte Furosemid iv. gegeben werden. Mutter und Fet sollten durch Ultraschall- und Doppler- sowie CTG-Kontrollen überwacht werden. Bei jeglicher Verschlechterung muss die Beendigung der Schwangerschaft entweder durch Geburtseinleitung oder Sectio erfolgen.

Bei Eklampsie muss sofort für eine suffiziente Beatmung und Beendigung des Krampfanfalls durch Diazepam oder Magnesiumsulfat iv. sowie für eine Blutdrucksenkung gesorgt werden. Die sofortige Entbindung mittels Sectio ist obligat. Postpartal sollte die Patientin intensivmedizinisch überwacht werden (D. Bancher-Todesca 1998). Die einzige ursächliche Therapie der Präeklampsie stellt zurzeit die Entbindung dar. (Briceno-Perez et al. 2009).

Diagnostik und Behandlung der Erkrankung kann durch Bestimmung des sFlt1/PIGF-Quotienten verbessert werden.

Frauen mit einem sFlt-1/PIGF-Quotient < 38 haben zur Zeit der Diagnostik keine PE und werden innerhalb einer Woche keine Erkrankung entwickeln.

Beträgt der sFlt1/PIGF-Quotient > 85 (bei early-onset PE) oder > 110 (bei late-onset PE), ist das Vorliegen einer PE wahrscheinlich. Je nach klinischer Situation sollte eine erneute Messung nach zwei bis vier Tagen erfolgen. Sehr hohe Werte (> 655 bei early-onset PE, > 201 bei late-onset PE) machen eine Entbindung innerhalb der nächsten 48 Stunden notwendig. Bei einer Schwangerschaft < 34 SSW sollte eine sofortige Lungenreifeinduktion mittels Glukokortikoiden initiiert werden.

Bei einem sFlt1/PIGF-Quotient < 110 (late-onset PE) besteht zur Zeit des Testes keine PE, das Risiko eine PE innerhalb der nächsten vier Wochen zu entwickeln, ist erhöht.

Je nach klinischer Symptomatik sollte bei Patientinnen mit einer early-onset PE nach 1-2 Wochen eine Kontrolle des sFlt1/PIGF-Quotienten erfolgen. Bei Patientinnen mit

einer late-onset PE und einem sFlt1/PlGF-Quotienten von 38-110 ist eine baldige Geburtseinleitung sinnvoll, da diese Werte auf eine beginnende Plazentadysfunktion hindeuten (Schlembach 2015).

Bisher existieren jedoch keine Daten, wie hilfreich die Bestimmung des Quotienten zur Verhinderung von maternalen Komplikationen oder Verbesserung des fetalen Outcomes ist (Stepan et al. 2015).

Neuere Therapiestrategien sehen die Möglichkeit bereits frühzeitig in der Schwangerschaft eingreifen zu können.

Die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen angiogenen und antiangiogenen Faktoren bei der Entstehung der Präeklampsie als möglichem Ausgangspunkt für eine kausale Therapie ist Inhalt aktueller Forschung. So wird bei Patientinnen mit früher Präeklampsie durch Apherese eine Entfernung von überschüssigem sFlt-1 aus der Blutzirkulation angestrebt (Thadhani et al. 2011). sFlt-1 trägt bei normalem pH-Wert eine positive Ladung und bindet so an die negative Ladung der Dextran-Sulfate der Apheresesäulen. Im Moment ist diese Methode jedoch lediglich in klinischen Studien durchführbar und wird derzeit in den Universitätskliniken Köln und Leipzig eingesetzt. Es konnte eine Reduktion des sFlt-1-Levels von 25-30 % erreicht und die Schwangerschaften im Schnitt um vier Tage prolongiert werden (Heihoff-Klose 2016).

3 Ziele der Arbeit

Der Entstehungsprozess schwangerschaftsinduzierter Erkrankungen ist Schwerpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Studien. Bis heute sind die Ursache und Pathogenese der Präeklampsie nicht vollständig geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu prüfen, ob Serum von Patientinnen mit Präeklampsie die JAK-STAT- sowie die ERK1/2-Signaltransduktion in trophoblastären Zellen beeinflusst. Die Resultate sollen mit denen von Serum Nicht-Schwangerer und gesunder Schwangerer verglichen werden und orientierende Ergebnisse für weiterführende Studien liefern. Weiterhin soll dargestellt werden, welchen Einfluss Präeklampsie-Serum auf die Proliferation und Apoptose von JEG-3-Zellen ausübt.

Hypothesen:

- Serum von Patientinnen mit Präeklampsie hemmt die Proliferation und steigert die Apoptose von trophoblastären Zellen.
- Präeklampsie beeinflusst die STAT3- sowie die ERK1/2-Aktivität von trophoblastären Zellen.
- LIF wirkt über eine STAT3- und ERK1/2-Aktivierung auf trophoblastäre Zellen (Abb. 7).
- PE-Serum hemmt über die LIF-vermittelte STAT3- und ERK1/2-Phosphorylierung die Invasion trophoblastärer Zellen und somit die vollständige Ausbildung der Plazenta (Abb. 7).

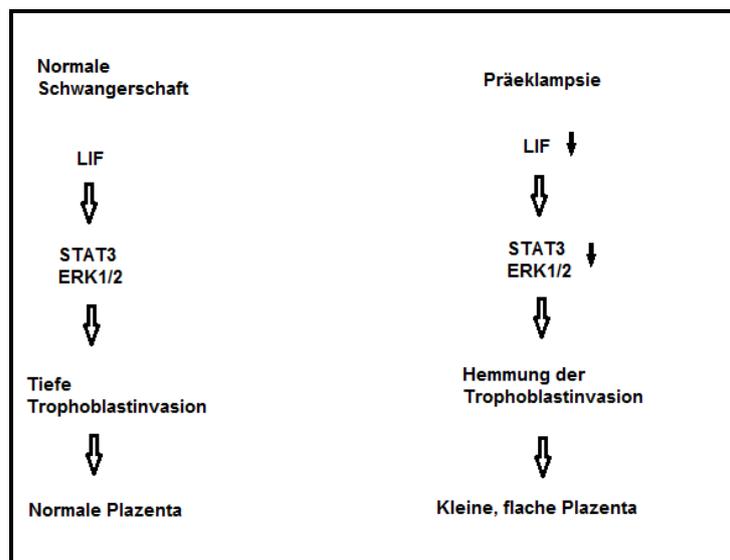


Abb. 7: Schema zur Hypothese der Wirkung von LIF auf die Aktivierung von STAT3 und ERK1/2 und die dadurch bedingte Beeinflussung der Trophoblastinvasion bei einer normalen Schwangerschaft und bei einer Präeklampsie

4 Methoden

Alle benutzten Reagenzien, Verbrauchsmittel und Geräte sind detailliert im Anhang aufgelistet.

4.1 Die JEG3-Zelllinie

JEG3-Zellen sind Chorionkarzinom-Zellen, welche 1971 von Kohler und Bridson während einer Autopsie aus Hirnmetastasen erstmals

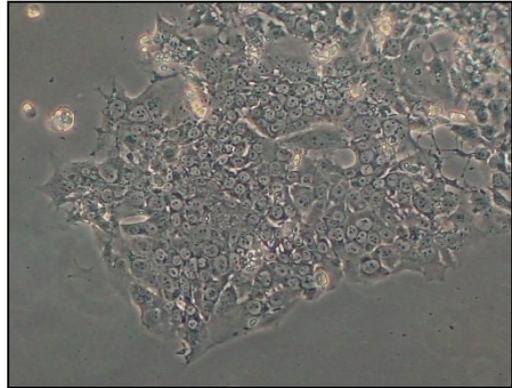


Abb. 8: JEG3-Zelllinie in Kultur

isoliert und anschließend in Kultur genommen wurden. Die Zellen wachsen adhärent in Einzell-Schichten (sogenannte Monolayer) und bilden Zellaggregate (Abb. 8). Sie produzieren β -HCG, humanes Chorion-Somatomammotropin, Progesteron und aus steroidalen Vorstufen Östron und Östradiol.

Ihr Wachstumsverhalten ähnelt dem der Trophoblastzellen. Sie dienen daher als Modell für Experimente zur Erforschung fetaler und uteriner Zellinteraktionen der Plazenta. Mittlerweile existieren bis zu 124 Subkulturen dieser Zelllinie.

Bei einem Chorionkarzinom (auch Chorionepithelioma malignum genannt) handelt es sich um einen malignen Trophoblasttumor. Die Erkrankung ist sehr selten (1 % aller Tumore weiblicher Genitalorgane) und verläuft meist foudroyant. Histologisch weist der Tumor karzinomatös entartete choriale Zellen auf. Es sind nur noch anaplastische Zellen, keine Zotten mehr nachweisbar. Nachweisbar sind übermäßig erhöhte β -HCG-Werte von über 5.000– 1 Mio. IE/l im Serum (Stauber 2007).

Ein Chorionkarzinom entsteht in 50 % der Fälle durch eine Blasenmole, in 30 % als Folge eines Spontanabortes und in 20 % auch nach einer normal verlaufenden Schwangerschaft.

4.1.1 Zellkultur von JEG3-Zellen

Als Kulturmedium für die Chorionkarzinomzelllinie JEG3 wurde F12-Medium verwendet, welches zu 10 % mit fetalem Kälberserum und zu 2 % mit Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Die Zellen wuchsen unter Standardbedingungen bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % im Brutschrank.

JEG3-Zellen besitzen eine Verdopplungszeit von circa 24 Stunden, woraufhin diese alle zwei bis drei Tage unter sterilen Bedingungen trypsiniert, verdünnt und mit neuem Medium versetzt wurden. Hierfür wurde das alte F12-Medium verworfen und

die nun am Kulturflaschenboden adhärenen Zellen mit 5 ml PBS (phosphate buffered saline) gewaschen, um ein neutrales Milieu zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin abgelöst und so ihre Zell-Zell-Kontakte zerstört. Die Reaktion wurde mit Medium abgestoppt. Die hierbei gewonnenen Zellen konnten für die folgenden Experimente verwendet werden oder wurden 1:5 mit neuem Medium verdünnt, um weiter kultiviert zu werden.

4.1.2 Zählen der Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Kulturflasche wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert. Die gelösten Zellen wurden in ein definiertes Mediumvolumen aufgenommen, in ein 15 ml-Falkon-Röhrchen überführt und anschließend bei 2.500 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert. Hierbei setzten sich die Zellen am Boden des Falkons ab, der Überstand konnte verworfen werden. Das Zellpellet wurde in 2 ml Medium aufgenommen. 20 µl der Zellsuspension wurden 1:1 mit dem Zellfarbstoff Tryphtanblau versetzt und auf einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurden die noch lebenden Zellen (erscheinen durchsichtig, nehmen keinen Zellfarbstoff auf) in vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt. Nun konnte mit Hilfe folgender Rechnung die Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension bestimmt werden:

$$\text{Zellen}/4(\text{Quadrantenanzahl}) \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 = \text{Zellen/ml.}$$

4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen trypsinierten wir diese aus einer Kulturflasche ab, versetzten sie mit frischem Medium und zentrifugierten sie mit 1.800 Umdrehungen für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 % DMSO, 40 % FKS und 50 % Medium gelöst und anschließend bei -20 °C tiefgefroren. Nach 24 Stunden konnten die gefrorenen Zellen bei -80 °C dauerhaft gelagert werden. Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen tropfenweise mit auf 37 °C angewärmtem Medium versetzt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in einen 15 ml Falkon überführt und bei 2.500 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert, um das zelltoxische DMSO zu eliminieren. Der Überstand wurde verworfen und die gereinigten Zellen in frischem Medium gelöst.

4.2 Gewinnung der Präeklampsie-Proben

Für die Versuche wurden Seren von sieben Schwangeren mit Symptomatik einer Präeklampsie (Präeklampsie-Serum – PES) in einem Schwangerschaftsalter von 25+4. SSW bis 38. SSW, einer Schwangeren mit Präeklampsiesymptomen und Blasenmole in der 15+1. SSW (ebenfalls zu Präeklampsie-Serum – PES gehörend), einer Patientin mit regelrechter Schwangerschaft in der 32+5. SSW (Gesund-Schwangeren-Serum - GSS) sowie Serum einer Nicht-schwangeren Probandin (Nicht-Schwangeren-Serum - NSS) genutzt. Alle schwangeren Probandinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Entnahme in stationärer Behandlung der Universitätsfrauenklinik Jena und hatten ihr Einverständnis zur Probenentnahme gegeben. Die nicht-schwangere Probandin arbeitete zum gleichen Zeitpunkt im Plazentalabor. Den Probandinnen wurde 10 ml Blut in eine Serum Gel Sarstedt Monovette entnommen. Die Probengewinnung erfolgte im Zeitraum vom 28.05.2009 bis 18.11.2009. Die Probenbezeichnungen mit Geburtsjahr, Schwangerschaftsalter und Serumzusammensetzung sind in Tabelle 1 ersichtlich.

Tab. 1: Bezeichnungen der verwendeten Serumproben mit Angabe der Probennummer, des Geburtsjahres der Probandinnen, des Schwangerschaftsalters bei Probenentnahme und der Serumzusammensetzung

Probennummer	Geburtsjahr der Probandinnen	Schwangerschaftsalter bei Serumabnahme	Serumzusammensetzung
1	1987	38	Präeklampsie
2	1974	25+4	Präeklampsie
7	1984	32+5	Gesund schwanger
8	1983	35+5	Präeklampsie
9	1980	15+1	Blasenmole und Präeklampsie
10	1985	37+6	Präeklampsie
11	1971	35+6	Präeklampsie
12	1982	27+1	Präeklampsie
13	1986	-	Nicht schwanger

Die Serum-Röhrchen wurden bei 3.800 Umdrehungen für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, sodass sich das Serum von den weiteren Blutbestandteilen trennte und für weitere Versuche bei –80 °C aufbewahrt werden konnte.

4.2.1 Kultivierung auf Mikrotiter-Kulturplatten

Für die geplanten Versuche wurden die Zellen, wie oben beschrieben, aus der Kulturflasche trypsiniert und so verteilt, dass in jedes Well einer 6-Well-Platte 100.000 Zellen/ml eingesetzt wurden.

Zu Beginn unserer Versuchsreihe versetzten wir die JEG3-Zellen mit 5 % Humanserum. Bereits nach zwei Tagen waren die Zellen in Kultur abgestorben, unabhängig von der Zusammensetzung des Humanserums. Daraufhin entschieden wir uns je zwei Zellansätze mit 1 % Nicht-Schwangeren-Serum, Gesund-Schwangeren-Serum oder Präeklampsie-Serum je einer Probandin für 7 Tage bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % zu kultivieren. Alle zwei Tage fand ein Wechsel von Kulturmedium sowie Proben-Serum statt.

4.3 Proteinisolation

4.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Nach sieben Tagen Kultivierung der Zellen, wie oben beschrieben, waren die Mikrotiterplatten zu 70 bis 100 % bewachsen. Jetzt konnte je eine Zellkultur pro Serumgruppe mit jeweils 1 µl LIF (entspricht einer 1.000fachen Verdünnung der Stammlösung) für 20 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert werden.

Anschließend wurde das Medium verworfen, jedes Well mit 1 ml PBS gewaschen und mit je 100 µl Zellyse-Puffer mit Proteinaseinhibitor versetzt. Der Lyse-Puffer zerstört Zellmembranen und ermöglicht eine Freisetzung intrazellulärer Proteine. Die lysierten Zellen wurden mit einem Plastikschaber aus dem Well gekratzt und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert. Mittels Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen gelang es, die Zellmembranen weiter zu zerstören. Um die Zellbestandteile nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und eine möglichst reine Konzentration an Proteinen zu gewinnen, wurden die Zelllysate bei 18.000 Umdrehungen für 30 Minuten zentrifugiert. Am Boden setzten sich schwerere Bestandteile ab, Proteine befanden sich im Überstand, wurden entnommen und konnten der Konzentrationsbestimmung zugeführt oder eingefroren werden.

4.3.2 Bradford-Proteinbestimmung

Um die Konzentration der Proteine in den Zelllysaten zu bestimmen, wurden diese mit Bradford-Reagenz versetzt. Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie-Blau, welcher unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten von

Aminosäuren bindet. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nm zu 595 nm. Die photometrische Absorption bei 595 nm kann gemessen werden. Durch parallele Messung der Absorptionen einer bekannten Proteinkonzentrationsreihe kann eine Standardkurve ermittelt und diese mit den gemessenen Absorptionen der zu bestimmenden Proteine korreliert werden (Lottspeich 2008).

Zur Durchführung des Versuches wurden je 995 µl Bradford-Reagenz mit je 5 µl der Proteinprobe versetzt, für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Absorptionen anschließend im Spektrometer gemessen.

Die Bradford-Messung kann ebenfalls mit einem Elisa-Reader erfolgen. Hierfür wurden je 99,5 µl Bradford-Reagenz mit jeweils 0,5 µl Proteinprobe in einer 96-Wellplatte gemischt. Es folgte die Dreifach-Bestimmung der Absorptionen mittels Elisa-Reader und die Korrelation mit einer mitgeführten Standardreihe im Programm „Omega“.

4.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

4.4.1 Hintergrund

Mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes. Die Teilchen wandern in einem Polymergel aus Polyacrylamid, welches durch das Quervernetzungsreagenz N, N'-Methylenbisacrylamid durch Zugabe des Katalysators Ammoniumpersulfat mit N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED) durch Copolymerisation von Acrylamid hergestellt wurde.

Durch Zugabe des anionischen Reagenz SDS (Natriumdodecylsulfat) zu den Proteinen und dem Gel erhalten die Proteine eine negative Ladung. Die meisten Proteine binden SDS in einem konstanten Verhältnis, sodass diese nahezu identische Ladung-Masse-Verhältnisse besitzen und nicht durch ihre Eigenladungen beeinflusst werden. Weiterhin werden durch die Negativbeladung die hydrophoben Wechselwirkungen in den Proteinen aufgehoben und dadurch ihre Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört. Zusätzlich führt die Zugabe von β -Mercaptoethanol zur Störung der Disulfidbrücken. Hierdurch wird erreicht, dass die Polypeptide gespalten werden und Proteine einzeln in der Elektrophorese laufen.

Die Proteine laufen je nach Molekulargewicht, Konformation und Gesamtladung im elektrischen Feld durch die Poren des Gels. Kleinere Proteine gelangen schneller in Richtung Anode, da sie in ihrem Lauf weniger gebremst werden.

SDS-PAGE ist eine diskontinuierliche Elektrophorese. Die Proteine passieren zunächst ein Sammelgel mit einem größeren Porendurchmesser als im Trenngel. Durch unterschiedliche pH-Werte und Anionenzusammensetzung des Sammelgels gegenüber dem Trenngel kann eine Konzentrierung der Proteine und dadurch im Anschluss eine gleichmäßige Auftrennung erreicht werden.

Die Geschwindigkeit der Teilchen ist ihrer Ladung sowie der Potentialdifferenz zwischen den Elektroden direkt proportional; dem Elektrodenabstand, dem Teilchenradius und der Viskosität der Lösung umgekehrt proportional.

Als Puffer werden schwache Säuren oder Basen eingesetzt, welche keine spezifischen Wechselwirkungen mit den zu untersuchenden Proteinen eingehen.

4.4.2 Durchführung

Die Zubereitung des 9 %igen Trenn- und Sammelgels erfolgte nach Protokoll (siehe Anhang). Zunächst wurde das Trenngel in die Elektrophoresekammer hineingegossen. Im Anschluss erfolgte die Aufschichtung des Sammelgels. Durch Einlage eines Kamms wurden die Proteintaschen geformt.

Es wurden 20 µg der Probe mit je 5 µl 5fach-Ladepuffer versetzt. Der Probe wurde Zell-Lyse-Puffer zugesetzt, um ein Gesamtvolumen von 30 µl pro Tasche zu erhalten. Die Proben wurden bei 95 °C für 7 Minuten denaturiert und anschließend zentrifugiert.

Im Anschluss erfolgte die Auffüllung der Kammer mit Running-Puffer.

Die Bestückung der Taschen erfolgte in dargestellter Weise:

- 1 Marker (5 µl Precision Dual)
- 2 Zelllysate ohne Probandenserum (Kontrolle)
- 3 Zelllysate mit Nicht-Schwangeren-Serum
- 4 Zelllysate mit Gesund-Schwangeren-Serum
- 5 Zelllysate ohne Probandenserum mit LIF
- 6 Zelllysate mit Nicht-Schwangeren-Serum mit LIF
- 7 Zelllysate mit Gesund-Schwangeren-Serum mit LIF
- 8 Zelllysate mit Präeklampsie-Serum
- 9 Zelllysate mit Präeklampsie-Serum mit LIF

Die Elektrophoresekammer wurde mit 25 mA bei 300 V für circa 90 Minuten betrieben.

4.5 Western Blot

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die getrennten Proteine auf eine stabile Membran übertragen und über nicht-kovalente Wechselwirkungen gebunden. Die so konzentrierten Proteine werden empfindlicher gegenüber Nachweismethoden und es kann eine semi-quantitative Proteinbestimmung mittels spezifischer Antikörper durchgeführt werden.

4.5.1 Durchführung

Die Membran Hybond P wurde vorbehandelt, indem sie zunächst für 10 Sekunden in Methanol geschwenkt, im Anschluss für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gereinigt und dann für mindestens 10 Minuten mit Blotting-Puffer behandelt wurde.

Die Materialien wurden in folgender Weise in der Blot-Kammer geschichtet (von oben nach unten):

5 Filterpapiere

Membran

Gel

5 Filterpapiere

Das Blotting erfolgte bei einer Stromstärke von 250 mA und 300 V für 25 Minuten. Dies entspricht einer Stromstärke von 3 mA pro cm².

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die Membran nach dem Blotten mit Net-G für drei Mal 7 Minuten gewaschen und geblockt. Diese Methode ersetzen wir während der Experimente durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBS/Tween und Blocken der Membran mit einer Milchlösung für eine Stunde.

Durch das Blocken der Membran werden noch freie Proteinbindungsstellen besetzt und dadurch unspezifische Antikörperbindungen verhindert.

4.5.2 Immundetektion

Die Membran wurde für 24 Stunden bei 4 °C mit den ersten Antikörpern anti-p-STAT3(tyr 705) oder anti-p-ERK1/2 in einer 1:1.000 Verdünnung (Verdünnungslösung Net-G oder Milch) inkubiert.

Anschließend wurde die Membran mit Net-G oder TBS/Tween drei Mal 5 Minuten gewaschen und mit dem zweiten Antikörper anti-rabbit-Antikörper (1:10.000) versetzt, welcher gegen Strukturen des ersten Antikörpers gerichtet ist. Durch wiederholtes Waschen im Anschluss konnte der Antikörperüberschuss entfernt werden.

Durch Behandlung der Membran mit einer ECL-Lösung bestehend aus 1.800 µl H₂O, 100 µl Peroxid und 100 µl Luminol konnte nachfolgend die Entwicklung auf Röntgenfilmen oder die Detektion der Antikörperbanden unter Lichtausschluss im ChemiBis erfolgen. Die Dichten der Banden wurden mit dem Programm „TotalLab“ quantifiziert.

Um die Membran für weitere Analysen vorzubereiten, wurde diese mit einem Mild Stripping Buffer behandelt, anschließend mit PBS und TBS/Tween gewaschen und schließlich mit Net-G oder Milchpuffer geblockt.

Die erneute Immundetektion erfolgte wie oben beschrieben für das Protein β -Aktin als Kontrollprotein.

4.6 Bestimmung der metabolischen Aktivität als Maß für Proliferation mittels MTT-Test

4.6.1 Hintergrund

Der MTT-Test kann genutzt werden, um Proliferation und Aktivierung von Zellen zu messen. Mit Hilfe des Tests kann die Aktivität von Dehydrogenasen in Mitochondrien bestimmt werden. Es findet die Reduktion des 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfonphenyl)-2H-Tetrazolium-Ring-Salzes (MTS) in blau-violettes, alkohollösliches Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen statt. Die Absorbanz des Farbstoffes bei 492 nm ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden, kernhaltigen Zellen und kann photometrisch mit dem Elisa-Reader gemessen werden. Proliferierende Zellen sind metabolisch aktiver als nicht-proliferierende Zellen, sodass mit Hilfe des MTT-Tests die Zellaktivierung bestimmt werden kann. Je höher die Zellzahl, desto mehr Farbstoff entsteht, desto höher ist die Absorbanz (Mosmann 1983).

4.6.2 Durchführung

Da zu Beginn unserer Versuchsreihe die JEG3-Zellen nach Zugabe von 5 % Humanserum abstarben, wollten wir mittels MTT-Test herausfinden, welche Humanserumkonzentration und welche Zellzahl einen negativen Einfluss auf die metabolische Aktivität von JEG3-Zellen haben könnten und ob sich die Zugabe von GSS, NSS und PES auf die Proliferationsrate von JEG3-Zellen auswirken würde.

Für den CellTiter 96[®] One Solution Cell Proliferation Assay wurden die JEG3-Zellen trypsiniert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden in Triplikaten in einer Zahl von 5.000, 10.000 und 20.000 Zellen auf je drei 96-Wellplatten ausgesät und mit Nährlösung (F12-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum und mit 2 % Penicillin/Streptomycin) versetzt, sodass sich in jedem Well 100 µl befanden. Anschließend wurde den Zellen nach folgendem Ansatz (siehe Tabelle 2) kein (Kontrolle), 1 %, 2 % oder 5 % Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum zugegeben.

Tabelle 2: Bestückung der 96-Wellplatte zur Durchführung des Proliferationsassays ohne (Kontrolle) und mit Probandenserum. Es wurden jeweils drei Messungen für jede Zellzahl und Serumzusammensetzung durchgeführt. Mit x sind befüllte Kammern gekennzeichnet.

	5.000 Zellen			10.000 Zellen			20.000 Zellen					
Kontrolle	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5.000 + GSS 5 %		
+NSS 1 %	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10.000 + NSS 5 %		
+GSS 1 %	x	x	x	x	x	x	x	x	x	20.000 + GSS 5 %		
+PES 1 %	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5.000 + PES 5 %		
+NSS 2 %	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10.000 + PES 5 %		
+GSS 2 %	x	x	x	x	x	x	x	x	x	20.000 + PES 5 %		
+PES 2 %	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
+NSS 5 %	x	x	x	x	x	x	x	x	x			

Die Absorbanzmessung mittels Elisa-Reader bei 492 nm erfolgte nach 4h, 24h und 48h jeweils 4h nach Zugabe von 20 µl MTS-Lösung, welche mit einer 8-Kanal-Pipette auf die Wells aufgebracht wurde. Den 1. Messzeitpunkt definierten wir als 0h.

Der Proliferationsassay wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

4.7 Apoptose-Assay mittels Annexin V via Durchflusszytometrie

4.7.1 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorter) dient der Analyse von Einzelzellen anhand ihrer Eigenschaften. Die Zellen passieren einen Laser, welcher Licht bestimmter Wellenlängen sendet. Dieses Licht wird über eine Fokussierungslinse gebündelt und auf die Proben geleitet. Je nach Größe und Granularität streuen die Proben das auftreffende Licht unterschiedlich.

Nur wenige Zellen emittieren allein fluoreszierendes Licht, daher werden fluoreszierende Farbstoffe verwendet, welche an Zellbestandteile binden. Ein Teil des Laser-Lichtes wird durch Fluorochrome absorbiert und die Elektronen in den Farbstoffen können auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Fallen die Elektronen auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, geben sie Energie in Form von Photonen ab. Die Energie wird durch einen Photodetektor registriert und ist dem gebundenen Farbstoff proportional.

Durch verschiedenfarbige Laser und Filter kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe pro Messung erhöht werden.

4.7.2 Apoptose-Assay

Apoptose ist der Prozess des programmierten Zelltodes, der in verschiedenen Stadien abläuft: Schrumpfung der Zelle, Kondensation und Fragmentierung der DNA, Abbau der Mitochondrien, Bildung von Apoptosekörpern durch Zellfragmentierung und Änderung der Oberflächenstruktur der Zelle zur leichteren Phagozytose durch Makrophagen. Hierbei verliert die Zellmembran unter anderem N-Acetylneuraminsäure und exprimiert Phosphatidylserin auf der Oberfläche.

Die Zellmembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht. In der äußeren Schicht findet man bevorzugt Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, während die innere Schicht in höherem Maße aus Phosphatidylserin besteht.

Durch Kombination von FITC und Annexin V sowie der Färbung mit Propidium-Iodid (PI) ist eine Identifikation und Quantifizierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen mit dem FACS möglich.

In der frühen apoptotischen Zelle wird Phosphatidylserin nach Kernkondensations-Beginn nach außen verlagert. An dieses negativ-geladene Phosphatidylserin bindet Annexin V in Anwesenheit von Calcium-Ionen. Die Zellen sind aber noch PI-negativ, da ihre Plasmamembranen noch intakt sind.

Bei spät apoptotischen oder nekrotischen Zellen ist die Plasmamembran permeabel, PI kann eindringen und die DNA färben. Diese Zellen sind Annexin-V-FITC- und PI-positiv.

4.7.2.1 Durchführung

Zunächst wurden die JEG3-Zellen auf 6-Wellplatten in angegebener Weise (Tabelle 3 und 4) ausgesät, mit Medium, FKS und Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert und mit Gesund-Schwangerem- oder Präeklampsie-Serum (PES 1) jeweils einer Probandin versetzt.

Tabelle 3: Bestückung der 6-Wellplatte mit JEG3-Zellen, Medium und Gesund-Schwangeren-Serum einer Probandin zur Probengewinnung für den Apoptoseassay

Medium + FKS	Medium + FKS + 1 % GSS	-
Medium + FKS + 2 %GSS	Medium + FKS + 5 % GSS	-

Tabelle 4: Bestückung der 6-Wellplatte mit JEG3-Zellen, Medium und Präeklampsie-Serum (PES 1) einer Probandin zur Probengewinnung für den Apoptoseassay

Medium + FKS	Medium + FKS + 1 % PES 1	-
Medium + FKS + 2 % PES 1	Medium + FKS + 5 % PES 1	-

Alle zwei Tage erfolgte ein Medium- und Serum-Wechsel. Nach sieben Tagen der Zellkultivierung wie oben beschrieben, wurden die Proben am FACS gemessen.

Die Zellen wurden durch Zusatz von 200 µl Trypsin von den Wells gelöst, in Eppendorfgefäße aufgenommen und bei 2.500 U für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 100 µl Annexin-V-PBS-Bindepuffer 1:10 resuspendiert.

Je 25 µl der Probe wurden mit 1 µl Annexin-V-FITC versetzt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 30 Minuten inkubiert.

Kurz vor der Messung wurde den Proben jeweils 1 µl PI zugegeben. Anschließend konnten die gefärbten Proben im Durchflusszytometer gemessen werden.

Zur Erstellung einer FACS-Messvorlage wurden Zellen ungefärbt, nur mit Annexin-FITC-gefärbt und nur mit PI-gefärbt bestimmt.

Als Positivkontrolle (sichere Apoptose) wurde eine Probe 10 Minuten mit UV-Licht bestrahlt und anschließend der Färbung und Messung zugeführt.

Mittels „Cell Quest Pro“ wurden 10.000 Zellen in einem festgelegtem Bereich gezählt.

Wir führten den Apoptose-Assay einmal durch.

Dieser Versuch diente ebenso wie der Proliferationsassay der Überprüfung der potenziellen Beeinflussung oder eventuellen Zytotoxizität von Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum in steigender Konzentration auf JEG3-Zellkulturen.

4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten des Western Blots erfolgte durch Berechnung der Mittelwerte sowie des Standardfehlers als Maß für die Güte der ermittelten Mittelwerte durch Microsoft Excel 2010.

Signifikanzen wurden mit SPSS 17,0 berechnet. Die Signifikanzanalyse der Western Blots erfolgte mittels des ungepaarten t-Tests nach Welch.

Die Proliferationsassays wurden mit der mehrfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit SPSS 17,0 ausgewertet. Als abhängige Variable definierten wir die relative optische Dichte (OD) als Maß für die metabolische Aktivität. Wir unterschieden nach den Faktoren Messzeitpunkt (0h, 24h und 48h), Serumkonzentration (1 %, 2 % und 5 %) und Zusammensetzung des Serums (Nicht-schwanger, Gesund-schwanger und PE). Bei der Varianzanalyse des Proliferationsassays mit 5.000, 10.000 und 20.000 Zellen war der Levene-Test auf Varianzhomogenität signifikant, sodass nicht von homogenen Varianzen für die abhängige Variable ausgegangen werden konnte. Wir führten daher zur Korrektur eine Welch-ANOVA und einen post-Hoc-Test nach Games-Howell für den Messzeitpunkt durch.

Die Korrelation zwischen der Proteinexpression von p-STAT3 und der Schwangerschaftswoche wurde durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson mit SPSS 17,0 bestimmt.

Das Signifikanzniveau wurde jeweils bei $p < 0,05$ erreicht.

Die Graphiken zur Auswertung der Western Blots und des Apoptoseassays wurden mit Microsoft Excel 2010, die Graphiken zur Auswertung des Proliferationsassays mit SPSS 17,0 erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse des Proliferationsassays

Die Durchführung des Proliferationsassays erfolgte, um den Einfluss von Messzeitpunkt, steigender Konzentrationen und Zusammensetzung von humanem Serum auf die metabolische Aktivität von JEG3-Zellen zu überprüfen. Wir untersuchten die optische Dichte als Maß für die metabolische Aktivität von JEG3-Zellen in steigender Zellzahl (5.000, 10.000 und 20.000 Zellen) nach Stimulation mit 1 %, 2 % und 5 % Gesund-Schwangeren-, Nicht-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum jeweils einer Probandin nach 24h und 48h. Den 1. Messzeitpunkt definierten wir als 0h, die Messung der Absorbanz erfolgte 4h nach Zugabe von 20 µl MTS-Lösung.

In bisher erschienenen Studien wurden Humanserumkonzentrationen von 10 % verwendet (Mahameed et al. 2005).

5.1.1 Proliferationsassay mit 5.000 JEG3-Zellen

In Tabelle 5 sind die relativen Mittelwerte der optischen Dichte als Maß für die metabolische Aktivität sowie deren Standardfehler für 5.000 JEG3-Zellen pro Well bei Inkubation dieser mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum nach 0h, 24h und 48h dargestellt.

Tabelle 5: Darstellung der relativen Mittelwerte der metabolischen Aktivität und der Standardfehler für **5.000 JEG3-Zellen** nach Inkubation mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum nach 0h, 24h und 48h. Als Maß diente die Absorbanz bei 490 nm. Es wurden zwei unabhängige Proliferationsassays mit jeweils drei Messungen für 1 % und 2 % NSS, GSS und PES durchgeführt. Für die Messung mit 5 % Serum konnten nur drei Messwerte (d. h. nur Werte eines Ansatzes) verwendet werden.

Messzeitpunkt	Konzentration des Serums	Mittelwerte der metabolischen Aktivität	Standardfehler	Anzahl der Messungen
Nicht-Schwangeren-Serum				
nach 0h	1 %	0,893	0,147	6
	2 %	0,874	0,136	6
	5 %	0,900	0,035	3
nach 24h	1 %	1,280	0,077	6
	2 %	1,192	0,058	6
	5 %	1,195	0,035	3
nach 48h	1 %	1,392	0,084	6
	2 %	1,442	0,121	6
	5 %	1,653	0,072	3
Gesund-Schwangeren-Serum				
nach 0h	1 %	0,898	0,139	6
	2 %	0,827	0,176	6
	5 %	0,993	0,032	3
nach 24h	1 %	1,189	0,082	6
	2 %	1,210	0,165	6
	5 %	1,143	0,042	3
nach 48h	1 %	1,331	0,053	6
	2 %	1,346	0,126	6
	5 %	1,405	0,114	3
Präeklampsie-Serum				
nach 0h	1 %	1,012	0,138	6
	2 %	0,819	0,166	6
	5 %	0,746	0,213	3
nach 24h	1 %	1,250	0,049	6
	2 %	1,176	0,087	6
	5 %	1,237	0,029	3
nach 48h	1 %	1,501	0,054	6
	2 %	1,389	0,127	6
	5 %	1,338	0,172	3

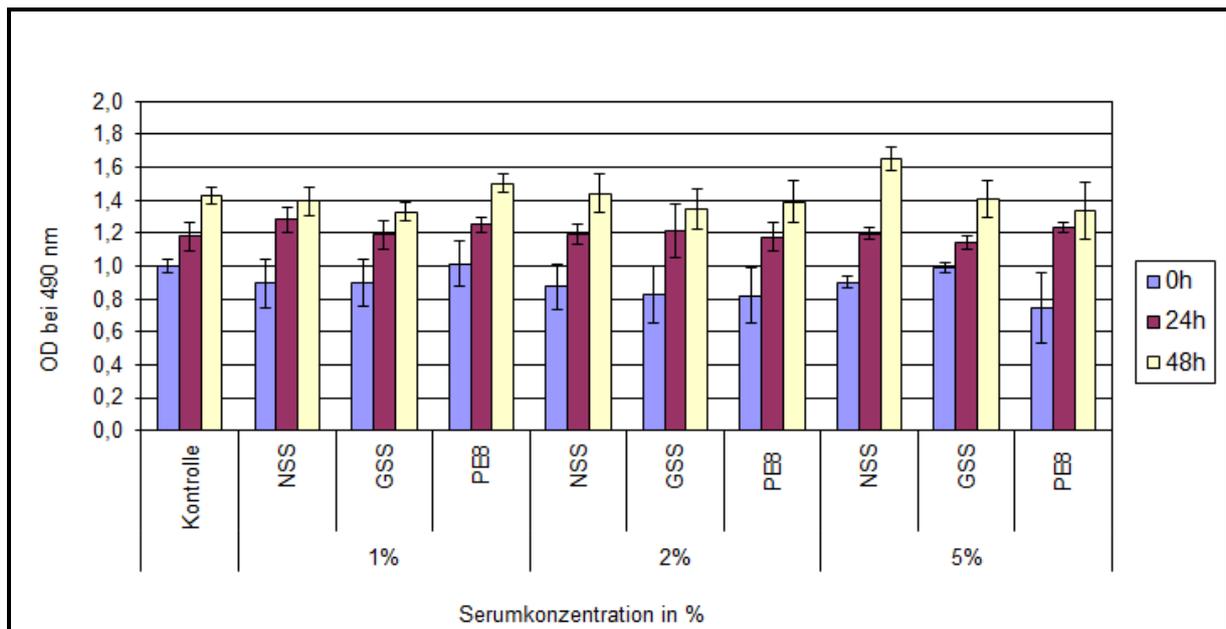


Abb. 9: Proliferationsassay mit **5.000 JEG3-Zellen** in Abhängigkeit von Probandenserum aus Tabelle 5. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität nach 0h, 24h und 48h sowie die jeweiligen Standardfehler. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der Absorbanzen von 5.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Die Messungen erfolgten nach Zugabe von Nicht-Schwangeren-Serum, Gesund-Schwangeren-Serum und PE-Serum (PE8) jeweils einer Probandin.

Die Messzeitpunkte von 0h, 24h und 48h haben einen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität von 5.000 JEG3-Zellen, wenn diese allein ohne Einfluss von Konzentration und Zusammensetzung des Serums betrachtet werden ($p < 0,001$) (Abb. 10). Der Mittelwert der optischen Dichte bei 490 nm zum Zeitpunkt 0h liegt bei 0,885 (95 % CI; 0,816 – 0,953), zum Zeitpunkt 24h bei 1,212 (95 % CI; 1,173 – 1,251) und zum Zeitpunkt 48h bei 1,414 (95 % CI; 1,362 – 1,467). Die metabolische Aktivität steigt signifikant von 0h zu 24h und von 24h zu 48h, jeweils $p < 0,001$ (Abb. 10). In die Ermittlung des jeweiligen relativen Mittelwertes nahmen wir alle Werte der zwei Versuchsreihen zu den Messzeitpunkten 0h, 24h und 48h auf, unabhängig von Konzentration und Zusammensetzung des Probandenserums, sodass wir eine Fallzahl von $n = 45$ erhielten.

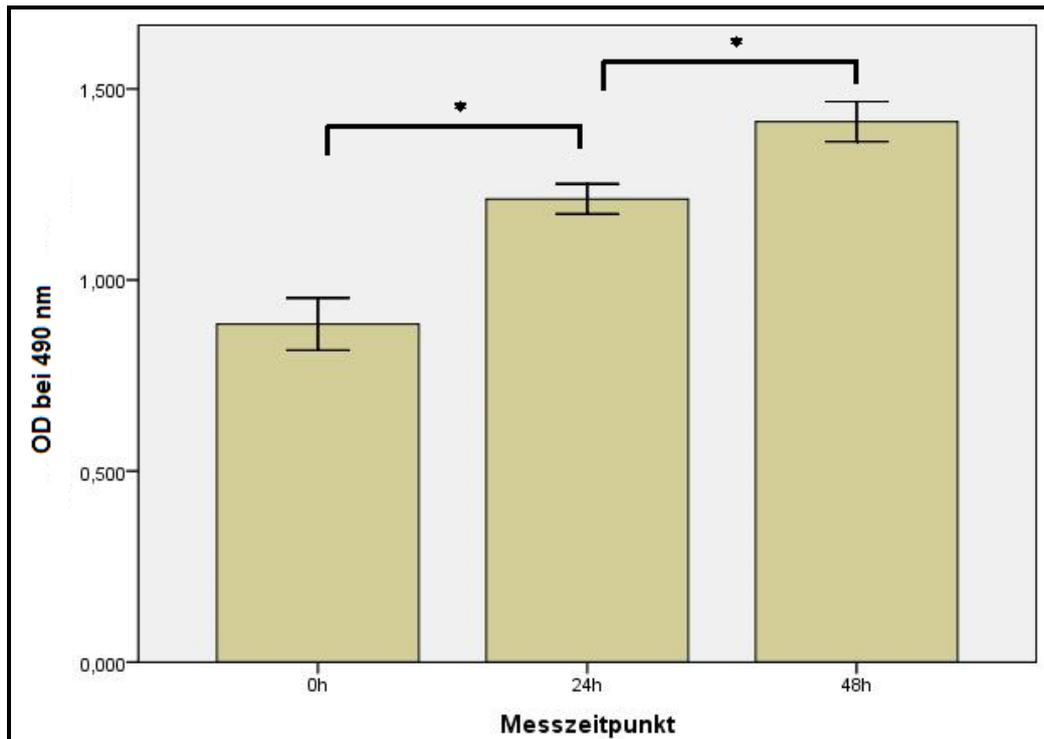


Abb. 10: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität zu den **Messzeitpunkten 0h** ([M]; 0,885; 95 % CI; 0,816 – 0,953), **24h** ([M]; 1,212; 95 % CI; 1,173 – 1,251) und **48h** ([M]; 1,414; 95 % CI; 1,362 – 1,467) von **5.000 JEG3-Zellen** unabhängig von Konzentration und Zusammensetzung des Probandenserums, jeweils n = 45. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der optischen Dichte von 5.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Die Abbildung zeigt die relativen Mittelwerte der OD mit 95 %-Konfidenzintervall sowie die relevanten Signifikanzen (gekennzeichnet mit *, Welch-ANOVA, jeweils $p < 0,001$).

Betrachtet man die Serumkonzentration von 1 %, 2 % oder 5 % unabhängig von Messzeitpunkt und Serumzusammensetzung, findet man, dass diese keinen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität der 5.000 JEG-3-Zellen hat ($p = 0,354$). Der Mittelwert der optischen Dichte bei 490 nm bei einer Serumkonzentration von 1 % liegt bei 1,193 (95 % CI; 1,234 – 1,262; n = 54), bei 2 % bei 1,142 (95 % CI; 1,058 – 1,226; n = 54) und bei 5 % bei 1,182 (95 % CI; 1,063 – 1,300; n = 27) (Abb. 9+11). In die Ermittlung des jeweiligen relativen Mittelwertes der optischen Dichte nahmen wir alle Werte der zwei Versuchsreihen mit einer Konzentration von jeweils 1 %, 2 % und 5 % auf, unabhängig vom Messzeitpunkt und Zusammensetzung des Probandenserums, sodass wir für die Konzentrationen von 1 % und 2 % eine Fallzahl von jeweils n = 54 erhielten. Für die Messungen mit 5 % Serum konnten nur je drei Messwerte verwendet werden, sodass wir eine Fallzahl von n = 27 erreichten.

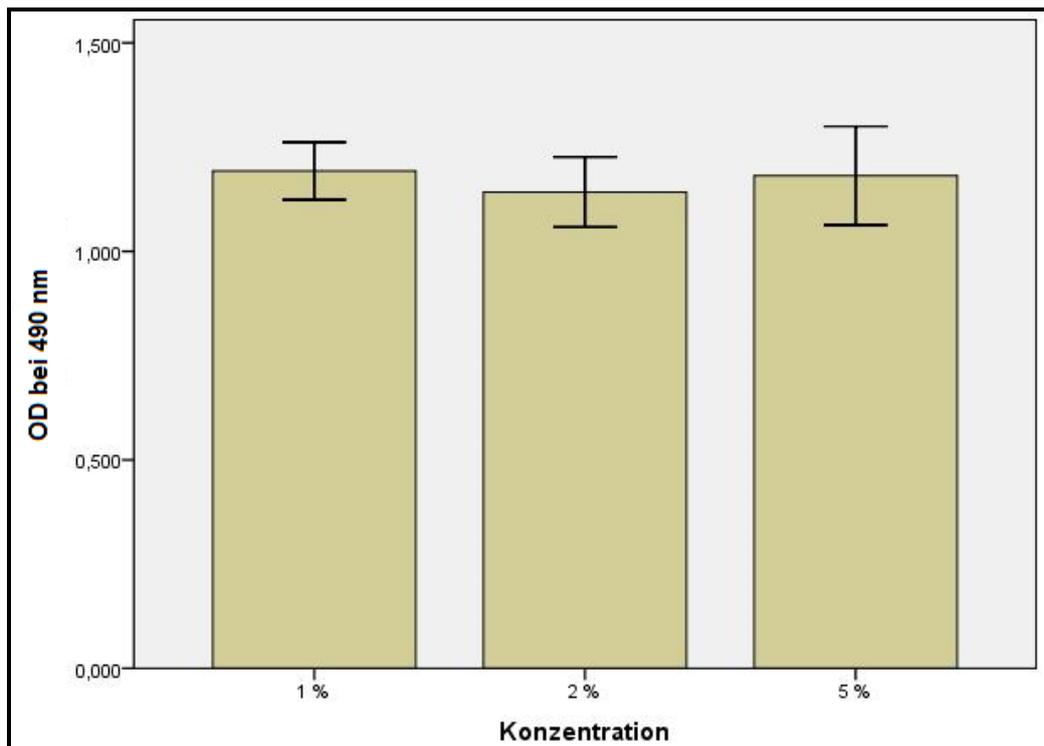


Abb. 11: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität bei Zugabe von **1 %**, ([M]; 1,193; 95 % CI; 1,234 – 1,262; n = 54), **2 %** ([M]; 1,142; 95 % CI; 1,058 – 1,226; n = 54) und **5 %** ([M]; 1,182; 95 % CI; 1,063 – 1,300; n = 27) **Probandenserum** zu **5.000 JEG3-Zellen** unabhängig von Messzeitpunkt und Zusammensetzung des Serums. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der optischen Dichte von 5.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Die Abbildung zeigt die relativen Mittelwerte der OD mit 95 %-Konfidenzintervall.

Ebenso zeigt sich, dass die Zusammensetzung des Serums (Nicht-Schwangeren-Serum, Gesund-Schwangeren-Serum und PE-Serum), unabhängig von Messzeitpunkt und Serumkonzentration, keinen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität der 5.000 JEG-3-Zellen hat ($p = 0,397$). Der relative Mittelwert der optischen Dichte bei 490 nm bei Zugabe von Nicht-Schwangeren-Serum liegt bei 1,194 (95 % CI; 1,107 – 1,281), bei Gesund-Schwangeren-Serum bei 1,142 (95 % CI; 1,061 – 1,223) und bei PE bei 1,175 (95 % CI; 1,086 – 1,265), jeweils $n = 45$ (Abb. 9+12). In die Ermittlung des jeweiligen relativen Mittelwertes nahmen wir alle Werte der zwei Versuchsreihen unterschieden nach Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und PE-Serum auf, unabhängig von Messzeitpunkt und Konzentration, sodass wir eine Fallzahl von $n = 45$ erhielten.

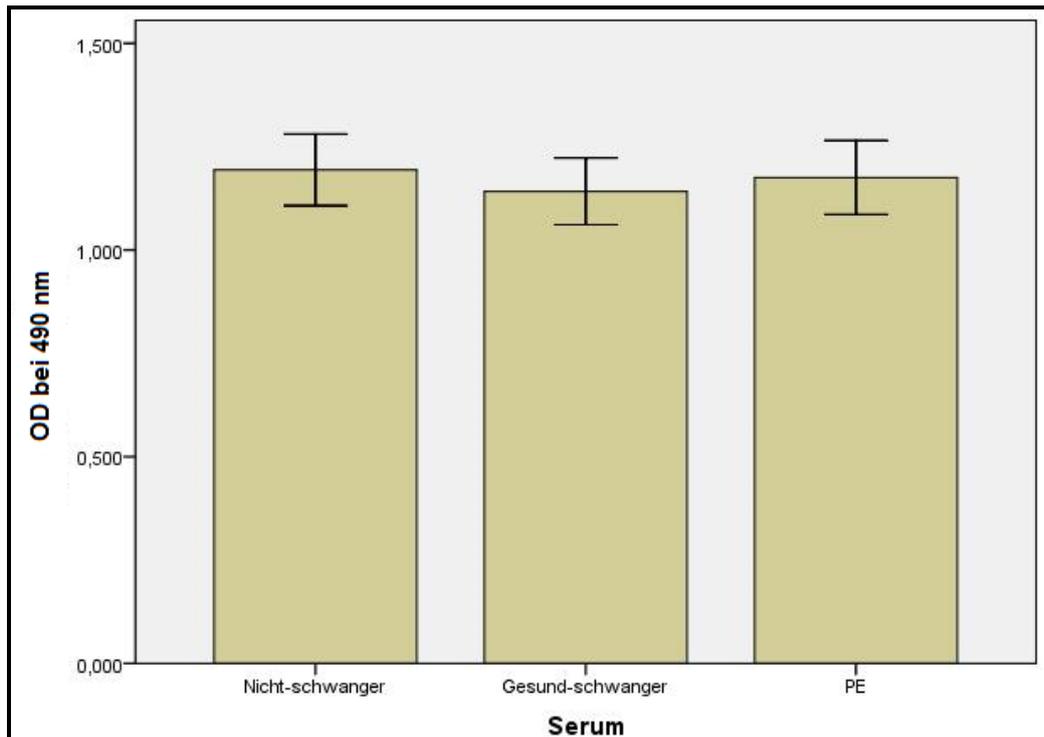


Abb. 12: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität in Abhängigkeit der **Serumzusammensetzung Nicht-schwanger** ([M]; 1,194; 95 % CI; 1,107 – 1,281), **Gesund-schwanger** ([M]; 1,142; 95 % CI; 1,061 – 1,223) und **PE** ([M]; 1,175; 95 % CI; 1,086 – 1,265) bei **5.000 JEG3-Zellen** unabhängig von Messzeitpunkt und Konzentration, jeweils n = 45. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der optischen Dichte von 5.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Die Abbildung zeigt die relativen Mittelwerte der OD mit 95 %-Konfidenzintervall.

Der Effekt des Messzeitpunktes auf die metabolische Aktivität der 5.000 JEG3-Zellen ist unabhängig von der Konzentration ($p = 0,798$) und Zusammensetzung des Serums ($p = 0,630$) (Abb. 9).

Weiterhin können wir keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität der 5.000 JEG3-Zellen finden, wenn Konzentration und Zusammensetzung des Serums gemeinsam betrachtet werden ($p = 0,279$) (Abb. 9).

5.1.2 Proliferationsassay mit 10.000 JEG3-Zellen

In Tabelle 6 sind die relativen Mittelwerte der metabolischen Aktivität sowie deren Standardfehler für 10.000 JEG3-Zellen pro Well bei Inkubation dieser mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum nach 0h, 24h und 48h dargestellt.

Tabelle 6: Darstellung der relativen Mittelwerte der metabolischen Aktivität und der Standardfehler für **10.000 JEG3-Zellen** nach Inkubation mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum nach 0h, 24h und 48h. Als Maß diente die Absorbanz bei 490 nm. Es wurden zwei unabhängige Proliferationsassays mit jeweils drei Messungen für 1 % und 2 % NSS, GSS und PES durchgeführt. Für die Messung mit 5 % Serum konnten nur drei Messwerte (d. h. nur Werte eines Ansatzes) verwendet werden.

Messzeitpunkt	Konzentration des Serums	Mittelwerte der metabolischen Aktivität	Standardfehler	Anzahl der Messungen
Nicht-Schwangeren-Serum				
nach 0h	1 %	0,891	0,173	6
	2 %	0,918	0,147	6
	5 %	0,913	0,105	3
nach 24h	1 %	1,129	0,163	6
	2 %	1,059	0,118	6
	5 %	1,006	0,106	3
nach 48h	1 %	0,965	0,110	6
	2 %	1,017	0,109	6
	5 %	1,014	0,106	3
Gesund-Schwangeren-Serum				
nach 0h	1 %	0,827	0,135	6
	2 %	0,830	0,166	6
	5 %	0,959	0,111	3
nach 24h	1 %	1,016	0,107	6
	2 %	1,040	0,138	6
	5 %	0,998	0,111	3
nach 48h	1 %	0,974	0,127	6
	2 %	0,951	0,123	6
	5 %	0,936	0,120	3
Präeklampsie-Serum				
nach 0h	1 %	0,882	0,231	6
	2 %	0,957	0,282	6
	5 %	0,815	0,357	3
nach 24h	1 %	1,067	0,108	6
	2 %	0,908	0,185	6
	5 %	1,121	0,117	3
nach 48h	1 %	0,998	0,112	6
	2 %	0,930	0,212	6
	5 %	0,923	0,329	3

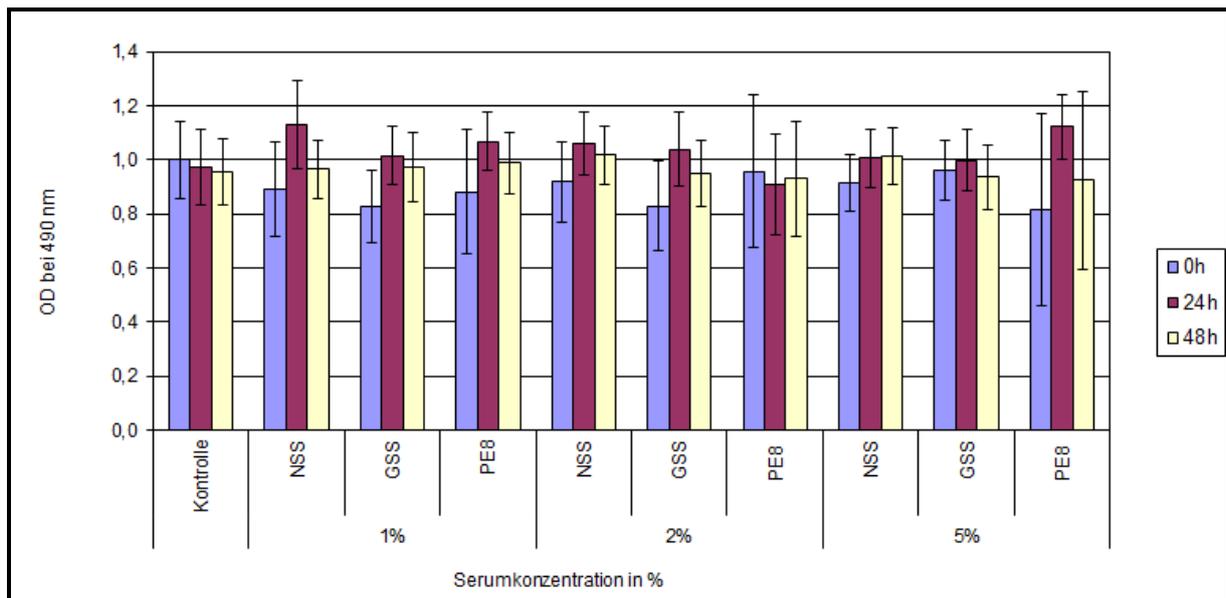


Abb. 13: Proliferationsassay mit **10.000 JEG3-Zellen** in Abhängigkeit von Probandenserum aus Tabelle 7. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der optische Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität nach 0h, 24h und 48h sowie die jeweiligen Standardfehler. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der Absorbanzen von 10.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Die Messungen erfolgten nach Zugabe von Nicht-Schwangeren-Serum, Gesund-Schwangeren-Serum und PE-Serum (PE8) jeweils einer Probandin.

Die Messzeitpunkte von 0h, 24h und 48h haben einen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität von 10.000 JEG3-Zellen, wenn diese allein ohne Einfluss von Konzentration und Zusammensetzung des Serums betrachtet werden ($p < 0,001$).

Der Mittelwert der optischen Dichte bei 490 nm zum Zeitpunkt 0h liegt bei 0,875 (95 % CI; 0,833 – 0,917), zum Zeitpunkt 24h bei 1,029 (95 % CI; 0,995 – 1,064) und zum Zeitpunkt von 48h bei 0,961 (95 % CI; 0,926 – 0,995), jeweils $n = 45$. Die metabolische Aktivität steigt signifikant von 0h zu 24h ($p < 0,001$) und fällt von 24h zu 48h ($p = 0,016$) (Abb. 14). Auch zwischen den Zeitpunkten 0h und 48h besteht ein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate ($p = 0,006$) (Abb. 14). In die Ermittlung des jeweiligen relativen Mittelwertes nahmen wir alle Werte der zwei Versuchsreihen zu den Messzeitpunkten 0h, 24h und 48h auf, unabhängig von Konzentration und Zusammensetzung des Probandenserums, sodass wir eine Fallzahl von $n = 45$ erhielten.

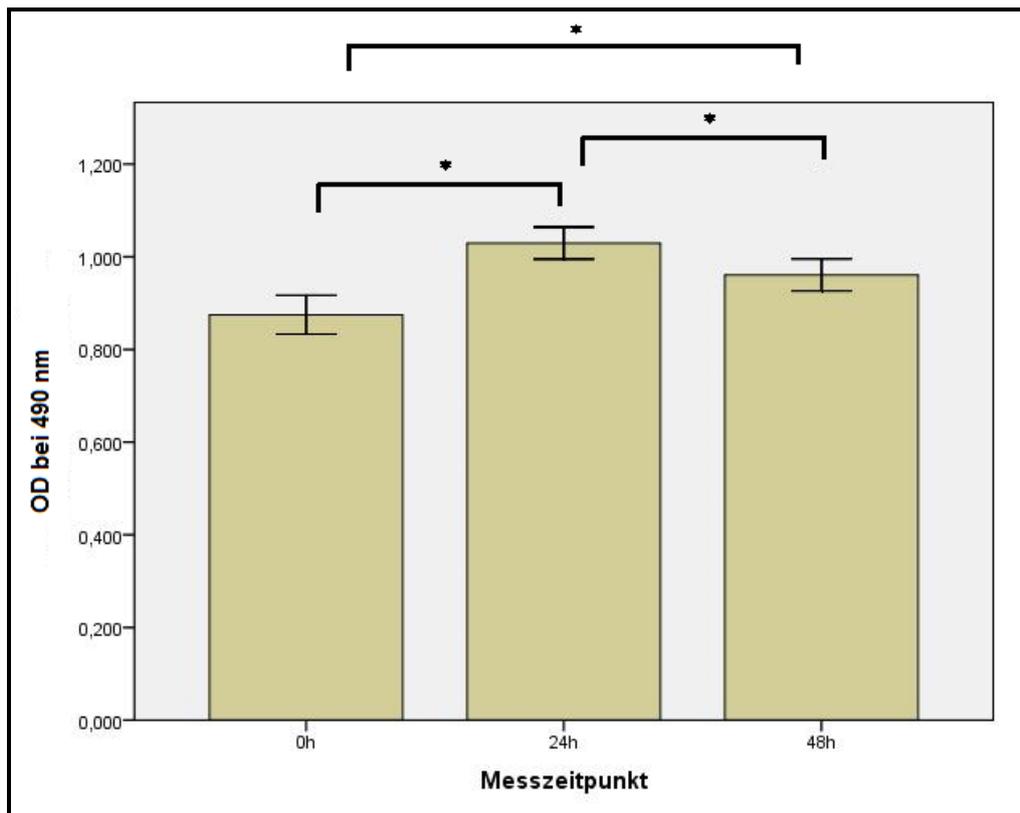


Abb. 14: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität zu den **Messzeitpunkten 0h** ([M]; 0,875; 95 % CI; 0,833 – 0,917), **24h** ([M]; 1,029; 95 % CI; 0,995 – 1,064) und **48h** ([M]; 0,961; 95 % CI; 0,926 – 0,995) von **10.000 JEG3-Zellen** unabhängig von Konzentration und Zusammensetzung des Probandenserums, jeweils n = 45. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der optischen Dichte von 10.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Die Abbildung zeigt die relativen Mittelwerte der OD mit 95 %-Konfidenzintervall und relevanten Signifikanzen (gekennzeichnet mit *, Welch-ANOVA, jeweils $p < 0,05$).

Betrachtet man die Serumkonzentration von 1 %, 2 % oder 5 % unabhängig von Messzeitpunkt und Serumzusammensetzung, findet man, dass diese keinen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität der 10.000 JEG-3-Zellen hat ($p = 0,203$). Der Mittelwert der optischen Dichte bei 490 nm bei einer Serumkonzentration von 1 % liegt bei 0,972 (95 % CI; 0,934 – 1,011; n = 54), bei 2 % bei 0,955 (95 % CI; 0,920; n = 54) und bei 5 % bei 0,920 (95 % CI; 0,862 – 0,979; n = 27) (Abb. 13+15). In die Ermittlung des jeweiligen relativen Mittelwertes der optischen Dichte nahmen wir alle Werte der zwei Versuchsreihen mit einer Konzentration von jeweils 1 %, 2 % und 5 % auf, unabhängig vom Messzeitpunkt und Zusammensetzung des Probandenserums, sodass wir für die Konzentrationen von 1 % und 2 % eine Fallzahl von jeweils n = 54 erhielten. Für die Messungen mit 5 % Serum konnten insgesamt nur je drei Messwerte verwendet werden, sodass wir eine Fallzahl von n = 27 erreichten.

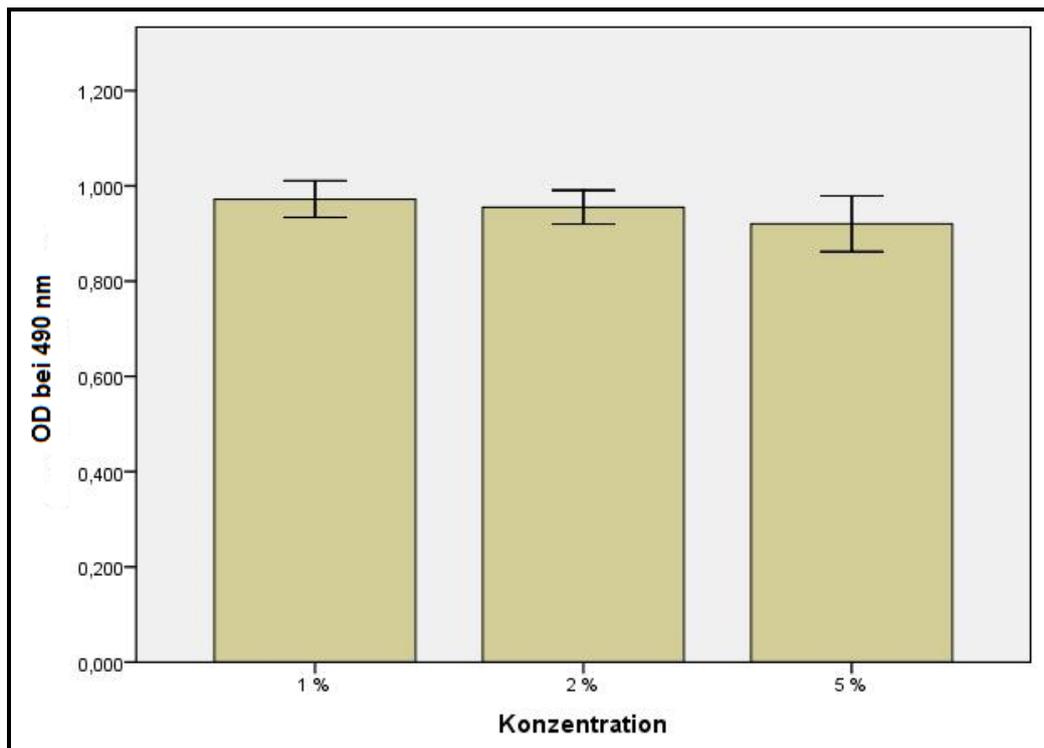


Abb. 15: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität bei Zugabe von **1 %**, ([M]; 0,972, 95 % CI; 0,934 – 1,011; n = 54), **2 %** ([M]; 0,955, 95 % CI; 0,920; n = 54) und **5 %** ([M]; 0,920, 95 % CI; 0,862 – 0,979; n = 27) **Probandenserum** zu **10.000 JEG3-Zellen** unabhängig von Messzeitpunkt und Zusammensetzung des Serums. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der optischen Dichte von 10.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der OD mit 95 %-Konfidenzintervall.

Ebenso zeigt sich, dass die Zusammensetzung des Serums (Nicht-Schwangeren-Serum, Gesund-Schwangeren-Serum und PE-Serum) unabhängig von Messzeitpunkt und Serumkonzentration keinen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität der 10.000 JEG-3-Zellen hat ($p = 0,223$). Der Mittelwert der optischen Dichte bei 490 nm bei Zugabe von Nicht-Schwangeren-Serum liegt bei 0,985 (95 % CI; 0,948 – 1,022), bei Gesund-Schwangeren-Serum bei 0,936 (95 % CI; 0,904 – 0,967) und bei PE bei 0,944 (95 % CI; 0,892 – 0,996), jeweils $n = 45$ (Abb. 13+16). In die Ermittlung des relativen Mittelwertes nahmen wir alle Werte der zwei Versuchsreihen unterschieden nach Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und PE-Serum auf, unabhängig von Messzeitpunkt und Konzentration, sodass wir eine Fallzahl von $n = 45$ erhielten.

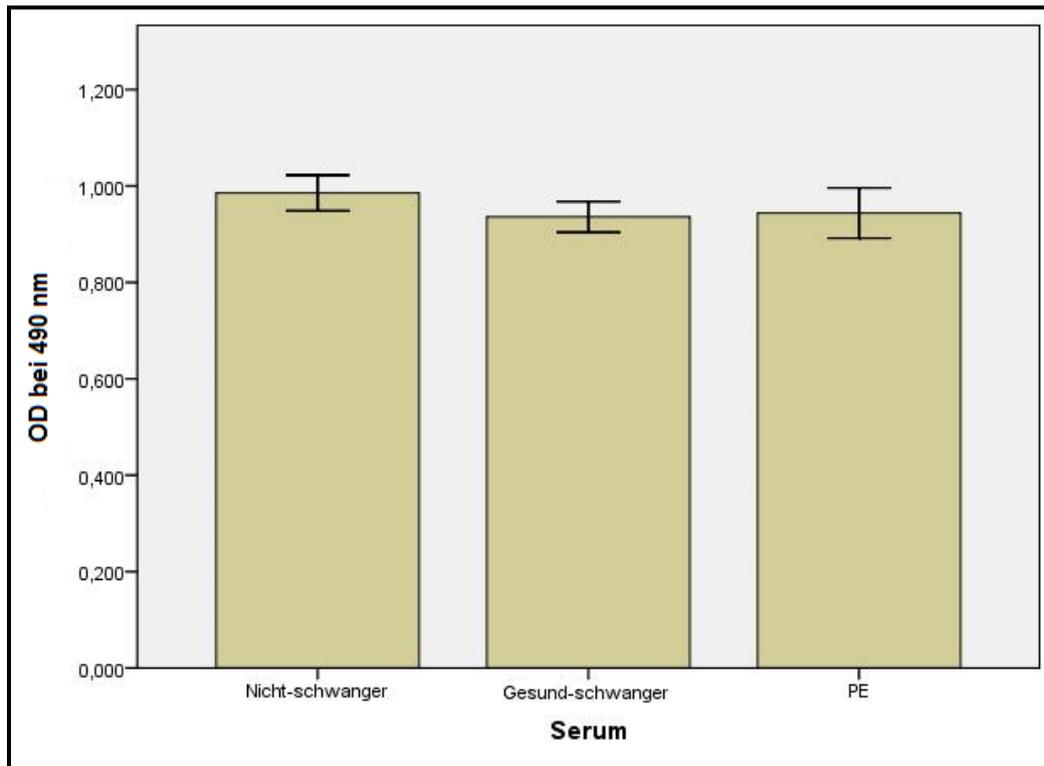


Abb. 16: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität in Abhängigkeit der **Serumzusammensetzung Nicht-schwanger** ([M]; 0,985; 95 % CI; 0,948 – 1,022), **Gesund-schwanger** ([M]; 0,936; 95 % CI; 0,904 – 0,967) und **PE** ([M]; 0,944; 95 % CI; 0,892 – 0,996) bei **10.000 JEG3-Zellen** unabhängig von Messzeitpunkt und Konzentration, jeweils n = 45. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der optischen Dichte von 10.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der OD mit 95 % Konfidenzintervall.

Der Effekt des Messzeitpunktes auf die metabolische Aktivität der 10.000 JEG3-Zellen ist unabhängig von der Konzentration ($p = 0,441$) und Zusammensetzung des Serums ($p = 0,995$) (Abb. 13).

Weiterhin können wir keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität der 10.000 JEG3-Zellen finden, wenn Konzentration und Zusammensetzung des Serums gemeinsam betrachtet werden ($p = 0,813$).

5.1.3 Proliferationsassay mit 20.000 JEG3-Zellen

In Tabelle 7 sind die relativen Mittelwerte der metabolischen Aktivität bei 490 nm sowie deren Standardfehler für 20.000 JEG3-Zellen pro Well bei Inkubation dieser mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum nach 0h, 24h und 48h dargestellt.

Tabelle 7: Darstellung der relativen Mittelwerte der metabolischen Aktivität und der Standardfehler für **20.000 JEG3-Zellen** nach Inkubation mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum nach 0h, 24h und 48h. Als Maß diente die Absorbanz bei 490 nm. Es wurden zwei unabhängige Proliferationsassays mit jeweils drei Messungen für 1 % und 2 % NSS, GSS und PES durchgeführt. Für die Messung mit 5 % Serum konnten nur drei Messwerte (d. h. nur Werte eines Ansatzes) verwendet werden.

Messzeitpunkt	Konzentration des Serums	Mittelwerte der metabolischen Aktivität	Standardfehler	Anzahl der Messungen
Nicht-Schwangeren-Serum				
nach 0h	1 %	0,901	0,385	6
	2 %	0,920	0,405	6
	5 %	0,896	0,345	3
nach 24h	1 %	0,738	0,353	6
	2 %	0,754	0,345	6
	5 %	0,713	0,345	3
nach 48h	1 %	0,537	0,335	6
	2 %	0,602	0,375	6
	5 %	0,425	0,494	3
Gesund-Schwangeren-Serum				
nach 0h	1 %	0,895	0,362	6
	2 %	0,855	0,337	6
	5 %	0,963	0,352	3
nach 24h	1 %	0,718	0,351	6
	2 %	0,745	0,353	6
	5 %	0,759	0,343	3
nach 48h	1 %	0,604	0,354	6
	2 %	0,575	0,372	6
	5 %	0,619	0,343	3
Präeklampsie-Serum				
nach 0h	1 %	0,933	0,381	6
	2 %	0,970	0,633	6
	5 %	0,650	0,697	3
nach 24h	1 %	0,769	0,353	6
	2 %	0,726	0,346	6
	5 %	0,735	0,343	3
nach 48h	1 %	0,604	0,347	6
	2 %	0,511	0,433	6
	5 %	0,620	0,357	3

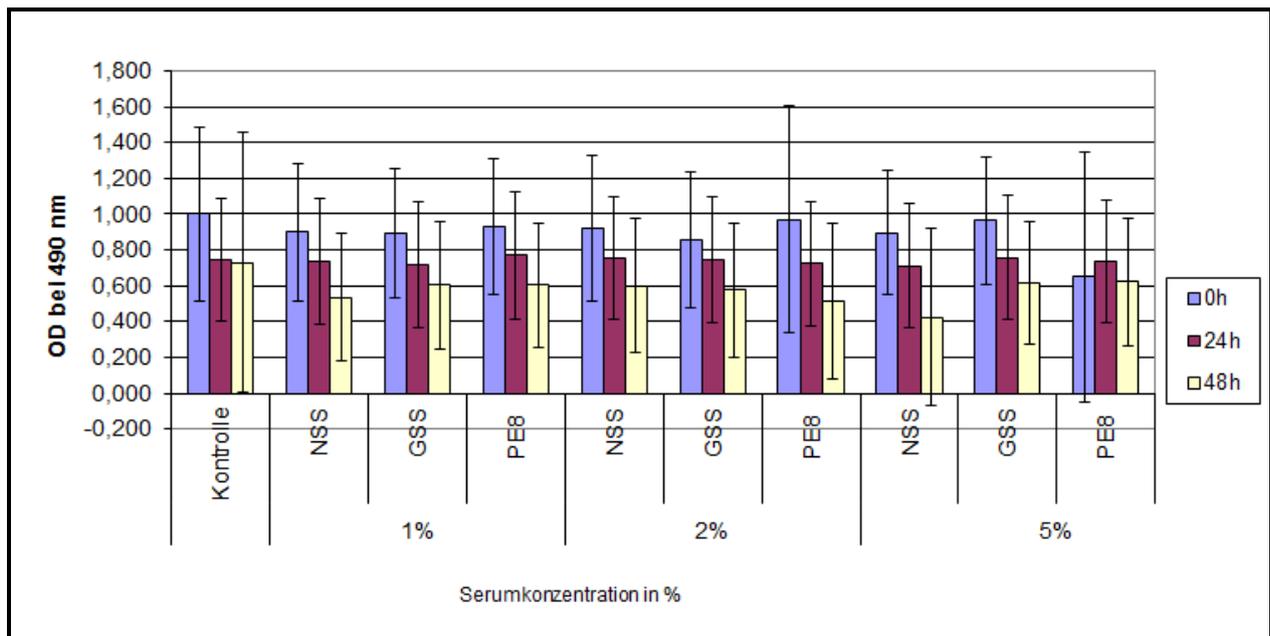


Abb. 17: Proliferationsassay mit **20.000 JEG3-Zellen** in Abhängigkeit von Probandenserum aus Tabelle 8. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität nach 0h, 24h und 48h sowie die jeweiligen Standardfehler. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der Absorbanzen von 20.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Die Messungen erfolgten nach Zugabe von Nicht-Schwangeren-Serum, Gesund-Schwangeren-Serum und PE-Serum (PE8) jeweils einer Probandin.

Die Messzeitpunkte von 0h, 24h und 48h haben einen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität von 20.000 JEG3-Zellen, wenn diese allein ohne Einfluss von Konzentration und Zusammensetzung des Serums betrachtet werden ($p < 0,001$).

Der Mittelwert der optischen Dichte bei 490 nm zum Zeitpunkt 0h liegt bei 0,910 (95 % CI; 0,852 – 0,967), zum Zeitpunkt 24h bei 0,746 (95 % CI; 0,733 – 0,760) und zum Zeitpunkt von 48h bei 0,575 (95 % CI; 0,539 – 0,612), jeweils $n = 45$. Die metabolische Aktivität sinkt signifikant von 0h zu 24h und von 24h zu 48h, jeweils $p < 0,001$ (Abb. 18). In die Ermittlung des relativen Mittelwertes nahmen wir alle Werte der zwei Versuchsreihen zu den Messzeitpunkten 0h, 24h und 48h auf, unabhängig von der Konzentration und Zusammensetzung des Probandenserums, sodass wir eine Fallzahl von $n = 45$ erhielten.

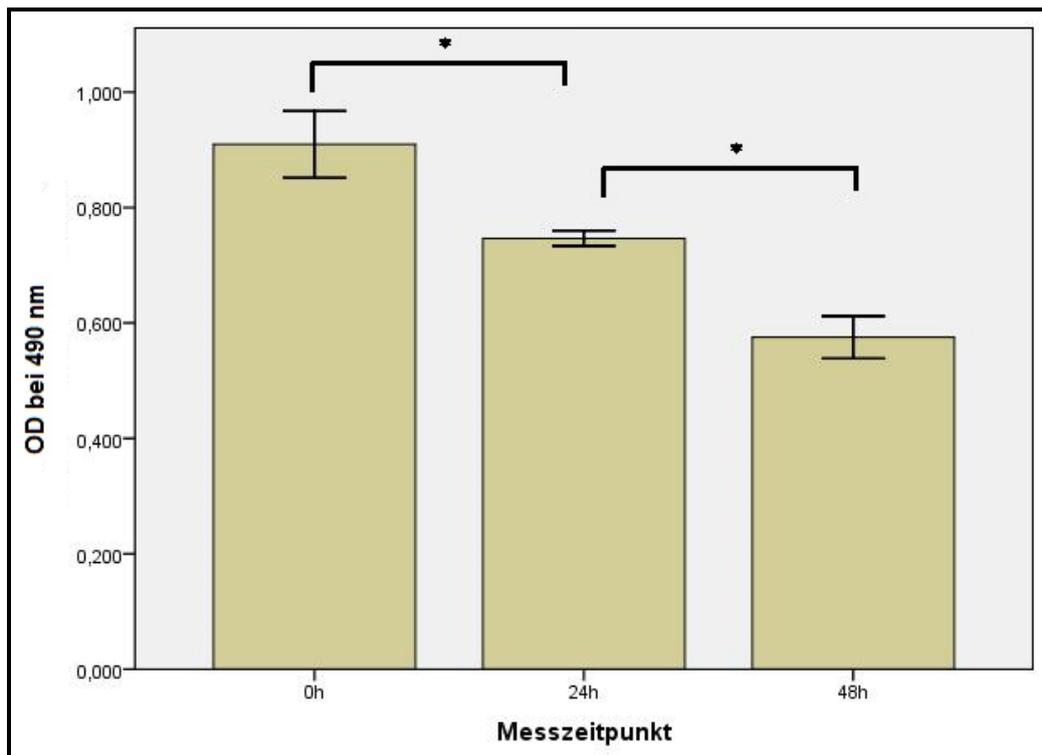


Abb. 18: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität zu den **Messzeitpunkten 0h** ([M]; 0,910; 95 % CI; 0,852 – 0,967), **24h** ([M]; 0,746; 95 % CI; 0,733 – 0,760) und **48h** ([M]; 0,575; 95 % CI; 0,539 – 0,612) von **20.000 JEG3-Zellen** unabhängig von Konzentration und Zusammensetzung des Probandenserums, jeweils n = 45. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der optischen Dichte von 10.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Die Abbildung zeigt die relativen Mittelwerte der OD mit 95 %-Konfidenzintervall sowie die relevanten Signifikanzen (gekennzeichnet mit *, Welch-ANOVA, jeweils $p < 0,001$).

Betrachtet man die Serumkonzentration von 1 %, 2 % oder 5 % unabhängig von Messzeitpunkt und Serumzusammensetzung, findet man, dass diese keinen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität der 20.000 JEG-3-Zellen hat ($p = 0,919$). Der Mittelwert der optischen Dichte bei 490 nm bei einer Serumkonzentration von 1 % liegt bei 0,749 (95 % CI; 0,704 – 0,794; n = 54), bei 2 % bei 0,743 (95 % CI; 0,686 – 0,800; n = 54) und bei 5 % bei 0,736 (95 % CI; 654 – 0,818; n = 27) (Abb. 17+19). In die Ermittlung des jeweiligen relativen Mittelwertes der optischen Dichte nahmen wir alle Werte der zwei Versuchsreihen mit einer Konzentration von jeweils 1 %, 2 % und 5 % auf, unabhängig vom Messzeitpunkt und Zusammensetzung des Probandenserums, sodass wir für die Konzentrationen von 1 % und 2 % eine Fallzahl von jeweils n = 54 erhielten. Für die Messungen mit 5 % Serum konnten insgesamt nur je drei Messwerte verwendet werden, sodass wir eine Fallzahl von n = 27 erreichten.

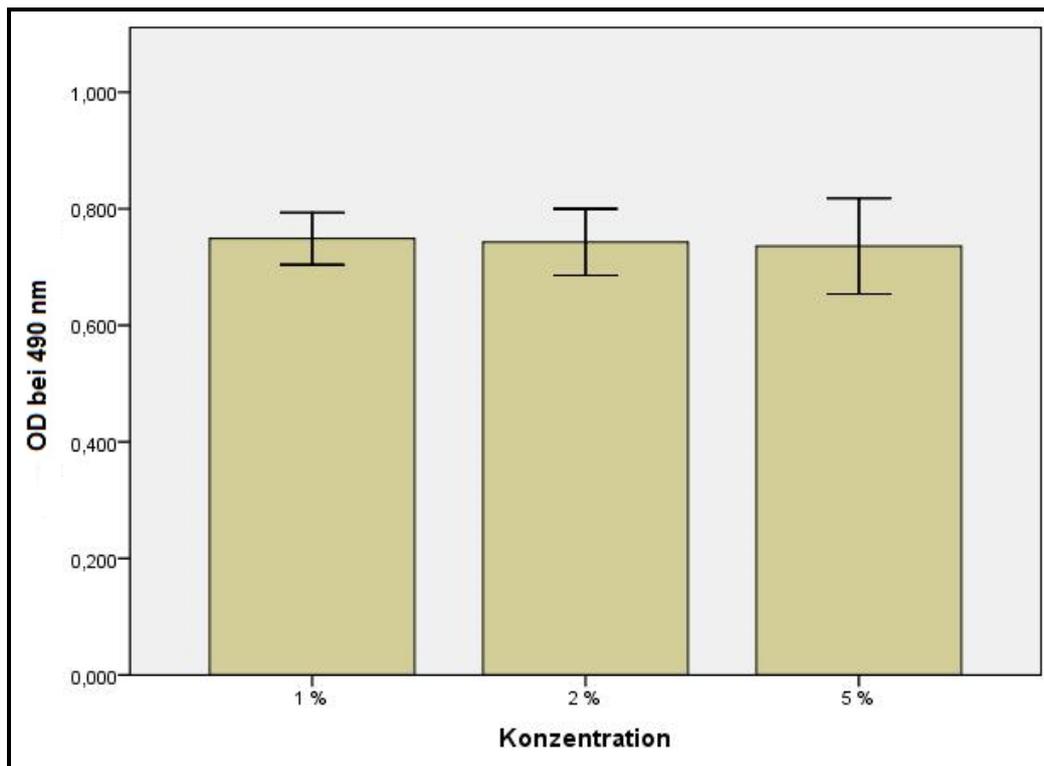


Abb. 19: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität bei Zugabe von **1 %**, ([M]; 0,749; 95 % CI; 0,704 – 0,794; n = 54), **2 %** ([M]; 0,743, 95 % CI; 0,686 – 0,800; n = 54) und **5 %** ([M]; 0,736, 95 % CI; 0,654 – 0,818; n = 27) **Probandenserum** zu **20.000 JEG3-Zellen** unabhängig von Messzeitpunkt und Zusammensetzung des Serums. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der optischen Dichte von 20.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der OD mit 95 %-Konfidenzintervall.

Ebenso zeigt sich, dass die Zusammensetzung des Serums (Nicht-Schwangeren-Serum, Gesund-Schwangeren-Serum und PE) unabhängig von Messzeitpunkt und Serumkonzentration keinen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität der 20.000 JEG-3-Zellen hat ($p = 0,520$). Der Mittelwert der optischen Dichte bei 490 nm bei Zugabe von Nicht-Schwangeren-Serum liegt bei 0,736 (95 % CI; 0,679 – 0,793), bei Gesund-Schwangeren-Serum bei 0,753 (95 % CI; 0,706 – 0,800) und bei PE bei 0,742 (95 % CI; 0,675 – 0,810), jeweils n = 45 (Abb. 17+20). In die Ermittlung des relativen Mittelwertes nahmen wir alle Werte der zwei Versuchsreihen unterschieden nach Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und PE-Serum, unabhängig von Messzeitpunkt und Konzentration auf, sodass wir eine Fallzahl von n = 45 erhielten.

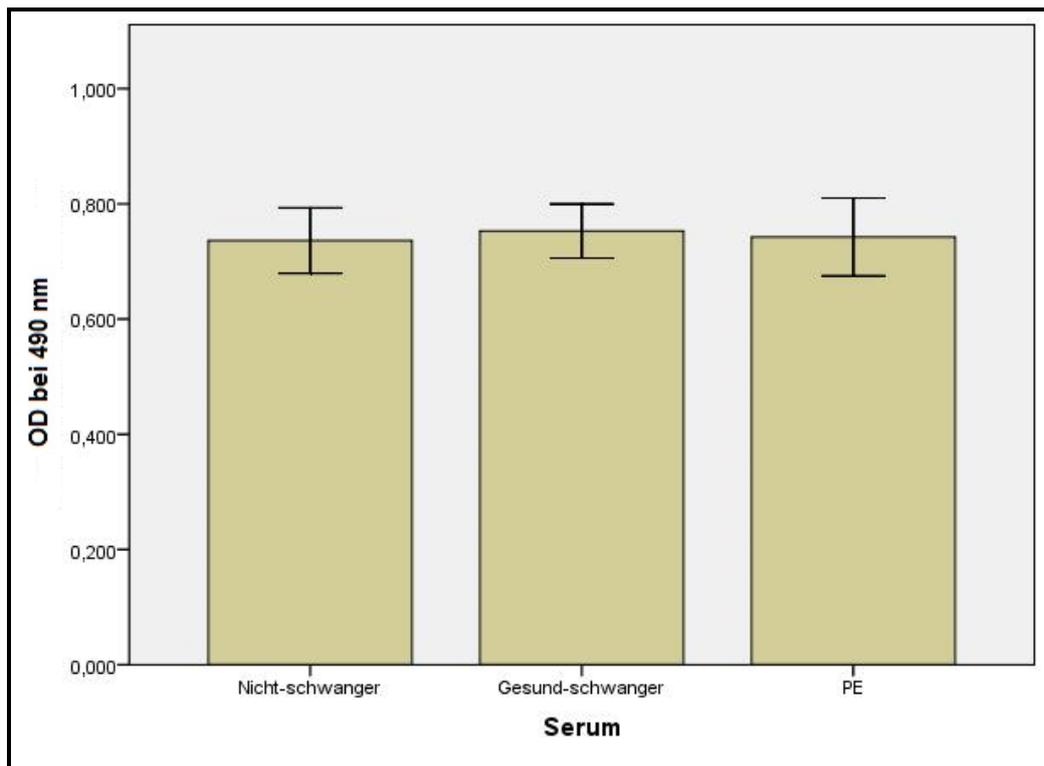


Abb. 20: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität in Abhängigkeit der **Serumzusammensetzung Nicht-schwanger** ([M]; 0,736; 95 % CI; 0,679 – 0,793), **Gesund-schwanger** ([M]; 0,753; 95 % CI; 0,706 – 0,800) und **PE** ([M]; 0,742; 95 % CI; 0,675 – 0,810) zu **20.000 JEG3-Zellen** unabhängig von Messzeitpunkt und Konzentration, jeweils n = 45. Die Normierung erfolgte mit dem Mittelwert der optischen Dichte von 20.000 JEG3-Zellen ohne Zugabe von Probandenserum bei 0h. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte der OD mit 95%-Konfidenzintervall.

Der Effekt des Messzeitpunktes auf die metabolische Aktivität der 20.000 JEG3-Zellen ist unabhängig von der Konzentration ($p = 0,881$) und Zusammensetzung des Serums ($p = 0,516$) (Abb. 17).

Weiterhin können wir keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität der 20.000 JEG3-Zellen finden, wenn Konzentration und Zusammensetzung des Serums gemeinsam betrachtet werden ($p = 0,273$) (Abb. 17).

Im Proliferationsassay zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei Verwendung von Konzentrationen von 1 %, 2 % oder 5 % unabhängig von Zusammensetzung des Serums.

Zu Beginn unserer Versuchsreihe überlebten die JEG3-Zellen die Zugabe von 5 % humanem Serum nicht, nach Zugabe von 1 % Serum zeigten sie jedoch eine aktive Zellteilung, sodass wir uns trotz der Ergebnisse des MTT-Tests für eine geringe Konzentration von 1 % Humanserum für die Experimente entschieden.

5.2 Ergebnisse des Apoptose-Assays mittels Annexin V via Durchflusszytometrie

Analog zum Proliferationsassay führten wir einen Apoptose-Assay durch, um den Einfluss von humanem Serum auf JEG3-Zellen unterschieden nach Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum in steigender Konzentration (0 %, 1 %, 2 % und 5 %) darzulegen.

5.2.1 Apoptose-Assay mit Gesund-Schwangeren-Serum und Präeklampsie-Serum

Mit steigender Konzentration (0 %, 1 %, 2 % und 5 %) von Gesund-Schwangeren-Serum und Präeklampsie-Serum zeigten sich keine erhöhten Apoptoseraten, wenn diese zu JEG3-Zellen zugegeben wurden (Tabelle 8 und Abb. 21). Im Gegenteil, der Anteil der lebenden Zellen war gegenüber der Kontrolle stets am größten, wenn diese mit Gesund-Schwangeren- oder Präeklampsie-Serum inkubiert wurden (Tabelle 8).

Es lagen höhere Apoptoseraten vor, wenn JEG3-Zellen mit Gesund-Schwangeren-Serum verglichen mit Präeklampsie-Serum inkubiert wurden (Abb. 21).

Der Anteil lebender Zellen war höher, wenn diese mit Präeklampsie-Serum im Vergleich zu Gesund-Schwangeren-Serum versetzt wurden unabhängig von der Konzentration (Abb. 22).

Die Ergebnisse dieses Versuches sind orientierend, da wir ihn einmal durchführten und die Probe nur einer Präeklampsiepatientin verwendeten.

Tabelle 8: Anteil apoptotischer, nekrotischer und lebender Zellen nach Versetzen der JEG3-Zellen mit Gesund-Schwangeren- (GSS) und Präeklampsie-Serum (PES 1) jeweils einer Probandin in steigender Konzentration, n=1

Serumkonzentration	Anteil apoptotischer Zellen		Anteil nekrotischer Zellen		Anteil lebender Zellen	
	GSS	PES 1	GSS	PES 1	GSS	PES 1
Kontrolle (0 %)	0,10		0,25		89,53	
1 %	0,14	0,06	0,43	0,06	86,71	92,58
2 %	0,00	0,00	0,06	0,11	89,25	90,98
5 %	0,11	0,02	0,41	0,05	90,77	94,38

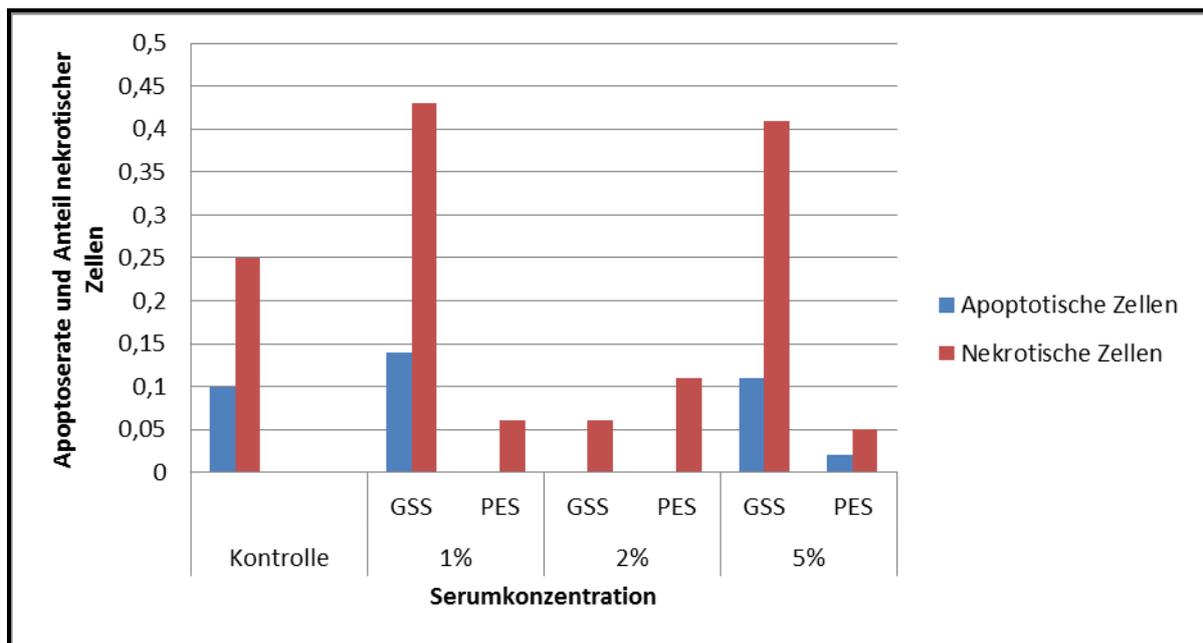


Abb. 21: Darstellung der Apoptoserate und des Anteils nekrotischer Zellen nach Versetzen der JEG3-Zellen mit Gesund-Schwangeren-Serum und Präeklampsie-Serum jeweils einer Probandin in steigender Konzentration

Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen GSS und PES 1 für 7 Tage inkubiert. Anschließend wurde mittels FACS der relative Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt, welcher in Form der Balken dargestellt ist (n=1).

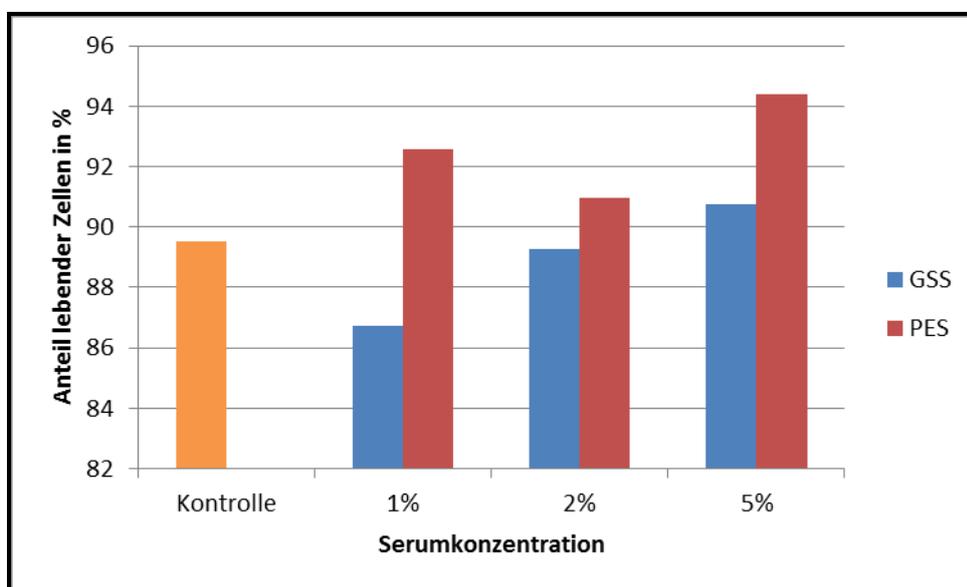


Abb. 22: Darstellung des Vergleichs der Anteile lebender Zellen nach Versetzen der JEG3-Zellen mit Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum jeweils einer Probandin.

Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen GSS und PES 1 für 7 Tage inkubiert. Anschließend wurde mittels FACS der relative Anteil lebender Zellen bestimmt, welcher in Form der Balken dargestellt ist (n=1).

5.3 Ergebnisse des Western Blots für p-STAT3

In diesem Experiment sollte untersucht werden, wie sich die Inkubation der JEG3-Zellen mit Nicht-Schwangeren-Serum, Gesund-Schwangeren-Serum und Präeklampsie-Serum auf die Phosphorylierung von STAT3 in JEG3-Zellen auswirkt. In Abbildung 23 ist exemplarisch das Ergebnis eines Western Blots für p-STAT3 und β -Aktin aus JEG3-Zellen dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass nur nach Stimulierung mit LIF eine Phosphorylierung von STAT3 erfolgt, nicht aber nach Inkubation mit humanem Serum allein.

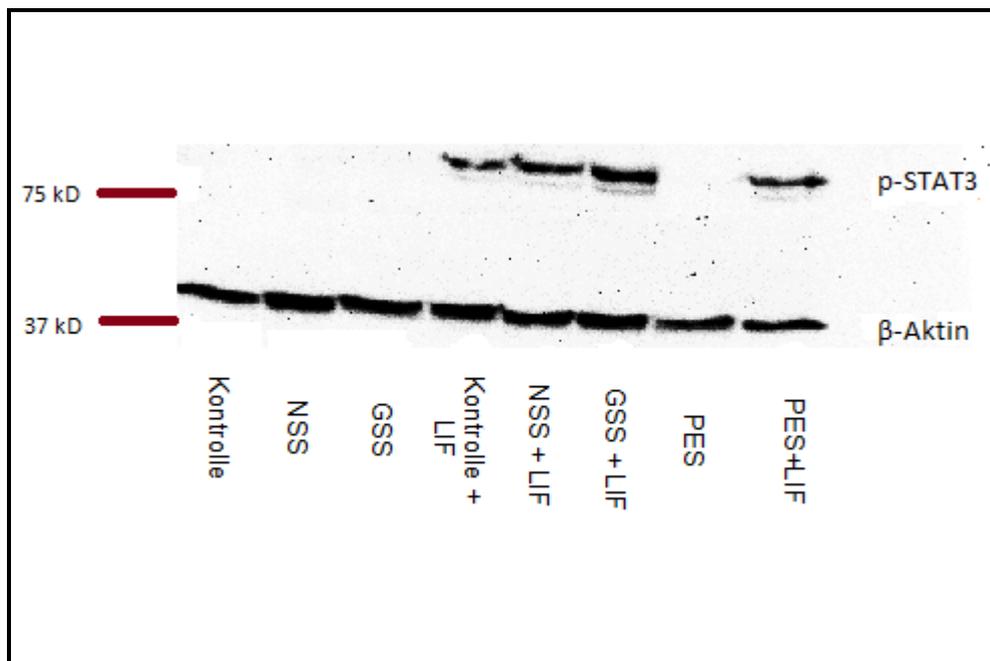


Abb. 23: Western Blot für p-STAT3(tyr705) und β -Aktin aus JEG3-Zellen nach Inkubation mit Probandenserum über 7 Tage und Stimulation mit LIF für 20 Minuten.

Insgesamt wurden Western Blots mit Sera von sieben verschiedenen Präeklampsie-Patientinnen in unterschiedlicher Anzahl durchgeführt (PE1, 2, 8, 9, 10, 11 und 12 – siehe Tabelle 1, Material und Methoden). Der Ansatz mit PE1 wurde jeweils viermal, mit PE2 zweimal, mit PE8 dreimal und PE11 zweimal wiederholt. Für die Proben PE9, PE10 und PE12 führten wir je einen Western Blot durch. Es erfolgte die densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von STAT3(tyr705), anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Probe bestimmt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von STAT3(tyr705) in unterschiedlich stimulierten JEG3-Zellen mittels Western Blot. JEG3-Zellen wurden in sieben verschiedenen Ansätzen für 7 Tage mit Medium und Serum einer Nicht-Schwangeren-, einer Normal-Schwangeren und Serum von sieben Präeklampsie-Probandinnen (PE1 bis PE12) inkubiert und anschließend lysiert. β -Aktin diente als Auftragskontrolle gegen welche die Bandenintensität von p-STAT3(tyr705) normalisiert wurde. Dargestellt sind die relativen p-STAT3-Expressionen in Prozent (Kontrolle + LIF = 100%).

Ansatz	1 (n=4)	2 (n=2)	3 (n=3)	4 (n=1)	5 (n=1)	6 (n=2)	7 (n=1)	Mittelwert	SD
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NSS	0	25,89	0	0	0	0	0	3,70	-
GSS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrolle +LIF	100	100	100	100	100	100	100	100	0
NSS+ LIF	134,86	109,01	87,39	101,07	122,58	136,77	101,03	113,24	7,06
GSS+ LIF	72,87	131,18	98,09	93,04	134,10	134,14	73,87	105,33	10,43
PES	PE1	PE2	PE8	PE9	PE10	PE11	PE12	0	0
	0	0	0	0	0	0	0		
PES+ LIF	PE1	PE2	PE8	PE9	PE10	PE11	PE12	130,44	18,26
	101,89	238,40	110,80	105,23	125,10	121,36	110,33		

Eine Phosphorylierung von STAT3 findet nur bei Stimulierung der Zellkulturen mit LIF statt, unabhängig vom eingesetzten Serum (siehe Tabelle 9 sowie Abb. 24).

Es konnte eine höhere Phosphorylierungsintensität von STAT3 gegenüber der Kontrollgruppe (also ohne Zusatz von humanem Serum) festgestellt werden, wenn die JEG3-Zellen mit Nicht-Schwangeren, Gesund-Schwangeren oder Präeklampsie-Serum versetzt wurden (Abb. 24).

Bei Inkubation der JEG3-Zellen mit Präeklampsie-Serum zeigte sich eine höhere Phosphorylierungsintensität von STAT3 durch LIF gegenüber der Inkubation mit Normal-Schwangeren- oder Gesund-Schwangeren-Serum. Die LIF-induzierte Phosphorylierungsintensität von STAT3 bei Inkubation mit Gesund-Schwangeren-Serum war niedriger als bei Inkubation mit Nicht-Schwangeren- oder Präeklampsie-Serum (Abb. 24). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (p jeweils $> 0,05$). Die Irrtumswahrscheinlichkeiten beim Vergleich der Gruppen untereinander sind detailliert im Anhang in Tabelle 12 aufgeführt.

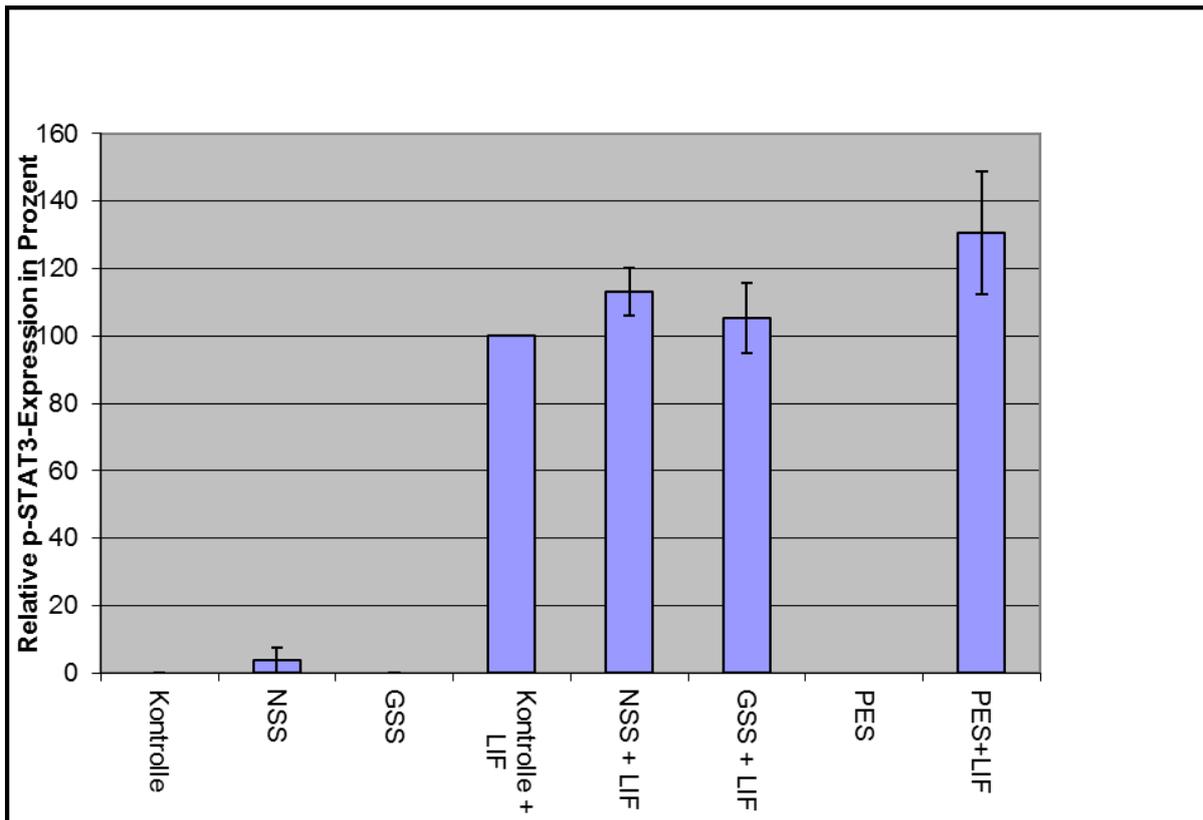


Abb. 24: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen p-STAT3-Expression in Prozent für die verschiedenen Serumgruppen (Kontrolle + LIF = 100%). Die Unterschiede zwischen den Einflüssen der verschiedenen Patientenserum waren nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$; $n = 14$).

Zwischen der Schwangerschaftswoche der Präeklampsiepatientinnen und p-STAT3-Expression besteht eine geringe negative Korrelation ($R = -0,238$, $n = 13$) (Abb. 25). Je höher die Anzahl der Schwangerschaftswochen, desto niedriger war die Proteinexpression. Mit 0,238 ist dieser Wert recht klein, sodass von einer geringen Korrelation ausgegangen werden muss. Diese Korrelation ist jedoch nicht signifikant ($p = 0,434$).

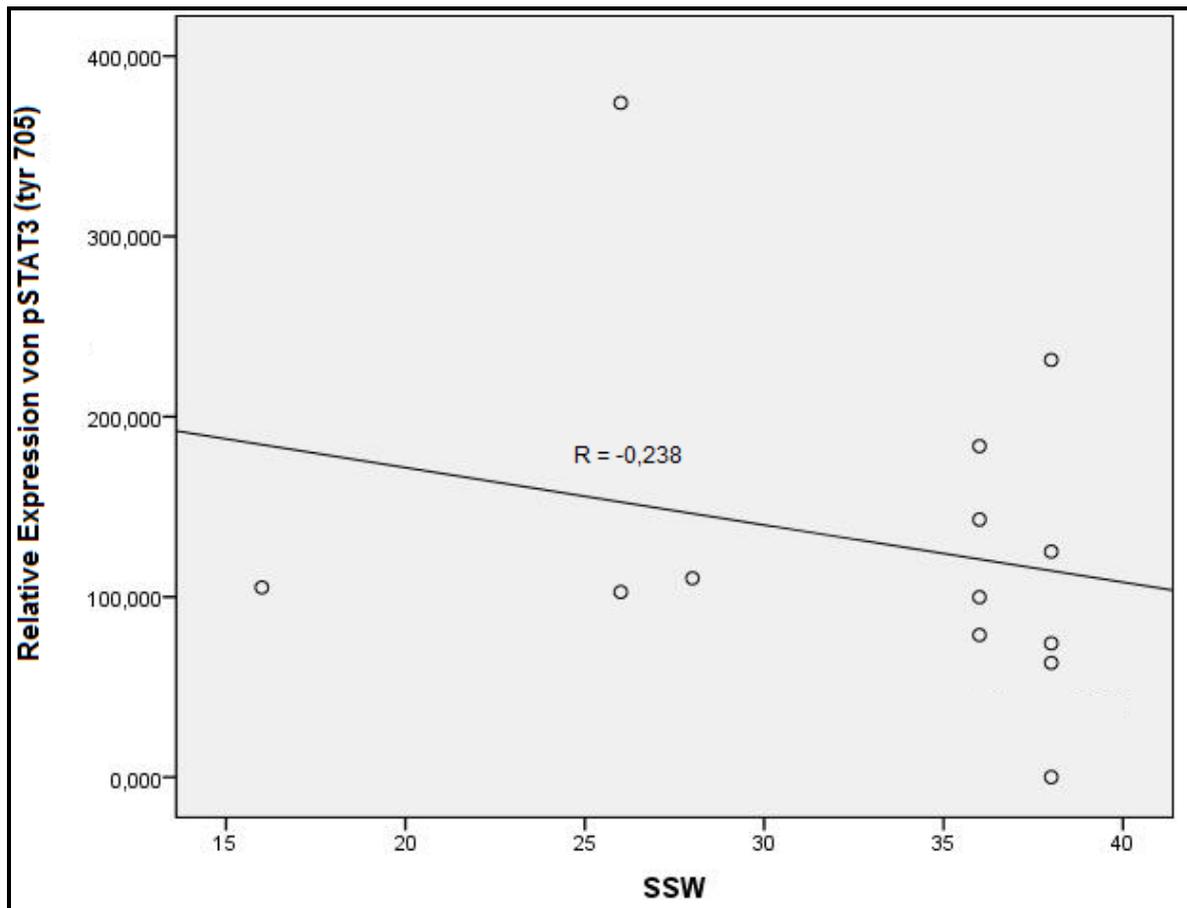


Abb. 25: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der relativen Expression von p-STAT3(tyr705) in JEG3-Zellen und der Schwangerschaftswoche (SSW) der Präeklampsiepatientinnen. Es besteht eine geringe negative, nicht signifikante Korrelation ($R = -0,238$, $n = 13$, $p = 0,434$).

5.4 Ergebnisse des Western Blots für p-ERK1

In diesem Experiment sollte untersucht werden, wie sich die Inkubation der JEG3-Zellen mit Nicht-Schwangeren-Serum, Gesund-Schwangeren-Serum und Präeklampsie-Serum verschiedener Schwangerer auf die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 auswirkt.

In Abbildung 26 ist exemplarisch das Ergebnis eines Western Blots für p-ERK1/2, p-STAT3 und β -Aktin aus JEG3-Zellen dargestellt.

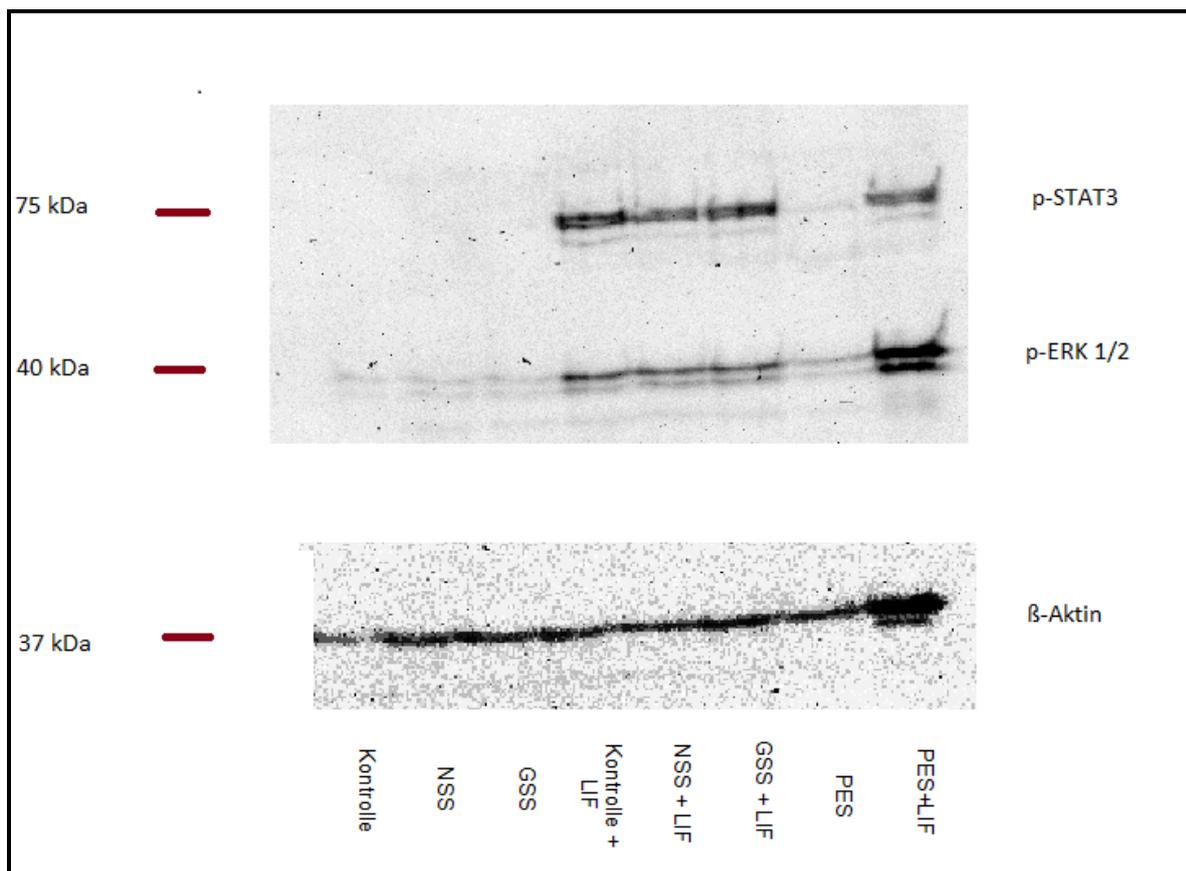


Abb. 26: Western Blot für p-ERK1/2, p-STAT3(Tyr705) und β -Aktin aus JEG3-Zellen nach Inkubation mit Probandenserum für 7 Tage und Stimulation mit LIF über 20 Minuten.

Insgesamt wurden Western Blots mit Sera von drei verschiedenen Präeklampsie-Patientinnen in jeweils einem Ansatz durchgeführt (PE 1, 11 und 12). Es erfolgte die densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2, anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Probe bestimmt (Tabelle 10 und 11).

Tabelle 10: Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von ERK1 in unterschiedlich stimulierten JEG3-Zellen mittels Western Blot. JEG3-Zellen wurden in drei Ansätzen für 7 Tage mit Medium und Serum einer Nicht-Schwangeren-, einer Normal-Schwangeren und Serum von jeweils einer von drei Präeklampsie-Probandinnen (PE1, 10 und 11) inkubiert und anschließend lysiert. Wir führten drei unabhängige Western Blots durch. β -Aktin diente als Auftragskontrolle gegen welche die Bandenintensität von p-ERK1 normalisiert wurde. Dargestellt sind die relativen p-ERK1-Expressionen in Prozent (Kontrolle + LIF = 100%). n=3

Ansatz	1	2	3	Mittelwert	SD
Kontrolle	67,54	41,39	44,98	51,30	8,18
NSS	62,83	48,34	76,05	62,41	8,00
GSS	72,21	47,12	94,27	71,20	13,62
PES	PE1	PE10	PE11	72,56	15,84
	67,78	47,83	102,06		
Kontrolle +LIF	100	100	100	100	0
NSS+LIF	92,82	122,18	123,59	112,86	10,03
GSS+LIF	92,57	93,16	139,9	108,54	15,68
PES+LIF	PE1	PE10	PE11	154,84	44,30
	125,02	97,5	242,01		

Eine Phosphorylierung von ERK1 findet im Gegensatz zu p-STAT3 sowohl bei Stimulierung der Zellkulturen mit LIF als auch ohne Stimulierung statt. Die Phosphorylierung des ERK1 war nach Zugabe von LIF teilweise signifikant höher als ohne Stimulation (Kontrolle – Kontrolle+LIF $p = 0,027$, NSS – NSS+LIF $p = 0,019$) (Abb. 27, Tabelle 10). Nicht signifikant erhöht zeigte sich die ERK1-Phosphorylierung beim Vergleich GSS und GSS+LIF ($p = 0,148$) sowie PES und PES+LIF ($p = 0,196$) (Abb. 27, Tabelle 10). Die Signifikanzanalyse erfolgte mittels des ungepaarten t-Tests nach Welch.

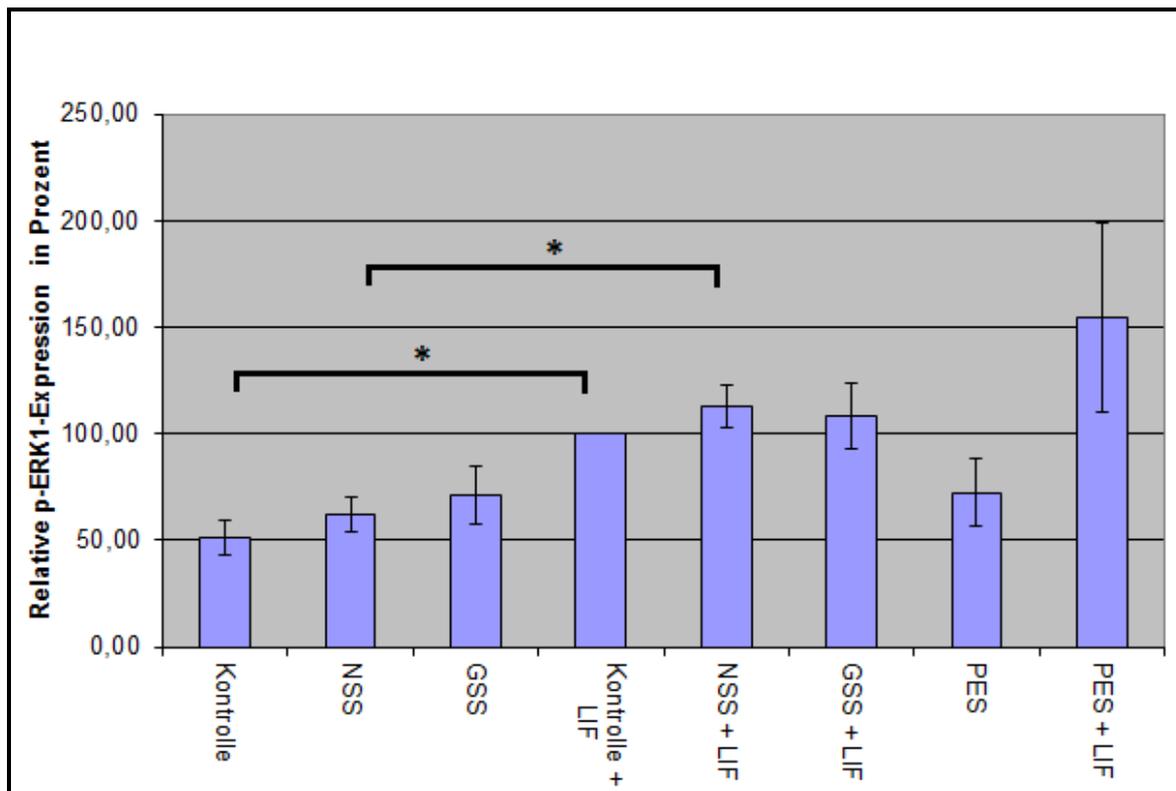


Abb. 27: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen p-ERK1-Expression für die verschiedenen Serumgruppen (Kontrolle + LIF = 100%) in Prozent. Die p-ERK1-Expression ist bei Zugabe von LIF in der Kontrollgruppe (Kontrolle – Kontrolle+LIF, t-Test, $p = 0,027$) sowie in der NSS-Gruppe (NSS – NSS+LIF, t-Test, $p = 0,019$) signifikant erhöht (gekennzeichnet mit *). $n = 3$.

Es konnte eine (nicht signifikant) höhere Phosphorylierungsintensität von p-ERK1 gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden, wenn die JEG3-Zellen mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- oder Präeklampsie-Serum versetzt wurden, unabhängig davon, ob die Proben mit LIF stimuliert wurden oder nicht (Abb. 27, Tabelle 10).

Bei Inkubation der JEG3-Zellen mit Präeklampsie-Serum zeigte sich eine (nicht signifikant) höhere Phosphorylierungsintensität von p-ERK1 gegenüber der Inkubation mit Nicht-Schwangeren- oder Gesund-Schwangeren-Serum. Auch nach Stimulation mit LIF und Zugabe von PES war die Phosphorylierungsintensität von p-ERK1 höher als nach Inkubation mit Nicht-Schwangeren- oder Gesund-Schwangeren-Serum und LIF, wenn auch nicht signifikant (Abb. 27, Tabelle 10).

Die Phosphorylierungsintensität von ERK1 bei Inkubation mit Gesund-Schwangeren-Serum war (nicht signifikant) niedriger als bei Inkubation mit Nicht-Schwangeren- oder Präeklampsie-Serum unabhängig von der Stimulation mit LIF (Abb. 27, Tabelle 10).

Alle Unterschiede waren nicht signifikant (jeweils $p > 0,05$). Die Irrtumswahrscheinlichkeiten beim Vergleich der Gruppen untereinander sind detailliert im Anhang in Tabelle 13 aufgeführt.

5.5 Ergebnisse des Western Blot für p-ERK2

Eine Phosphorylierung von p-ERK2 findet im Gegensatz zu p-STAT3 sowohl bei Stimulierung der Zellkulturen mit LIF als auch ohne Stimulierung statt (Tabelle 11, Abb. 26+28). Es zeigte sich für alle Serumgruppen, dass die Phosphorylierung des Proteins nach Zugabe von LIF höher war als ohne Stimulation: Kontrollgruppe (Kontrolle – Kontrolle+LIF, $p = 0,110$), NSS-Gruppe (NSS – NSS+LIF, $p = 0,252$), GSS-Gruppe (GSS – GSS+LIF, $p = 0,054$) sowie PES-Gruppe (PES – PES + LIF, $p = 0,205$).

Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Signifikanzanalyse erfolgte mittels des ungepaarten t-Tests nach Welch.

Tabelle 11: Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von p-ERK2 in unterschiedlich stimulierten JEG3-Zellen mittels Western Blot. JEG3-Zellen wurden in drei Ansätzen für 7 Tage mit Medium und Serum einer Nicht-Schwangeren-, einer Normal-Schwangeren und Serum von jeweils einer von drei Präeklampsie-Probandinnen (PE1, 10 und 11) inkubiert und anschließend lysiert. β -Aktin diente als Auftragskontrolle gegen welche die Bandenintensität von p-ERK2 normalisiert wurde. Dargestellt sind die relativen p-ERK-Expressionen in Prozent (Kontrolle + LIF = 100%), $n = 3$.

Ansatz	1	2	3	Mittelwert	SD
Kontrolle	91,31	57,29	56,46	68,35	11,48
NSS	56,97	44,02	113,8	71,60	21,43
GSS	76,99	38,44	53,12	56,18	11,23
PES	PE1	PE10	PE11	94,99	18,67
	118,09	58,04	108,85		
Kontrolle +LIF	100	100	100	100,00	0,00
NSS+LIF	74,05	124,6	127,8	108,82	17,41
GSS+LIF	107,97	83,22	93,35	94,85	7,18
PES+LIF	PE1	PE10	PE11	178,73	46,39
	168,93	103,73	263,53		

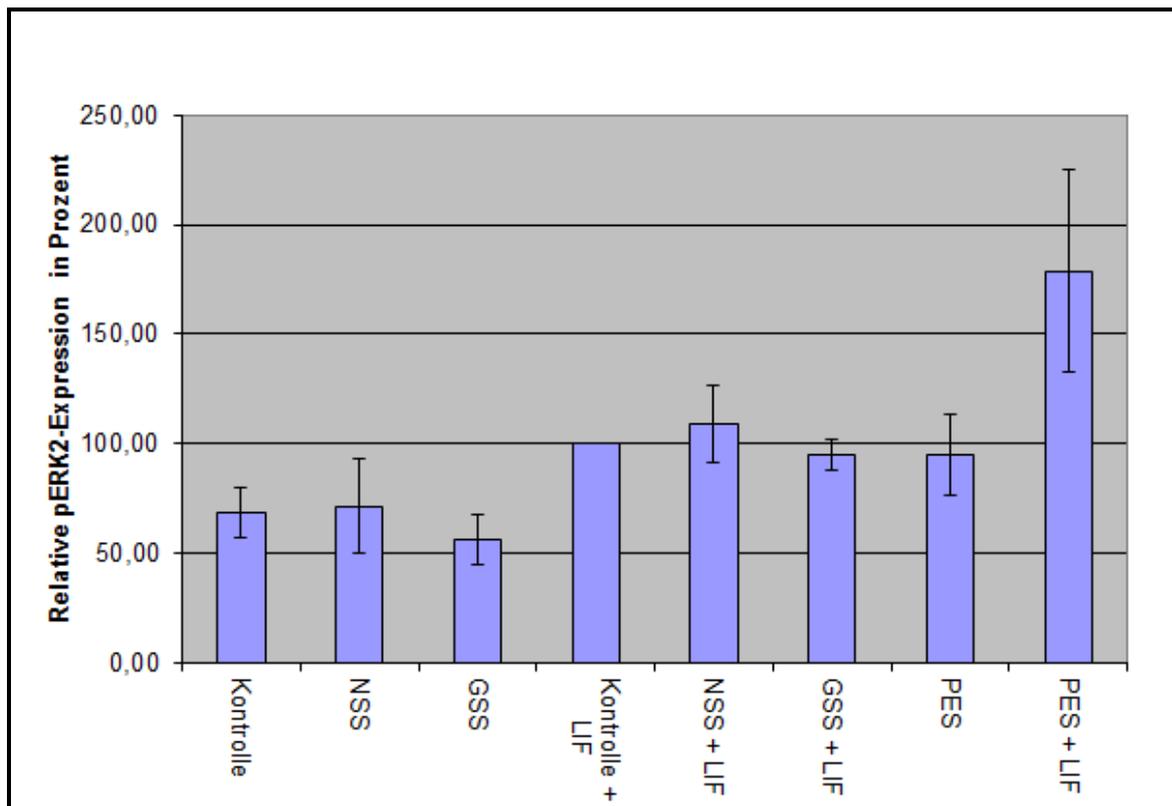


Abb. 28: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen p-ERK2-Expression für die verschiedenen Serumgruppen (Kontrolle + LIF = 100%), n = 3.

Es konnte eine (nicht signifikant) höhere Phosphorylierungsintensität von p-ERK2 gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden, wenn die JEG3-Zellen mit Nicht-Schwangeren- oder Präeklampsie-Serum versetzt wurden, unabhängig davon, ob die Proben mit LIF stimuliert wurden oder nicht. Dagegen zeigte sich die Proteinexpression gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt, wenn Gesund-Schwangeren-Serum zugegeben wurde, unabhängig von der LIF-Stimulation (Abb. 28, Tabelle 11).

Bei Inkubation der JEG3-Zellen mit Präeklampsie-Serum zeigte sich eine (nicht signifikant) höhere Phosphorylierungsintensität von ERK2 gegenüber der Inkubation mit Nicht-Schwangeren- oder Gesund-Schwangeren-Serum. Auch nach Stimulation mit LIF war die Phosphorylierungsintensität von ERK2 höher mit PE-Serum als nach Inkubation mit Nicht-Schwangeren- oder Gesund-Schwangeren-Serum, wenn auch nicht signifikant (Abb. 28, Tabelle 11).

Die Phosphorylierungsintensität von ERK2 bei Inkubation mit Gesund-Schwangeren-Serum war (nicht signifikant) niedriger als bei Inkubation mit Nicht-Schwangeren- oder Präeklampsie-Serum unabhängig von der Stimulation mit LIF (Abb. 28, Tabelle 11).

Alle Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (t-Test, p jeweils $> 0,05$). Die Irrtumswahrscheinlichkeiten beim Vergleich der Gruppen untereinander sind detailliert im Anhang in Tabelle 14 aufgeführt.

Insgesamt war die Phosphorylierungsintensität der Proteine nach Inkubation mit Präeklampsie-Serum und Stimulation mit LIF gegenüber der Inkubation mit Gesund-Schwangeren- und Nicht-Schwangeren-Serum und Stimulation mit LIF sowohl in der Versuchsreihe mit STAT3, als auch mit ERK1 und ERK2 am höchsten. Dagegen zeigte sich die Phosphorylierung nach Inkubation mit Gesund-Schwangeren-Serum und Stimulation mit LIF in allen Experimenten am niedrigsten. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (p jeweils $> 0,05$).

6 Diskussion

Die Präeklampsie ist ein bedeutendes und schweres Krankheitsbild in der Schwangerschaft, welches lebensbedrohliche Folgen für Mutter und Kind haben kann. Bis heute sind die molekularen Entstehungsmechanismen trotz intensiver Forschungsarbeit nicht hinreichend geklärt. Klarheit auf dem Gebiet der Ursachenforschung könnte zu Fortschritten in der Entwicklung möglicher Behandlungsstrategien führen.

In dieser Arbeit soll der Einfluss von humanem Schwangeren-Serum auf Trophoblastzellen dargestellt werden. Hierbei liegt der Fokus auf einem Vergleich der Wirkung von Gesund-Schwangeren-Serum (GSS) und Präeklampsie-Serum (PES) auf JEG3-Zellen.

Insbesondere untersuchten wir den Einfluss des humanen Serums auf den JAK-STAT- und MAPK-Kinase-Signalweg, welche als zentrale Aktivierungswege der Zellregulierung gelten. Hierbei konzentrierten wir uns auf die Untersuchung der Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle STAT-3 und ERK1/2, welche eine besondere Rolle in der Plazentation spielen (Fitzgerald et al. 2005a).

6.1 Diskussion der Verwendung von JEG3-Zellen als Modell für humane Trophoblastzellen

Die Experimente erfolgten mit der humanen Chorionkarzinomzelllinie JEG3 als Modell für Trophoblastzellen. Es handelt sich hierbei um maligne transformierte Zellen, welche oft ein verändertes Genexpressionsmuster aufweisen (Bischof und Irminger-Finger 2005). Obwohl JEG3-Zellen den humanen Trophoblastzellen ähneln, kommt den Versuchen lediglich ein Modellcharakter zu. Die Ergebnisse können möglicherweise nicht vollständig auf Signalwege in vivo übertragen werden.

Jedoch ist es notwendig, auf diese „Modellzellen“ zurückzugreifen. Die Isolierung und damit Verwendung menschlicher Trophoblastzellen ist aufgrund begrenzter Verfügbarkeit humanen plazentaren Materials und deren langwieriger, komplizierter Extrahierungsschritte schwierig. Weiterhin ist eine Kultivierung dieser Zellen aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer erschwert.

Zudem würden Untersuchungen an Plazentazellen verschiedener Mütter aufgrund unterschiedlicher biologischer Ursprünge (verschiedene Erkrankungen, Schwangerschaftsverläufe etc.) eine größere Varianz der Ergebnisse erwarten lassen.

6.2 Diskussion des Einflusses von humanem Serum auf die Proliferationsrate von JEG3-Zellen

Die Durchführung des MTT-Tests diente zur Überprüfung des Einflusses steigender Humanserumkonzentrationen (1 %, 2 % und 5 %) und unterschiedlicher Serumeigenschaften (Nicht-schwanger, Gesund-schwanger, Präeklampsie) auf das Proliferationsverhalten von JEG3-Zellen.

Bei der Planung unserer Versuchsreihe orientierten wir uns an der vorliegenden Studie von Mahameed et al (Mahameed et al. 2005). Diese Studie kultivierte JAR-Zellen mit Humanserum von Gesund-Schwangeren und Präeklampsiepatientinnen in einer Konzentration von 10 %. Hierbei zeigte sich, dass bei Zugabe von PE-Serum Zellproliferation, -invasion und MMP-2-Sekretion in JAR-Zellen inhibiert wurden. In unseren Vorversuchen überlebten die JEG3-Zellkulturen schon die Zugabe von 5 %igem humanem Serum nicht, unabhängig davon, ob es sich um Serum erkrankter oder nicht-erkrankter Probandinnen handelte. Zur möglichen Ursachenfindung des inhibierenden Charakters von Serumkonzentrationen höher als 1 % führten wir den vorliegenden Proliferationsassay durch.

Das Proliferationsverhalten der JEG3-Zellen zeigte signifikante Veränderungen bei steigender Zellzahl pro Well und Zunahme der Proliferationszeit unabhängig von der Serumkonzentration und der Zusammensetzung des Serums. Während die Proliferation von 5.000 Zellen nach 24h und 48h signifikant anstieg, nahm die Zellproliferation von 10.000 Zellen nach Inkubation von 48h und von 20.000 Zellen bereits nach 24h signifikant ab. Möglicherweise befanden sich zu viele Zellen in einem Well, sodass aufgrund begrenzter Platzkapazität und Nährstoffmangels keine Zellvermehrung stattfinden konnte, die Zellen also ihre eigene Proliferation verhinderten.

Im Versuch zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Zellproliferation bei Inkubation mit steigender Serumkonzentration unabhängig von der Zusammensetzung des Serums.

Eine mögliche Ursache dafür, dass unsere Zellen die Zugabe höherer Humanserumkonzentrationen nicht überlebten, könnte die Art der verwendeten Chorionkarzinomzelllinie darstellen. In der Studie von Mahameed et al. wurden die Experimente mit JAR-Zellen durchgeführt. Wir verwendeten JEG3-Zellen. Beide Zellpopulationen sind Chorionkarzinomzelllinien, welche als Modell für

Trophoblastzellen in der wissenschaftlichen Forschung Einsatz finden. Diese Zelllinien unterscheiden sich in Bezug auf Wachstums- und Proliferationsverhalten (Mandl et al. 2002) und machen somit die verschiedenen Ergebnisse im MTT-Assay erklärbar. Zum Beispiel wachsen JAR-Zellen als multizelluläre Sphäroide, im Gegensatz dazu bilden JEG3-Zellen Monolayer-Zellverbände.

Wir kultivierten die JEG3-Zellen mit 10 % fetalem Kälberserum und Humanserum. Eventuell könnte durch Verwendung von 10 % fetalem Kälberserum und zusätzlich 5 %igem humanen Serum insgesamt eine zu hohe Serumkonzentration vorgelegen haben, welche das Zellwachstum der JEG3-Zellen gehemmt haben könnte.

Die Inkubation der Zellen mit humanem Serum erfolgte für 7 Tage unter Standardbedingungen. Es wären Versuche mit einer kürzeren Inkubationszeit zu erwägen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass schon vor Durchführung des Proliferationsassays ein hemmender Effekt des humanen Serums durch die Inkubationszeit hervorgerufen wurde.

Entgegen unserer Hypothese, dass Präeklampsie-Serum das Proliferationsverhalten von JEG3-Zellen hemmen würde, erscheint es durch die Ergebnisse unseres MTT-Tests möglich, dass die metabolische Aktivität von JEG3-Zellen in gleicher Weise verändert wird, wenn die Zellen mit Präeklampsie-Serum oder Nicht-Schwangeren- und Gesund-Schwangeren-Serum versetzt werden.

In der Literatur werden gegensätzliche Einflüsse auf das Proliferationsverhalten von Trophoblastzellen bei einer Präeklampsie beschrieben.

Mahameed et al. zeigten, dass die Zellproliferation von JAR-Zellen durch Serum von Präeklampsie-Patientinnen gehemmt wurde. Sie konnten ein Zellwachstum von 6 % bei Zugabe von Präeklampsie-Serum gegenüber einem von 30 % bei Zugabe von Gesund-Schwangeren-Serum messen (Mahameed et al. 2005).

Weiterhin konnte eine höhere miR-141-Expression in Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen gegenüber Plazenten Gesund-Schwangerer gefunden werden, die miR-141-Inhibition führte zu einer reduzierten Invasionsfähigkeit in Trophoblastzellen (Ospina-Prieto et al. 2016). miR-141 ist eine schwangerschaftsassozierte miRNA, welche in erhöhter Konzentration durch Trophoblastzellen in maternalem Plasma im 3. Trimester exprimiert werden.

Kaya et al. dagegen fanden heraus, dass die Proliferation villöser Trophoblastzellen in Präeklampsie-Patientinnen gesteigert war, und vermuteten hierfür eine verstärkte

Zellregeneration nach Verletzungen der villösen Oberfläche bei Präeklampsie (Kaya et al. 2015).

Andere Studie bestätigen unsere Ergebnisse, dass bei Trophoblastzellen von Präeklampsie-Patientinnen kein verändertes Proliferationsverhalten gegenüber Gesund-Schwangeren zu finden ist.

So konnten Jeschke et al. eine erhöhte Expression des Proliferationsmarker Ki-67 und des Tumorsuppressorgens p53 in Zytotrophoblastzellen aus Plazenten mit HELLP-Syndrom, keine Unterschiede jedoch in der Expression dieser Marker zwischen präeklampsischen Zytotrophoblastzellen und gesunden Zytotrophoblastzellen nachweisen. Auch in IUGR-Zytotrophoblastzellen zeigte sich keine veränderte Ki-67-Expression (Jeschke et al. 2006). Ebenso fanden Prusac et al. eine höhere Apoptose- und Proliferationsrate in villösen Trophoblastzellen bei Patientinnen mit HELLP-Syndrom gegenüber Gesund-Schwangeren, bei PE-Patientinnen jedoch nur höhere Apoptoselevel und keine Unterschiede der Proliferation (Prusac et al. 2011).

Bereits in einer Studie von 1996 wurde dargelegt, dass lediglich Zellplasma von Präeklampsie-Patientinnen das endotheliale Zellwachstum um 20 % gegenüber Gesund-Schwangeren supprimiert, nicht jedoch Zellserum (Smáráson et al. 1996).

Es sind weitere Experimente mit höheren Fallzahlen nötig, die untersuchen, ob das Proliferationsverhalten von trophoblastären Zellen durch Zellplasma unterschiedlicher Konzentrationen oder auch durch Serum von Patientinnen mit HELLP-Syndrom oder einer IUGR gegenüber Gesund-Schwangeren-Serum beeinflusst wird.

Anhand des Proliferationsassays ließ sich keine Erklärung für einen hemmenden Einfluss auf die Inkubation mit Humanserum höherer Konzentrationen finden. Aufgrund der experimentellen Gegebenheiten in unseren Versuchen entschieden wir uns für eine Serumkonzentration von 1 % im weiteren Studienverlauf.

6.3 Diskussion des Einflusses von humanem Serum auf die Apoptoserate von JEG3-Zellen

Analog dem Proliferationsassay sollte mittels Apoptoseassay analysiert werden, inwieweit die steigende Konzentration (1 %, 2 % und 5 %) und Zusammensetzung von humanem Serum einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von JEG3-Zellen

hat. Wir verglichen hierbei den Einfluss von Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum.

Mittels Apoptoseassay lässt sich die Zahl der in Apoptose-befindlichen Zellen exakt bestimmen. Er stellt also eine objektive Messmethode dar.

JEG3-Zellen sind adhärenente Zellen und müssen durch verschiedene Lösungs- und Zentrifugationsschritte für die Versuche vorbereitet werden. Zum Lösen der Zellen vom Boden der Kultivierplatte versetzten wir diese zunächst mit Trypsin und benutzten anschließend einen Zellschaber. Durch diesen Zellstress könnte schon allein eine Apoptose induziert worden sein, sodass die vorliegenden Ergebnisse in Bezug auf die Apoptoserate falsch positiv sein könnten. Bundscherer et al. untersuchten die Membranschädigung sechs verschiedener maligner, adhärenenter Zelllinien, wenn diese mittels Trypsinierung oder mechanisch durch Schaben oder Waschen vorbereitet wurden. Dabei zeigte sich eine hohe Zellzahl der Zelllinien HAT 29, PANC 1 und A-673 Annexin-V-positiv nach mechanischer Vorbehandlung und damit falsch positiv für eine Apoptose (Bundscherer et al. 2013).

Da jedoch für unsere Versuche stets der gleiche Versuchsaufbau verwendet wurde, die JEG3-Zellen also immer gleich behandelt wurden, kann dieser Einfluss vernachlässigt werden.

Ebenso wie bei Durchführung des Proliferationsassays ließ sich bei diesem Versuch kein Unterschied im Apoptoseverhalten der JEG3-Zellen bei Inkubation mit steigender Serumkonzentration bestimmen, unabhängig davon, ob es sich um Serum einer an Präeklampsie-erkrankten oder gesund-schwangeren Probandin handelte.

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen könnte man also annehmen, dass auch bei steigender Humanserumkonzentration (zumindest bis 5 %) weder das Proliferations- noch das Apoptoseverhalten von JEG3-Zellen beeinflusst werden.

Vergleicht man jedoch das Apoptoseverhalten bei Versetzen der JEG3-Zellen mit Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum, lässt sich eine (nicht signifikant) erhöhte Apoptoserate bei Inkubation mit Gesund-Schwangeren-Serum finden.

Es wäre also möglich, dass Serum abhängig vom Zustand oder der Erkrankung der Patientin einen Einfluss auf die Apoptoserate von trophoblastären Zellen haben könnte. Die Entstehung der Präeklampsie könnte also durch eine fehlerhafte Apoptose, also eine fehlende Apoptoseinduktion von Trophoblastzellen bedingt sein. Durch Apoptose wird eine regelrechte Zellhomöostase gewährleistet, funktioniert

diese Regulierung nicht, kann dies zu einer verminderten oder eben überschießenden Zellvermehrung führen.

Dagegen sprechen zahlreiche Studien, die postulieren, dass eine mögliche Ursache der Entstehung der Präeklampsie eine erhöhte Apoptoserate von Trophoblastzellen darstellt (Gauster et al. 2009, Prusac et al. 2011, Sharp et al. 2014). Man nimmt an, dass bei der Entstehung einer Präeklampsie sowohl Proliferation als auch Fusion von Zytotrophoblastzellen und damit reaktiv die Apoptose des Synzytiotrophoblasten gesteigert sind (Huppertz und Kingdom 2004).

In einigen Plazenten in der Frühschwangerschaft fanden sich jedoch vermehrte Zytotrophoblast-Kolumnen (sogenannte Zellinseln), welche keine Verbindung zur Uteruswand aufnehmen konnten. Es ist unklar, warum sie in einigen Schwangerschaften in großer Anzahl vorkommen und in anderen nicht (Genbacev und Miller 2000). Möglicherweise könnten sie einen Kompensationsmechanismus gegenüber oxidativem Stress darstellen, zum Beispiel waren Zellinseln im Zusammenhang mit maternalem Zigarettenkonsum erhöht (Zdravkovic et al. 2006). Auch bei einer Präeklampsie wurden vermehrte Zellinseln gefunden (Redline und Patterson 1995). Es liegt also eine Zellvermehrung vor, jedoch von unreifen Trophoblastzellen mit fehlerhafter Funktion, eventuell bedingt durch eine gestörte Apoptoseinduktion.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse sind als orientierend anzusehen, da wir den vorliegenden Apoptoseassay mit Serum nur einer gesunden Schwangeren und einer Präeklampsie-Patientin durchführten.

6.4 Diskussion des Einflusses von PE-Serum auf die Phosphorylierung von STAT3 in JEG3-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Phosphorylierung von STAT3 und damit die Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges in trophoblastären Zellen untersucht. Hierbei lag das Hauptaugenmerk darauf, eine mögliche veränderte Phosphorylierungsaktivität dieses Signalmoleküls in Trophoblastzellen bei Schwangerschaften mit Präeklampsie gegenüber Schwangerschaften ohne Erkrankung darzustellen, da es fundamentale Funktionen dieser Zellen steuert (Fitzgerald et al. 2008).

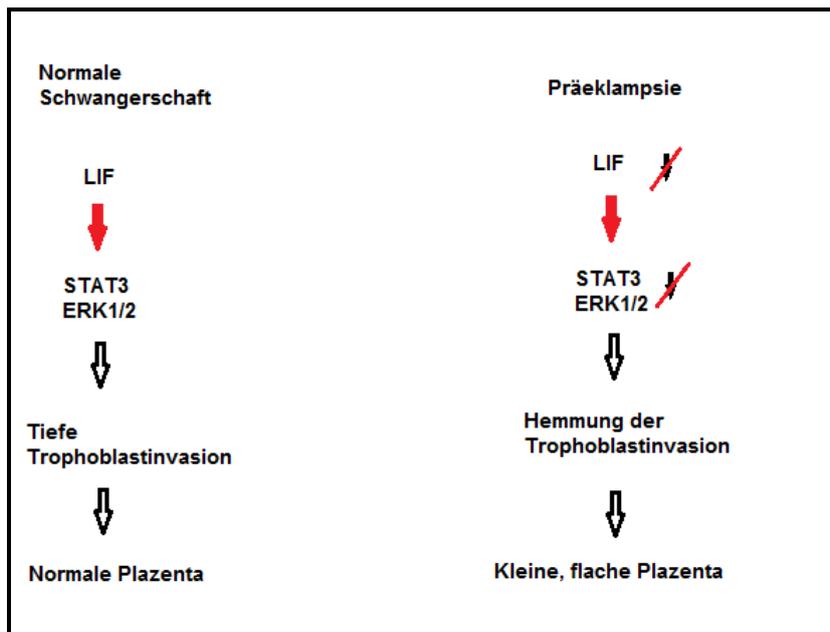


Abb. 29: Schema zur Hypothese der Wirkung von LIF auf die Aktivierung von STAT3 und ERK1/2 und die dadurch bedingte Beeinflussung der Trophoblastinvasion bei einer normalen Schwangerschaft und bei einer Präeklampsie anhand unserer Ergebnisse

Wie in der Abbildung 24 (Ergebnisse) zu sehen ist, lässt sich nur durch eine Aktivierung mit LIF eine signifikante Phosphorylierung von STAT3 erreichen, unabhängig davon, ob die JEG3-Zellen mit Nicht-Schwangeren-, Gesunden-Schwangeren- oder PE-Serum inkubiert wurden. Diese Ergebnisse bestätigen unsere Hypothese, dass LIF über eine STAT3-Aktivierung auf trophoblastäre Zellen wirkt und damit einen entscheidenden Aktivierungsfaktor der Trophoblastinvasion darstellt (Abb. 29, rote Pfeile), wie bereits in vorherigen Studien belegt wurde (Poehlmann 2005, Fitzgerald 2005a). So konnte durch STAT3-„Knock Down“-Versuche in Trophoblastzellen bewiesen werden, dass ihr Invasionsvermögen reduziert wurde, wenn kein LIF vorhanden war oder dessen Signalweg unterbrochen wurde (Poehlmann et al. 2005).

Dass LIF ein wichtiger Mediator der Plazentation ist, konnten bereits Stewart und Cullinan 1997 beschreiben. So fanden sie heraus, dass es sowohl essentiell für die Implantation des Embryos als auch für die Dezidualisierung des Uterus ist (Stewart und Cullinan 1997). LIF-„Knock Out“-Mäuse konnten keine erfolgreiche Schwangerschaft austragen, wenn nicht LIF intrauterin injiziert wurde (Stewart et al. 1992). Eine Implantation kann ohne LIF zwar stattfinden, jedoch sterben die Embryonen aufgrund einer unzureichenden Plazentafunktion innerhalb von 24 Stunden (Ware et al. 1995).

Entgegen unserer Hypothese, dass bei Versetzen der Trophoblastzellen mit Präeklampsieserum die LIF-vermittelte Phosphorylierung von STAT3, damit die Trophoblastzellinvasion reduziert und die vollständige Ausbildung der Plazenta gestört werden würde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der LIF-vermittelten-STAT3-Phosphorylierung bei Inkubation mit PE-Serum gegenüber Gesund-Schwangeren-Serum (Abb. 29). Im Gegenteil, die Phosphorylierung von STAT3 war sogar bei Zugabe von PE-Serum gegenüber Gesund-Schwangeren- oder Nicht-Schwangeren-Serum erhöht, wenn auch nicht signifikant.

Bisher ist unklar, inwieweit STAT3 die Pathogenese einer Präeklampsie bedingt. Zhang et al. fanden geringere Expressionen von STAT3 und p-STAT3 in extravillösen Zytotrophoblastzellen, villösen Trophoblastzellen und der gesamten Plazenta bei Patienten mit schwerer PE gegenüber Plazenten normotensiver Schwangerer (Zhang et al. 2015). Auch Weber et al. zeigten, dass die Expression von STAT3 in Trophoblast- und Deziduazellen bei einer Präeklampsie reduziert ist (Weber et al. 2012).

Es existieren jedoch auch Studien, welche sich mit unseren Ergebnissen decken. Xu et al. konnten erhöhte Expressionslevel von JAK und STAT3 in Plazentagewebe von PE-Patientinnen gegenüber Normal-Schwangeren nachweisen und nehmen an, dass durch Hypoxie der JAK/STAT3-Signalweg aktiviert wird, was die Überlebensfähigkeit von Trophoblastzellen und Angiogenese bei einer PE fördert und die Apoptose dieser Zellen reduziert (Xu et al. 2017). Eine weitere Studie zeigte, dass erhöhte p-STAT3-Expressionen in Endothelzellen von Plazenten mit einer PE assoziiert waren und zu fehlerhafter Angiogenese, proinflammatorischer Zytokin-Expression und Plazentastress geführt haben könnten (Zozzaro-Smith et al. 2015).

Das Trophoblastenwachstum ähnelt dem invasiven Wachstum von Tumorzellen. Bollrath et al. bewiesen, dass STAT3/p-STAT3 mit Tumorprogression korrelierte, und fanden hohe STAT3 und p-STAT3-Level bei verschiedenen Krebserkrankungen (Bollrath et al. 2009). Man könnte also annehmen, dass sich dies auf das Wachstum von Trophoblastzellen übertragen lässt.

Viele Zytokine, die eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung spielen, wirken über den JAK-STAT-Signalweg, so zum Beispiel HGF, IL-6, IL-11, GM-CSF und auch LIF (Fitzgerald et al. 2008). Es wird angenommen, dass ein „Crosstalk“ zwischen verschiedenen Liganden/Rezeptoren besteht, welche den Defekt anderer

Signalwege kompensieren (Hana und Murphy 1994). So könnten in unseren Versuchen Interaktionen verschiedener anderer Seruminhalte mit den Rezeptoren des JAK-STAT-Signalweges vorliegen, welche die Ergebnisse beeinflussen.

6.5 Diskussion des Einflusses von PE-Serum auf die Phosphorylierung von ERK1/2 in JEG3-Zellen

Einen weiteren wichtigen Signalweg bei der Plazentation stellt der MAPK-Kinase-Weg dar. Sowohl der JAK-STAT- als auch der MAPK-Kinase-Weg wird von Zytokinen genutzt, welche die Trophoblastentwicklung steuern (Mudgett et al. 2000). Um die Ergebnisse der p-STAT3-Versuchsreihe mit dem MAPK-Kinase-Weg vergleichen zu können, führten wir parallel Western Blots zum Nachweis von p-ERK1/2 durch.

Die JEG3-Zellen wurden in gleicher Weise wie bei der Versuchsdurchführung des Western Blots für STAT3 vorbereitet und mit Serum Nicht-Schwangerer, Normal-Schwangerer und an Präeklampsie-Erkrankter inkubiert.

Entgegen der Phosphorylierung von STAT3 fand eine konstitutive Aktivierung von ERK1/2 auch ohne Stimulation mit LIF statt. Die Phosphorylierungsintensität von ERK1 war jedoch nach Stimulation mit LIF zum Teil signifikant höher als ohne LIF (Abb. 27, Abb. 29 rote Pfeile).

Es ließen sich auch bei diesem Versuch entgegen unserer Hypothese keine erniedrigten Phosphorylierungsraten von ERK1/2 bei Inkubation der JEG3-Zellen mit Präeklampsieserum nachweisen (Abb. 29). Im Gegenteil, wie in der Versuchsanordnung mit STAT3 war auch hier die Phosphorylierung des ERK1 und 2 bei Inkubation mit Präeklampsieserum unabhängig von der Stimulation mit LIF gegenüber der Stimulation mit Gesund-Schwangeren- und Normal-Schwangeren-Serum erhöht, wenn auch nicht signifikant.

Dies ließ sich bereits in anderen Studien aufzeigen. Szabo et al. zeigten, dass p-ERK1/2 in Plazenten mit Preterm-Präeklampsie und HELLP-Syndrom höher war als in Plazenten gesunder Schwangerer. Die Aktivierung von ERK1/2 könnte also an Trophoblastfunktionsstörungen wie dem HELLP-Syndrom beteiligt sein (Szabo et al. 2015).

Eine andere Studie fand heraus, dass die Wirkung von Schadstoffen in Trophoblastzellen über den MAPK-Signalweg vermittelt wird. Benzopyren (als gesundheitsgefährdender Schadstoff) wurde HTR-8/SVneo-Zellen zugegeben, was

zur Inhibition der Migration und Invasion dieser Zellen führte. Hieraus lässt sich ableiten, dass der MAPK-Signalweg Stressreaktionen vermittelt und bei Zuständen der Zellgefährdung vermehrt aktiviert wird (Liu et al. 2015).

LIF triggert die Phosphorylierung sowohl des JAK/STAT- als auch des MAPK-Signalweges unabhängig voneinander innerhalb weniger Minuten. ERK1/2 unterdrückt die STAT3-Phosphorylierung und ist ein Antagonist der STAT3-DNA-Bindungsplätze im Zellkern (Szabo et al. 2015). Durch den „Crosstalk“ zwischen den Signalwegen könnten die Ergebnisse des jeweiligen Versuches beeinflusst worden sein. Es wäre zu erwägen, die Versuche durch Inhibition des jeweils anderen Signalmoleküls zu verifizieren.

Wir führten die Versuche zur Phosphorylierung von ERK1/2 mit nur drei verschiedenen Sera von Präeklampsie-Patientinnen durch. Eine adäquatere Aussage ließe sich durch Erhöhung der Fallzahl erzielen.

6.6 Diskussion der Methodik und Durchführung des p-STAT3- und p-ERK1/2-Western Blots

Eine mögliche Ursache dafür, dass sich unsere Ergebnisse nicht mit unserer Hypothese decken, könnte die unterschiedliche Serumzusammensetzung der verschiedenen schwangeren Probandinnen sein. Humanes Serum besteht zu 91 % aus Wasser, zu 7 % aus Proteinen (im wesentlichen Albuminen) und zu 2 % aus Elektrolyten, Nährstoffen sowie anderen kleinmolekularen Substanzen. Weiterhin enthält es Bestandteile der Blutgerinnung in aktiver Form wie Thrombin. Individuell variiert die Zusammensetzung des Serums eines jeden Menschen von Natur aus. Beeinflusst werden kann diese durch äußere Faktoren wie Entzündungen oder Infekte, Hormonstatus, Ernährungssituation oder Erkrankungen wie eben eine Präeklampsie.

Der Blutentnahmezeitpunkt der Proben konnte nicht normiert werden. Deshalb mussten Proben und Laborwerte von Patientinnen verglichen werden, die nicht zum gleichen Zeitpunkt gewonnen wurden.

Wir verwendeten Proben von Frauen mit Geburtsjahren zwischen 1971 und 1987. Weiterhin differierte das Schwangerschaftsalter von 15+1. bis 38. SSW. Bei einer Patientin lag zusätzlich zu den Präeklampsiesymptomen eine Blasenmole vor. Auch bei einer Mole konnten erhöhte p-STAT3-Level in Zytotrophoblast- und Synzytiotrophoblastschichten detektiert werden (Kato et al. 2006).

Zwischen der Schwangerschaftswoche der Präeklampsiepatientinnen und p-STAT3-Expression bestand eine geringe negative Korrelation ($R = -0,238$, $n = 13$), welche nicht signifikant war. Man könnte man also annehmen, dass bei höherer Anzahl an Schwangerschaftswochen eine niedrigere Proteinexpression vorläge. Mit $0,238$ ist dieser Wert recht klein, sodass lediglich von einer geringen Korrelation ausgegangen werden kann.

Weiterhin wurde zur Kontrolle Serum nur einer Gesund-Schwangeren und einer Nicht-Schwangeren Probandin genutzt. Die Ergebnisse sind also als orientierend anzusehen und sollen als Grundlage für weiterführende Studien angesehen werden.

In der Durchführung der Untersuchungen wurden die Proben eingefroren gelagert, mussten jedoch zum Teil mehrfach aufgetaut werden, um wiederholte Messungen durchführen zu können. Ob und in welchem Ausmaß das Auftauen die Messergebnisse beeinflusst haben könnte, ist unklar.

In Hinblick auf die Versuchsanordnung lässt sich festhalten, dass aufgrund verschiedener technischer Widrigkeiten kein durchgehend einheitliches Protokoll verwendet werden konnte. So fand zu Beginn der Versuchsreihe die Immundetektion mittels manueller Fotoentwicklung, im weiteren Versuchsablauf mittels Computerdetektion ChemiBis statt. Durch die Verwendung des ChemiBis ließen sich die Western Blots unmittelbar ohne vorheriges Scannen nach manueller Fotoentwicklung auswerten. Hierdurch konnte eine höhere Auflösung und damit genauere Analyse der Banden erreicht werden.

Weiterhin wechselten wir im Verlauf die Blocklösung von NetG auf Milchlösung.

Die Studie von Mahameed 2005 verwendete Serumkonzentrationen von 10 %, wir jedoch nur eine von 1 %. Möglicherweise stellt dies eine zu niedrige Konzentration für einen signifikanten Einfluss auf die Trophoblastzellinvasion dar.

Um eine adäquate Aussage treffen zu können, müssen weitere Studien mit höheren Serumkonzentrationen und höheren, standardisierten Fallzahlen sowohl der PE- also auch der Kontroll-Probandinnen durchgeführt werden.

6.7 Diskussion des Zusammenhangs zwischen p-STAT3- und p-ERK1/2-Expression und Pathogenese der Präeklampsie

Es gibt aktuell viele Ansätze zur Bestimmung von Faktoren, welche bei einer Präeklampsie im Schwangeren-Serum verändert sein könnten. Dazu gehören sFlt,

Endoglin und extrazelluläre Synzytiotrophoblast-Vesikel (STBEV). Verschiedene Studien zeigen, dass diese Faktoren in diversen Zellen und Geweben über die Expression von STAT3 und ERK1/2 wirken.

Wie in der Einleitung erwähnt, könnte für eine Präeklampsie eine systemische endotheliale Dysfunktion ursächlich sein, es überwiegen die antiangiogenen gegenüber den angiogenen Faktoren (Schlembach 2003).

sFlt als antiangiogener Faktor bindet VEGF und PlGF, welche die Angiogenese begünstigen, und entzieht diese so dem Endothel. Die Bestimmung des sFlt (erhöht) und des plazentaren Wachstumsfaktors PlGF (erniedrigt) sowie des sFlt-1/PlGF-Quotienten (erhöht) aus dem peripheren mütterlichen Blut kann zur Früherkennung der Präeklampsie in der zweiten Schwangerschaftshälfte genutzt werden (Maynard et al. 2003). Die Bestimmung macht es den Geburtshelfern möglich, die Zeit zur Induktion einer Lungenreife oder die Verlegung in ein Perinatalzentrum bemessen zu können. Weiterhin kann abgeschätzt werden, ob die Prolongierung der Schwangerschaft einen Nutzen oder eher Schaden für Mutter und Kind haben wird.

STAT3 spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der physiologischen Angiogenese als auch bei pathologischen Zuständen unter anderem über Regulation der transkriptionellen Aktivierung von VEGF (Chen und Han 2008). Xu et al. konnten zeigen, dass durch Inhibition von STAT3 die VEGF-Expression in vitro geblockt und Tumorwachstum und Angiogenese in vivo gehemmt wurden (Xu et al. 2005).

Auch die Aktivierung von ERK1/2 (ebenso AKT1 und p38-MAPK) ist wichtig für VEGF-stimulierte endotheliale Zellproliferation und –differenzierung (D'Angelo et al. 1995). Für die FGF2-stimulierte Zellproliferation und –migration von endothelialen Milz-Zellen in Mäusen zum Beispiel wird die simultane Aktivierung von ERK1/2 und p38-MAPK benötigt (Tanaka et al. 1999).

Andererseits zeigte sich, dass die Inhibition von p38-MAPK die VEGF-induzierte Angiogenese in HLDME-Zellen (human lung-derived microvascular endothelial cells) verstärkte, begleitet durch eine prolongierte ERK1/2-Aktivierung (Issbrücker et al. 2003). Somit ist auch eine antagonistische Regulierung zwischen p38-MAPK und ERK1/2 wichtig für die Angiogenese bestimmter Zellen.

Ebenso fand sich eine Aktivierung von ERK1/2 durch VEGF in OFPAE-Zellen (ovine fetal placental artery endothelial cells), welche aus Sekundär- und Tertiärzotten der Nabelschnurarterien des Mutterschafes in der späten Schwangerschaft gewonnen wurden (Zheng et al. 2005).

Möglicherweise wird die Expression von VEGF über STAT3 und ERK1/2 reaktiv erhöht, wenn VEGF bei einer Präeklampsie von sFlt gebunden wird und so nicht mehr der Angiogenese zur Verfügung steht. In unseren Versuchen zeigte sich eine höhere Phosphorylierung der beiden Proteinen STAT3 und ERK1/2, wenn JEG3-Zellen mit PE-Serum im Vergleich zu Normal-Schwangeren-Serum versetzt wurden, was für diese reaktive Aktivierung sprechen könnte.

Weiterhin konnte lösliches Endoglin bei präeklampsischen Frauen in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden. Daraus könnte eine vermehrte Bindung von TGF („transforming growth factor“) resultieren und damit eine anti-angiogene Wirkung erklärt werden (Venkatesha et al. 2006). Endoglin soll als Marker einer PE besonders interessant sein, da es bereits Wochen vor Manifestation der Erkrankung im Serum erhöht ist. Bei Patientinnen mit einer Early-onset-Präeklampsie konnte ein starker Anstieg der Endoglin-Werte bis auf das Doppelte bereits ab der 17.-20. SSW im Vergleich zu gesunden Schwangeren gezeigt werden (Levine et al. 2006).

Der ERK-Signalweg ist wichtig in der Entstehung einer Fibrose durch Regulierung der Myofibroblasten-Differenzierung, -Proliferation und des Überlebens dieser Zellen (Pannu et al. 2007). Endoglin-Expression reduziert, TGF- β 1 induziert die Kollagen-Synthese über den ERK1/2-Signalweg. So konnte in L6E9-Myoblasten eine Aktivierung von ERK1/2 und p38-MAPK durch TGF- β 1 nachgewiesen werden (Rodríguez-Barbero et al. 2006). In epithelialen Zellen inhibiert TGF- β ERK1/2, in dermalen Fibroblasten und mikrovaskulären Endothel-Zellen aktiviert es dieses (Bandyopadhyay et al. 2011).

Andere Arbeiten konnten zeigen, dass Endoglin die Phosphorylierung von ERK1/2 in hepatischen Sternzellen (hepatic stellate cells –HSCs) erhöht (Meurer et al. 2013). Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Leberfibrose.

STAT3 und TGF- β 1 kooperieren bei der Aktivierung von HSCs. Durch STAT3-Aktivierung verschlechtert sich eine Leberfibrose über eine Hochregulation von TGF- β 1 (Xu et al. 2014).

Proteine der Extrazellulären Matrix (unter anderem Fibronectin) können zur Entstehung und Verschlechterung einer renalen interstitiellen Fibrose beitragen. Durch mechanischen Stress (als in-vitro-Modell für eine chronisch-obstruktive Nephropathie) werden Fibronectin und TGF- β 1 hochreguliert und STAT3 aktiviert (Hamzeh et al. 2015).

Auch in unseren Experimenten wiesen wir eine höhere STAT3- und ERK1/2-Phosphorylierung bei Zugabe von PE-Serum zu den JEG3-Zellen nach. Endoglin könnte also, da es bei Präeklampsie erhöht ist, diese Aktivierung bedingen.

Weiterhin nimmt man an, dass bei der Entstehung einer Präeklampsie mit IUGR sowohl Proliferation als auch Fusion von Zytotrophoblastzellen und damit reaktiv die Apoptose des Synzytiotrophoblasten gesteigert sind (Huppertz und Kingdom 2004). Es existieren zwei Typen extrazellulärer Vesikel (EV): Exosomen und Mikrovesikel. Sie werden von aktivierten Zellen oder Zellen, die an pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind, abgegeben (Anderson et al. 2010). Exosomen sind kleiner als Mikrovesikel (30-120 nm vs. 4-100 nm) (Colombo et al. 2014) und werden durch Exozytose aus Zellen entlassen. Mikrovesikel sind membrangebunden und werden von der Plasmamembran abgegeben (Colombo et al. 2014). Bisher konnten noch keine oberflächenspezifischen Marker identifiziert werden, um Mikrovesikel und Exosomen zu unterscheiden (Gould und Raposo 2013). Mikrovesikel können von verschiedenen Zelltypen abgespalten werden.

Verschiedene aktuelle Studien beschäftigen sich mit der Messung von extrazellulären Synzytiotrophoblast-Vesikeln (STBEV), welche von der Plazenta abgegeben (Gohner et al. 2015) und in den mütterlichen Kreislauf entlassen werden. Bei einer gesunden Schwangerschaft haben sie eine immunregulatorische Funktion durch Inhibition der T-Zell- und NK-Zell-Antwort. Bei einer Präeklampsie vermitteln sie eine systemische Inflammation und antiangiogene Effekte sowie die Aktivierung der Koagulation (Tannetta et al. 2013). Es werden bei einer Präeklampsie vermehrt STBEV abgegeben (Germain et al. 2007), wodurch die typischen klinischen Symptome entstehen können. Auch eine andere Zusammensetzung der STBEV gegenüber der Normalschwangeren könnte ursächlich für die Entstehung einer PE sein (Gilani et al. 2016).

Mikrovesikel und Exosomen spielen durch Beeinflussung der Tumorangio-genese eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Mikrovesikel aus verschiedenen Tumorzellen können den JAK-STAT- und den MAPK-Signalweg aktivieren. Ebenso werden durch Mikrovesikel inflammatorische Prozesse aktiviert.

Zum Beispiel können Mikrovesikel miRNAs (microRNAs) enthalten, die die Angiogenese der Umgebungszellen beeinflussen. Diese miRNA-Vesikel werden von Tumorzellen abgegeben, aktivieren in Nachbarzellen den JAK-STAT-Signalweg (Lam

et al. 2013) und dadurch Zellmigration und Angiogenese (Zhuang et al. 2012). Melanom-Mikrovesikel wirken unter anderem über den MAPK-Signalweg und funktionieren so als „Tumormessenger“ bei Progression des Melanoms (Zhao et al. 2015). Wie in der Einleitung beschrieben ähneln Trophoblastzellen Tumorzellen. Auch in unseren Versuchen zeigte sich eine erhöhte Aktivierung des STAT3 und ERK1/2 bei Zugabe von PE-Serum, was wiederum zu einer erhöhten Expression von STBEV führen könnte.

Bei paradontalen Erkrankungen wird durch Mikrovesikel, die aus Zahntaschenepithelzellen stammen, die Genexpression von Fibroblasten über den ERK1/2-Signalweg moduliert und so eine Entzündung hervorgerufen (Bi et al. 2016). Auch einer Präeklampsie liegen höchstwahrscheinlich inflammatorische Prozesse zugrunde.

Eine erfolgreiche Schwangerschaft benötigt verschiedene Interaktionen zwischen dem maternalen Immunsystem und dem Fetus, damit dieser nicht als fremd erkannt wird. Auch hierfür sind Mikrovesikel mitverantwortlich. So konnten Pap et al. zeigen, dass Mikrovesikel aus Trophoblastzellen und maternalen Thrombozyten an zirkulierende periphere T-Zellen binden und eine STAT3-Phosphorylierung hervorrufen (Pap et al. 2008).

Es werden weitere Studien nötig sein, um die exakten molekularen Signalwege, welche die Produktion von STBEV stimulieren, zu identifizieren.

7 Schlussfolgerungen und Ausblick

In den letzten Jahren sind enorme Fortschritte in der Erforschung der Pathogenese der Präeklampsie erlangt worden. Dank der Ursachenforschung steht uns mittlerweile eine Vielzahl von Screening-Markern mit positivem prädiktivem Aussagewert (z. B. s-Flt-1/PlGF-Quotient, Endoglin) zur Verfügung. Es ist sinnvoll, diese Marker im Blut mit klinischer Untersuchung und Ultraschalluntersuchung mit Dopplersonographie der Aa. uterinae zu kombinieren, um ein mögliches Risikoprofil zu erstellen. Durch frühe Detektion einer Risikosituation kann die Schwangere einer intensivierten Schwangerschaftsvorsorge zugeführt werden.

Bereits in der Frühschwangerschaft kann im Rahmen des Ersttrimesterscreenings eine Risikoeinschätzung durch Bestimmung des PAPP-A-Wertes ermöglicht werden. Ist dieser Wert erniedrigt, ist das PE-Risiko erhöht (Poon 2009).

Die Erkennung einer Early-Onset-PE kann durch Kombination aus Anamnese, Dopplersonographie der Aa. uterinae, Blutdruckkontrolle und Bestimmung von PAPP-A und PlGF in bis zu 93,4 % erreicht werden (Akolekar 2013).

Ab dem zweiten Trimenon ist mit der Bestimmung des sFlt-1/PlGF-Quotienten sowie des Endoglins in Verbindung mit klinischer Untersuchung und uteriner Dopplermessung, eine aussagekräftige Screeningmethode entwickelt worden. Bei auffälligem uterinen Doppler und Kombination mit Messung von sFlt-1 und Endoglin konnte z. B. in Studien von Stepan 2008 eine Sensitivität von 99 %, eine Spezifität von 93 % und ein positiv prädiktiver Wert von 71 % erreicht werden (Stepan et al. 2008).

Weiterhin existieren Ansätze zur Intervention auf Grundlage der Pathophysiologie.

Pilotstudien zur Entfernung des sFlt-1 aus dem maternalen Kreislauf durch eine extrakorporale Apherese versprechen aussichtsreiche Ergebnisse. Schwangerschaften mit PE konnten im Durchschnitt um vier Tage prolongiert werden (Thadhani et al. 2011).

Zusammenfassend konnten wir in unseren Versuchen zeigen, dass die STAT3- und ERK1/2-Aktivität in trophoblastären Zellen durch PE-Serum beeinflusst werden.

Möglicherweise lassen sich STAT3 und ERK1/2 als weitere potentielle prädiktive Marker einer Präeklampsie einsetzen, da sie sich in unseren Experimenten bei Inkubation mit PE-Serum stets erhöht zeigten. Hierzu sind jedoch Studien mit höheren Fallzahlen nötig. Wir sammelten im Zeitraum vom 28.05.2009 bis

18.11.2009 acht Präeklampsie-Proben, worunter sich auch eine Blasenmole mit Präeklampsie-Symptomen befand. Eine Präeklampsie tritt bei 4,6 % aller Schwangerschaften weltweit auf (Abalos et al. 2013), es ist daher nicht einfach im zeitlichen Rahmen der Promotion eine hohe Fallzahl zu erreichen.

Die Ergebnisse unseres MTT-Tests zeigen, dass die metabolische Aktivität von JEG3-Zellen entgegen unserer Annahme in gleicher Weise verändert wird, wenn die Zellen mit Präeklampsie-Serum oder Nicht-Schwangeren- und Gesund-Schwangeren-Serum versetzt werden. Dies deckt sich mit zahlreichen Studien zum Proliferationsverhalten von Trophoblastzellen bei einer Präeklampsie.

Der von uns angefertigte Apoptoseassay zeigte niedrigere Apoptoserate von JEG3-Zellen (nicht signifikant) bei Inkubation mit PE-Serum gegenüber Gesund-Schwangeren-Serum. Wir vermuten also, dass Serum abhängig vom Zustand oder der Erkrankung der Patientin einen Einfluss auf die Apoptoserate von trophoblastären Zellen haben könnte.

Die vorliegende Arbeit stellt den Beginn der Charakterisierung des Einflusses von Präeklampsie-Serum auf Signalwege in der JEG3-Zelllinie bzw. in trophoblastären Zellen dar. Es ist notwendig, weitere Studien mit veränderten Versuchsbedingungen durchzuführen, um die vorliegende Ergebnisse zu unterstützen, zum Beispiel durch Verwendung höherer Serumkonzentrationen. Weiterhin müssen die Untersuchungen auf andere trophoblastäre Zellen und primäre Plazentazellen ausgedehnt werden. Ebenso sollte der spezifische Einfluss verschiedener weiterer für die Plazentation wichtiger Zytokine neben LIF wie z. B. IL-6, IGF2 oder HGF in den jeweiligen Seren untersucht werden.

Dank der Grundlagenforschung werden uns in der Zukunft weitere Möglichkeiten genauerer Diagnostik und therapeutischer Ansätze zur Verfügung stehen.

8 Quellen- und Literaturverzeichnis

2013. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*, 122 (5):1122-1131.
- Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. 2013. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 170 (1):1-7.
- AbdAlla S, Lother H, el Massiery A, Quitterer U. 2001. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*, 7 (9):1003-1009.
- Akira S. 1999. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells*, 17 (3):138-146.
- Akolekar R. 2013. Competing risks model in early screening for preeclampsia by biophysical and biochemical markers. *Fetal Diagn Ther*:6-15.
- Al-Safi Z, Imudia AN, Filetti LC, Hobson DT, Bahado-Singh RO, Awonuga AO. 2011. Delayed postpartum preeclampsia and eclampsia: demographics, clinical course, and complications. *Obstet Gynecol*, 118 (5):1102-1107.
- Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. 2000. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 96 (2):271-276.
- Alnemri ES. 1997. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*, 64 (1):33-42.
- Andersen M, Schrama D, Thor Straten P, Becker J. 2006. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*, 126 (1):32-41.
- Anderson H, Mulhall D, Garimella R. 2010. Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis. *Lab Invest*, 90 (11):1549-1557.
- Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*, 72 (1):1-22.
- Armant DR. 2005. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Dev Biol*, 280 (2):260-280.
- Askie LM, Duley L, Henderson-Smart DJ, Stewart LA. 2007. Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet*, 369 (9575):1791-1798.
- Axt-Flidner R. 2004. Molekulare Mechanismen der Präeklampsie. *Gynäkologe*, 37:132-139.
- Axt R, Kordina AC, Meyberg R, Reitnauer K, Mink D, Schmidt W. 1999. Immunohistochemical evaluation of apoptosis in placentae from normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 26 (3-4):195-198.
- Bandyopadhyay B, Han A, Dai J, Fan J, Li Y, Chen M, Woodley D, Li W. 2011. TbetaRI/Alk5-independent TbetaRII signaling to ERK1/2 in human skin cells according to distinct levels of TbetaRII expression. *J Cell Sci*, 124 (Pt 1):19-24.
- Bi J, Koivisto L, Owen G, Huang P, Wang Z, Shen Y, Bi L, Rokka A, Haapasalo M, Heino J, Häkkinen L, Larjava H. 2016. Epithelial Microvesicles Promote an Inflammatory Phenotype in Fibroblasts. *J Dent Res*, 95 (6):680-688.
- Bischof P, Campana A. 2000. A putative role for oncogenes in trophoblast invasion? *Hum Reprod*, 15 Suppl 6:51-58.

- Bischof P, Irminger-Finger I. 2005. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (1):1-16.
- Bischof P, Haenggeli L, Campana A. 1995. Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion is dependent on integrin expression on human cytotrophoblasts. *Hum Reprod*, 10 (3):734-742.
- Bjorn SF, Hastrup N, Lund LR, Dano K, Larsen JF, Pyke C. 1997. Co-ordinated expression of MMP-2 and its putative activator, MT1-MMP, in human placentation. *Mol Hum Reprod*, 3 (8):713-723.
- Bollrath J, Pheesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli O, Schwitalla S, Matthews V, Schmid RM, Kirchner T, Arkan MC, Ernst M, Greten FR. 2009. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*, 15 (2):91-102.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19 (21):2474-2488.
- Briceno-Perez C, Briceno-Sanabria L, Vigil-De Gracia P. 2009. Prediction and prevention of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 28 (2):138-155.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98 (3):295-303.
- Bundscherer A, Malsy M, Lange R, Hofmann P, Metterlein T, Graf B, Gruber M. 2013. Cell harvesting method influences results of apoptosis analysis by annexin V staining. *Anticancer Res*, 33 (8):3201-3204.
- Burger O, Pick E, Zwickel J, Klayman M, Meiri H, Slotky R, Mandel S, Rabinovitch L, Paltieli Y, Admon A, Gonen R. 2004. Placental protein 13 (PP-13): effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta*, 25 (7):608-622.
- Burrows TD, King A, Loke YW. 1993. Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin. *Hum Reprod*, 8 (3):475-484.
- Campbell S, Pearce JM, Hackett G, Cohen-Overbeek T, Hernandez C. 1986. Qualitative assessment of uteroplacental blood flow: early screening test for high-risk pregnancies. *Obstet Gynecol*, 68 (5):649-653.
- Cartwright JE, Tse WK, Whitley GS. 2002. Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase. *Exp Cell Res*, 279 (2):219-226.
- Carty DM, Delles C, Dominiczak AF. 2008. Novel biomarkers for predicting preeclampsia. *Trends Cardiovasc Med*, 18 (5):186-194.
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10 (1):105-115.
- Chafetz I, Kuhnreich I, Sammar M, Tal Y, Gibor Y, Meiri H, Cuckle H, Wolf M. 2007. First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, 197 (1):35 e31-37.
- Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ. 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, 13 (19):2604-2616.
- Chen Z, Han Z. 2008. STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Med Res Rev*, 28 (2):185-200.

- Chesley LC, Annitto JE, Cosgrove RA. 1968. The familial factor in toxemia of pregnancy. *Obstet Gynecol*, 32 (3):303-311.
- Clark G, Angel N, Kato M, López J, MacDonald K, Vuckovic S, Hart D. 2000. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes Infect*, 2 (3):257-272.
- Colombo M, Raposo G, Théry C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30:255-289.
- Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. 1996. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (7):3115-3120.
- Cunningham FG, Lindheimer MD. 1992. Hypertension in pregnancy. *N Engl J Med*, 326 (14):927-932.
- D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner R. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic faktor 16-kDA N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (14):6374-6378.
- D. Bancher-Todesca MH, K. Chalubinski, P. Husslein 1998. Die Präeklampsie. *Journal für Hypertonie*.
- Darnell JE, Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science*, 277 (5332):1630-1635.
- Davis R. 1995. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev*, 42 (4):459-467.
- Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N. 2000. The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol*, 123 (2):107-119.
- den Haan J, Arens R, van Zelm M. 2014. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett*, 162 (2 Pt B):103-112.
- Denker HW. 1993. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool*, 266 (6):541-558.
- Dietl J, Ruck P, Horny HP, Handgretinger R, Marzusch K, Ruck M, Kaiserling E, Griesser H, Kabelitz D. 1992. The decidua of early human pregnancy: immunohistochemistry and function of immunocompetent cells. *Gynecol Obstet Invest*, 33 (4):197-204.
- Duckitt K, Harrington D. 2005. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*, 330 (7491):565.
- Dudenhausen JW. 2003. *Frauenheilkunde und Geburtshilfe*.94-96.
- Duley L. 2009. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*, 33 (3):130-137.
- Duncan SA, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. 1997. STAT signaling is active during early mammalian development. *Dev Dyn*, 208 (2):190-198.
- Dunkelberger J, Song W. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20 (1):34-50.
- Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*, 84 (3):443-450.
- Ellis S. 1990. HLA G: at the interface. *Am J Reprod Immunol*, 23 (3):84-86.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35 (4):495-516.
- Feinberg RF, Kao LC, Haimowitz JE, Queenan JT, Jr., Wun TC, Strauss JF, 3rd, Kliman HJ. 1989. Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human

- trophoblasts. PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts. *Lab Invest*, 61 (1):20-26.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9 (6):669-676.
- Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR. 2008. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update*, 14 (4):335-344.
- Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR. 2005a. Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy*, 88:181-199.
- Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, Meissner A, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K. 2005b. Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (11):2284-2296.
- Fleming T, Sheth B, Fresenko I. 2001. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci*, 6.
- Fletcher S, Drewry JA, Shahani VM, Page BD, Gunning PT. 2009. Molecular disruption of oncogenic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein. *Biochem Cell Biol*, 87 (6):825-833.
- France J. 1981. Overview of the biological aspects of the fertile period. *Int J Fertil*, 26 (3):143-152.
- Frémin C, Meloche S. 2010. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol*, 3:8.
- Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ, Dekker GA, Sibai BM. 1995. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 172 (1 Pt 1):202-203.
- Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A, Baricordi OR. 2002. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol*, 32 (2):311-315.
- Gauster M, Moser G, Orendi K, Huppertz B. 2009. Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta*, 30 Suppl A:S49-54.
- Genbacev O, Miller RK. 2000. Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models - a review. *Placenta*, 21 (Suppl A):45-49.
- Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, Sargent IL, Redman CW. 2007. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol*, 178 (9):5949-5956.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science*, 285 (5430):1028-1032.
- Gilani S, Weissgerber T, Garovic V, Jayachandran M. 2016. Preeclampsia and Extracellular Vesicles. *Curr Hypertens Rep*, 18 (9):68.
- Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE. 2006. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med*, 203 (9):2165-2175.
- Gohner C, Weber M, Tannetta DS, Groten T, Plosch T, Faas MM, Scherjon SA, Schleussner E, Markert UR, Fitzgerald JS. 2015. A New Enzyme-linked Sorbent Assay (ELSA) to Quantify Syncytiotrophoblast Extracellular Vesicles in Biological Fluids. *Am J Reprod Immunol*, 73 (6):582-588.
- Gould S, Raposo G. 2013. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2.

- Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ. 1998. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth In vitro. *J Clin Invest*, 102 (7):1385-1392.
- Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. 2001. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens*, 14 (6 Pt 2):178S-185S.
- Häcker G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, 301 (1):5-17.
- Hamzeh MT, Sridhara R, Alexander LD. 2015. Cyclic stretch-induced TGF- β 1 and fibronectin expression is mediated by β 1-interin through c-Src- and STAT3-dependent pathways in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 308 (5):F425-436.
- Hana V, Murphy LJ. 1994. Interdependence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I expression in the mouse uterus. *Endocrinology*, 135 (1):107-112.
- Heihoff-Klose AS, Holger. 2016. Prävention und Früherkennung der Präeklampsie. *Gynäkologie und Geburtshilfe*:26-29.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2):297-314.
- Heinrichs H, Orr HT. 1990. HLA non-A,B,C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res*, 9 (4):265-274.
- Helewa ME, Burrows RF, Smith J, Williams K, Brain P, Rabkin SW. 1997. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 1. Definitions, evaluation and classification of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ*, 157 (6):715-725.
- Hill JA. 1992. Cytokines considered critical in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 28 (3-4):123-126.
- Hilton DJ. 1999. Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci*, 55 (12):1568-1577.
- Hirano H, Imai Y, Ito H. 2002. Spiral artery of placenta: development and pathology-immunohistochemical, microscopical, and electron-microscopic study. *Kobe J Med Sci*, 48 (1-2):13-23.
- Hof H, Dörries, Rüdiger. 2005. *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. 3. Aufl. Stuttgart.
- Hofmeyr GJ, Atallah AN, Duley L. 2006. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):CD001059.
- Hohn HP, Denker HW. 2002. Experimental modulation of cell-cell adhesion, invasiveness and differentiation in trophoblast cells. *Cells Tissues Organs*, 172 (3):218-236.
- Huppertz B. 2005. Das Epithel der Plazentazotten: Veränderungen des Trophoblasten bei Präeklampsie. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 84-89.
- Huppertz B, Kingdom JC. 2004. Apoptosis in the trophoblast--role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig*, 11 (6):353-362.
- Huppertz B, Gauster M. 2011. Trophoblast fusion. *Adv Exp Med Biol*, 713:81-95.
- Ihle JN, Nosaka T, Thierfelder W, Quelle FW, Shimoda K. 1997. Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells*, 15 Suppl 1:105-111; discussion 112.
- Issbrücker K, Marti H, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler H, Suttrop N, Clauss M. 2003. p38 MA kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB J*, 17 (2):262-264.

- Jeschke U, Schiessl B, Mylonas I, Kunze S, Kuhn C, Schulze S, Friese K, Mayr D. 2006. Expression of the proliferation marker Ki-67 and of p53 tumor protein in trophoblastic tissue of preeclamptic, HELLP, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Int J Gynecol Pathol*, 25 (4):354-360.
- Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 382 (6587):174-177.
- Kato H, Inoue T, Asanoma K, Matsuda T, Yoshikawa Y, Wake N. 2006. Activation of STAT3/5 signal pathways in complete mole and repression in choriocarcinoma cell lines. *J Reprod Med*, 51 (1):41-48.
- Kaya B, Nayki U, Nayki C, Ulug P, Oner G, Gultekin E, Yildirim Y. 2015. Proliferation of trophoblasts and Ki67 expression in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*, 291 (5):1041-1046.
- Kennedy NJ, Davis RJ. 2003. Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle*, 2 (3):199-201.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26 (4):239-257.
- Kim CJ, Choe YJ, Yoon BH, Kim CW, Chi JG. 1995. Patterns of bcl-2 expression in placenta. *Pathol Res Pract*, 191 (12):1239-1244.
- Kingdom JC, Kaufmann P. 1999. Oxygen and placental vascular development. *Adv Exp Med Biol*, 474:259-275.
- Kliman HJ. 1993. The placenta revealed. *Am J Pathol*, 143 (2):332-336.
- Klonoff-Cohen HS, Savitz DA, Cefalo RC, McCann MF. 1989. An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *JAMA*, 262 (22):3143-3147.
- Knofler M, Sooranna SR, Daoud G, Whitley GS, Markert UR, Xia Y, Cantiello H, Hauguel-de Mouzon S. 2005. Trophoblast signalling: knowns and unknowns-- a workshop report. *Placenta*, 26 Suppl A:S49-51.
- Koenderman L, Buurmann W, Daha M. 2014. The innate immune response. *Immunol Lett*, 162 (2 Pt B):95-102.
- Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J. 1995. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Hum Reprod*, 10 (7):1907-1911.
- Kuhn K, Eble J. 1994. The structural bases of integrin-ligand interactions. *Trends Cell Biol*, 4 (7):256-261.
- Lam D, Barré B, Guette C, Conqueret O. 2013. Circulating miRNAs as new activators of the JAK-STAT3 pathway. *JAKSTAT*, 2 (1):e22996.
- Leonard WJ, O'Shea JJ. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 16:293-322.
- Levine R, Maynard S, Qian C, Kim K, England L, Yu K, Schisterman E, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. 2004. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 350 (7):672-683.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA. 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 355 (10):992-1005.
- Levy DE, Lee CK. 2002. What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 109 (9):1143-1148.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, 74:49-139.

- Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galaray R, Damsky CH, Fisher SJ. 1991. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol*, 113 (2):437-449.
- Liu L, Wang Y, Shen C, He J, Liu X, Ding Y, Gao R, Chen X. 2015. Benzo(a)pyrene inhibits migration and invasion of extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cells via activation of the ERK and JNK pathway. *J Appl Toxicol*.
- Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. 1997. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev*, 11 (2):179-186.
- Löffler G. 2003. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 5. Aufl. Berlin: Springer.
- Loke YW, King A. 2000. Immunology of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 14 (5):827-837.
- Lottspeich F, Hrsg. 2008. *Bioanalytik*.
- Lyall F, Myatt L. 2002. The role of the placenta in pre-eclampsia--a workshop report. *Placenta*, 23 Suppl A:S142-145.
- Mac Gabhann F, Popel AS. 2004. Model of competitive binding of vascular endothelial growth factor and placental growth factor to VEGF receptors on endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286 (1):H153-164.
- 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 (7):575-576.
- Mahameed S, Goldman S, Gabarin D, Weiss A, Shalev E. 2005. The effect of serum from women with preeclampsia on JAR (trophoblast-like) cell line. *J Soc Gynecol Investig*, 12 (6):e45-50.
- Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146 (1):3-15.
- Mandl M, Haas J, Bischof P, Nohammer G, Desoye G. 2002. Serum-dependent effects of IGF-I and insulin on proliferation and invasion of human first trimester trophoblast cell models. *Histochem Cell Biol*, 117 (5):391-399.
- Maquoi E, Polette M, Nawrocki B, Bischof P, Noel A, Pintiaux A, Santavicca M, Schaaps JP, Pijnenborg R, Birembaut P, Foidart JM. 1997. Expression of stromelysin-3 in the human placenta and placental bed. *Placenta*, 18 (4):277-285.
- Martin JN, Jr., May WL, Magann EF, Terrone DA, Rinehart BK, Blake PG. 1999. Early risk assessment of severe preeclampsia: admission battery of symptoms and laboratory tests to predict likelihood of subsequent significant maternal morbidity. *Am J Obstet Gynecol*, 180 (6 Pt 1):1407-1414.
- Marwood M, Visser K, Salamonsen LA, Dimitriadis E. 2009. Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation. *Endocrinology*, 150 (6):2915-2923.
- Mayer M. 1972. Mechanism of Cytolysis by Complement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69 (10):2954-2958.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 111 (5):649-658.
- McHeyzer-Williams L, Malherbe L, McHeyzer-Williams M. 2006. Helper T cell-regulated B cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 311:59-83.
- McKay MM, Morrison DK. 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, 26 (22):3113-3121.

- McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK. 2001. Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (8):3665-3674.
- Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. 1994. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*, 101 (8):669-674.
- Meurer S, Alsamman M, Sahin H, Wasmuth H, Kisseleva T, Brenner D, Trautwein C, Weiskirchen R, Scholten D. 2013. Overexpression of endoglin modulates TGF- β 1-signalling pathways in anovel immortalized mouse hepatic stellate cell line. *PLoS One*, 8 (2):e56116.
- Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Weber M, Holters S, Schleussner E, Fitzgerald JS, Markert UR. 2013. Intranuclear crosstalk between extracellular regulated kinase1/2 and signal transducer and activator of transcription 3 regulates JEG-3 choriocarcinoma cell invasion and proliferation. *ScientificWorldJournal*, 2013:259845.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65 (1-2):55-63.
- Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, Shen MM. 2000. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (19):10454-10459.
- Murray MJ, Lessey BA. 1999. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*, 17 (3):275-290.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274 (31):21491-21494.
- Nithianandarajah-Jones G, Wilm B, Gorldring C, Müller J, Cross M. 2012. ERK5: structure, regulation and function. *Cell Signal*, 24 (11):2187-2196.
- Nolte D. 1979. [Physiological and pathological aspects of the immune reactions (author's transl)]. *Prax Klin Pneumol*, 33 Suppl 1:260-267.
- Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Herrmann J, Groten T, Schleussner E, Markert U, Morales-Prieto DM. 2016. MicroRNA-141 is upregulated in preeclamptic placenta and regulates trophoblast invasion and intercellular communication. *Transl Res*, 172:61-72.
- Pannu J, Nakerakanti S, Smith E, al. e. 2007. Transforming growth factor-beta receptor type I-dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ER1/2 pathways. *J Biol Chem*, 282:10405-10413.
- Pap E, Pállinger E, Falus A, Kiss A, Kittel A, Kovács P, Buzás E. 2008. T lymphocytes are targets for platelet- and trophoblast-derived microvesicles during pregnancy. *Placenta*, 29 (9):826-832.
- Park M, Koff A. 2001. Overview of the cell cycle. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 8: Unit 8.1.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22 (2):153-183.
- Plaza-Menacho I, van der Sluis T, Hollema H, Gimm O, Buys CH, Magee AI, Isacke CM, Hofstra RM, Eggen BJ. 2007. Ras/ERK1/2-mediated STAT3 Ser727 phosphorylation by familial medullary thyroid carcinoma-associated RET mutants induces full activation of STAT3 and is required for c-fos promoter

- activation, cell mitogenicity, and transformation. *J Biol Chem*, 282 (9):6415-6424.
- Poehlmann TG, Fitzgerald JS, Meissner A, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K, Markert UR. 2005. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta*, 26 Suppl A:S37-41.
- Poon L. 2009. First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and preeclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*:23-33.
- Prakash GJ, Suman P, Morales Prieto DM, Markert UR, Gupta SK. 2011. Leukaemia inhibitory factor mediated proliferation of HTR-8/SVneo trophoblast cells is dependent on activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Reprod Fertil Dev*, 23 (5):714-724.
- Prusac I, Zekic Tomas S, Roje D. 2011. Apoptosis, proliferation and Fas ligand expression in placental trophoblast from pregnancies complicated by HELLP syndrome or pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 90 (10):1157-1163.
- Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. 2004. Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration. *Mol Hum Reprod*, 10 (9):677-684.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, 117 (Pt 8):1281-1283.
- Redline RW, Patterson P. 1995. Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Human pathology*, 26 (6):594-600.
- Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. 1999. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 180 (2 Pt 1):499-506.
- Reed JC. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 124 (1-2):1-6.
- Rezzani R, Bonomini F, Rodella L. 2008. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Prog Histochem Cytochem*, 43 (2):73-120.
- Rieger L, Kammerer U, Hofmann J, Sutterlin M, Dietl J. 2001. Choriocarcinoma cells modulate the cytokine production of decidual large granular lymphocytes in coculture. *Am J Reprod Immunol*, 46 (2):137-143.
- Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. 1999. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem*, 274 (23):16513-16521.
- Ritson A, Bulmer JN. 1987. Endometrial granulocytes in human decidua react with a natural-killer (NK) cell marker, NKH1. *Immunology*, 62 (2):329-331.
- Roberts JM, Redman CW. 1993. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet*, 341 (8858):1447-1451.
- Rodríguez-Barbero A, Obreo J, Alvarez-Munoz P, Pandiella A, Bernabéu C, López-Novoa J. 2006. Endoglin modulation of TGF-beta1-induced collagen synthesis is dependent on ERK1/2 MAPK activation. *Cell Physiol Biochem*, 18 (1-3):135-142.
- Sadler T. 1998. *Medizinische Embryologie - Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. Stuttgart: Thieme.
- Saftlas AF, Beydoun H, Triche E. 2005. Immunogenetic determinants of preeclampsia and related pregnancy disorders: a systematic review. *Obstet Gynecol*, 106 (1):162-172.

- Salamonsen LA, Hannan NJ, Dimitriadis E. 2007. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. *Semin Reprod Med*, 25 (6):437-444.
- Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J. 1999. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J*, 18 (17):4657-4668.
- Sano S, Takahama Y, Sugawara T, Kosaka H, Itami S, Yoshikawa K, Miyazaki J, van Ewijk W, Takeda J. 2001. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity*, 15 (2):261-273.
- Schlembach D. 2003. Pre-eclampsia--still a disease of theories. *Fukushima J Med Sci*, 49 (2):69-115.
- Schlembach D VS, Klein E, Lapaire O, Ramoni A, Stepan H. 2015 (10). Der sFlt-1/PIGF-Quotient in Prädiktion und Diagnostik der Präeklampsie. *Frauenarzt*:858-865.
- Seger R, Krebs EG. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 9 (9):726-735.
- Sepúlveda C, Puente J. 2000. Natural killer cells and the innate immune system in infectious pathology. *Rev Med Chil*, 128 (12):1361-1370.
- Sette A, O'Sullivan D, Krieger J, Karr R, Lamont A, Grey H. 1991. MHC-antigen-T cell interactions: an overview. *Semin Immunol*, 3 (4):195-202.
- Sharkey A. 1998. Cytokines and implantation. *Rev Reprod*, 3 (1):52-61.
- Sharp AN, Heazell AE, Baczyk D, Dunk CE, Lacey HA, Jones CJ, Perkins JE, Kingdom JC, Baker PN, Crocker IP. 2014. Preeclampsia is associated with alterations in the p53-pathway in villous trophoblast. *PLoS One*, 9 (1).
- Shen Y, Devgan G, Darnell JE, Jr., Bromberg JF. 2001. Constitutively activated Stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (4):1543-1548.
- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5 (4):519-524.
- Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, 380 (6575):630-633.
- Shuai K, Liu B. 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 3:900-911.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. 2005. Pre-eclampsia. *Lancet*, 365 (9461):785-799.
- Smárason A, Sargent I, Redman C. 1996. Endothelial cell proliferation is suppressed by plasma but not serum from women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 174 (2):787-793.
- Stauber M. 2007. Duale Reihe - Gynäkologie und Geburtshilfe., 785:484-486.
- Staun-Ram E, Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*, 3:56.
- Stepan H, Unversucht A, Wessel N, Faber R. 2007. Predictive value of maternal angiogenic factors in second trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion. *Hypertension*, 49 (4):818-824.
- Stepan H, Geipel A, Schwarz F, Kramer T, Wessel N, Faber R. 2008. Circulatory soluble endoglin and its predictive value for preeclampsia in second-trimester

- pregnancies with abnormal uterine perfusion. *Am J Obstet Gynecol*, 198 (2):175 e171-176.
- Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, Verlohren S, Brennecke S, Chantraine F, Klein E, Lapaire O, Llubra E, Ramoni A, Vatish M, Wertaschnigg D, Galindo A. 2015. Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45 (3):241-246.
- Stewart CL, Cullinan EB. 1997. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Dev Genet*, 21 (1):91-101.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359 (6390):76-79.
- Suzuki J, Ricordi C, Chen Z. 2010. Immune tolerance induction by integrating innate and adaptive immune regulators. *Cell Transplant*, 19 (3):253-268.
- Szabo S, Mody M, Romero R, Xu Y, Karaszi K, Mihalik N, Xu Z, Bhatti G, Fule T, Hupuczi P, Krenacs T, Rigo J, Jr., Tarca AL, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kovalszky I, Papp Z, Than NG. 2015. Activation of villous trophoblastic p38 and ERK1/2 signaling pathways in preterm preeclampsia and HELLP syndrome. *Pathol Oncol Res*, 21 (3):659-668.
- Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Palkovics T, Papp O, Varga P. 2005. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy*, 89:118-125.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (8):3801-3804.
- Tanaka K, Abe M, Sato Y. 1999. Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Jpn J Cancer Res*, 90 (6):647-654.
- Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. 2013. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS One*, 8 (2):e56754.
- Tannetta DS, Hunt K, Jones CI, Davidson N, Coxon CH, Ferguson D, Redman CW, Gibbins JM, Sargent IL, Tucker KL. 2015. Syncytiotrophoblast Extracellular Vesicles from Pre-Eclampsia Placentas Differentially Affect Platelet Function. *PLoS One*, 10 (11):e0142538.
- Tarrade A, Goffin F, Munaut C, Lai-Kuen R, Tricottet V, Foidart JM, Vidaud M, Frankenne F, Evain-Brion D. 2002. Effect of matrigel on human extravillous trophoblasts differentiation: modulation of protease pattern gene expression. *Biol Reprod*, 67 (5):1628-1637.
- Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93 (5):841-850.
- Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, Bossung V, Noack S, Schaarschmidt W, Jank A, Kribs A, Cornely OA, Kreyssig C, Hemphill L, Rigby AC, Khedkar S, Lindner TH, Mallmann P, Stepan H, Karumanchi SA, Benzing T. 2011. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation*, 124 (8):940-950.
- Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. 1984. Characterization of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic cells purified from

- conditioned medium of mouse Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett*, 178 (2):291-296.
- Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, Lo HY. 2000. Leukemia inhibitory factor expression in different endometrial locations between fertile and infertile women throughout different menstrual phases. *J Assist Reprod Genet*, 17 (8):415-418.
- Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, Gilbert-Barness E, Good RA. 1997. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod*, 3 (8):655-662.
- Valensise H, Vasapollo B, Gagliardi G, Novelli GP. 2008. Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension*, 52 (5):873-880.
- Vatten LJ, Skjaerven R. 2004. Is pre-eclampsia more than one disease? *BJOG*, 111 (4):298-302.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*, 12 (6):642-649.
- Verlohren S, Stepan H, Dechend R. 2012. Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)*, 122 (2):43-52.
- Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, Gliniak BC, McKenna HJ, Papayannopoulou T, Thoma B, et al. 1995. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development*, 121 (5):1283-1299.
- Watson AJ. 1992. The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev*, 33 (4):492-504.
- Watts C, Powis S. 1999. Pathways of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenet*, 1 (1):60-74.
- Weber M, Kuhn C, Schulz S, Schiessl B, Schleussner E, Jeschke U, Markert UR, Fitzgerald JS. 2012. Expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and its activated forms is negatively altered in trophoblast and decidual stroma cells derived from preeclampsia placentae. *Histopathology*, 60 (4):657-662.
- Weinstein L. 1982. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 142 (2):159-167.
- Wichers MC, Maes M. 2004. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression. *J Psychiatry Neurosci*, 29 (1):11-17.
- Wienhard J, Bielska B, Munstedt K, Lang U, Zygmunt M. 2002. Increased endothelial thrombomodulin (TM) expression in pregnancies complicated by IUGR. *J Perinat Med*, 30 (4):322-328.
- Xu C, Li X, Guo P, Wang J. 2017. Hypoxia-Induced Activation of JAK/STAT3 Signaling Pathway Promotes Trophoblast Cell Viability and Angiogenesis in Preeclampsia. *Med Sci Monit*, 23:4909-4917.
- Xu MY, Hu JJ, Shen J, Wang ML, Zhang QQ, Qu Y, Lu LG. 2014. Stat3 signaling activation crosslinking of TGF- β 1 in hepatic stellate cell exacerbates liver injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, 1842 (11):2237-2245.

- Xu Q, Briggs J, Park SH, Niu G, Kortylewski M, Zhang, Gritsko T, Turkson J, Kay H, Semenza GL, Cheng JQ, Jove R, Yu H. 2005. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene*, 24 (36):5552-5560.
- Zdravkovic T, Genbacev O, Prakobphol A, Cvetkovic M, Schanz A, McMaster M, al. e. 2006. Nicotine downregulates the 1-selectin system that mediates cytotrophoblast emigration from cell columns and attachment to the uterine wall. *Reprod Toxicol*, 22 (1):69-76.
- Zhang Z, Yang X, Zhang L, Duan Z, Jia L, Wang P, Shi Y, Li Y, Gao J. 2015. Decreased expression and activation of Stat3 in severe preeclampsia. *J Mol Histol*, 46 (2):205-219.
- Zhao X, Wang M, Song Y, Song K, Yan T, Wang L, Liu K, Shang Z. 2015. Membrane microvesicles as medators for melanoma-fibroblasts communication: roles of the VCAM-1/VLA-4 axis and the ERK1/2 signal pathway. *Cancer Lett*, 360 (2):125-133.
- Zheng J, Bird I, Chen D, Magness R. 2005. Angiotensin II regulation of ovine fetoplacental artery endothelial functions: interactions with nitric oxide. *J Physiol*, 565 (Pt 1):59-69.
- Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, Oeh J, Modrusan Z, Bais C, Sampath D, Frerrara N. 2012. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J*, 31 (17):3513-3523.
- Zozzaro-Smith PE, Bushway ME, Gerber SA, Hebert D, Pressman EK, Lord EM, Miller RK, Murphy SP. 2015. Whole mount immunofluorescence analysis of placentas from normotensive versus preeclamptic pregnancies. *Placenta*, 36 (11):1310-1317.
- Zygmunt M. 2002. Früherkennung der Präeklampsie. *Der Gynäkologe*, 35:644-651.

9 Anhang

Verwendete Geräte und Materialien

Geräte

Autoklav	
KSG-112	KSG-Ölching
Brutschränke:	
HERAcell CO2 Inkubator	Heraeus Instruments
FUNCTIONline CO2 Inkubator	Heraeus Instruments
Durchflußzytometer:	
Flowmax Galaxy	DAKO
FACSCalibur	Becton Dickinson
Auswertungs-Software „Cell Quest Pro“	Becton Dickinson
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie
Blot-Kammer	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Spektrophotometer Cary UV 50	Bio Varian
Waage	Satorius Basic
Zentrifugen	
Biofuge 13	Heraeus
Labofuge T	Heraeus
Mikro 22R	Hettich
Neubauerkammer	Optik Labor
Pipetten	Eppendorf, Gilson, Hirschmann
Mikrozentrifuge	Roth
Mikroskop (Auflicht)	
Axiovert 25	Zeiss
Gel-Dokumentationsgerät	
MF-ChemiBIS 3.2	Biostep
Auswertungsprogramm „GelCapture“	DNR Bio-Imaging Systems
Western Blot-Quantifizierung	
TotalLab TL100	Nonlinear Dynamics

Verbrauchsmittel

Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Sarstedt
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Limited
Zellkulturflaschen	Greiner
Membran Hybond-C	Amersham Pharmacia Biotech
Zellkulturplatten	
6-Well	Becton-Dickinson Labware
12-Well + 24-Well	Nunc
48-Well + 96-Well	Cellstar

Reagenzien

Acrylamid 40 %	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
deionisiertes H2O Millipore Synergy UV	Bedford
Ethanol	Roth
FACS Clean	BD
FACS Flow	BD

FACS Lysing	BD	
FACS Rinse	BD	
Fetales Kälberserum	Bio Whittaker	
Glycerin	Roth	
Human LIF	Chemicon	
Lumiglo		
Reagent A (20xconc.) + Peroxide Reagent B (20xConc.)		Cell Signaling
Molekulargewichtsmarker		
Precision Plus Protein Standards Dual Color	BIO-RAD	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	
Penicillin/Streptomycin (Pen./Strep.)	PAA	
PBS	PAA Laboratories	
Protease Inhibitor Cocktail	SIGMA	
TEMED	Pharmacia Biotech	
Trypsin EDTA	Bio Whittaker	
Zell-Lysepuffer (CLB)	Cell Signaling	
	Technology	

Zellkulturmedium

F-12 (Ham) (+10 % FKS + 2 % Penicillin/Streptokinase) Gibco

Verwendete Antikörper

p-STAT3 (Y705) Rabbit Ab	Cell Signaling
Beta-Actin (13E5) Rabbit mAb	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr 202/Tyr 204) (197G2) Rabbit mAb	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling
Annexin V-FITC	Immunotools

Zusammensetzungen von Puffern, Lösungen und Gelen

Für SDS-PAGE

4x Lower Tris

200 ml Stammlösung

TrisBase	36,3 g	1,5 M Tris
SDS	0,8 g	0,4 % SDS

Destilliertes Wasser zufügen bis auf 150 ml

pH 8,8 mit konzentrierter HCl einstellen

Destilliertes Wasser zufügen bis auf 200 ml

4x Upper Tris

100 ml Stammlösung

TrisBase	6,06 g	0,5 M Tris
SDS	0,4 g	0,4 % SDS

Destilliertes Wasser zufügen bis auf 90 ml

pH 6,8 mit konzentrierter HCl einstellen

Destilliertes Wasser zufügen auf 100 ml

5x SDS-PAGE Loading Buffer

15 ml Stammlösung

TrisBase	0,454 g	250 mM Tris
SDS	1,5 g	10 % (w/v)
Bromophenolblau	0,015 g	1,0 mg/ml
DTT	1,16 g	0,5 M DTT

Destilliertes Wasser zufügen bis auf 7,5 ml

pH 6,8 mit konzentrierter HCl einstellen

Glycerol 7,5 ml 10 % (v/v)

10x Running Buffer (Laufpuffer)

1000 ml Stammlösung

TrisBase	30,3 g	250 mM Tris
Glycin	144 g	1,9 mM Glycin
SDS	10 g	1 % SDS

Destilliertes Wasser zufügen bis auf 900 ml

pH 8,3 mit konzentrierter HCl einstellen

Destilliertes Wasser zufügen bis auf 1000 ml

=>mit destilliertem Wasser auf 1x Running-Puffer verdünnen

APS 40 %

Ammoniumpersulfat 0,4 g

Destilliertes Wasser auffüllen auf 0,6 ml

10x Tris Glycin Puffer

1000 ml Stammlösung

Tris Base	14,54 g	120 mM Tris
Glycin	72,07 g	960 mM Glycin

Destilliertes Wasser zufügen bis auf 900 ml

pH 8,3 mit konzentrierter HCl einstellen

Destilliertes Wasser zufügen bis auf 1000 ml

1x Blotting Buffer

1000 ml Stammlösung

100 ml 10x Tris/Glycin Puffer

200 ml Methanol

700 ml Destilliertes Wasser

10x Net-G

1000 ml Stammlösung

NaCl	87,66 g	1,5 M
EDTA	14,61 g	0,05 M
TrisBase	30,29 g	0,5 M
TrisHCl	30,40 g	

Destilliertes Wasser auf 850 ml auffüllen

pH 7,5 mit konzentrierter HCl einstellen

Gelatine	2 g (vorher in dest. Wasser lösen, erhitzen)	0,2 %
Triton X	5 g (am Ende dazugeben)	0,5 %
Destilliertes Wasser auf 1000 ml auffüllen		

⇒ verdünnen zu 1x Net-G mit destilliertem Wasser

10x Tris Buffered Saline (TBS)

1000 ml Stammlösung

Tris Base	24,2 g
NaCl	80 g
pH 7,6 mit konzentrierter HCl einstellen	
auf 1000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen	
Tween 20	1 %

Verdünnen auf 1x TBS mit destilliertem Wasser

Blocking Puffer (Milchblocking)

150 ml Stammlösung

10x TBS	15 ml
Dest. Wasser	135 ml
Trockenmilchpulver 7,5g	5 % w/v
Während des Rührens 0,15 ml Tween 20 (100 %) zugeben	

Antikörperlösungspuffer

20 ml

10x TBS	2 ml
Dest. Wasser	18 ml
Trockenmilchpulver 1 g	5 %
Während des Rührens 20 µl Tween 20 (100 %) zugeben	

10x AnnexinV-PBS-Bindepuffer

0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4)

1,4 M NaCl

25 mM CaCl₂

Destilliertes Wasser

Gruppen im Vergleich	Irrtumswahrscheinlichkeit
Kontrolle+LIF – Nicht-schwanger+LIF	p=0,110
Kontrolle+LIF – Gesund-schwanger+LIF	p=0,628
Kontrolle+LIF – PE+LIF	p=0,147
Nicht-schwanger+LIF – Gesund-schwanger+LIF	p=0,543
Nicht-schwanger+LIF – PE+LIF	p=0,406
Gesund-schwanger+LIF – PE+LIF	p=0,261

Tabelle 12: Irrtumswahrscheinlichkeit für den Vergleich der Phosphorylierungsintensität von STAT3(tyr705). Dargestellt ist der p-Wert, welcher mittels unabhängigen t-Tests (Welch-Test) bestimmt wurde.

Gruppen im Vergleich	Irrtumswahrscheinlichkeit
Kontrolle – Nicht-schwanger	p=0,387
Kontrolle – Gesund-schwanger	p=0,292
Kontrolle - PE	p=0,319
Nicht-schwanger – Gesund-schwanger	p=0,614
Nicht-schwanger - PE	p=0,608
Gesund-schwanger - PE	p=0,951
Kontrolle – Kontrolle+LIF	p=0,027
Nicht-Schwanger – Nicht-schw+LIF	p=0,019
Gesund-schwanger – Gesund-schw+LIF	p=0,148
PE – PE+LIF	p=0,196
Kontrolle+LIF – Nicht-schwanger+LIF	p=0,328
Kontrolle+LIF – Gesund-schwanger+LIF	p=0,640
Kontrolle+LIF – PE+LIF	p=0,341
Nicht-schwanger+LIF – Gesund-schwanger+LIF	p=0,830
Nicht-schwanger+LIF – PE+LIF	p=0,445
Gesund-schwanger+LIF – PE+LIF	p=0,410

Tabelle 13 : Irrtumswahrscheinlichkeit für den Vergleich der Phosphorylierungsintensität von ERK1. Dargestellt ist der p-Wert, welcher mittels unabhängigen t-Tests (Welch-Test) bestimmt wurde.

Gruppen im Vergleich	Irrtumswahrscheinlichkeit
Kontrolle – Nicht-schwanger	p=0,902
Kontrolle – Gesund-schwanger	p=0,491
Kontrolle - PE	p=0,303
Nicht-schwanger – Gesund-schwanger	p=0,569
Nicht-schwanger - PE	p=0,457
Gesund-schwanger - PE	p=0,165
Kontrolle – Kontrolle+LIF	p=0,110
Nicht-schwanger – Nicht-schw+LIF	p=0,252
Gesund-schwanger – Gesund-schw+LIF	p=0,054
PE – PE+LIF	p=0,205
Kontrolle+LIF – Nicht-schwanger+LIF	p=0,663
Kontrolle+LIF – Gesund-schwanger+LIF	p=0,548
Kontrolle+LIF – PE+LIF	p=0,232
Nicht-schwanger+LIF – Gesund-schwanger+LIF	p=0,518
Nicht-schwanger+LIF – PE+LIF	p=0,268
Gesund-schwanger+LIF – PE+LIF	p=0,210

Tabelle 14: Irrtumswahrscheinlichkeit für den Vergleich der Phosphorylierungsintensität von ERK2. Dargestellt ist der p-Wert, welcher mittels unabhängigen t-Tests (Welch-Test) bestimmt wurde.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Tubenwanderung einer befruchteten Eizelle in der ersten Woche (Sadler 1998).....	3
Abb. 2: Die Entwicklung von Primär- zu Tertiärzotten (Sadler 1998).....	5
Abb. 3: Der Zellzyklus eukaryoter Zellen (Löffler 2003).....	13
Abb. 4: Darstellung des JAK-STAT-Signalwegs (Shuai und Liu 2003).....	15
Abb. 5: Darstellung des ERK1/2-Signalwegs (Frémin und Meloche 2010).....	22
Abb. 6: Entstehung der PE durch Aponekrose (Huppertz 2005).	29
Abb. 7: Schema zur Hypothese der Wirkung von LIF auf die Aktivierung von STAT3 und ERK1/2 und die dadurch bedingte Beeinflussung der Trophoblastinvasion bei einer normalen Schwangerschaft und bei einer Präeklampsie	35
Abb. 8: JEG3-Zelllinie in Kultur.....	36
Abb. 9: Proliferationsassay mit 5.000 JEG3-Zellen in Abhängigkeit von Probandenserum aus Tabelle 5.....	50
Abb. 10: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität zu den Messzeitpunkten 0h, 24h und 48h von 5.000 JEG3-Zellen	51
Abb. 11: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität bei Zugabe von 1 %, 2 % und 5 % Probandenserum zu 5.000 JEG3-Zellen.....	52
Abb. 12: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität in Abhängigkeit der Serumzusammensetzung Nicht-schwanger, Gesund-schwanger und PE bei 5.000 JEG3-Zellen	53
Abb. 13: Proliferationsassay mit 10.000 JEG3-Zellen in Abhängigkeit von Probandenserum aus Tabelle 7.....	55
Abb. 14: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität zu den Messzeitpunkten 0h, 24h und 48h von 10.000 JEG3-Zellen	56
Abb. 15: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität bei Zugabe von 1 %, 2 % und 5 % Probandenserum zu 10.000 JEG3-Zellen.....	57
Abb. 16: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität in Abhängigkeit der Serumzusammensetzung. Nicht-schwanger, Gesund-schwanger und PE zu 10.000 JEG3-Zellen	58
Abb. 17: Proliferationsassay mit 20.000 JEG3-Zellen in Abhängigkeit von Probandenserum aus Tabelle 8.....	60
Abb. 18: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität zu den Messzeitpunkten 0h, 24h und 48h von 20.000 JEG3-Zellen	61
Abb. 19: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität bei Zugabe von 1 %, 2 % und 5 % Probandenserum zu 20.000 JEG3-Zellen.....	62
Abb. 20: Vergleich der relativen Mittelwerte der optischen Dichte (OD) bei 490 nm als Maß für die metabolische Aktivität in Abhängigkeit der Serumzusammensetzung. Nicht-schwanger, Gesund-schwanger und PE zu 20.000 JEG3-Zellen	63

Abb. 21: Darstellung der Apoptoserate und des Anteils nekrotischer Zellen nach Versetzen der JEG3-Zellen mit Gesund-Schwangeren-Serum und Präeklampsie-Serum jeweils einer Probandin in steigender Konzentration.....	65
Abb. 22: Darstellung des Vergleichs der Anteile lebender Zellen nach Versetzen der JEG3-Zellen mit Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum jeweils einer Probandin.	65
Abb. 23: Western Blot für p-STAT3(tyr705) und β -Aktin aus JEG3-Zellen nach Inkubation mit Probandenserum über 7 Tage und Stimulation mit LIF für 20 Minuten.	66
Abb. 24: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen p-STAT3-Expression in Prozent für die verschiedenen Serumgruppen.....	68
Abb. 25: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der relativen Expression von p-STAT3(tyr705) in JEG3-Zellen und der Schwangerschaftswoche (SSW) der Präeklampsiepatientinnen.	69
Abb. 26: Western Blot für p-ERK1/2, p-STAT3(tyr705) und β -Aktin aus JEG3-Zellen nach Inkubation mit Probandenserum für 7 Tage und Stimulation mit LIF über 20 Minuten.....	70
Abb. 27: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen p-ERK1-Expression für die verschiedenen Serumgruppen.....	72
Abb. 28: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen p-ERK2-Expression für die verschiedenen Serumgruppen.....	74
Abb. 29: Schema zur Hypothese der Wirkung von LIF auf die Aktivierung von STAT3 und ERK1/2 und die dadurch bedingte Beeinflussung der Trophoblastinvasion bei einer normalen Schwangerschaft und bei einer Präeklampsie anhand unserer Ergebnisse	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Bezeichnungen der verwendeten Serumproben mit Angabe der Probennummer, des Geburtsjahres der Probandinnen, Schwangerschaftsalters bei Probenentnahme und Serumzusammensetzung	38
Tabelle 2:	Bestückung der 96-Wellplatte zur Durchführung des Proliferationsassays ohne (Kontrolle) und mit Probandenserum	44
Tabelle 3:	Bestückung der 6-Wellplatte mit JEG3-Zellen, Medium und Gesund-Schwangeren-Serum einer Patientin zur Probengewinnung für den Apoptoseassay	46
Tabelle 4:	Bestückung der 6-Wellplatte mit JEG3-Zellen, Medium und Präeklampsie-Serum (PES 1) einer Patientin zur Probengewinnung für den Apoptoseassay	46
Tabelle 5:	Darstellung der relativen Mittelwerte der metabolischen Aktivität und der Standardfehler für 5.000 JEG3-Zellen nach Inkubation mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum nach 0h, 24h und 48h.....	49
Tabelle 6:	Darstellung der relativen Mittelwerte der metabolischen Aktivität und der Standardfehler für 10.000 JEG3-Zellen nach Inkubation mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum nach 0h, 24h und 48h.....	54
Tabelle 7:	Darstellung der relativen Mittelwerte der metabolischen Aktivität und der Standardfehler für 20.000 JEG3-Zellen nach Inkubation mit Nicht-Schwangeren-, Gesund-Schwangeren- und Präeklampsie-Serum nach 0h, 24h und 48h.....	59
Tabelle 8:	Anteil apoptotischer, nekrotischer und lebender Zellen nach Versetzen der JEG3-Zellen mit Gesund-Schwangeren- (GSS) und Präeklampsie-Serum (PES 1) jeweils einer Probandin in steigender Konzentration	64
Tabelle 9:	Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von STAT3(Tyr705) in unterschiedlich stimulierten JEG3-Zellen mittels Western Blot.....	67
Tabelle 10:	Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von ERK1 in unterschiedlich stimulierten JEG3-Zellen mittels Western Blot.....	71
Tabelle 11:	Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von p-ERK2 in unterschiedlich stimulierten JEG3-Zellen mittels Western Blot.....	73
Tabelle 12:	Irrtumswahrscheinlichkeit für den Vergleich der Phosphorylierungsintensität von STAT3(Tyr705)	110
Tabelle 13:	Irrtumswahrscheinlichkeit für den Vergleich der Phosphorylierungsintensität von ERK1.	110
Tabelle 14:	Irrtumswahrscheinlichkeit für den Vergleich der Phosphorylierungsintensität von ERK2.	111

Danksagung

Ich bedanke mich beim gesamten Team des Plazentalabors der Universitätsklinik Jena für Unterstützung, Erklärungen, Geduld und konstruktive Zusammenarbeit. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Udo Markert, welcher mich all die Jahre stets motiviert und unterstützt hat. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Levon Khachatryan für die Proben der Präeklampsiepatientinnen und die Anleitung zur Durchführung und Auswertung der Experimente.

Außerdem bedanke ich mich bei Ingeborg Radel für das schnelle und kompetente Korrekturlesen.

Meiner Familie, und dabei ganz besonders meinem Ehemann Dr. Jonas Graul, danke ich dafür, dass sie immer an mich glaubt und für mich da ist.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Udo Markert, Dr. med. Jonas Graul, Dr. med. Levon Khachatryan, Dr. rer. nat. Diana Maria Morales Prieto, Dr. rer. nat. Maja Weber, Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth, Dr. rer. nat. Sebastian Hölter, Dipl. oec. troph. Uta Enke, Dr. rer. nat. Stefan Neubeck, Dipl. oec. troph. Martina Mai (geb. Klas), M. Sc. Christoph Herrmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Halle, 04.05.2018

Unterschrift des Verfassers