

Die Bedeutung des lokalen und zirkulierenden Renin-Angiotensin Systems in der Präeklampsie

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Florian Herse
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer.nat. Lothar Kroh
Berichter:	Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl
Berichter:	PD Dr. med. Ralf Dechend

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18. Dezember 2007

Berlin, 2007

D 83

1	ZUSAMMENFASSUNG	4
2	EINLEITUNG	5
2.1	PRÄEKLAMPSIE	5
2.2	RENIN-ANGIOTENSIN SYTEM	8
2.3	PROBLEMSTELLUNG	13
3	MATERIAL	15
3.1	CHEMIKALIEN	15
3.2	REAKTIONSPUFFER, ANTIBIOTIKA, RT-PCR	15
3.3	ALLGEMEIN VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER	15
3.4	PRIMER UND OLIGONUCLEOTIDE	16
3.5	MARKER	17
3.6	ANTI-KÖRPER	17
3.7	ZELLKULTURMEDIUM	17
3.8	KITS	17
3.9	GERÄTE	18
3.10	SOFTWARE	18
4	METHODEN	19
4.1	PATIENTEN	19
4.2	PROBENGEWINNUNG	19
4.3	RNA-ISOLIERUNG	20
4.4	RNA-QUANTIFIZIERUNG/QUALIFIZIERUNG	21
4.5	SYNTHESE VON CDNA	21
4.6	MICROARRAY	22
4.6.1	DATENANALYSE	22
4.6.2	DURCHFÜHRUNG	22
4.7	REALTIME-RT-PCR	22
4.8	IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE	25
4.9	PLASMA RENIN AKTIVITÄT	25
4.10	AUFREINIGUNG DER AT1-AA AUS SERUM (IGG-AUFREINIGUNG)	26
4.10.1	CAPRYLSÄURE	26
4.10.2	AMMONIUMSULFAT-FÄLLUNG (AS-FÄLLUNG)	26
4.10.3	GLOBAFFIN	27
4.11	KARDIOMYOZYTEN-KONTRAKTIONS-BIOASSAY	27
4.12	ZELLKULTUR	27
4.13	PROTEINISOLATION	27
4.14	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	28
4.15	WESTERNBLOTANALYSE	28
4.15.1	SDS-PAGE	28
4.15.2	BLOTTEN	29
4.15.3	BLOCKEN	29
4.15.4	ANTI-KÖRPER	29
4.15.5	DETEKTIERUNG DES ANTI-KÖRPERS	30
4.16	QUANTIFIZIERUNG WESTERN BLOT	30
4.17	STATISTIK	30

<u>5</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>31</u>
5.1	PATIENTENCHARAKTERISTIK	31
5.2	MICROARRAY	32
5.3	LOKALES RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM	35
5.4	ZIRKULIERENDES RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM	48
<u>6</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>51</u>
<u>7</u>	<u>LITERATUR</u>	<u>57</u>
<u>8</u>	<u>PUBLIKATIONSLISTE</u>	<u>64</u>
8.1	BEITRÄGE	65
<u>10</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>67</u>

1 Zusammenfassung

Präeklampsie ist verheerend für Mutter und Kind. Der Ursprung der Krankheit liegt in der utero-plazentären Einheit (upE). Auswirkungen sind bis in die Zirkulation der Mutter messbar. Das Renin-Angiotensin System (RAS) ist in die Präeklampsie involviert, obwohl nicht geklärt ist, wie das zirkulatorische und das gewebespezifische utero-plazentäre RAS miteinander interagieren. Diese Arbeit sollte die Dysregulation in der upE und der maternalen und fetalen Zirkulation, insbesondere des RAS, zeigen. Es wurden Expressionsanalysen der Decidua, Plazenta (als upE), Fett- und Muskelgewebe von 10 Kontroll-Schwangeren und 10 präeklampsischen Schwangeren durchgeführt und auf Proteinebene verifiziert. Außerdem wurden die Plasma-Renin Aktivität (PRA) und der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1-Autoantikörper (AT1-AA) in der Zirkulation untersucht und die Aktivität des AT1-AA charakterisiert. Die meisten Gene waren in der Decidua dysreguliert. Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1-R) war um den Faktor 5,0 in der präeklampsischen Decidua hochreguliert, der AT2-R in der präeklampsischen Plazenta runterreguliert. Der AT1-AA wurde in maternalem Serum und im transplazentaren Transfer detektiert und zeigte sich befähigt den MAPK-Weg spezifisch zu aktivieren. Die PRA war in der Präeklampsie um den Faktor 3 reduziert. Die RAS-Komponenten Renin (35-fach), Angiotensin converting enzyme (2,8-fach) und Angiotensinogen (9-fach) waren unabhängig der Präeklampsie in der Decidua höher expremiert als in der Plazenta, wohingegen der AT1-R in der Plazenta höher expremiert wurde. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Dysregulation des lokalen und zirkulierenden RAS während der Präeklampsie und beschreiben das RAS in der upE. Diese neuen Faktoren könnten zum besseren Verständnis der Pathologie von Präeklampsie beitragen.

2 Einleitung

2.1 Präeklampsie

Die Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie manifestiert sich durch schlagartigen Anstieg des Bluthochdrucks, einhergehend mit einer Proteinurie und wurde das erste mal 2000 v. Chr. in dem Kahun-Papyrus im alten Ägypten beschrieben (Stevens, 1975). Die Auswirkungen für Mutter und Fötus sind verheerend (Sibai et al., 2005). So ist die Präeklampsie die Hauptursache für mütterliche und kindliche Morbidität und Mortalität (Norwitz und Repke, 2000). Das American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) hat Kriterien aufgestellt, wonach eine Präeklampsie deutlich charakterisiert wird und von anderen schwangerschaftsinduzierten Bluthochdruckerkrankungen unterschieden werden kann. So ist der Blutdruck einer vormals nicht an Bluthochdruck leidenden Patientin mit $>140/90$ mm Hg definiert und die Proteinurie mit >300 mg/l Protein in einem 24h-Sammelurin angegeben (2002). Eine schwere Verlaufsform der Präeklampsie ist das HELLP-Syndrom, was für Haemolyse, Elevated Liver enzymes (erhöhte Leberwerte) und Low Platelets (verminderte Thrombozyten) steht, sowie die Eklampsie (Auftreten von schweren Krämpfen bei der Mutter) (Davison et al., 2004). Leidet die Mutter bereits vor der Schwangerschaft an Bluthochdruck, so addieren sich die Pathologien auf und man spricht von einer Pfropfgestose.

Insgesamt 5-10 % aller Schwangerschaften weltweit entwickeln eine Präeklampsie. Die Unterschiede sind aber regional sehr unterschiedlich und variieren von 2-5% in Europa und den USA, bis maximal 19% in Entwicklungsländer (Roberts et al., 2003). Die kindliche Morbidität oder sogar Mortalität ist bedingt durch eine mögliche Mangelversorgung des Kindes, hervorgerufen durch eine eingeschränkte Funktion der Plazenta. Hierbei kann es zu Wachstumsretardierung, mangelnde Sauerstoffversorgung oder sogar zum Kindstod kommen (Fayyad und Harrington, 2005). Liegt diese Mangelversorgung nicht vor, so verbleibt das Risiko eines zu geringen Geburtsgewichtes, IUGR (intrauterine growth restriction) genannt, resultierend aus dem vorzeitigen Schwangerschaftsabbruch. Kinder mit IUGR haben im weiteren Leben ein erhöhtes Risiko kardiovaskuläre Krankheiten zu erleiden (Barker, 1997; Barker, 1999). Ebenfalls bei Frauen, die unter einer Präeklampsie

entbunden haben, ist ein erhöhtes Risiko für kardiovaskulären Erkrankungen erkennbar (Anderson, 2007).

Zurzeit steht keine geeignete Therapie zur Verfügung, welche sowohl die Gesundheit des Kindes wie die der Mutter berücksichtigt. Dies beruht auf der Tatsache, dass der genaue Hintergrund der Krankheit nicht geklärt ist. Die herkömmlichen Therapieansätze bei Bluthochdruckerkrankungen wie ACE-Hemmer und AT-Blocker sind eher kontraindizierend für die fetale Entwicklung. Es bleibt nur eine vorzeitige Entbindung, um schwere Schädigungen der Mutter wie Hirnblutungen oder Nierenschädigung zu verhindern (Wolf et al., 2001). Es wurde bei Risikopatientinnen versucht, mit verschiedenen Medikamenten und Diäten, wie z.B. Magnesium-, Zink-Verabreichung oder einer Proteindiät, die Entwicklung einer Präeklampsie/Eklampsie zu verhindern. Meist haben diese Studien nur eine sehr geringe Fallzahl und zeigen widersprüchliche Ergebnisse (Witlin und Sibai, 1997).

Für Präeklampsie ist eine Vielzahl an Risikofaktoren bekannt, die mehr oder weniger alle auf statistischen Erhebungen beruhen. So nimmt das Risiko, an Präeklampsie zu erkranken mit jeder folgenden Schwangerschaft um das etwa 6 bis 8-fache ab. Dieser relative Schutz in den folgenden Schwangerschaften ist nicht mehr vorhanden, wenn die Kinder mit verschiedenen Vätern gezeugt werden, was eine deutliche immunologische Komponente erkennen lässt (Trupin et al., 1996). Ein weiterer Hinweis auf eine immunologische Komponente liefert die Tatsache, dass Frauen, die längere Zeit vor der Befruchtung mit dem Vater sexuellen Kontakt hatten, ein geringeres Risiko für Präeklampsie aufweisen (Einarsson et al., 2003). Es gibt ebenfalls einige Faktoren, die auf eine genetische Komponente schließen lassen, welche sowohl den mütterlichen wie den väterlichen Ursprung berücksichtigen. So haben Töchter und Schwestern von präeklampsischen Frauen ein 30%iges Risiko, an Präeklampsie zu erkranken (Chesley, 1980). Die Inzidenz von Präeklampsie ist erhöht bei jungen Schwangeren, Mehrlingsschwangerschaften, Diabetes mellitus, Übergewicht und anderen Erkrankungen, die mit einer Autoimmunkrankheit assoziiert sind (wie Anti-Cardiolipin Antikörper Syndrom) (Roberts und Cooper, 2001). Eine breite Akzeptanz findet die 2-stage-disorder theory. Hiernach entwickelt sich eine Präeklampsie in zwei Stufen, wobei sich die erste Stufe durch eine verminderte Perfusion der Plazenta und die zweite Stufe als Translation der ersten Stufe auf das gesamte System der Mutter verstanden wird (Roberts und Gammill, 2005).

Dass die Plazenta die ausschlaggebende Einheit in der Entstehung der Präeklampsie ist, begründet sich schon in der Tatsache, dass ihr Auftreten an das Vorhandensein der Plazenta gebunden ist. Die Plazenta fängt an sich auszubilden, sobald sich der Blastozyste (befruchtete Eizelle) im Endometrium der Mutter einnistet. Aus der Blastozyste entwickelt sich der Embryoblast und eine umgebene Zellschicht, aus der sich die Trophoblasten bilden, welche wiederum die Plazenta aufbauen. Die Plazenta besteht somit aus fetalem Gewebe. Sie kann im ausgereiften Stadium etwa 500-600g wiegen, mit einem Durchmesser von 15-20cm. Das Endometrium bildet sich nach Einnistung des Blastozysten in die Decidua um. Hier sind die Spiralarterien lokalisiert, welche einen enorm hohen Nährstoff- und Sauerstoffaustausch gewährleisten. Dieser Teil ist mütterliches Gewebe und wird durch einwandernde Trophoblasten mit fetalen Zellen infiltriert. Dieser Teil verbleibt normalerweise bei der Geburt im Uterus, währenddessen die Plazenta mit der Nachgeburt ausgestoßen wird. In einer normalen Schwangerschaft muss dem Fötus ein ausreichendes Nährstoffangebot zur Verfügung gestellt werden, d.h. die Arterien in der Plazenta werden umgebaut. Dies geschieht, indem Trophoblasten gegen den Blutstrom in die Arterien einwandern, die Gefäßwand ausbetten und so zu einer Umgestaltung der Spiralarterien durch Ersetzen der Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen führen (Kam et al., 1999). Diese endovaskulären Trophoblasten erfahren einen Differenzierungsprozess, an dessen Ende sie endotheliale Marker wie angiogenetische Faktoren und Rezeptoren exprimieren. Dieser Prozess wird durch Hypoxie gesteuert (Red-Horse et al., 2004). Durch diesen Umbau der Arterien (engl. artery-remodeling) ist sicher gestellt, dass in Stresssituationen freigesetzte vasokonstriktische Stimuli, wie z.B. Angiotensin II, kein Verengen der Arterien und damit einhergehende Mangelversorgung des Kindes vermitteln können und die uneingeschränkte Blutversorgung des Fötus gesichert ist. Neben den endovaskulären Trophoblasten tritt auch eine weitere invasive Art auf, die interstitialen Trophoblasten, welche nicht durch die Gefäße wandern, sondern direkt durch das mütterliche Gewebe. In der präeklampsischen Plazenta kommt es zu einem stark hypoxischen Zustand und einem gestörten Level an angiogenetischen wie antiangiogenetischen Faktoren. Die Trophoblasteninvasion ist inhibiert, der Umbau der Spiralarterien vermindert und es kommt zu einer gestörten Zirkulation in der Plazenta (Redman, 1991). Dieser Vorgang wird auch als abnormale Plazentation bezeichnet.

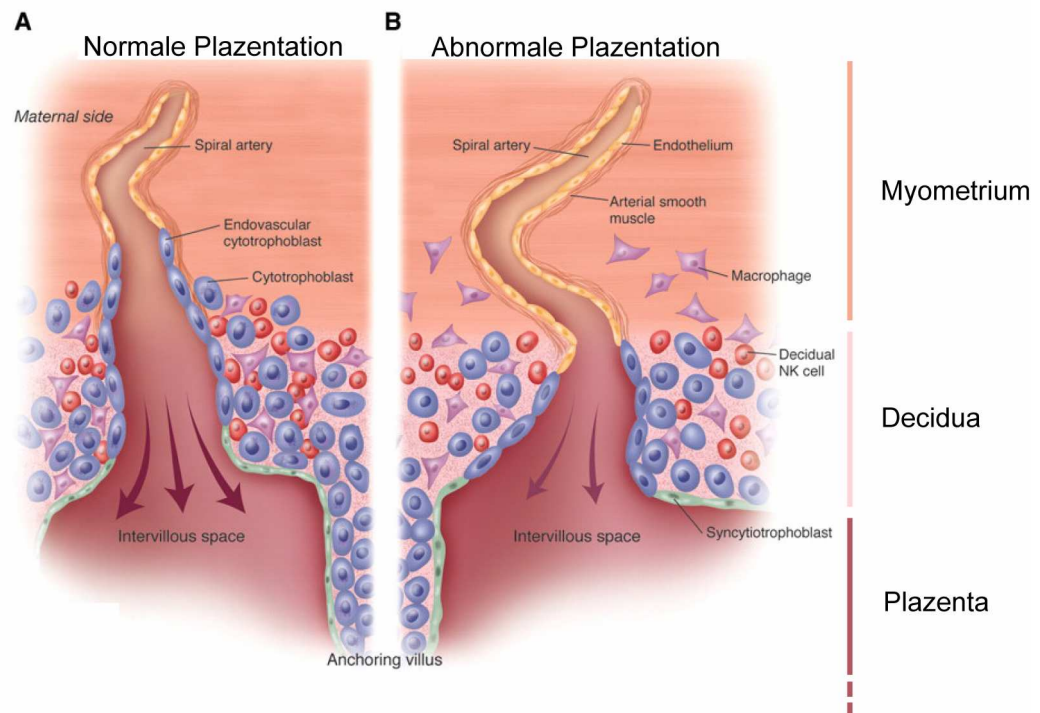


Abb.1: Veränderte Plazentation während der Präeklampsie (nach Redman und Sargent, 2005).
A) Der Aufbau und das Umgestalten der Spiralarterienwand durch einwandernde Trophoblasten führt zu einer nicht-kontraktionsfähigen Spiralarterie und einem hohen Blutfluß. **B)** Während der Präeklampsie kommt es zu einer verminderten Trophoblasteninvasion, gestörter Umgestaltung der Spiralarterien und dadurch zu einer abnormalen Plazentation. Durch eine mögliche Kontraktion kommt es zu einer Mangelversorgung des Fetus.

2.2 Renin-Angiotensin Sytem

Das Renin-Angiotensin System (RAS) ist eine gut charakterisierte Hormon-Enzym-Kaskade, welche die Salz- und Wasserretention sowie das Blutdrucksystem steuert. Am bekanntesten ist die Wirkungsweise über die Zirkulation (zirkulierendes RAS). Hier kommt es zum Zusammenspiel aus in der Niere exprimiertem Enzym Renin und in der Leber freigesetztem Hormon Angiotensinogen. Neben diesem zirkulierenden RAS gibt es auch ein lokales RAS. Hier sind alle Komponenten des RAS mit gewebespezifischer Lokalisierung exprimiert. Das final aktive Peptidhormon der Kaskade ist das Angiotensin II (AngII). Es ist ein Octapeptid und wurde zuerst unter dem Namen Angiotonin 1957 beschrieben (Bumpus et al., 1957). Es wird über die Vorstufe Angiotensin I (AngI) aus dem nicht-bioaktiven Peptidhormon Angiotensinogen gebildet. Die Protease Renin spaltet und aktiviert das Angiotensinogen (AGT) zu dem AngI. Durch das Angiotensin Converting Enzyme

(ACE) werden zwei Aminosäuren von AngI abgespalten und somit in AngII umgewandelt. AngII hat die Sequenz Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe und wurde in der Vergangenheit lediglich als Hormon angesehen, welches regulatorischen Einfluß auf den Blutdruck, die Natrium-Resorption und die Aldosteron-Freisetzung nahm. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass AngII auch die Expression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und Adhensionsmolekülen reguliert. Diese sind in das Zellwachstum, Apoptose, Fibrose (Vermehrung des Bindegewebes) und inflammatorische Prozesse involviert (Ruiz-Ortega et al., 2001). Aufgrund eines erhöhten Gehaltes an ACE, AngII und deren Rezeptor in arteriosklerotischen Herzkranzgefäßen konnte gezeigt werden, dass das RAS in inflammatorischen Prozessen der Gefäßwand mitwirkt (Schieffer et al., 2000). Ebenfalls in Sauerstoffradikalbildung ist das AngII involviert, da es durch Regulierung der NADH/NADPH-Oxidase vermehrt die Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen induziert (Griendling et al., 1997). Diese reaktiven Sauerstoffmoleküle beeinflussen das Zellwachstum, die Herzhypertrophie, die Lipidoxidation und inflammatorische Prozesse (Luft, 2000). Die Wirkung von AngII wird über zwei Rezeptoren vermittelt. Bei dem Menschen sind zwei Subtypen von Angiotensinrezeptoren bekannt: Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1-R) und der Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT2-R). Der AT1-R wurde das erste Mal 1970 beschrieben und 1991 kloniert (Goodfriend und Lin, 1970; Sasaki et al., 1991).

Der menschliche AT1-Rezeptor besteht aus 359 Aminosäuren (41 kDa) und weist sieben hydrophobe, transmembrane Segmente in α -Helixstruktur auf (Murphy et al., 1991). Der AT1-R gehört zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (engl. G protein-coupled receptors, GPCR). Über ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C und dadurch wiederum zur Aktivierung von Calciumkanälen und der Protein-Kinase C (PKC). Diese G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion, welche unter anderem die Kontraktion von glatten Muskelzellen, Sekretion von Aldosteron, Aktivierung von Nerven, Transport von Ionen und die Proliferation von Zellen und deren Wachstum steuert, setzt sich über die MAP-Kinase/ERK-Signalkaskade fort. Hierdurch kommt es zur Regulation der Transkription und Expression von Proteinen, die das Wachstum und die Proliferation von AngII-Zielgewebe kontrollieren (de Gasparo et al., 2000).

Es gibt viele Hinweise, dass das RAS in der Entstehung der Präeklampsie beteiligt ist (Shah, 2005). Das zirkulierende RAS wird bereits durch die Schwangerschaft

aktiviert, was sich dadurch äußert, dass Renin- und Angiotensinogen-Spiegel erhöht sind (Hsueh et al., 1982). In der Präeklampsie sind AngII Spiegel, Plasma-Renin Aktivität und Aldosteronspiegel gegenüber einer unkomplizierten Schwangerschaft reduziert. Neben den „normalen“ RAS (zirkulierendes und lokales RAS) kommt es bei schwangeren Frauen zu einem weiteren Auftreten eines RAS, das uteroplazentare RAS (Shah, 2005).

Präeklampsische Patientinnen zeigen eine höhere Sensitivität gegenüber AngII (Shah, 2006). Studien, bei denen schwangeren Patientinnen AngII in geringen Dosierungen infundiert wurde, zeigten, dass die Patientinnen, welche später eine Präeklampsie entwickelten eine geringere Dosis an AngII benötigten, um einen Blutdruckanstieg zu erreichen (Gant et al., 1973). Mögliche Erklärungen könnten eine vermehrte Aktivierung durch Autoantikörper gegen den AT1-R, eine erhöhte Expression des AT1-R, bzw eine Heterodimerisierung des AT1-R mit dem Bradykinin Rezeptor (BDKRB2) sein (Shah, 2006). Viele dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigen im heterodimerisierten Zustand veränderte Eigenschaften, wie Bindungsaffinität oder Signalvermittlung (Barki-Harrington, 2004). In der Präeklampsie kommt es durch diese Rezeptor-Dimerisierung zwischen dem AT1-R und dem BDKRB2 oder auch dem AT1-R mit sich selber bei gleicher AngII Konzentration zu einer verstärkten Signaltransduktion. Zudem ist der heterodimerisierte AT1-R vor einer Inaktivierung geschützt (AbdAlla et al., 2001). Der AT1-R ist ebenfalls in die Aktivität von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (engl. Growth factor receptors) involviert. So kommt es durch den AT1-R zu einer Transaktivierung des Epidermal Growth factor- Rezeptors (EGF-R) (Higuchi et al., 2007). Als Erweiterung des RAS kann man das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) auffassen, da die Bildung von Aldosteron (Ald) und AngII eng verknüpft ist. Aldosteron wird durch die Aldosteronsynthase (Cyp11B2) in der Nebennierenrinde gebildet und interagiert über den Mineralocorticoid Rezeptor (MR). Die durch AngII und Ald vermittelte Signaltransduktion ist eng gekoppelt. So aktivieren AngII und Ald beide die Phosphorylierung der MAP-Kinase (ERK) und wirken in Kombination additiv. Die induzierte Phosphorylierung lässt sich durch einen spezifischen MR Blocker sowie EGF-R Blocker hemmen (Mazak et al., 2004). Hieraus ergibt sich ein enges Zusammenspiel zwischen den einzelnen Rezeptoren und deren Agonisten.

In der Zirkulation schwangerer Frauen sind gegenüber nicht-schwangeren Frauen einige Faktoren verändert. Neben einem veränderten Hormonhaushalt sind auch

Trophoblasten-Trümmer und angiogenetisch-assoziierte Faktoren detektierbar. Gerade diesen Faktoren widerfährt eine Dysregulation in der Präeklampsie (Redman und Sargent, 2005). Ein weiterer Faktor, der in der Zirkulation präeklampsischer Frauen detektierbar ist, ist ein agonistischer Autoantikörper, der gegen den AT1-R gerichtet ist (AT1-AA) (Wallukat et al., 1999). Dieser AT1-AA ist nicht spezifisch für die Präeklampsie, da er auch in weiteren schwangerschaftsinduzierten Bluthochdruckerkrankungen sowie IUGR anzutreffen ist (Walther et al., 2005). Da er auch in der Zirkulation eines präeklampsischen Rattenmodells gefunden wurde, scheint er auch nicht speziesgebunden zu sein (Dechend et al., 2005). Ebenfalls in Patienten mit Nieren-Transplantat-Abstoßungs-Reaktion ist der AT1-AA detektierbar (Dragun et al., 2005). Das Epitop gegen welches der AT1-AA reaktiv ist, wurde als Sequenz (sieben Aminosäuren) aus dem zweiten extrazellulären Loop des AT1-R charakterisiert (Wallukat et al., 1999). Die Signaltransduktion ist nur in Teilen charakterisiert, zeigen jedoch immer einen deutlichen Hintergrund zu der präeklampsischen Erkrankung auf. So führen die Autoantikörper zu einer intrazellulären Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Dieser Prozess wird durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase vermittelt. Als Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren werden im folgendem die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-kB durch AT1-AA aktiviert (Dechend et al., 2003). Durch isolierte Zellen aus Knock-out Tieren konnte gezeigt werden, dass die NADPH Oxidase für die AT1-AA induzierte Aktivierung von NF-kB notwendig ist. Als Folge dieser Aktivierung kommt es zu einer vermehrten Expression und Aktivität des Tissue Faktors, eines der wichtigsten pro-koagulatorischen Proteine (Dechend et al., 2000). In humanen Mesangialzellen (Ursprung: Niere) führen die AT1-AA in Vitro zur erhöhten Expression von Interleukin-6 und dem Plasminogen activator inhibitor-1 (Bobst et al., 2005). Diese beiden Faktoren deuten auf einen inflammatorischen Prozeß und einen pathologischen Zustand der Niere hin, welches beides in einer Präeklampsie gegeben ist. Eine weitere Signalkaskade welche durch den AT1-AA aktiviert wird, ist die intrazelluläre Calciumfreisetzung und die damit verbundene Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (Thway et al., 2004). Erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel in Thrombozyten sind ebenfalls in Patienten mit Präeklampsie beschrieben worden (Haller et al., 1989).

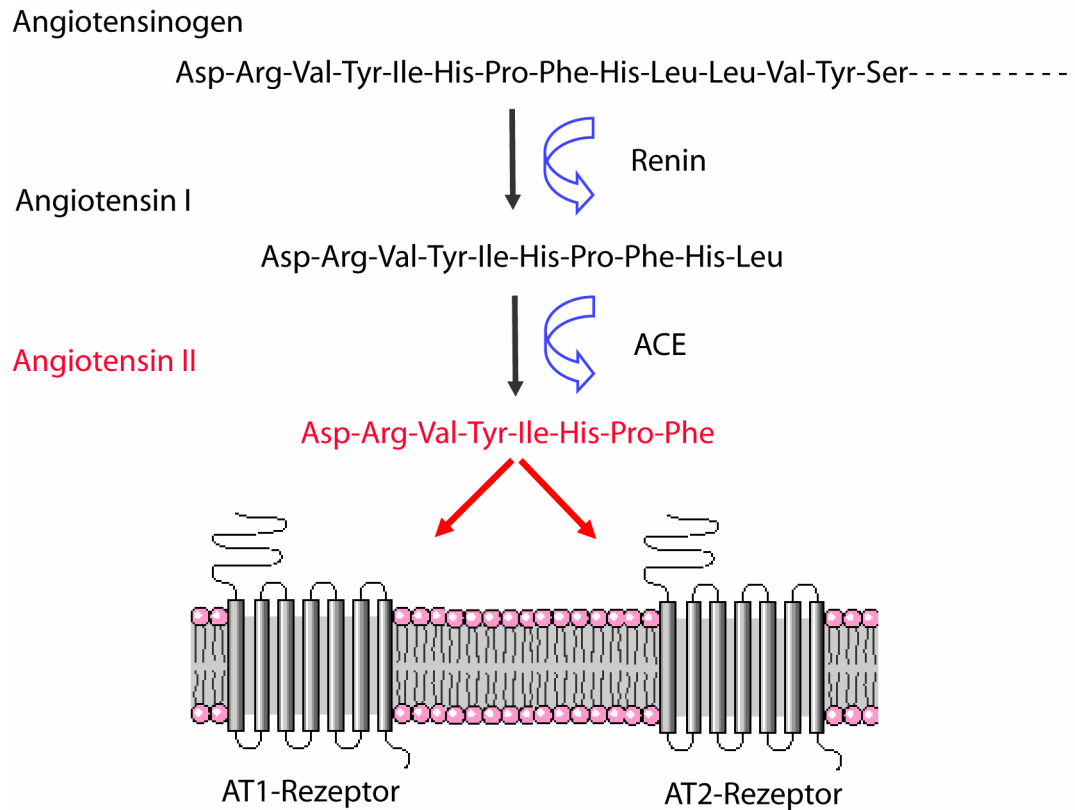


Abb.2: Renin-Angiotensin System (RAS). Das RAS besteht aus dem Hormon Angiotensinogen welches durch die Enzyme Renin und Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) in das aktive Peptidhormon Angiotensin II gespalten wird. Dieses vermittelt Signaltransduktion über die Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 (AT1-R) und Typ 2 (AT2-R) und ist in die Blutdruckregulation involviert.

2.3 Problemstellung

Einige in dieser Arbeit untersuchten Aspekte waren im Einzelnen schon aus anderen Arbeiten bekannt. Dieser Arbeit liegt zu Grunde, dass ein gut charakterisiertes Patientenkollektiv von Kontroll-Schwangeren (n=10) und präeklampsischen Schwangeren (n=10) genutzt wurde, um das komplexe Bild der Präeklampsie besser im Ganzen zu betrachten. So sollte von jeder Patientin das Genexpressionsverhalten der uteroplazentaren Einheit (Plazenta und Decidua) in der Gesamtheit und im Einzelnen sowie des Fettgewebes charakterisiert werden. Insbesondere sollten in diesen Geweben und zusätzlich in Muskelgewebe die Komponenten des RAS sowie deren Cofaktoren näher untersucht werden. Da die Präeklampsie auch als 2 stage disorder bezeichnet wird, die Entstehung der uteroplazentaren Einheit zugesprochen wird und die Auswirkung oder die gebildeten Faktoren über die Zirkulation der Patientin vermittelt werden, sollten neben dem lokalen RAS auch das zirkulierende RAS untersucht werden. Ein sehr wichtiger Faktor im zirkulierenden System präeklampsischer Frauen ist der AT1-AA, dessen vermittelnde Signaltransduktion im Vordergrund stehen sollte.

Durch die in dieser Arbeit gewählten Methoden und ausgehend von dem umfangreichen und sehr gut klinisch charakterisierten Patientenmaterial, sollte die ausgesprochen komplexe Pathologie der Präeklampsie untersucht werden.

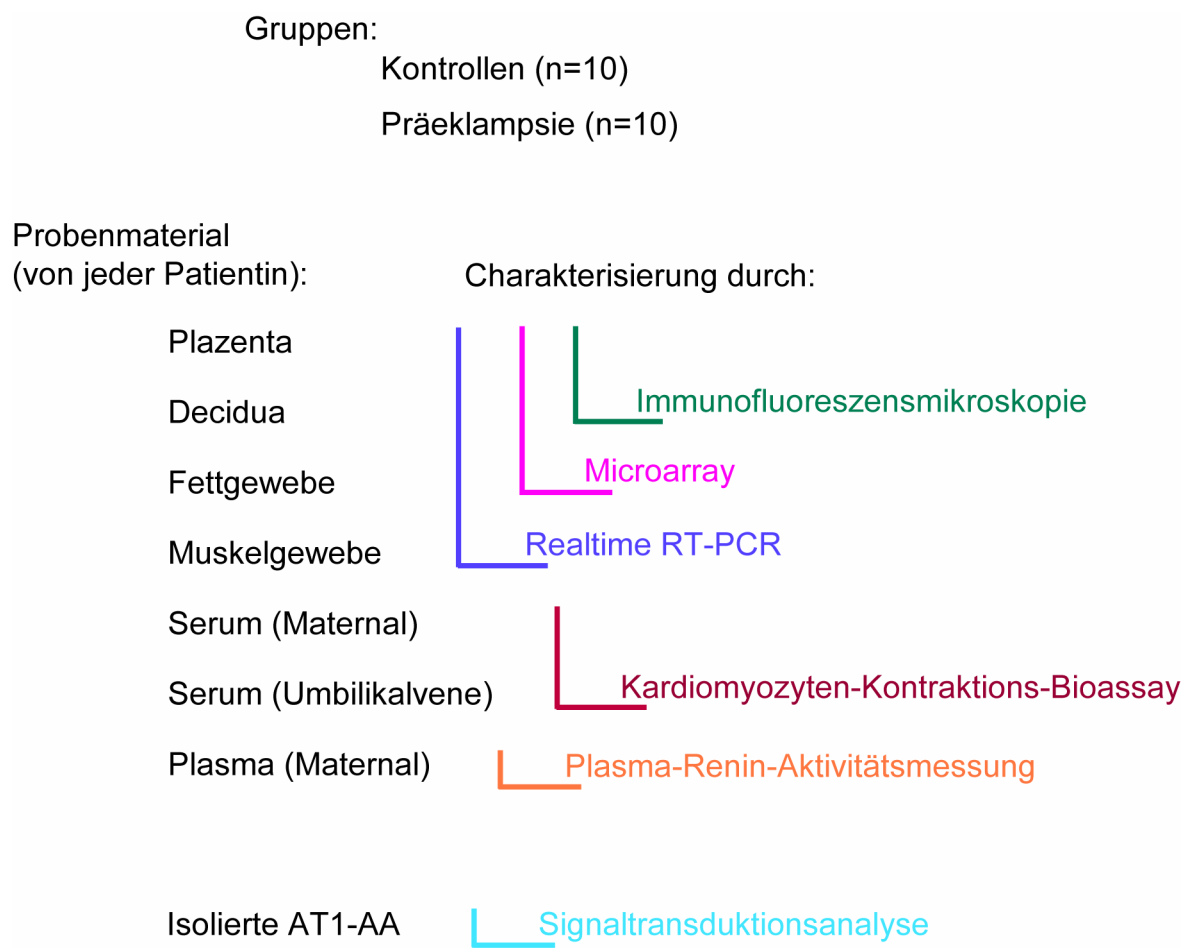


Abb.3: Studiendesign.

3 Material

3.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Gibco Life Technologies (Karlsruhe) und Fluka (Neu-Ulm) in *reinst* oder *p.A.* Qualität verwendet.

3.2 Reaktionspuffer, Antibiotika, RT-PCR

Rnase, dNTPs stammten von Promega (Mannheim) und AmpliTaq DNA Polymerase von Applied Biosystems (Weiterstadt), Advantage II Polymerasemix und 10 x Reaktionspuffer von BD-Biosciences (Heidelberg).

3.3 Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

10 x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,4 mM Na ₂ HPO ₄
10 x PAGE	0,25 M Tris; 1,92 M Glycin
10 x TBE Puffer	0,9 M Tris-HCl; 0,9 M Borsäure; 20 mM EDTA; pH 7,8
DNA Probenpuffer	Bromphenolblau 0,25% (w/V); Glyzerin 30% (w/V)
TE Puffer	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,6
Auftragepuffer (Proteingel)	310 mM Tris-HCL pH 6,8; SDS 10%; Glyzerin 50%; Bromphenolblau 0,01%; 2-Mercaptoethanol 25%
TBS-T (Blotten)	NaCl 0,8%; 20 mM Tris-HCL pH 7,5; Tween 20 0,2%
Elektrophoresepuffer	1x PAGE; SDS 10%
Coomassie-Färbung	G 250 0,1%; Essigsäure 10%; Methanol 50%
Coomassie-Entfärbung	Essigsäure 10%; Methanol 20%
Lysispuffer	20mM HEPES pH 7,9 ; 350mM NaCl ; 20% Glycerol ; 1mM MgCl ₂ ; 0,5mM EDTA 0,1mM EGTA ; 1% NP40; Complete (Roche) (1 Tablette auf 30 ml) ; 1% Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1 (SIGMA)
Vectashild-Mounting Medium	Vector-Laboratories, Burlingame, USA

3.4 Primer und Oligonucleotide

Gen		Primer fw	Primer rv	Amplikon- länge [Basen]
ACE	Primer	5'-CACCCAGGCCAGGAAGTTT-3'	5'-TGCCCGTTCTAGGTCCTGAA-3'	88
	Sonde	5' FAM-CCAGTTGCAGAACACCACTATCAAGCGG-TAMRA3'		
AGT	Primer	5'-CTTCACTGAGAGCGCCTGC-3'	5'-AGACCCTCCACCTTGTTCA-3'	73
	Sonde	5' FAM-CTGATCCAGCCTCACTATGCCTCTAACC-TAMRA3'		
AT1-R	Primer	5'-ACCCAATGAAGTCCCGCCT-3'	5'-AGCAGCCAAATGATGATGCAG-3'	70
	Sonde	5' FAM-CGACGCACAATGCTTGTAGCCAAAGTCA-TAMRA3'		
AT2-R		Applied Biosystems Assay on Demand Hs 00169126_m1		113
BDKRB2	Primer	5'-CCCACCACGGCCTCTTT-3'	5'-GTTAAGAGTGGGCCCTTGCA-3'	63
	Sonde	5' FAM-AGCGCCGACATGCTCAATGTCACC-TAMRA3'		
Cyp11B2	Primer	5'-CTTGGTGCTTCAGAACTACCACAT-3'	5'-CATTGCGACCCAGCGAGTA-3'	74
	Sonde	5' FAM-CCAGCTGGGACATTGGTACAGGTTTTCC-TAMRA3'		
EGFR	Primer	5'-GACAGCATAGACGACACCTTCCT-3'	5'-GCCAGCGGGCCTTTTG-3'	72
	Sonde	5' FAM-CCAGTGCCTGAATACATAAACAGTCCGTTC-TAMRA3'		
M-R	Primer	5'-CCCAGAGGAAGGGACAACGT-3'	5'-GCTGAGGAACCAAGTGCTGTGT-3'	72
	Sonde	5' FAM-TCGCTCCTGCAAAAGAACCCTCGG-TAMRA3'		
Renin		Applied Biosystems Assay on Demand Hs 00166915_m1		71
Renin-R	Primer	5'-CCAGGACTCGCAGTGGGTAA-3'	5'-ACTCCCTTCACCATCACCATG-3'	67
	Sonde	5' FAM-TGTTTCATCGTCCTCGGGCTACCGA-TAMRA3'		
TBP	Primer	5'-GACCTAAAGACCATTGCACTTCGT-3'	5'-CCTCATGATTACCGCAGCAAA-3'	75
	Sonde	5' FAM-CCGAAACGCCGAATATAATCCCAAGC-TAMRA3'		
36B4	Primer	5'-AGCAGATGCAGCAGATCCG-3'	5'-TCTTGCCCATCAGCACCCAC-3'	59
	SYBR			

Tab.1: Primerliste. In dieser Liste sind die Sequenzen der Primer und Sonden und deren Amplikonlängen für die Realtime RT-PCR aufgeführt.

3.5 Marker

Kaleidoscope	Bio-Rad Laboratories, München
Prestained Standards	

3.6 Antikörper

Anti-hu Cytokeratin 7	Santa Cruz
Anti-hu AT1-Rezeptor	Santa Cruz
Anti-hu Renin	Roche, Mannheim
Anti-rabbit-Cy3	Jackson Immunoresearch Laboratories
Anti-pERK	Cell Signaling Technologies
Anti-ERK	Cell Signaling Technologies
Anti-rabbit-HRP	Jackson Immunoresearch Laboratories

*tragen Horseradish Peroxidase (HRP) –Label

3.7 Zellkulturmedium

D-MEM:F-12 (1:1)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom, Berlin

3.8 Kits

RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
ECL Western blotting detection reagents and analysis system	Amersham Biosciences, Freiburg
Globaffin	Affina Immuntechnik GmbH (heute Fresenius)
RNA 6000 Assay	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Primer Random	Roche, Mannheim
M-MLV RT	Promega, USA
Megascript T7	Ambion, USA
qPCR MasterMix Plus	Eurogentec, Köln

3.9 Geräte

Kühlzentrifuge	Beckmann, München
PCR Maschinen	Applied Biosystems, Weiterstadt
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
NanoDrop	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
SpectraFluor Plus	TECAN, Crailsheim
Elektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories, München
Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories, München
Trans-Blot SD Semi-Dry	Bio-Rad Laboratories, München
Transfer Cell	
Zellkulturzentrifuge	Beckmann, München
Entwickler (Optimax)	Protec, Oberstenfeld
Cryostat CM3050S	Leica,
Axioplan 2 mit SensiCam	Zeiss, Jena
Ultra-Turrax T25 basic	IKA-Werke

3.10 Software

GeneWorks	Oxford Molecular Group
Primer Express 2.0	Applied Biosystems, Weiterstadt
AxioVision 3.0	Zeiss, Jena
MAS 5.0	Affymetrix, United Kingdom
RMAexpress 0.5	B.M. Bolstad, USA (http://rmaexpress.bmbolstad.com/)
Cluster 3.0	Michael Eisen, USA (http://rana.lbl.gov/)
TreeView	Michael Eisen, USA (http://rana.lbl.gov/)
Magellan	TECAN, Crailsheim
GeneAmp 5700 SDS	Applied Biosystems, Weiterstadt
SPSS 14.0	SPSS, USA (http://www.spss.com/)

4 Methoden

4.1 Patienten

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben waren Plazenta, Decidua, Fett- und Muskelgewebe, Serum und Plasma der Mutter und Serum aus der Umbilikalvene. Sie wurden alle am Institut für Geburtshilfe und Gynäkologie am Ulleval Universitäts-Krankenhaus in Oslo, Norwegen gesammelt. Die schwangeren Frauen waren alle Nichtraucher, Kaukasen, gesund und mit einer unauffälligen Schwangerschaft. Es gab keinen chronischen Bluthochdruck und keine Nierenerkrankung oder Diabetes in der Vorgeschichte. Beide eingeschlossene Gruppen, präeklampsische Gruppe und normal-schwangerschafts Gruppe (Kontrollgruppe), wurden mit einem Kaiserschnitt entbunden und hatten zur Zeit der Entbindung keine infektiöse Erkrankung. Die Kaiserschnittgeburt in der Kontrollgruppe wurde nach freiem Wunsch durchgeführt und nicht aufgrund von Komplikationen. Eine Präeklampsie wurde diagnostiziert, wenn der Blutdruck bei einer ehemals normotensiven Schwangeren ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) $>140/90$ mmHg an zwei zeitlich getrennten Messungen war und eine Proteinurie im 24 h Sammelurin ($>0,3$ g Protein) oder über Proteinstick (bei mindestens zwei unabhängigen Messungen $>1+$) detektiert wurde. Hierbei durfte keine Harnwegsinfektion vorliegen. Alle Patientinnen haben eine Einwilligung unterschrieben und die Studie wurde von dem Committee of Medical Research Ethics in Eastern Norway kontrolliert.

4.2 Probengewinnung

Während des Kaiserschnittes wurde abdominales Fettgewebe, Muskelgewebe, sowie Plazentagewebe durch eine Biopsie entnommen. Das Deciduagewebe wurde durch eine besondere Technik, der sogenannten „decidual suction method (DSM)“, nach der Entfernung der Plazenta gewonnen. Hierbei wurde durch eine Vakuumabsaugung die Decidua aus dem Myometrium herausgetrennt und das Gewebe in einem Nylonnetz aufgefangen. Dort wurde es unmittelbar mit 500ml sterile NaCl-Lösung gewaschen, um Verunreinigungen durch Blut zu entfernen. Alle Proben wurden unmittelbar nach ihrer Gewinnung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Ein kleiner Teil der Decidua wurde direkt histologisch untersucht, um den decidualen Ursprung zu verifizieren.

Das maternale Blut wurde aus der Armvene entnommen. Das Blut aus der Umbilical Vene wurde direkt nach der Abnabelung des Kindes entnommen. Das Blut wurde in entsprechenden Monovetten (für Serum oder Plasma) gesammelt und nach einer halben Stunde bei RT für 10 min bei 1600g abzentrifugiert. Das Serum/Plasma wurde entnommen, portioniert und bei -80°C gelagert.

4.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits von Qiagen, welches eine rasche Aufreinigung von RNA-Molekülen (>200 Nukleotide) verspricht.

Ca. 500mg Gewebe wurden mit ca. 2 ml Lysepuffer RLT (der Lysepuffer muss 1% β -Mercaptoethanol enthalten; dieses Gemisch ist nur ca. 30 Tage stabil) in einem 8 ml Rundbodenröhrchen gemischt und für 1 min bei 24000 Umdrehungen/min mit einem Stabhomogenisator homogenisiert (Ultra-Turrax T25 basic, IKA-Werke). Es wurden 1 ml in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und für 2 min bei 8600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Um eine Scherung der vorhandenen DNA zu erreichen, wurde die wässrige Phase sieben mal durch eine Kanüle (20 G) und einer 5 ml Spritze aufgesogen. Die weiteren Schritte folgten der Vorschrift von Qiagen.

Für die RNA-Isolierung aus Fettgewebe steht ein leicht modifiziertes Protokoll des RNeasy Mini Kit von Qiagen zur Verfügung:

Nach der Entnahme des Fettgewebes aus der Lagerung (-80°C) musste es sofort auf Eis gelagert und langsam aufgetaut werden. Das Fettgewebe wurde nun im Mengenverhältnis 1:2 mit dem Lysepuffer RLT (1% β -Mercaptoethanol. Dieses Gemisch ist nur ca. 30 Tage stabil) gemischt und im Wasserbad bei 37°C unter mehrmaligem Vortexen erwärmt und lysiert. Das Lysat lag nun als ölige Emulsion vor und wurde zentrifugiert (5 min, 2500 g, 25°C). Nach erfolgter Zentrifugation war deutlich eine Phasentrennung zu erkennen (wässrige Phase, ölige Phase). Mit einer 5 ml Spritze und einer langen Kanüle (20 G) wurde die wässrige Phase in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Ab diesem Schritt wurde wie bei der herkömmlichen RNA-Isolierung verfahren (beginnend mit der DNA-Scherung).

4.4 RNA-Quantifizierung/Qualifizierung

Die RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop quantifiziert. Hierzu wurden 1,5 µl auf die Probenhalterung aufgetragen und gegen einen Leerwert gemessen. In dieser Arbeit wurde darauf geachtet, dass folgende Richtwerte eingehalten wurden:

- Quotient 260/280: 1,8-2,0
- Quotient 260/230: 1,8-2,2
- RNA-Konzentration: >500 ng/µl

Zur Qualifizierung (und erneuten Quantifizierung) wurde eine RNA Konzentrationsmessung mit dem RNA 6000 Assay unter Verwendung des 2100 Bioanalyzer und nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.5 Synthese von cDNA

Um aus einer RNA-Matrize einzelsträngige cDNA zu erhalten, musste eine reverse Transkription durchgeführt werden. Da die Gesamt-RNA umgeschrieben werden sollte, wurde als Primer der aus vielen kurzen Oligonukleotiden bestehende Random-Primer (Randomhexamere) ausgewählt, so dass mehrfache, unspezifische Bindungen über die gesamte RNA erfolgte (anders als bei dem Poly-(dT) Primer, welcher lediglich an den Polyadenylierungssequenzen bindet). Zur Anwendung kam das M-MLV RT-Kit. Es wurde wie in Tab.2 dargestellt vorgegangen:

Probe	2 µg RNA
Random Primer	1,8 µl
Wasser	Auf 14 µl auffüllen
65°C, 10 min, danach sofort auf Eis	
5x M-MLV RT-buffer	4 µl
dNTPs(10 mM each)	1 µl
M-MLV RT	1 µl
Ges.-Vol.	20 µl
Mischen (Pipette), 60 min 37°C, 10 min 95°C	

Tab.2: Pipettierschema cDNA Synthese.

4.6 Microarray

Mit der Arraytechnologie ist es möglich, viele tausend Transkripte in einem Experiment zu untersuchen. Die gleichzeitige Analyse dieser Transkripte eröffnet ein Potenzial, neue Zusammenhänge zwischen Genen aufzudecken. Isolierte mRNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase zu cDNA umgeschrieben, daraus wiederum cRNA synthetisiert. Bei diesem letzten Schritt werden markierte Nukleotide verwendet. Die synthetisierte, einzelsträngige cRNA kann nun an speziellen Sonden auf einer Trägersubstanz hybridisieren. Findet eine sequenzspezifische Hybridisierung statt, so kann sie durch die Markierung der cRNA detektiert werden. Somit ist es möglich, eine Aussage darüber zu treffen, welche Gene in dem Gewebe exprimiert werden. In dieser Arbeit wurden die Human Genom U133 Plus 2 Arrays von Affymetrix verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach den MIAME-Kriterien (Minimum information about a microarray experiment) durchgeführt (Brazma und Vilo, 2001; Stoeckert et al., 2002).

4.6.1 Datenanalyse

In dieser Arbeit wurden die Programme MAS 5.0 (Affymetrix Software), RMAexpress 0.5 (B.M. Bolstad), Cluster 3.0, TreeView (Michael Eisen), sowie die Internetseite <http://david.abcc.ncifcrf.gov> des National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH in Maryland, USA, für die Auswertung des Microarray genutzt.

4.6.2 Durchführung

Für die Microarrayanalysen wurde die RNA der Patientinnen innerhalb der Gruppen (Kontrolle und Präeklampsie) und innerhalb der Gewebegruppen (Fettgewebe, Plazenta, Decidua) gepoolt. So ist jedes Microarrayergebnis das Resultat aus n=10 Patientinnen. Nach dem Poolen der RNA wurden je 5 µg RNA zu cDNA umgeschrieben und einem früheren Protokoll gefolgt (Wellner et al., 2005).

Die Qualität wie Quantität wurden mit dem NanoDrop Spectralphotometer kontrolliert. Nach dem Umschreiben zu cDNA wurde eine Test-PCR durchgeführt.

4.7 Realtime-RT-PCR

Die Realtime-RT-PCR wurde mit dem Gene Amp 5700 Sequence Detector von ABI durchgeführt. Es wurde der qPCR Mastermix Plus von Eurogentec und ein Primer-Sonden-System verwendet. Die Sonden waren FAM und TAMRA markiert. Neben

der genspezifischen Primer/Sonden-Paarung wurde ein zweiter Ansatz erstellt, der eine Primer/Sonden-Paarung enthielt, welche spezifisch an ein sogenanntes „housekeeping-Gen“ hybridisiert. Somit konnte die Expression des Zielgens auf die Expression des housekeeping-Gens normalisiert werden.

Das Primer/Sonden-Design wurde mit Hilfe des Primer Express 2.0-Computerprogramms ausgewählt.

Ein charakteristisches Pipettierschema ist in Abb.4 dargestellt.

Um die Ergebnisse entsprechend darstellen zu können, mussten die Daten aus dem Realtime-Report in die relative Expression umgerechnet werden. Hierzu wurde die gemittelte Menge (Mean Qty) der Probe durch die Mean Qty des housekeeping-Gens dividiert.

Abb.4: Realtime RT-PCR Pipettierschema. Hier ist ein Beispiel eines Pipettierschemas dargestellt, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde.

variable Parameter zur MM Berechnung:			
Anzahl der Proben		23.0	
Anzahl der rxns pro Proben-Submastermix		3.2	rxns
Anzahl der Standards		5.0	
Anzahl der rxns pro Standard-Submastermix		3.2	rxns
Anzahl der rxns pro NTC Submastermix		3.5	rxns
Anzahl der Reaktionen insgesamt		94.6	rxns
Volumen pro Reaktion		25.0	µl
cDNA Volumen pro Reaktic	10 ng / µl	1.00	µl
FP forward primer		10.0	µM
RP reverse primer		10.0	µM
S Sonde		5.0	µM

optimale End-Konzentration	
FP [] in nM	300
RP [] in nM	300
S [] in nM	150

TaqMan Universal MasterMix (uMM) P/N 4304447 for 200 rxn, store @ 4°C			
Reagenzien	Konzentration der Stammlösungen	End-Konzentration	µl pro 1 rxn
2 x uni MM Buffer	2 x	1 x	12.50
FP Forward Primer	10	300	0.75
RP Reverse Primer	10	300	0.75
S Sonde	5	150	0.75
RNA (convertiert zu cDNA)	10 ng / µl	10ng/Ansatz	1.00
Wasser			9.25
Gesamtvolumen µl			25.00

Reagenzien		µl pro 94.6 rxns	Reagenzien
2 x uni MM Buffer		1182.50	2 x uni MM Buffer
FP Forward Primer		70.95	FP Forward Primer
RP Reverse Primer		70.95	RP Reverse Primer
S Sonde		70.95	S Sonde
RNA (convertiert zu cDNA)		94.60	Template, add later!
Wasser		875.05	Wasser
Gesamtvolumen µl		2365.00	Gesamtvolumen µl

NTC			
Submastermix	µl pro 1 rxn	µl pro Reaktionen	
	24.0	84.0	µl Mastermix
plus	1.0	3.5	µl H ₂ O
total	25.0	87.5	µl Volumen

Proben -			
Submastermix	µl pro 1 rxn	µl pro Reaktionen	
	24.0	76.8	µl Mastermix
plus	1.00	3.2	µl cDNA
	0.00	0.0	µl H ₂ O
total	25.0	80.0	µl Volumen

Standard			
Submastermix	µl pro 1 rxn	µl pro Reaktionen	
	24.0	153.6	µl Mastermix
plus	1.00	6.4	µl cDNA
	0.00	0.0	µl H ₂ O
total	25.0	160.0	µl Volumen

Standard			
Submastermix	µl pro 1 rxn	µl pro Reaktionen	
2, 3, 4 bzw. 5			
	12.0	76.8	µl Mastermix
plus	12.5	80.0	µl Submastermix 1, 2, 3, 4
	0.5	3.2	µl H ₂ O
total	25.0	160.0	µl Volumen

20 ng/µl			
Standard			
Submastermix	µl pro 1 rxn	µl pro Reaktionen	
	24.0	153.6	µl Mastermix
plus	1.00	6.4	µl cDNA
	0.00	0.0	µl H ₂ O
total	25.0	160.0	µl Volumen

Standard			
Submastermix	µl pro 1 rxn	µl pro Reaktionen	
2, 3, 4 bzw. 5			
	12.0	76.8	µl Mastermix
plus	12.5	80.0	µl Submastermix 1, 2, 3, 4
	0.5	3.2	µl H ₂ O
total	25.0	160.0	µl Volumen

4.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenz wurden die tiefgefrorenen Gewebe (Plazenta und Decidua) mit dem Cryostaten (Leica, CM3050S) in 6 µm dünne Scheiben geschnitten. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und wie folgt behandelt:

Fixierung:

- Aceton (10min, -20°C)
- Lagerung bei -20°C

Färbung:

- Erneute Fixierung mit Aceton (10 min, -20°C)
- Trocknen lassen und Gewebe mit PAP-Pen umranden
- In PBS 10 min quellen lassen
- Blocken mit 10% Eselserum in TBS (45min, RT)
- 1. Antikörper (60 min, RT) (Anti-hu Cytokeratin 7, 1:500 verdünnt; oder Anti-hu Renin, 1:200 verdünnt; oder Anti-hu AT1-Rezeptor, 1:500 verdünnt)
- Waschen (3 x 10 min TBS)
- 2. Antikörper (60 min, RT) (Anti-rabbit-Cy3, 1:500 verdünnt)
- Waschen (3 x 10 min TBS)
- Einbetten mit Vectashild-Mounting Medium

Mikroskopisch untersucht wurden die markierten Schnitte mit dem Axioplan 2 mit SensiCam (40 fache Vergrößerung) (Zeiss) sowie der Software AxioVision 3.0. (Zeiss)

4.9 Plasma Renin Aktivität

Bei der Bestimmung der Plasma Renin Aktivität wird die Menge an gebildeten Angiotensin I aus Angiotensinogen gemessen. Hierbei wurden 50 µl Plasma mit 47 µl Tris Puffer (pH 7,4) gemischt und zusammen mit 3 µl PMSF (Proteaseinhibitor) für 2h bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 5 µl Ro 42 (2×10^{-6} M) hinzupipettiert. Die Durchführung folgt dem früher beschriebenen Protokoll (Poulsen und Jorgensen, 1974).

4.10 Aufreinigung der AT1-AA aus Serum (IgG-Aufreinigung)

4.10.1 Caprylsäure

Die Caprylsäure ist eine gesättigte Fettsäure, mit deren Hilfe sich viele Bestandteile aus dem Serum herausfällen lassen. Die IgGs bleiben jedoch in Lösung. Somit ist es eine geeignete Wahl um IgGs besonders schonend aufzureinigen.

- Serumvolumen messen
- 2x Volumen 60 mM Na-Acetat (pH 4,0) unter Schütteln hinzufügen
- pH auf 4,8 einstellen
- Caprylsäure unter Schütteln langsam tröpfchenweise hinzufügen (auf 10 ml Serum kommen 700 µl Caprylsäure)
- 30 min bei RT schütteln
- Zentrifugation: 15 min, 5000 g (4°C)
- Überstand vorsichtig abnehmen und über Nacht gegen PBS dialysieren

4.10.2 Ammoniumsulfat-Fällung (AS-Fällung)

- Auf 1 ml Serum 660 µl gesättigte Ammoniumsulfatlsg. **tropfenweise** auf Vortexmixer zugeben
- Über Nacht bei 4°C stehen lassen
- Am nächsten Tag 1x vortexen
- Zentrifugation (7 min bei 5000 g, 4°C)
- Überstand verwerfen
- Sediment in 500 µl PBS lösen, dann 500 µl gesättigte Ammoniumsulfatlsg. auf einmal (nicht tropfenweise) zugeben, mischen und dann kurz fällen lassen (ca. 1 min)
- Zentrifugation (7 min bei 5000 g, 4°C)
- Erneut Fällung und Zentrifugation (wie oben)
- Sediment in 660 µl PBS lösen
- Lösung in Dialyseschlauch (MWCO: 6-8.000) überführen
- Dialyse gegen PBS 24 h lang, alle 8 h PBS wechseln (3 Proben in 1 l Volumen dialysiert)

4.10.3 Globaffin

Globaffin (Affina Immuntechnik) basiert auf dem Prinzip der IgG-Auffreinigung mit Hilfe von Protein G. Hierbei wird das Serum über eine Säule gegeben, gewaschen und das IgG eluiert. Globaffin wird bei bestimmten Immunerkrankungen am Menschen angewandt. Das Säulenmaterial besitzt eine IgG-Bindungskapazität von 20mg IgG/ml Säulenvolumen. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

4.11 Kardiomyozyten-Kontraktions-Bioassay

Es wurden neonatale Rattenkardiomyozyten aus Rattenherzen isoliert (Wallukat et al., 1995) und als einzelne Schicht in einer Dichte von 800 Zellen/mm² für wenige Tage kultiviert. Die Basal-Schlagfrequenz und die Schlagfrequenz nach Inkubation mit IgG's (gegebenenfalls Inhibitoren) wurden bei 37°C via Mikroskopie ermittelt.

4.12 Zellkultur

1x10⁶ CHO- und CHO-AT1-Zellen wurden in einer 150 cm² Zellkulturflasche in 25 ml D-MEM:F-12 (1:1) (1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, 10% FCS) -Medium mit kultiviert und jeweils Montag, Mittwoch und Freitag nach diesem Protokoll neu ausgesät. Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurden diese mit PBS gewaschen (3x) und anschließend mit 4 ml Trypsin für ca. 1-2 min inkubiert (37°C) und mit Medium abgestoppt (Zugabe von ca. 10 ml).

Für Stimulationsversuche wurden 2x10⁵ -Zellen in 6 cm-Schälchen (3 ml Medium) ausgesät und nach 48 h Inkubation (37°C) Medium gewechselt (Medium ohne FCS). Die Stimulantien wurden nach 6 h hinzugegeben.

4.13 Proteinisolation

Nach entsprechender Inkubation mit den Stimulantien wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden 100 µl Bäuerle-Puffer (1% Phosphatase-Inhibitor-Cocktail, 1:25 Complete Protease-Inhibitor-Cocktail) auf dem Schälchen verteilt und auf Eis gestellt. Das Zellen-Lysispuffer-Gemisch wurde mit einem Schaber von dem Schälchen geschabt und in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach ca. 15 min Inkubation auf Eis wurde bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

4.14 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration in den Proben wurde durch die Bradfordmethode in einer 96-Well-Platte mit dem SpectraFluor Plus und der dazugehörigen Software (Magellan) gemessen (Bradford, 1976). Hierzu wurden die Proben entsprechend verdünnt, um in den Bereich der Standardkurve zu gelangen (0-40 µg BSA) und in einer Dreifachbestimmung gemessen.

4.15 Westernblotanalyse

4.15.1 SDS-Page

Um Proteine in einem Gemisch zu identifizieren und deren Massengewicht zu bestimmen, wurde die Gel-Elektrophorese angewandt. Es wurden Polyacrylamidgele mit einer Konzentration von 10% eingesetzt.

Die Herstellung der Polyacrylamidgele wurde mit Hilfe des Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System von Bio-Rad Laboratories durchgeführt.

	10%
H ₂ O	4,0
30% Acrylamidmix	3,3
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10% SDS	0,1
10% APS	0,1
TEMED	0,004
Gesamtvolumen (ml)	10

Tab.3: Pipettierschema Polyacrylamid-Trenngel. In dieser Tabelle ist das Pipettierschema für ein 10% iges Polyacrylamid-Trenngel aufgeführt. 10 ml entsprechen der Menge für ein Trenngel.

H ₂ O	1,4
30% Acrylamidmix	0,33
1 M Tris (pH 6,8)	0,25
10% SDS	0,2
10% APS	0,2
TEMED	0,002
Gesamtvolumen (ml)	2

Tab.4: Pipettierschema Polyacrylamid-Sammelgel. In dieser Tabelle ist das Pipettierschema Polyacrylamid-Sammelgel aufgeführt. 2 ml entsprechen der Menge für ein Trenngel.

4.15.2 Blotten

Beim Blotten wurden die Proteine aus dem Gel mittels elektrischen Feldes auf eine Membran (Nylon- oder Nitrozellulosemembranen) übertragen, welche später mit entsprechenden Antikörpern inkubiert werden konnten. Es wurde die Blottaparatur Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Biorad verwandt und pro Membran mit 110 mA 1 h inkubiert.

4.15.3 Blocken

Um unspezifisches Anlagern des Antikörpers an die Membran zu verhindern, wurde die Membran in TBS-T + Magermilch (5%) inkubiert (2 h, auch über Nacht möglich). Das in der Magermilch enthaltene BSA blockiert die freie Membranfläche für den Antikörper.

4.15.4 Antikörper

Der gegen das pERK gerichtete Antikörper (Anti-pERK) wurde in TBS-T + Magermilch (5%) verdünnt (1:1000) und für 2 h zur Inkubation auf die Membran gegeben. Ebenso wurde mit dem Anti-ERK–Antikörper verfahren. Nach der Inkubation wurde 5 x mit TBS-T gewaschen. Danach Inkubation mit 2. Antikörper (1 h). Beide polyklonale Antikörper haben den Ursprung Kaninchen, weshalb als zweite Antikörper Anti-rabbit-HRP (1:6000) genutzt wurden. Danach 5x mit TBS-T waschen.

4.15.5 Detektierung des Antikörpers

Da die Antikörper einen Horseradish Peroxidase (HRP) –Label trugen, wurde das ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System von Amersham Bioscience verwendet und nach dem Protokoll verfahren. Der Hyperfilm wurde nach einer Belichtungszeit von etwa 1 min im Entwickler (Optimax) entwickelt.

4.16 Quantifizierung Western Blot

Um mehrere Western Blot Ergebnisse zusammenfassen zu können, wurden die entwickelten Filme eingescannt und mit dem ImageJ 1.32j vom National Institut of Health, USA, densitometrisch erfasst.

4.17 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Software SPSS 14.0 durchgeführt. Es wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test die Normalverteilung überprüft. Normal verteilte Daten wurden mit dem t-Test analysiert, nicht-normal verteilte Daten mit dem Mann-Whitney Test. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Patientencharakteristik

Die klinische Patientencharakteristik ist in Tab.5 gezeigt. Die Kontrollgruppe und die Präeklampsiegruppe unterscheiden sich im Blutdruck, Proteinurie (nicht gezeigt) und dem Geburtsgewicht der Feten. Im Schnitt wurde in der Präeklampsiegruppe die Schwangerschaft 6 Wochen vor der normalen Entbindungswoche beendet. Aufgrund der vorzeitigen Entbindung war auch das Geburtsgewicht signifikant niedriger als das der Feten aus der Kontrollgruppe. Auch wenn die Neugeborenen Gewichts-Perzentil in der Präeklampsiegruppe geringer war, so wurde lediglich bei einem Neugeborenen ein Gewicht unter der 10. Gewichts-Perzentil und damit zu niedrigen Geburtsgewicht protokolliert.

Charakteristik	Kontrolle (n=10)	Präeklampsie (n=10)	p-Wert
Patientenalter bei Entbindung (Jahre)	28 (21-37)	29 (19-38)	0,8
BMI vor Schwangerschaft (kg/m ²)	21,3 (17,4-25,0)	23,6 (19,8-30,4)	0,1
BMI während Schwangerschaft (kg/m ²)	28,2 (20,3-32,4)	30,9 (24,2-35,7)	0,2
Parität	0 (0-0)	0 (0-0)	1
Schwangerschaftswoche bei Geburt	39,0 (34,4-39,6)	33,1 (26,4-36,0)	<0,001
Geburtsgewicht Fetus (g)	3433 (2575-3695)	1735 (879-2764)	<0,001
Neugeborenen Gewichts-Perzentil	51 (10-64)	37 (2-54)	<0,04
Systolischer BD bei Geburt (mmHg)	120 (90-130)	158 (147-171)	<0,001
Diastolischer BD bei Geburt (mmHg)	78 (70-85)	105 (95-110)	<0,001

Tab.5: Patientencharakteristik. Für die Präeklampsie bedeutsame Charakteristika der Patienten. BMI = body-mass index; BD = Blutdruck

Die statistische Auswertung der Genexpressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tab.6) zeigt eindeutig ein unterschiedliches Muster zwischen den

Gewebe. So sind die meisten Gene während des präeklampsischen Verlaufs in der Decidua dysreguliert und auch das fast ausnahmslos in positiver Weise. Dysregulierte Gene in der Plazenta oder im Fettgewebe haben im Vergleich zur Decidua ein ca. 88% geringeres Vorkommen. Die Anzahl der Gene, welche in zwei verschiedenen Geweben dysreguliert sind, ist sehr gering und lediglich zwei Gene sind gleichzeitig in allen Geweben dysreguliert: *Pentraxin-related gene*, PTX3; (Accessionnr.: NM_002852) ist in allen Geweben hochreguliert während der Präeklampsie und *splicing factor, arginine/serine-rich 6*, SFRS6 (Accessionnr.: NM_006275) ist in Decidua und Plazenta hoch und im Fettgewebe runter reguliert.

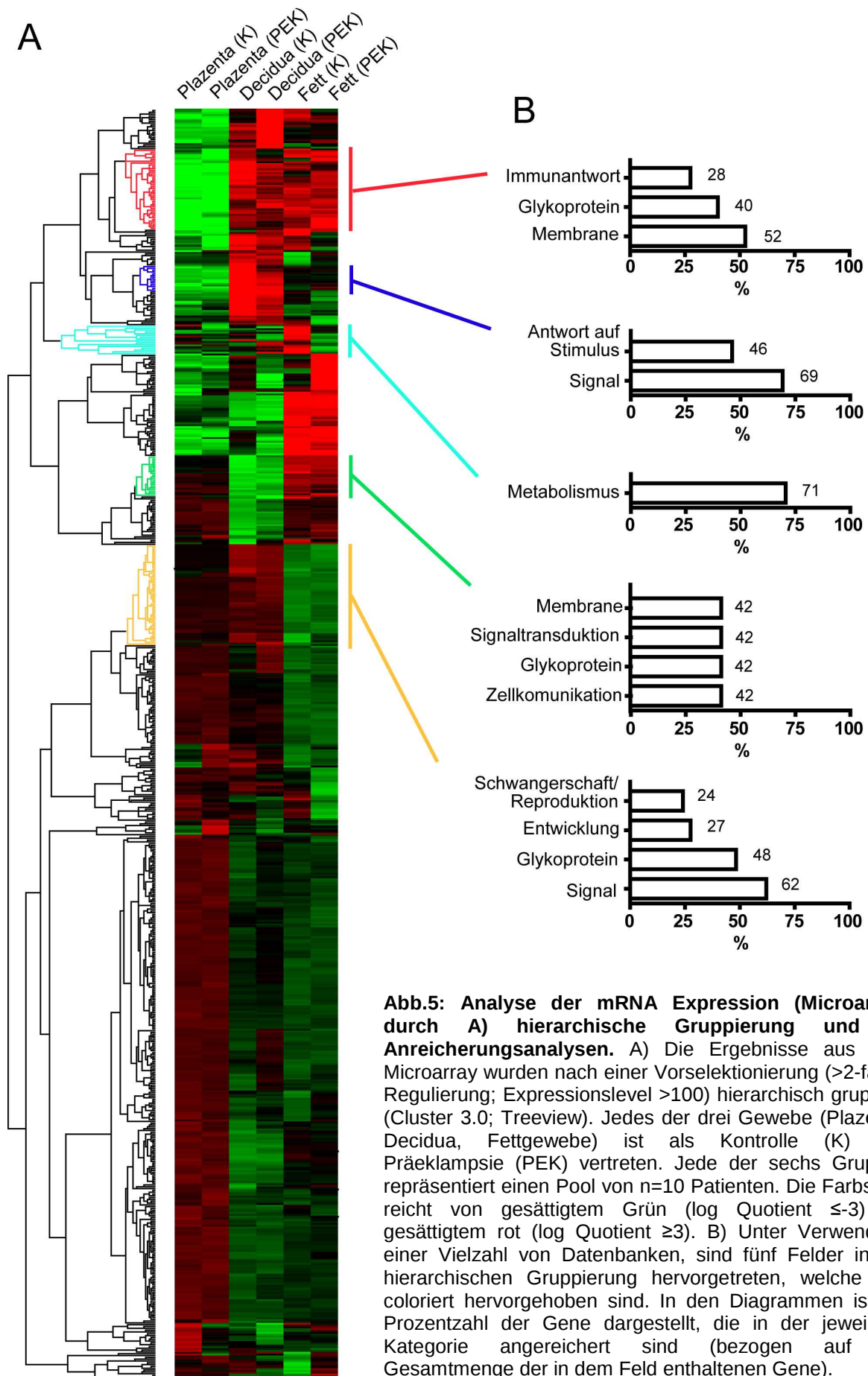
5.2 Microarray

A	Dysregulation (Kontrolle vs. Präeklampsie)	hochregulierte Gene	runterreguliert Gene
	Nur Decidua	347	11
	Nur Plazenta	42	32
	Nur Fettgewebe	59	42

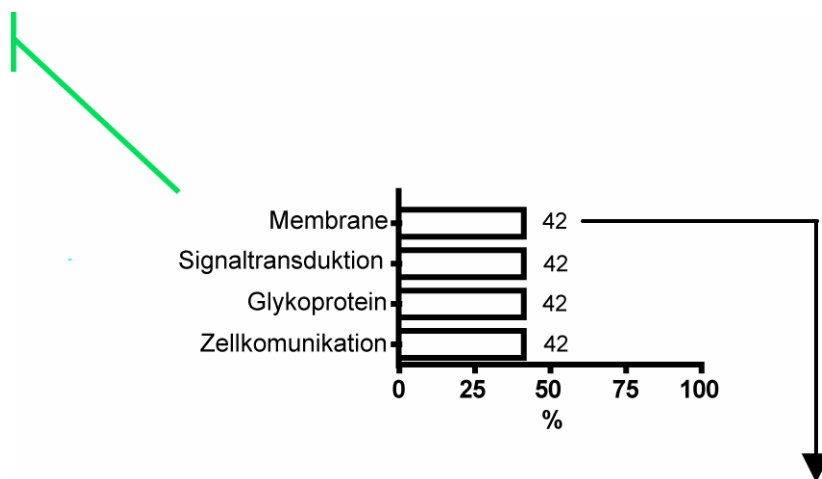
B	Dysregulation (Kontrolle vs. Präeklampsie)	Gene Gesamt
	Nur Decidua und Plazenta	7
	Nur Decidua und Fettgewebe	30
	Nur Plazenta und Fettgewebe	4
	Decidua, Plazenta, Fettgewebe	2

C	Differenzielle Genexpression	Plazenta höher expremiert	Decidua höher expremiert
	Plazenta vs. Decidua	3200	3439

Tab.6: Statistische Auswertung der Genexpressionsdaten aus den Microarrayanalysen. Es ist die Anzahl der durch die Präeklampsie dysregulierten Gene in verschiedenen Gruppierungen dargestellt. A) gibt die Anzahl der Gene an, welche ausschließlich in einem Gewebe dysreguliert sind, B) in zwei oder in allen Geweben dysreguliert sind und C) differenziell zwischen Plazenta und Decidua der Kontrollpatienten expremiert sind (nicht Präeklampsieabhängig). Jedes der drei Gewebe (Plazenta, Decidua, Fettgewebe) gilt als dysreguliert, wenn sich die Präeklampsiegruppe von der Kontrollgruppe unterscheidet und den Vorselektionierungskriterien (>2-fache Regulierung; Expressionslevel >100) entspricht. Jede der sechs Gruppen repräsentiert einen Pool von n=10 Patienten.



Um die Vielzahl der dysregulierten Gene in den drei Geweben besser charakterisieren zu können, wurde eine hierarchische Gruppierungsanalyse der Genexpressionsdaten, die aus dem Microarray hervorgingen, durchgeführt (Abb.5A). Hier traten 5 Gruppierungen hervor, die in der anschließenden Anreicherungsanalyse Informationen zur weiteren Selektionierung der Daten ergaben (Abb.5B). Besonderes Interesse wurde an der Gruppe 3 gezeigt, welche eine Anreicherung von 42% in dem Bereich der Membranproteine aufzeigte. Diese während der Präeklampsie dysregulierten Gene sind mit ihrem Grad der Regulation in der Decidua in Abb.2 gezeigt. Hier findet sich der Complement-Faktor C7 mit einer 5,4-fachen Hochregulierung wieder. C7 ist Teil des Membranangriffskomplexes, welcher nach Aktivierung der Complement-Kaskade im Rahmen der Deaktivierung von Krankheitserregern wirkt, im Verlauf einiger Krankheiten aber auch Gewebeschädigung vermitteln kann.



Accessionnummer	Genname; Genabkürzung	Dysregulation in Decidua (x-fach Änderung)
NM_000587	complement component 7; C7	5,4
NM_000300	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid); PLA2G2A	3,6
NM_000685	angiotensin II receptor, type 1; AGTR1	4,5
NM_012302	latrophilin 2; LPHN2	2,2
NM_018286	transmembrane protein 100; TMEM100	2,2
NM_004961	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon; GABRE	2,2
NM_005233	EPH receptor A3; EPHA3	2,5
NM_005161	angiotensin II receptor-like 1; AGTRL1	3,7

Abb.6: Membrangene aus der Anreicherungsanalyse (s.Abb.1B). Aus der Anreicherungsanalyse sind die Gene einzeln aufgeführt, welche zu 42% in der Kategorie „Membrane“ angereichert sind. Alle Gene sind lediglich in der Decidua dysreguliert. Besonders hervorgehoben ist das Gen für den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1.

Ebenso findet sich hier die Phospholipase A2-Gruppe IIA (PLA2G2) mit einer 3,6-fachen Hochregulierung. Die PLA2G2A ist dafür verantwortlich, dass Arachidonsäure aus der Membran freigesetzt wird und somit dem Cytochrom P450 (CYP) als Substrat zur Verfügung steht. Die entstehenden Metabolite sind abhängig von der Cytochrom P450-Subfamilie und haben ein breites Wirkungsspektrum. So wurde das Cytochrom P450 CYP2J2 aus der Epoxygenasefamilie in der präeklampsischen Decidua als hochreguliert detektiert (Daten nicht gezeigt). Besonders hervorgehoben ist in der Abb.2 der AT1-R. Hier wurde eine Hochregulation von 4,5 detektiert.

5.3 Lokales Renin-Angiotensin System

Um das Expressionsprofil des AT1-R und der anderen RAS-Komponenten, sowie die Cofaktoren des AT1-R auf mRNA-Ebene zu verifizieren, wurden Realtime RT-PCR's für die einzelnen Gewebe durchgeführt. Die Tab.7 zeigt, dass in der Plazenta keine Komponente signifikant dysreguliert war. In der Decidua konnte die Hochregulation des AT1-R in der Präeklampsiegruppe mit dem Faktor 5,0 verifiziert werden (siehe Tab.8 und Abb.7). Ebenfalls im Fettgewebe wurde eine signifikante Hochregulation des AT1-R detektiert (siehe Tab.9 und Abb.10). Da es aufgrund des Krankheitsverlaufs zu einer frühzeitigen Entbindung des Kindes kommt und damit die SSW bei Entbindung im Durchschnitt 6 Wochen vor der bei der Kontrollgruppe lag, wurde durch eine Korrelation geprüft, ob die Regulierung des AT1-R mit der SSW gekoppelt ist. Wie Abb.8-9 zeigt besteht in der Decidua keine Korrelation zwischen der SSW bei der Entbindung und der Expression des AT1-R. Ein gleichgesinntes Ergebnis zeigt Abb.11-12 für das Fettgewebe. Keine Expression konnte für die Aldosteronsynthase (Cyp 11b2) in den untersuchten Geweben detektiert werden.

	Plazenta		
	Kontrolle (n=10) [A.U. $\pm$ SEM]	Präeklampsie (n=10) [A.U. $\pm$ SEM]	p-Wert
Angiotensinogen	25,0 $\pm$ 4,8	26,7 $\pm$ 6,1	0,824
Angiotensin-converting enzyme	78,6 $\pm$ 18,8	119,1 $\pm$ 23,2	0,192
Renin	3,8 $\pm$ 0,7	10,5 $\pm$ 5,2	0,28
Renin-Rezeptor	77,7 $\pm$ 10,8	91,9 $\pm$ 12,9	0,41
Angiotensin II-Rezeptor 1	195,9 $\pm$ 34,3	218,9 $\pm$ 34,2	0,642
Angiotensin II-Rezeptor 2	8,4 $\pm$ 5,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,133
Epidermal-growth-factor Rezeptor	162,2 $\pm$ 27,0	182,7 $\pm$ 26,9	0,598
Bradykininrezeptor-B2	29,1 $\pm$ 6,4	20,8 $\pm$ 3,7	0,275
Mineralocorticoidrezeptor	183,1 $\pm$ 28,1	169,3 $\pm$ 24,8	0,725
Cyp-11b2	n.d.	n.d.	-

Tab.7: mRNA Expression der RAS-Komponenten und deren Cofaktoren in der Plazenta.
(Resultate der Realtime RT-PCR)

	Decidua		
	Kontrolle (n=8) [A.U. $\pm$ SEM]	Präeklampsie (n=10) [A.U. $\pm$ SEM]	p-Wert
Angiotensinogen	275,9 $\pm$ 73,5	197,4 $\pm$ 49,3	0,372
Angiotensin-converting enzyme	246,6 $\pm$ 31,3	309,2 $\pm$ 37,2	0,231
Renin	264,9 $\pm$ 75,7	236,9 $\pm$ 44,6	0,742
Renin-Rezeptor	99,7 $\pm$ 11,5	124,1 $\pm$ 18,0	0,297
Angiotensin II-Rezeptor 1	4,6 $\pm$ 0,7	23,4 $\pm$ 8,6	0,016
Angiotensin II-Rezeptor 2	760,0 $\pm$ 747,0	35,0 $\pm$ 21,9	0,291
Epidermal-growth-factor Rezeptor	25,5 $\pm$ 3,7	37,9 $\pm$ 4,2	0,047
Bradykininrezeptor-B2	141,0 $\pm$ 15,5	152,0 $\pm$ 23,2	0,713
Mineralocorticoidrezeptor	31,1 $\pm$ 2,4	41,9 $\pm$ 3,5	0,027
Cyp-11b2	n.d.	n.d.	-

Tab.8: mRNA Expression der RAS-Komponenten und deren Cofaktoren in der Decidua.
(Resultate der Realtime RT-PCR)

	Fettgewebe		
	Kontrolle (n=10) [A.U. $\pm$ SEM]	Präeklampsie (n=10) [A.U. $\pm$ SEM]	p-Wert
Angiotensinogen	84,7 $\pm$ 9,6	75,5 $\pm$ 8,9	0,491
Angiotensin-converting enzyme	180,1 $\pm$ 23,9	194,4 $\pm$ 19,5	0,648
Renin	651,5 $\pm$ 330,0	403,2 $\pm$ 184,3	0,519
Renin-Rezeptor	45,0 $\pm$ 3,6	54,0 $\pm$ 4,0	0,096
Angiotensin II-Rezeptor 1	44,9 $\pm$ 3,6	73,2 $\pm$ 9,6	0,013
Angiotensin II-Rezeptor 2	1013,4 $\pm$ 310	1021,8 $\pm$ 287,4	0,984
Epidermal-growth-factor Rezeptor	34,4 $\pm$ 3,5	51,7 $\pm$ 8,2	0,067
Bradykininrezeptor-B2	91,8 $\pm$ 20,4	105,7 $\pm$ 20,5	0,637
Mineralocorticoidrezeptor	34,0 $\pm$ 2,4	43,0 $\pm$ 4,7	0,105
Cyp-11b2	n.d.	n.d.	-

Tab.9: mRNA Expression der RAS-Komponenten und deren Cofaktoren in Fettgewebe.
(Resultate der Realtime RT-PCR)

	Muskelgewebe		
	Kontrolle (n=9) [A.U. $\pm$ SEM]	Präeklampsie (n=9) [A.U. $\pm$ SEM]	p-Wert
Angiotensinogen	1197,25 $\pm$ 8,56	1344,46 $\pm$ 12,12	0,287
Angiotensin-converting enzyme	486,88 $\pm$ 2,38	297,75 $\pm$ 6,07	0,005
Renin	n.d.	n.d.	-
Renin-Rezeptor	798,4 $\pm$ 8,86	646,91 $\pm$ 2,49	0,086
Angiotensin II-Rezeptor 1	721,4 $\pm$ 7,05	676,13 $\pm$ 4,21	0,549
Angiotensin II-Rezeptor 2	695,43 $\pm$ 34,65	329,77 $\pm$ 11,19	0,281
Epidermal-growth-factor Rezeptor	562,45 $\pm$ 2,4	491,86 $\pm$ 3,17	0,066
Bradykininrezeptor-B2	960,08 $\pm$ 24,74	642,25 $\pm$ 9,97	0,204
Mineralocorticoidrezeptor	582,09 $\pm$ 7,23	419,94 $\pm$ 6,62	0,085
Cyp-11b2	n.d.	n.d.	-

Tab.10: mRNA Expression der RAS-Komponenten und deren Cofaktoren in Muskelgewebe.
(Resultate der Realtime RT-PCR)

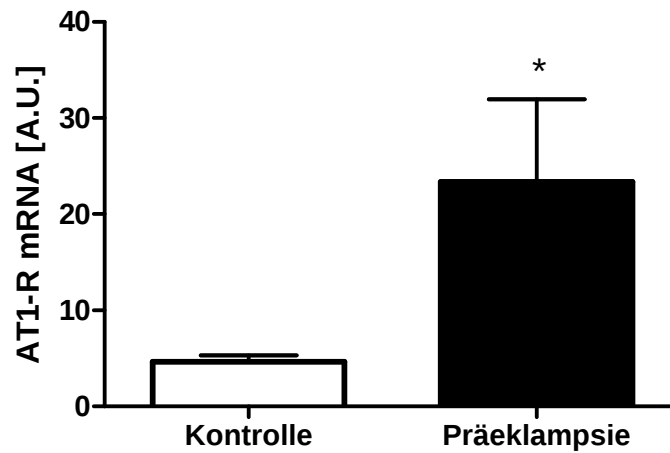


Abb.7: Dysregulation des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1-R) in präeklaptischer Decidua. Der AT1-R ist auf mRNA-Ebene in der Präeklampsiegruppe signifikant um den Faktor 5 hochreguliert. (* $p=0,016$)

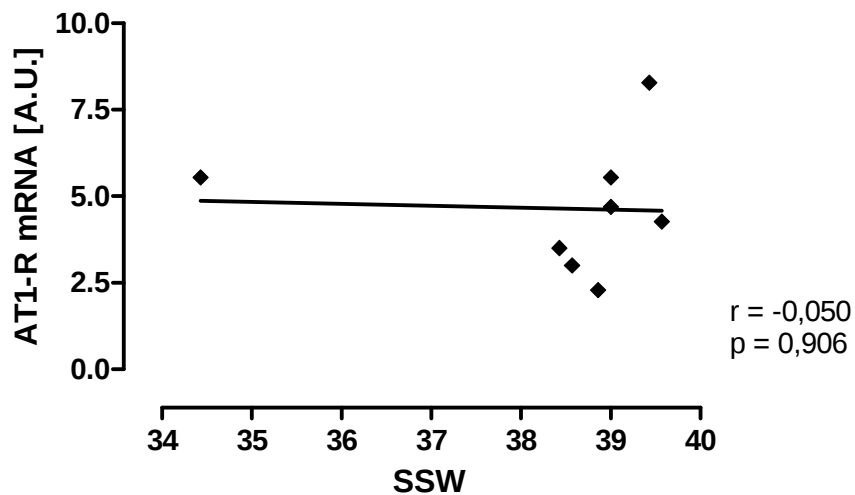


Abb.8: Korrelation zwischen Schwangerschaftswoche (SSW) und Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1-R)-Expression in Decidua der Kontrollgruppe. Es ist keine signifikante Korrelation erkennbar.

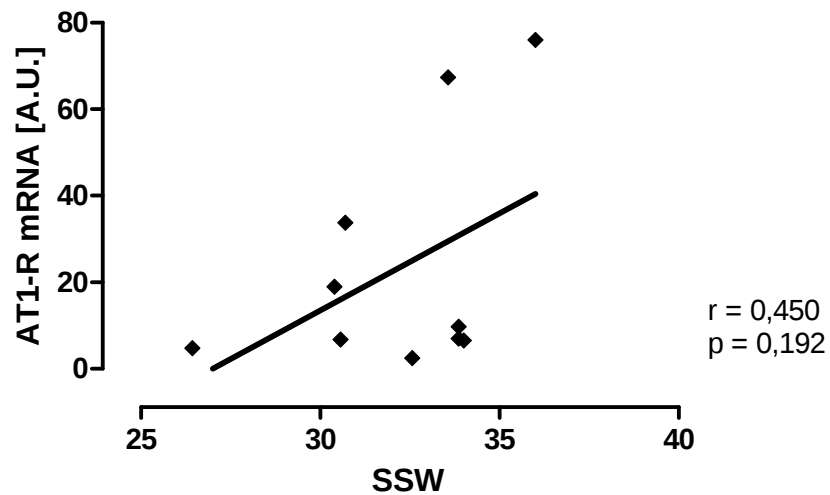


Abb.9: Korrelation zwischen Schwangerschaftswoche (SSW) und Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1-R)-Expression in präeklaptischer Decidua. Es ist keine signifikante Korrelation erkennbar.

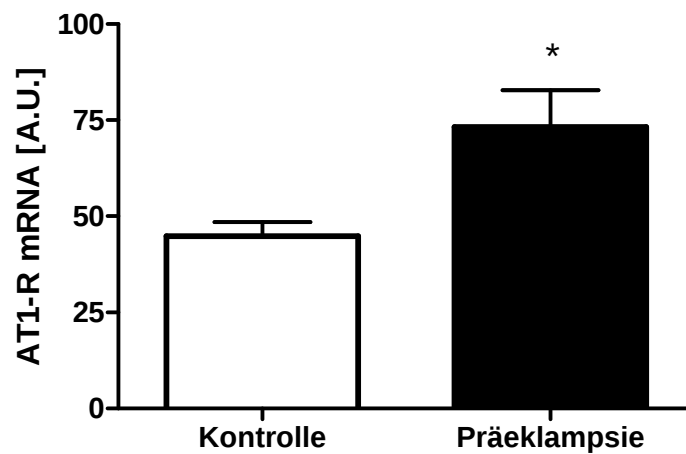


Abb.10: Dysregulation des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1-R) in präeklaptischen Fettgewebe. Der AT1-R ist auf mRNA-Ebene in der Präeklampsiegruppe signifikant um den Faktor 1,6 hochreguliert. (* $p=0,013$)

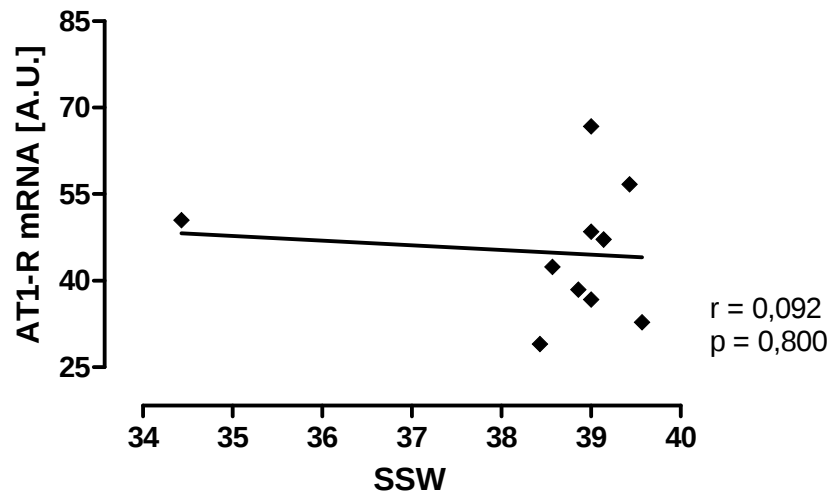


Abb.11: Korrelation zwischen Schwangerschaftswoche (SSW) und Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1-R)-Expression in Fettgewebe der Kontrollgruppe. Es ist keine signifikante Korrelation erkennbar.

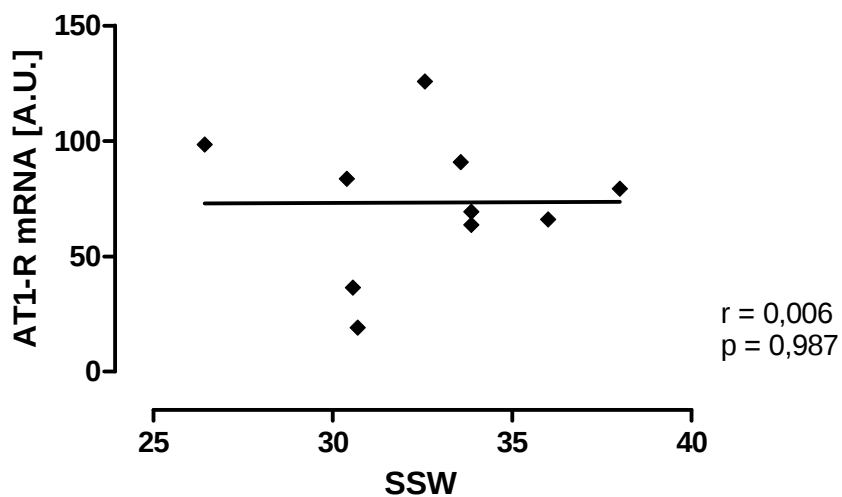


Abb.12: Korrelation zwischen Schwangerschaftswoche (SSW) und Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1-R)-Expression in präeklaptischem Fettgewebe. Es ist keine signifikante Korrelation erkennbar.

In Tab.7 fällt auf, dass der AT2-R um den Faktor 84,0 in der präeklaptischen Plazenta runterreguliert wurde. Dieses Ergebnis ist nicht signifikant, da das Expressionslevel für alle Proben (Kontrolle und Präeklampsie) so gering war, dass es

zu sehr hohen Schwankungen in den Einzelbestimmungen kam. Um den AT2-R näher zu charakterisieren, wurde hier von jeder Probe 7 Realtime RT-PCR-Ansätze durchgeführt. Wenn wenigstens ein Ansatz eine typische PCR-Kurve ergab, so konnte davon ausgegangen werden, dass in der Probe wenigstens eine Kopie des AT2-R-Genes vorlag. In der Kontrollgruppe waren 80% der Replikate positiv, wohingegen nur 20% der Replikate in der Präeklampsiegruppe positiv waren (siehe Abb.13).

Betrachtet man die Expressionsprofile zwischen Plazenta und Decidua, so fällt auf, dass es zu großen Unterschieden zwischen den beiden Geweben kommt. So ist die Reninexpression in der Decidua signifikant um den Faktor 35 höher als in der Plazenta. Auch die RAS-Komponenten ACE und AGT, sowie der Cofaktor des AT1-R, der BDKRB2 sind signifikant höher in der Decidua expremiert (siehe Abb.14 und 16). Der AT1-R selber sowie seine Cofaktoren EGF-R und M-R sind signifikant höher in der Plazenta expremiert (siehe Abb.15 und 16).

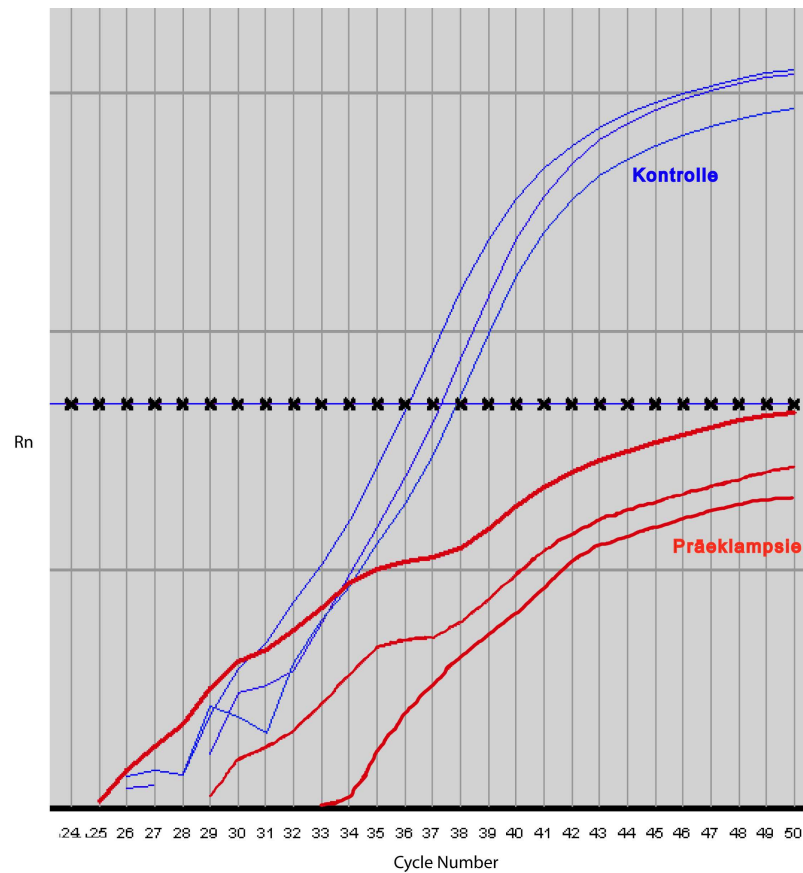


Abb.13: Dysregulation des Angiotensin II Rezeptor Typ 2 (AT2-R) in Plazenta. In den Plazentaprobe der Präeklampsiegruppe waren lediglich 20% der Replikate (7 PCR-Ansätze pro Patientin) durch eine PCR-Kurve positiv detektierbar, im Gegensatz zu 80% in der Kontrollgruppe. Es sind repräsentative Realtime RT-PCR Realtime-Kurven der positive Detektierung (Kontrollgruppe) und der negativen Detektierung (Präeklampsiegruppe) gezeigt.

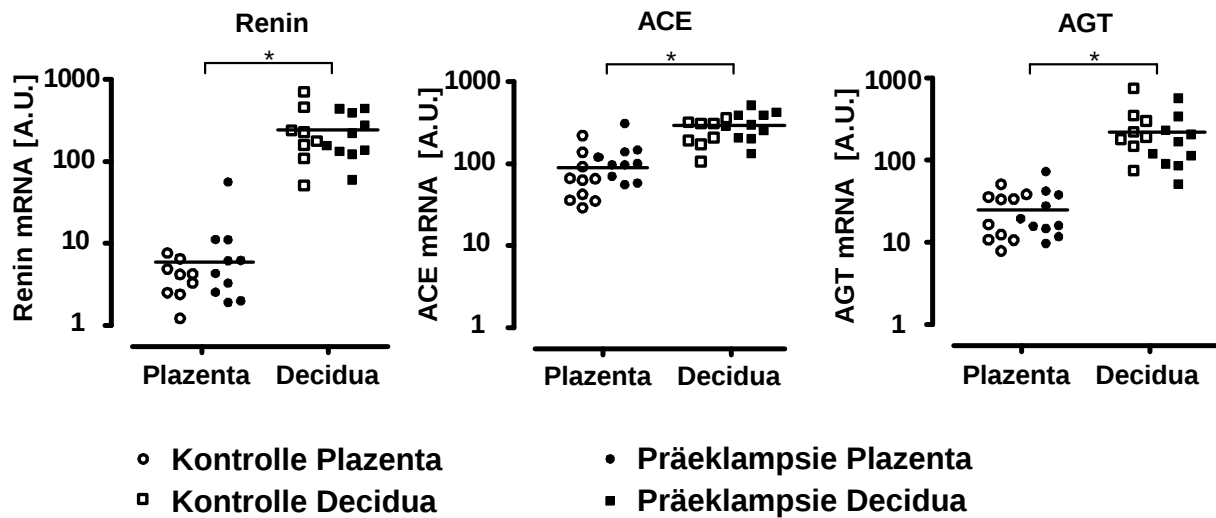


Abb.14: Differenzielle Genexpression der Renin-Angiotensin System (RAS) Komponenten (Renin, ACE, AGT) in der Plazenta vs. Decidua. Die RAS Enzyme Renin und ACE, sowie das Protein AGT sind in der Decidua signifikant höher expremiert (Renin: Faktor 35; ACE: Faktor 2,8; AGT: Faktor 9) als in der Plazenta (* p<0,001).

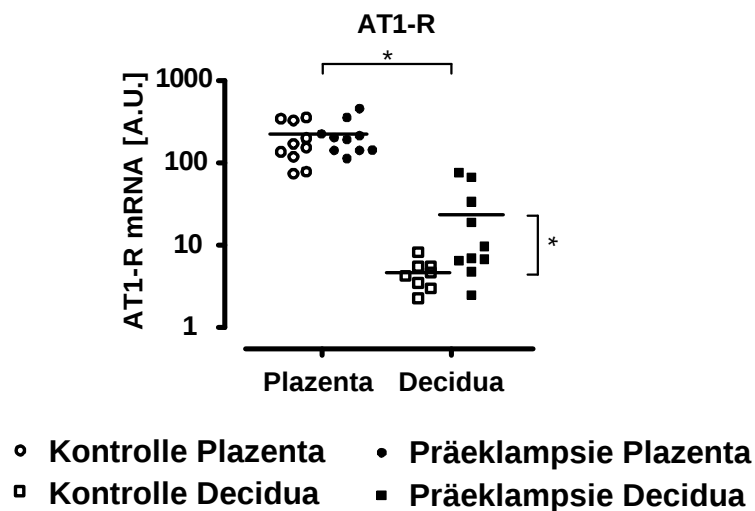


Abb.15: Differenzielle Genexpression des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 (AT1-R) in der Plazenta vs. Decidua. Der AT1-R ist in der Plazenta (Kontrolle) signifikant höher expremiert (Faktor 42) als in der Decidua. Die Dysregulation des AT1-R in der präeklampsischen Decidua ist erkennbar (Faktor 5) (* p<0,01).

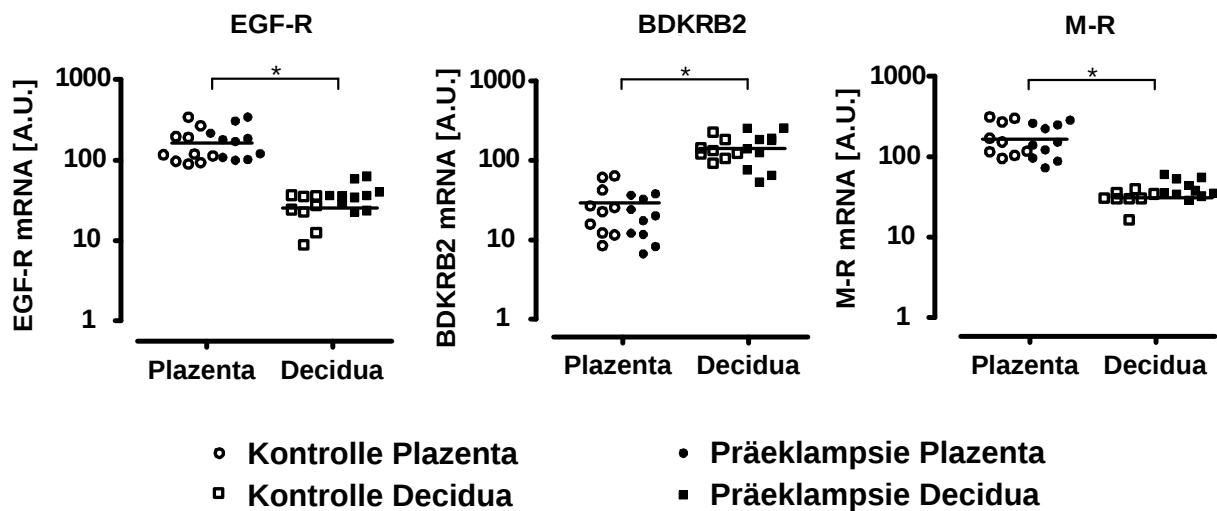


Abb.16: Differenzielle Genexpression der Coaktivatoren des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGF-R), Bradykinin-Rezeptor B2 (BDKRB2), Mineralocorticoid-Rezeptor (M-R)) in der Plazenta vs. Decidua. Der EGF-R und der M-R sind in der Plazenta signifikant höher expremiert (EGF-R: Faktor 5,3; M-R: Faktor 4,7). Der BDKRB2 ist in der Decidua signifikant höher expremiert (Faktor 5,9) (* $p < 0,001$).

Die Expression des AT1-R wurde ebenfalls auf Proteinebene durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie verifiziert. Hierzu sieht man in Abb.17 deutlich, dass es in der präeklampsischen Decidua zu einer stärkeren AT1-R-Expression kommt als in der Kontroll-Decidua. Diese markierten Rezeptoren sind, wie aus Abb.18 ersichtlich wird, hauptsächlich am Trophoblasten lokalisiert. Auch die höhere Renin-Expression in der Decidua im Vergleich zu der dazugehörigen Plazenta ist eindeutig verifiziert worden. Dieses Ergebnis ist nicht durch den Krankheitsstatus (Präeklampsie) beeinflusst (siehe Abb.19). Neben den lokalen Phänomenen der Präeklampsie kommt es zu Veränderungen im zirkulierenden RAS. Die Plasma-Renin Aktivität war im Serum präeklampsischer Frauen signifikant um den Faktor 3 reduziert (siehe Abb.20). Ebenso wurde der AT1-AA in ihrem Serum detektiert (siehe Abb.21). Im Kardiomyozyten-Kontraktions- Bioassay kam es nur nach Inkubation mit den aus präeklampsischen Frauen isolierten IgGs zu einer Erhöhung der Schlagfrequenz, welche sich AT1-R-spezifisch durch Losartan blocken ließ. 83% der präeklampsischen Patientinnen waren AT1-AA-Positiv im Gegensatz zu 0% der Kontroll-Schwangeren. Derselbe Effekt wurde nach Inkubation mit isolierten IgGs aus

Serum, welches aus der Umbilikalvene stammte, detektiert (siehe Abb.22). Der AT1-AA vermittelt seine Aktivität über den MAPK-Weg. Hierbei kam es nach Inkubation zu einer verstärkten Phosphorylierung des ERK1/2. Dieser Effekt war nicht abhängig von der Isolationsmethode, wohl aber von dem Vorhandensein des AT1-R auf der

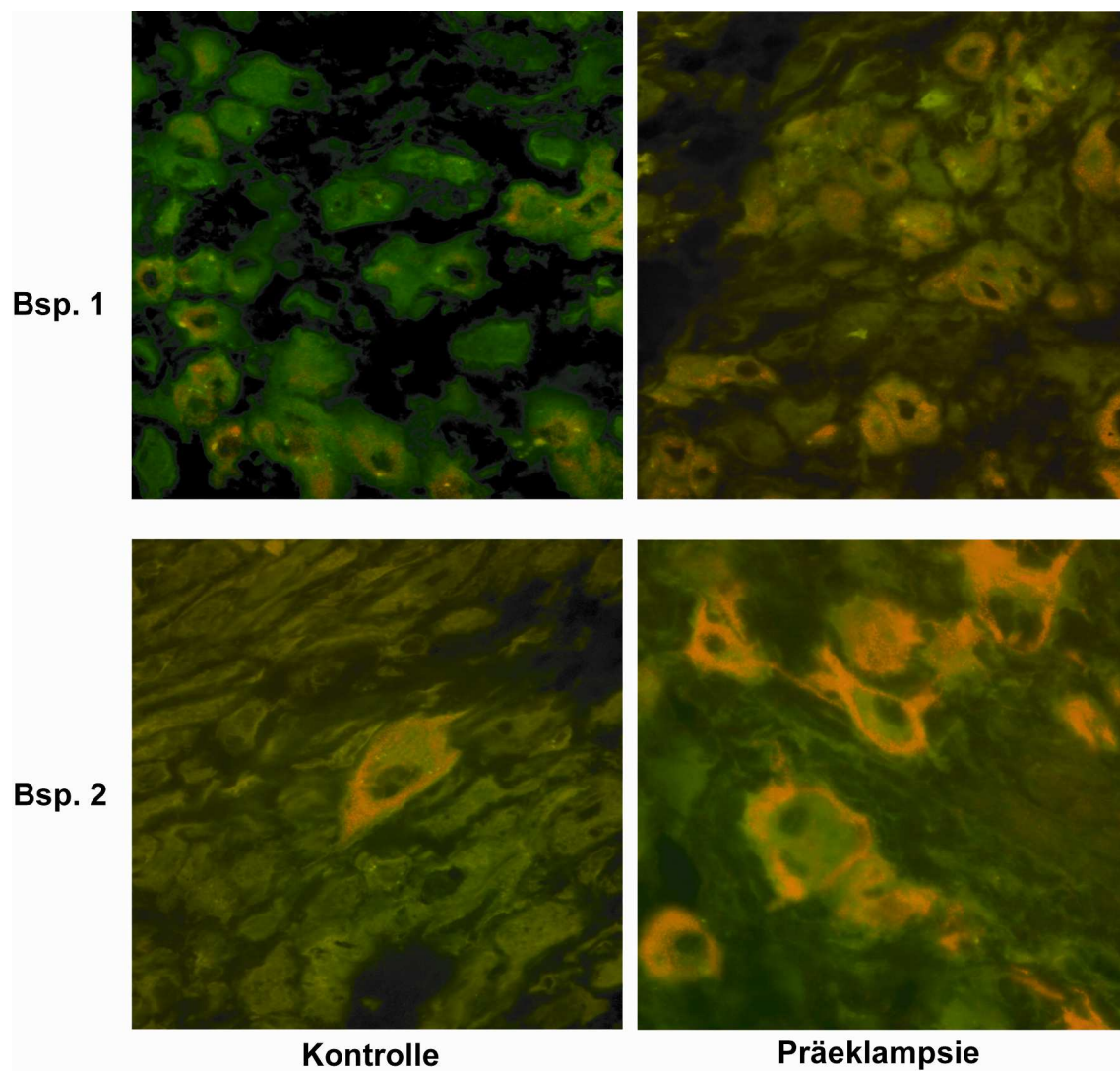


Abb.17: Dysregulation des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1-R) in Decidua (Immunfluoreszenz-Mikroskopie). Die spezifische Immunfluoreszenzfärbung zeigt, dass der AT1-R auf Protein-Ebene in der Präeklampsiegruppe deutlich hochreguliert ist. Da das Deciduagewebe ein sehr inhomogenes Gewebe ist, sind hier zwei repräsentative Beispiele gewählt.

Zelloberfläche. Nach Inkubation mit 100nM AngII kam es ebenfalls zur Phosphorylierung (siehe Abb.23). Insgesamt war die Signaltransduktion des AT1-AA signifikant und spezifisch, da sie nur Zellen, die den AT1-R präsentierten, aktiviert haben und war nur gering schwächer als die Aktivierung durch das AngII (siehe Abb.24).

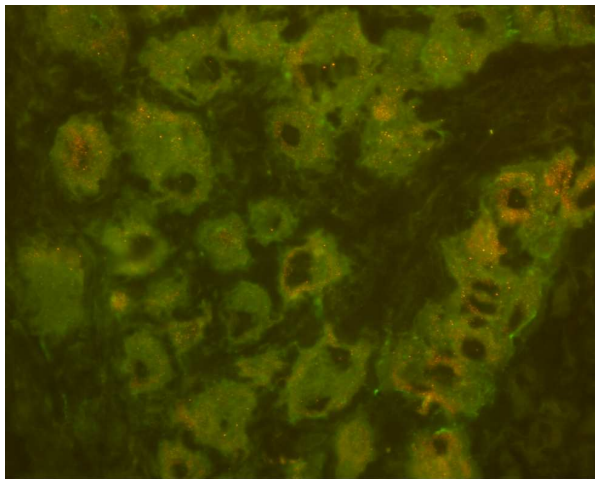
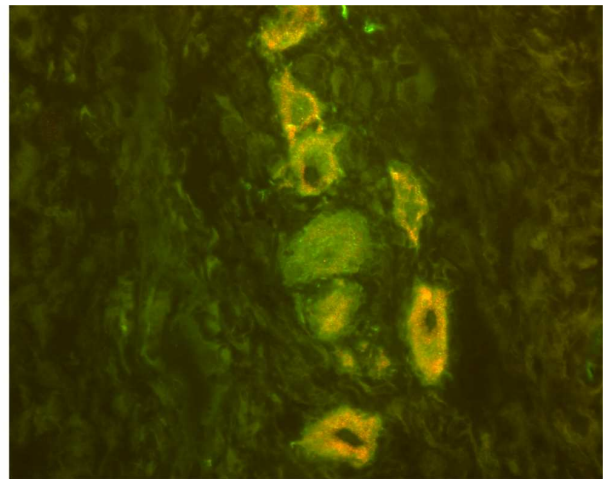
**Bsp. 1****Bsp. 2**

Abb.18: Immunfluoreszenzfärbung von Deciduagewebe zur Charakterisierung von Trophoblasten. Es sind Trophoblasten im Deciduagewebe spezifisch durch Cytokeratin 7 angefärbt. Es ist derselbe Zelltyp erkennbar wie unter Abb.13. Da das Deciduagewebe ein sehr inhomogenes Gewebe ist, sind hier zwei repräsentative Beispiele gewählt.

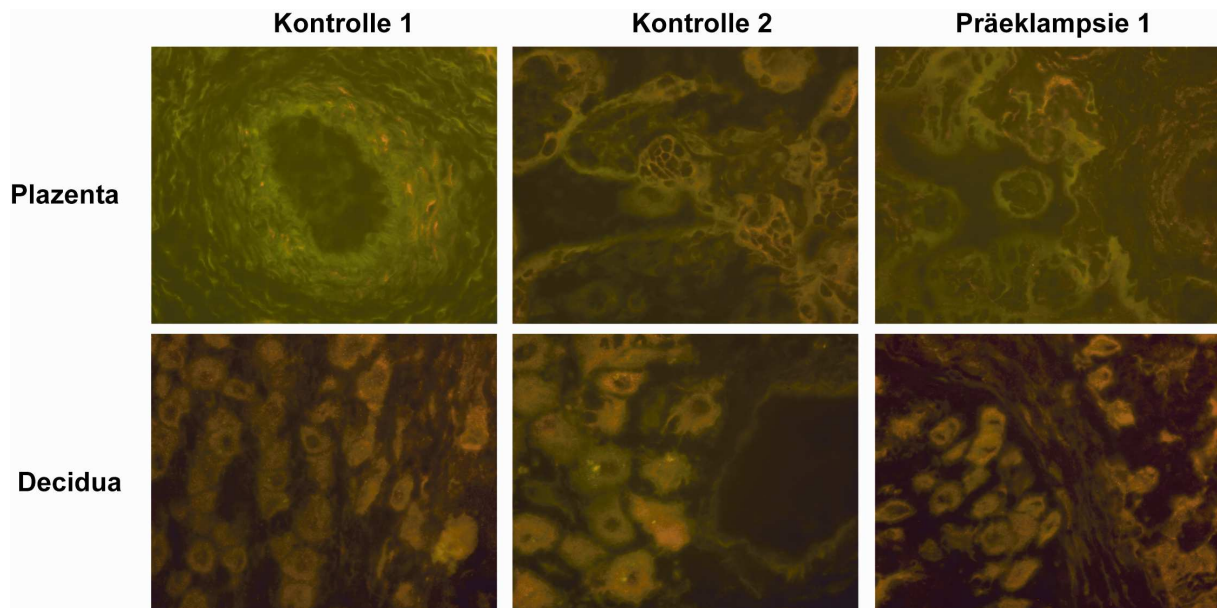


Abb.19: Differenzielle Genexpression des Renin in der Plazenta vs. Decidua (Immunfluoreszenz-Mikroskopie). Die spezifische Immunfluoreszenzfärbung zeigt, dass das Enzyme Renin in der Decidua deutlich höher expremiert ist als in der dazugehörigen Plazenta. Aufgrund der Inhomogenität beider Gewebe sind drei verschiedene Plazenten im Vergleich zu ihren entsprechenden Deciduen dargestellt. Zur Verdeutlichung, dass keine Dysregulation durch die Präeklampsie stattfindet, ist neben zwei Kontrollen auch das Gewebe einer Präeklampsie aufgeführt.

5.4 Zirkulierendes Renin-Angiotensin System

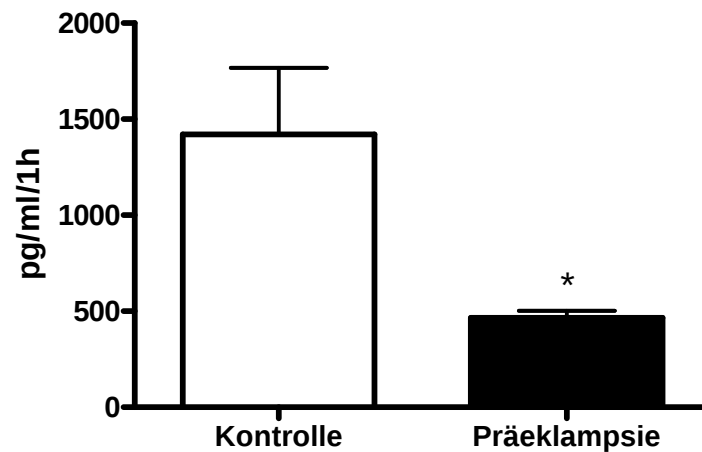


Abb.20: Dysregulation der Plasma-Renin Aktivität (PRA) in der Präeklampsie. Die PRA ist in der Präeklampsiegruppe signifikant um den Faktor 3 geringer (* $p=0,015$)

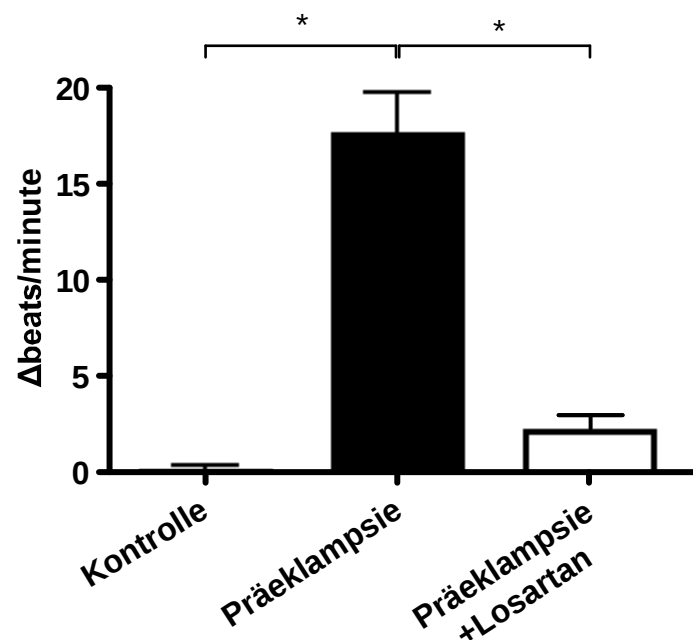


Abb.21: Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1-R)-Autoantikörpers (AT1-AA) in prägeklampischen maternalem Serum. Im Kardiomyozyten-Kontraktions-Bioassay ist ein signifikanter Anstieg der Schlagfrequenz nach Inkubation mit maternalem Serum aus der Präeklampsiegruppe erkennbar. Dieser Effekt ist spezifisch blockbar durch Vorinkubation mit dem AT1-R Blocker Losartan (* $p<0,001$).

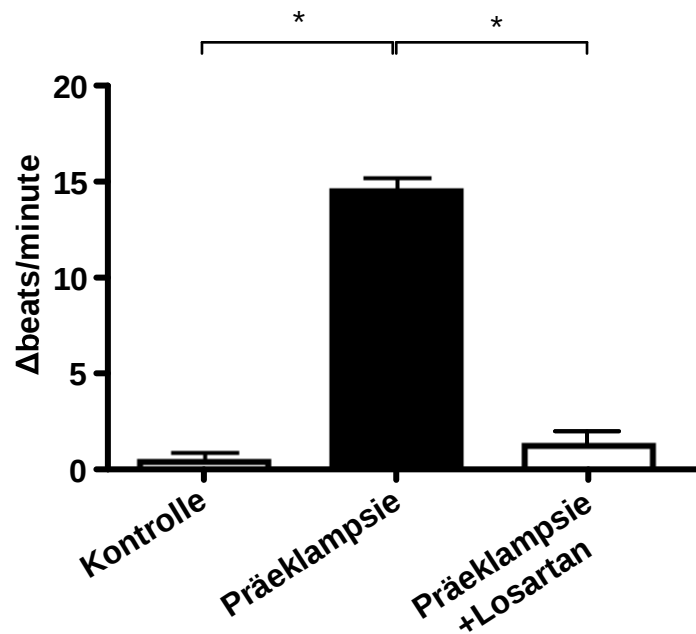


Abb.22: Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1-R) -Autoantikörpers (AT1-AA) in prägeklampischen Serum der Umbilikalvene (UV). Im Kardiomyozyten-Kontraktions-Bioassay ist ein signifikanter Anstieg der Schlagfrequenz nach Inkubation mit Serum aus der UV (Repräsentiert den Blutstrom von der Mutter zum Fötus) der Präeklampsiegruppe erkennbar. Dieser Effekt ist spezifisch blockbar durch Vorinkubation mit dem AT1-R Blocker Losartan (* $p < 0,001$).

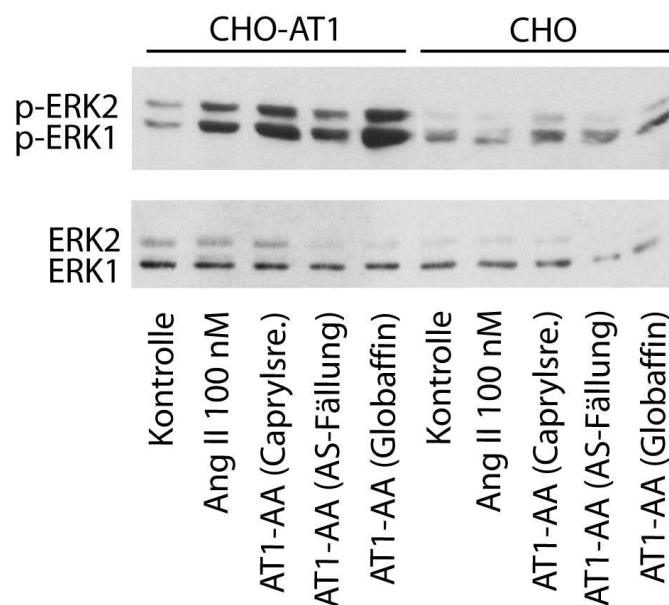


Abb.23: Signaltransduktion des Angiotensin II Rezeptor (AT1-R) Typ 1-Autoantikörpers (AT1-AA). Es ist eine repräsentative Phosphorylierung der p44/42-MAP Kinase (ERK2/1) in Chinese Hamster ovary (CHO) Zellen und AT1-R überexprimierenden CHO Zellen (CHO-AT1) im Westernblot dargestellt. In CHO-AT1 Zellen ist eine deutliche Phosphorylierung nach Stimulation mit Angiotensin II (Ang II) (100 nM, 15 min) und den AT1-AA (aus verschiedenen Aufreinigungsmethoden) (Verdünnung 1/40, 30 min) erkennbar. In CHO Zellen ist dieser Effekt nicht ersichtlich. Es wurden jeweils die gleichen Proteinmengen aufgetragen. Als Normalisierung ist die unphosphorylierte Variante von ERK1/2 dargestellt.

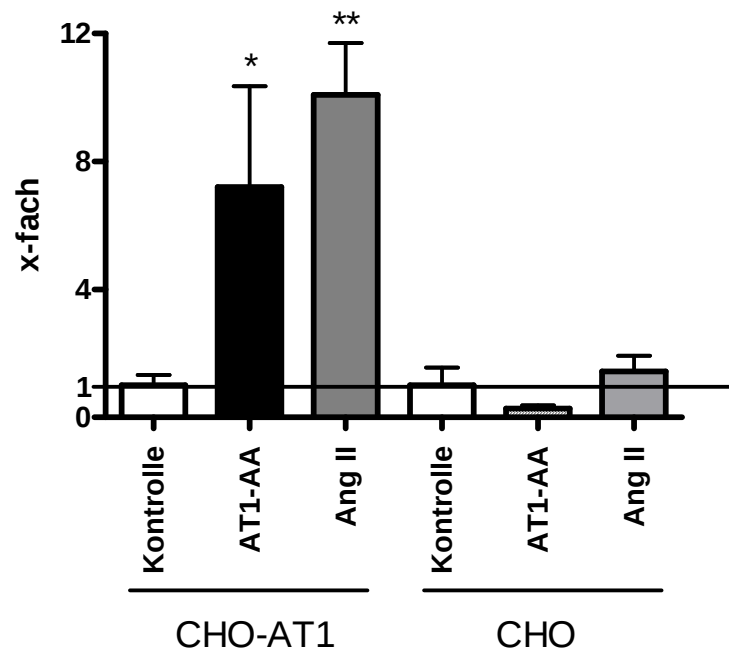


Abb.24: Densitometrische Auswertung der Signaltransduktion des Angiotensin II Rezeptor (AT1-R) Typ 1-Autoantikörpers (AT1-AA). Die Westernblot Ergebnisse zur Signaltransduktion des AT1-AA sind hier zusammenfassend dargestellt. In Chinese Hamster ovary (CHO) Zellen, die den AT1-R überexprimieren (CHO-AT1), ist ein signifikanter Anstieg der Signalintensität nach Inkubation mit dem AT1-AA (nach AS-Fällung) zu erkennen (Faktor 7). Einen ähnlichen Effekt erzielte Angiotensin II (Faktor 10). In CHO Zellen ist keine relevante Veränderung erkennbar. (* $p=0,004$; ** $p=0,001$)

6 Diskussion

Die Microarraydaten zeigten, dass es durch die Präeklampsie zu einer Dysregulation des Expressionsprofiles in den untersuchten Geweben kam, mit dem häufigsten Auftreten in der Decidua. Das RAS ist insbesondere an der Pathologie der Präeklampsie beteiligt. So war der AT1-R in der präeklampsischen Decidua hochreguliert was sich im Microarray zeigte und via Realtime RT-PCR und Immunofluoreszenzmikroskopie verifiziert werden konnte. Ebenso kam es zu einer leichten Dysregulation im Fettgewebe. Der AT2-R wurde in der präeklampsischen Plazenta runterreguliert. Das zirkulatorische RAS war durch die reduzierte PRA und das Vorhandensein des AT1-AA im Serum der Mutter und im transplazentaren Transfer dysreguliert. Der AT1-AA ist eindeutig befähigt, die MAPK/ERK-Kaskade zu aktivieren. Unabhängig der Dysregulation durch die Präeklampsie kam es zu einer differenziellen Genexpression von RAS-Komponenten und den AT1-R-Cofaktoren. So war Renin wesentlich höher in der Decidua expremiert als in der Plazenta, ebenso ACE, AGT und der BDKRB2. Konträr dazu verhielt sich der EGF-R, M-R und der AT1-R. Eine Expression der Aldosterone-Synthase konnte in keinem der untersuchten Gewebe nachgewiesen werden.

Präeklampsie ist eine Krankheit, die bei schwangeren Frauen seit Beginn der menschlichen Aufzeichnungen bekannt ist und mit einem relativ hohen Prozentsatz von 3-5% in den Industrieländern vertreten ist. Dennoch ist trotz intensiver Bemühungen bislang keine adäquate Therapie oder Frühdiagnostik gefunden worden (Mutter und Karumanchi, 2007). Der Grund hierfür dürfte in der besonderen Komplexität der Pathologie zu finden sein, welche nicht nur auf die utero-plazentare Einheit beschränkt ist, sondern auch die Mutter sowie den Fetus beinhaltet. Mit den in dieser Arbeit bereitgestellten Proben wurde diese Komplexität bedient. So wurde Plazenta und Decidua für die utero-plazentare Einheit, Muskel- sowie Fettgewebe für mütterliches Gewebe, Serum und Plasma der Mutter für das zirkulatorische System der Mutter und Serum aus der Umbilikalvene für den transplazentaren Transfer von Mutter zu Kind für Expressionsstudien und weitere Analysen verwandt. Die gute klinische Charakterisierung der in dieser Studie einbezogenen Frauen muss ebenfalls als begünstigend angesehen werden. Das Fettgewebe lässt weiteren Spielraum zur näheren Untersuchung des Risikofaktors Übergewicht. Der gesamte Aufbau der Studie zielte darauf hinaus, das Zusammenspiel von utero-plazentarer

Einheit und dem zirkulatorischen System der Mutter zu untersuchen. Hierbei wurde der akzeptierten Theorie gefolgt, dass die Präeklampsie eine 2-stage disorder ist (Roberts, 2000). Diese Theorie wird durch das Microarrayergebnis gestützt, nachdem in der Decidua ca. 7x mehr Gene dysreguliert sind, als in den anderen untersuchten Geweben. Hier ist der Ort, wo es zur abnormalen Plazentation und zur gestörten Spiralarterienumgestaltung kommt (Robertson et al., 1985).

Es wurde in dieser Studie darauf geachtet, dass die Auswahl der Patientinnen ihren Gruppen entsprechend eindeutige Befunde zeigten, um die späteren Ergebnisse auch sicher interpretieren zu können. Es gab zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede, außer den präeklampsiebedingten, wie Blutdruck, Schwangerschaftswoche und Geburtsgewicht. Das Geburtsgewicht war nicht nur aufgrund der geringeren Schwangerschaftswoche niedriger, sondern auch krankheitsbedingt, wie die neonatale Gewichtspercentile zeigt. Dies deutet eindeutig auf die mangelnde Versorgung des Fetus hin, was hervorgerufen wird durch einen reduzierten plazentaren Blutfluss (Friedman et al., 1991; 2000).

Das RAS ist ein sehr wichtiger Faktor, der bei der Pathologie von Bluthochdruckerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt und auch in Präeklampsie involviert ist (Luft, 2004). So gibt es viele Publikationen, die sich auf einen genetischen Aspekt bei RAS-abhängigen Genen beziehen (Chappell und Morgan, 2006). Einen entscheidenden Hinweis brachte ebenfalls Gant et al mit seinen, nach heutigen Maßstäben nicht zu verantwortbaren, Infusionsstudien mit AngII (Gant et al., 1973). Frauen mit schwangerschafts-induzierten Bluthochdruck reagierten sensibler auf AngII, was ähnliche Beobachtungen bei präeklampsischen Frauen bekräftigen (Talledo, 1968). Dies deutet darauf hin, dass eine erhöhte Anzahl von AngII-Rezeptoren bereit steht, was Baker et al anhand vom hochregulierten AT1-R auf Blutplättchen präeklampsischer Frauen bestätigen konnte (Baker et al., 1992). Die Hochregulation von dem AT1-R in der Decidua konnte anhand dieser Arbeit somit in einem weiteren Gewebe gezeigt werden, was ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist und auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden konnte. Ebenfalls kam es zur Hochregulation des AT1-R im Fettgewebe. Eine weitere interessante Entdeckung war die differenzielle Genexpression von den RAS-Komponenten. So war Renin ca. 35-fach höher in der Decidua expremiert als in der Plazenta. Ebenfalls AGT und ACE waren in der Decidua höher expremiert, was unabhängig vom Krankheitsbild Präeklampsie gezeigt werden konnte. Diese Entdeckung bestätigen die Studien von

Shaw et al, die das Deciduagewebe als eine Hauptquelle für die Reninproduktion beschreiben (Shaw et al., 1989). Der AT1-R war im Gegensatz dazu höher in der Plazenta expremiert als in der Decidua. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine erhöhte physiologische AngII-Produktion in der Decidua spekulieren mit einem geringen AT1-R-Vorkommen. Plazenta und Decidua sind verschieden im Hinblick auf ihren zellularen Ursprung. Die Plazenta besteht aus Gewebe, welches den Ursprung Fetus hat, wohingegen die Decidua aus dem uterinen Endometrium (maternale Zellen, wie Deciduazellen und auch Immunzellen), aber auch aus eingedrungenen fetalen Trophoblasten aufgebaut ist. Wie dieses komplizierte und auch sehr inhomogen aufgebaute utero-plazentare Gewebe interagiert in Hinsicht auf AngII-Produktion kann mit dieser Arbeit nicht geklärt werden. Einen möglichen Hinweis bietet die Arbeit von Hunton et al, die chemotaxische Interaktion von AngII und dem AT1-R untersuchte (Hunton et al., 2005). Eine vorstellbare Möglichkeit könnte sein, dass die Decidua der Ort der AngII-Produktion ist und die Plazenta das Zielorgan darstellt. Eine hochregulierte AT1-R-Expression in der präeklampsischen Decidua mag dieses komplexe utero-plazentare RAS initial stören.

Shah et al konnten in früheren Studien zeigen, dass die Reninexpression in präeklampsischen Frauen in der Decidua 3-fach höher war als in den Deciduen der Kontrollgruppe (Shah et al., 2000). Dieses Ergebnis konnten in der Arbeit nur bedingt verifiziert werden. Es wurde zwar auf mRNA-Ebene eine Hochregulation detektiert, jedoch war diese nicht signifikant. Dies mag an der unterschiedlichen Art der Gewinnung des Materials liegen. Für diese Arbeit wurde das Decidua-Gewebe durch eine spezielle Vakuumabsaugung des Plazentabettes aus der Uterina gewonnen. Dieser Teil der Plazenta verbleibt für gewöhnlich bei der Geburt (auch bei herkömmlichen Kaiserschnitten) in der Gebärmutter. Bei Shah et al wurde eine Microdissektion der entbundenen Plazenta durchgeführt. Dies führt auch einen weiteren Unterschied auf. In dieser Arbeit wurde darauf geachtet, dass nur Proben aus Kaiserschnitten verwandt wurden, die, bevor die Wehen eingesetzt hatten, gewonnen wurden. Dadurch wurde vermieden, dass das Gewebe (oder auch Serum/Plasma) dem unkontrollierbaren und damit schwer kalkulierbaren oxidativen Stress der unterschiedlich langen und starken Wehenzeit unterlag (Rogers et al., 1998). Dass Renin auch außerhalb der Niere expremiert wird, konnten schon Hodari et al und Symonds et al zeigen und wurde auch durch die vorliegende Arbeit wie oben beschrieben verifiziert (Hodari et al., 1967; Symonds et al., 1968). Die

Verbindung von Präeklampsie und Renin in der Zirkulation wurde anhand der PRA belegt. So ist die PRA in normalen Schwangeren gesteigert, was auf ein höheres Reninsubstrat zurückgeführt wurde (Ganten et al., 1971; Weinberger et al., 1977). Während der Präeklampsie kommt es allerdings zu einer Erniedrigung der PRA (Gordon et al., 1969). In dieser Arbeit wurde eine 3-fach höhere PRA im Plasma von normalschwangeren Frauen im Gegensatz zu präeklampsischen Frauen detektiert. Dieses Ergebnis passt zu den Studien von Langer et al., welche zeigen, dass AngII in der Zirkulation von präeklampsischen Frauen reduziert ist (Langer et al., 1998). Ein weiterer dysregulierter Faktor in der Zirkulation von präeklampsischen Frauen ist der AT1-AA. Dieser Autoantikörper wurde eindeutig im Serum detektiert, hingegen im Serum von Schwangeren aus der Kontrollgruppe nicht. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der AT1-AA auch zum Fetus transportiert wird. Die Auswirkungen dieses Transfers wurden hier zwar nicht untersucht, aber es ist denkbar, dass dieser Faktor eine Erklärung für die Tatsache ist, dass Mutter und Kind im späteren Leben ein erhöhtes Risiko haben, kardiovaskulären Krankheiten zu erleiden (Roberts und Gammill, 2005). Ein Hinweis in diese Richtung wurde auch schon von Khan et al. diskutiert, welche das RAS für eine mögliche Quelle für kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen in der Mutter, hervorgerufen durch „fetal programming“, ansehen (Khan et al., 2003). Dass der AT1-AA Aktivität besitzt und diese via AT1-R vermittelt, konnte in dieser Arbeit ebenfalls deutlich gezeigt werden. So ist der Kardiomyozyten-Kontraktions-Bioassay an sich schon ein Aktivitätsnachweis, da er auf der Kontraktion der neonatalen Rattenkardiomyozyten beruht und diese durch Losartan spezifisch für den AT1-R blockbar waren. Dieser Effekt wurde bei den AT1-AA, isoliert aus Serum der Mutter und Serum aus der Umbilikalvene, detektiert. Dies wird auch durch vorangegangene Ergebnisse bestätigt, wo gezeigt werden konnte, dass der Autoantikörper befähigt ist, NADPH-Oxidase und die Expression von tissue factor zu aktivieren (Dechend et al., 2000; Dechend et al., 2003). Auch wurde beschrieben, dass eine Aktivierung des AT1-R durch den AT1-AA zu einer erhöhten intrazellulären freien Ca^{2+} Konzentration führt (Thway et al., 2004). In dieser Arbeit wurde nun eine weitere Signaltransduktion beschrieben, die durch den AT1-AA vermittelt wird. Der MAPK-Weg ist eindeutig aktiviert, was durch die Phosphorylierung von ERK gezeigt werden konnte. Durch den MAPK-Weg kommt es zur Aktivierung des AP-1-Promoters. Dass AP-1 durch AT1-AA aktiviert wird, konnten schon Dechend et al. zeigen (Dechend et al., 2000).

AT1-AA spielen eine entscheidende Rolle in Herzerkrankungen, indem sie die Eigenschaften der Mastzellen verändern (Okruhlicova et al., 2007). Außerdem treten sie in weiteren Erkrankungen auf, die alle das Bild einer Abstoßungsreaktion zeigen. 2001 wurden die AT1-AA in einer HELLP-Patientin detektiert, deren einer Fetus (Mehrlingsschwangerschaft) in der Gebärmutter verstorben war (Fischer et al., 2001). Außerdem wurden die Autoantikörper bei Schwangeren mit IUGR detektiert (Walther et al., 2005). Eine Nicht-Schwangerschaftserkrankung, bei der die Autoantikörper auftreten, stellt die Transplantatabstoßung nach Nierentransplantation dar (Dragun et al., 2005). Präeklampsie muss auch als eine solche Krankheit angesehen werden, da sie die Anzeichen von Entzündungsreaktionen trägt und nach Entbindung des Kindes, bzw. der Plazenta die Abwehrreaktionen abbrechen. So wurden lediglich in 17,2% der Frauen mit ehemals Präeklampsie der AT1-AA 18 Monate postpartum noch detektiert (Hubel et al., 2007). In dieser Arbeit konnten zur Zeit der Entbindung 83% der präeklampsischen Frauen als AT1-AA-positiv detektiert werden. Ob das Auftreten des AT1-AA die Präeklampsie fördert oder sogar bedingt oder in Folge der Präeklampsie auftritt, zum Beispiel als Abwehrreaktion gegen eine pathologische utero-plazentare Einheit, kann abschließend nicht geklärt werden.

Die in letzter Zeit als mögliche Präeklampsiemarker diskutierten Faktoren konnten anhand dieser Arbeit größtenteils bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). So wurde in der präeklampsischen Plazenta der lösliche Vaskular Endothelien Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (soluble VEGFR1, oder sFLT1) und Endoglin als hochreguliert detektiert. Beide Faktoren sind in der Zirkulation von präeklampsischen Frauen erhöht (Maynard et al., 2003; Venkatesha et al., 2006). Auch das Gen für Leptin ist in der Decidua und in der Plazenta der Präeklampsiegruppe hochreguliert, was für die Plazenta schon gezeigt wurde und mit dieser Arbeit für die Decidua bestätigt wurde (Haugen et al., 2006). Laivuori et al konnten weiterhin zeigen, dass Leptin im präeklampsischen, maternalem Plasma erhöht ist (Laivuori et al., 2006). Eine enge Korrelation zwischen dem AT1-R und dem Epoxyeicosatriensäurebildner Cytochrom P450 CYP2J2 wurde in der Decidua detektiert. CYP2J2 ist neben anderen Cytochrom P450 in einem Rattenmodell für Präeklampsie dysreguliert (Kaergel et al., 2002). Angiotensin II stimuliert die Expression von Cytochrom P450 Isoformen, welche in engen Kontakt zu Albuminurie und Bluthochdruck stehen (Muller und Oertle, 1993). Eine Inhibition von Cytochrom P450 führte in einem weiteren Rattenmodell für Präeklampsie, dem RUPP-Modell, zu einer Senkung des Blutdruckes (Llinas et al., 2004).

Ein Schwachpunkt dieser Studie ist die geringe Patientenzahl in den Gruppen. Da unterschiedliche Individuen generell ein relativ verschiedenes Expressionsprofil aufweisen, kann es zu großen Schwankungen kommen, welche Signifikanzen beeinträchtigen können. Abhilfe schafft hier nur eine kostenaufwendige Erhöhung der n-Zahl. Außerdem war es nicht möglich, die Resultate gegen die Schwangerschaftslänge zu korrigieren. Allerdings ergaben die Analysen der Expressionsdaten gegen die Schwangerschaftswoche in den Gruppen keine signifikante Korrelation, was auf eine Unabhängigkeit hindeutet.

Das RAS ist während der Präeklampsie eindeutig dysreguliert und zwar als lokale Komponente in der utero-plazentaren Einheit, und zirkulatorische Komponente. Auch andere Systeme, die eng mit dem RAS gekoppelt sind oder sogar durch dieses gesteuert werden, sind in der Präeklampsie dysreguliert. Dies weist darauf hin, dass ein Eingreifen in dieses System als therapeutisches Mittel eine enorme Bedeutung hat. ACE-Inhibition und AT1-R-Blockade können aufgrund der reproduktionstoxischen Wirkung nicht eingesetzt werden (Paternoster et al., 2006). Gegenwärtig sind Faktoren zur Neutralisation der Präeklampsiemarker sFLT1 und sEndoglin in der Entwicklung. Dieses Interesse sollte ebenfalls dem AT1-AA beigemessen werden und weitere Möglichkeiten zur Intervention des inflammatorisch aktivierten RAS durchdacht werden. Denkbar wäre eine spezifische Plasmaphorese, durch die der Autoantikörper aus der Zirkulation der Mutter genommen werden würde, was bei anderen Autoimmunerkrankungen bereits als Therapieform Anwendung findet (Mutasim, 2004). Diese Anstrengungen könnten zu einer unbedingt notwendigen Verlängerung der Schwangerschaft bei präeklampsischen Frauen führen und die Auswirkungen des enormen Bluthochdrucks, wie Nierenschäden und spätere kardiovaskuläre Erkrankungen bei Mutter und Kind, lindern.

7 Literatur

- Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.*(2000)183: S1-S22.
- ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol.*(2002)99: 159-67.
- AbdAlla, S., Lothar, H., el Massiery, A.Quitterer, U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med.*(2001)7: 1003-9.
- Anderson, C. M. Preeclampsia: exposing future cardiovascular risk in mothers and their children. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.*(2007)36: 3-8.
- Baker, P. N., Broughton Pipkin, F.Symonds, E. M. Comparative study of platelet angiotensin II binding and the angiotensin II sensitivity test as predictors of pregnancy-induced hypertension. *Clin Sci (Lond).*(1992)83: 89-95.
- Barker, D. J. Intrauterine programming of coronary heart disease and stroke. *Acta Paediatr Suppl.*(1997)423: 178-82; discussion 183.
- Barker, D. J. Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med.*(1999)31 Suppl 1: 3-6.
- Barki-Harrington, L. Oligomerisation of angiotensin receptors: novel aspects in disease and drug therapy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*(2004)5: 49-52.
- Bobst, S. M., Day, M. C., Gilstrap, L. C., 3rd, Xia, Y.Kellems, R. E. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion. *Am J Hypertens.*(2005)18: 330-6.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*(1976)72: 248-54.
- Brazma, A.Vilo, J. Gene expression data analysis. *Microbes Infect.*(2001)3: 823-9.
- Bumpus, F. M., Schwarz, H.Page, I. H. Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin. *Science.*(1957)125: 886-7.
- Chappell, S.Morgan, L. Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond).*(2006)110: 443-58.
- Chesley, L. C. Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis. *Kidney Int.*(1980)18: 234-40.

- Davison, J. M., Homuth, V., Jeyabalan, A., Conrad, K. P., Karumanchi, S. A., Quaggin, S., Dechend, R. Luft, F. C. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol.*(2004)15: 2440-8.
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. Unger, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.*(2000)52: 415-72.
- Dechend, R., Gratze, P., Wallukat, G., Shagdarsuren, E., Plehm, R., Brasen, J. H., Fiebeler, A., Schneider, W., Caluwaerts, S., Vercruysse, L., Pijnenborg, R., Luft, F. C. Muller, D. N. Agonistic autoantibodies to the AT1 receptor in a transgenic rat model of preeclampsia. *Hypertension.*(2005)45: 742-6.
- Dechend, R., Homuth, V., Wallukat, G., Kreuzer, J., Park, J. K., Theuer, J., Juepner, A., Gulba, D. C., Mackman, N., Haller, H. Luft, F. C. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation.*(2000)101: 2382-7.
- Dechend, R., Viedt, C., Muller, D. N., Ugele, B., Brandes, R. P., Wallukat, G., Park, J. K., Janke, J., Barta, P., Theuer, J., Fiebeler, A., Homuth, V., Dietz, R., Haller, H., Kreuzer, J. Luft, F. C. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation.*(2003)107: 1632-9.
- Dragun, D., Muller, D. N., Brasen, J. H., Fritsche, L., Nieminen-Kelha, M., Dechend, R., Kintscher, U., Rudolph, B., Hoebeke, J., Eckert, D., Mazak, I., Plehm, R., Schonemann, C., Unger, T., Budde, K., Neumayer, H. H., Luft, F. C. Wallukat, G. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med.*(2005)352: 558-69.
- Einarsson, J. I., Sangi-Haghpeykar, H. Gardner, M. O. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.*(2003)188: 1241-3.
- Fayyad, A. M. Harrington, K. F. Prediction and prevention of preeclampsia and IUGR. *Early Hum Dev.*(2005)81: 865-76.
- Fischer, T., Wallukat, G., Schneider, M. P., Schlembach, D., Munz, W. Homuth, V. HELLP syndrome in the 18th week of gestation in association with elevated angiotensin AT(1)-receptor autoantibodies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*(2001)97: 255-7.
- Friedman, S. A., Taylor, R. N. Roberts, J. M. Pathophysiology of preeclampsia. *Clin Perinatol.*(1991)18: 661-82.
- Gant, N. F., Daley, G. L., Chand, S., Whalley, P. J. MacDonald, P. C. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest.*(1973)52: 2682-9.
- Ganten, D., Minnich, J. L., Granger, P., Hayduk, K., Brecht, H. M., Barbeau, A., Boucher, R. Genest, J. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science.*(1971)173: 64-5.

- Goodfriend, T. L., Lin, S. Y. Receptors for angiotensin I and II. *Circ Res.*(1970)27: 163-74.
- Gordon, R. D., Parsons, S., Symonds, E. M. A prospective study of plasma-renin activity in normal and toxæmic pregnancy. *Lancet.*(1969)1: 347-9.
- Griendling, K. K., Ushio-Fukai, M., Lassegue, B., Alexander, R. W. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension.*(1997)29: 366-73.
- Haller, H., Oeney, T., Hauck, U., Distler, A., Philipp, T. Increased intracellular free calcium and sensitivity to angiotensin II in platelets of preeclamptic women. *Am J Hypertens.*(1989)2: 238-43.
- Haugen, F., Ranheim, T., Harsem, N. K., Lips, E., Staff, A. C., Drevon, C. A. Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*(2006)290: E326-33.
- Higuchi, S., Ohtsu, H., Suzuki, H., Shirai, H., Frank, G. D., Eguchi, S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond).*(2007)112: 417-28.
- Hodari, A. A., Smeby, R., Bumpus, F. M. A renin-like substance in the human placenta. *Obstet Gynecol.*(1967)29: 313-7.
- Hsueh, W. A., Luetscher, J. A., Carlson, E. J., Grislis, G., Frazee, E., McHargue, A. Changes in active and inactive renin throughout pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.*(1982)54: 1010-6.
- Hubel, C. A., Wallukat, G., Wolf, M., Herse, F., Rajakumar, A., Roberts, J. M., Markovic, N., Thadhani, R., Luft, F. C., Dechend, R. Agonistic angiotensin II type 1 receptor autoantibodies in postpartum women with a history of preeclampsia. *Hypertension.*(2007)49: 612-7.
- Hunton, D. L., Barnes, W. G., Kim, J., Ren, X. R., Violin, J. D., Reiter, E., Milligan, G., Patel, D. D., Lefkowitz, R. J. Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol Pharmacol.*(2005)67: 1229-36.
- Kaergel, E., Muller, D. N., Honeck, H., Theuer, J., Shagdarsuren, E., Mullally, A., Luft, F. C., Schunck, W. H. P450-dependent arachidonic acid metabolism and angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension.*(2002)40: 273-9.
- Kam, E. P., Gardner, L., Loke, Y. W., King, A. The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum Reprod.*(1999)14: 2131-8.
- Khan, I. Y., Lakasing, L., Poston, L., Nicolaides, K. H. Fetal programming for adult disease: where next? *J Matern Fetal Neonatal Med.*(2003)13: 292-9.
- Laivuori, H., Gallaher, M. J., Collura, L., Crombleholme, W. R., Markovic, N., Rajakumar, A., Hubel, C. A., Roberts, J. M., Powers, R. W. Relationships

- between maternal plasma leptin, placental leptin mRNA and protein in normal pregnancy, pre-eclampsia and intrauterine growth restriction without pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.*(2006)12: 551-6.
- Langer, B., Grima, M., Coquard, C., Bader, A. M., Schlaeder, G.Imbs, J. L. Plasma active renin, angiotensin I, and angiotensin II during pregnancy and in preeclampsia. *Obstet Gynecol.*(1998)91: 196-202.
- Llinas, M. T., Alexander, B. T., Capparelli, M. F., Carroll, M. A.Granger, J. P. Cytochrome P-450 inhibition attenuates hypertension induced by reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Hypertension.*(2004)43: 623-8.
- Luft, F. C. The preeclampsia enigma and the renin-angiotensin system. *J Mol Med.*(2000)78: 63-5.
- Luft, F. C. Present status of genetic mechanisms in hypertension. *Med Clin North Am.*(2004)88: 1-18, vii.
- Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T. A., Morgan, J. P., Sellke, F. W., Stillman, I. E., Epstein, F. H., Sukhatme, V. P.Karumanchi, S. A. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.*(2003)111: 649-58.
- Mazak, I., Fiebeler, A., Muller, D. N., Park, J. K., Shagdarsuren, E., Lindschau, C., Dechend, R., Viedt, C., Pilz, B., Haller, H.Luft, F. C. Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation.*(2004)109: 2792-800.
- Muller, J.Oertle, M. Separate induction of the two isozymes of cytochrome P-450(11) beta in rat adrenal zona glomerulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.*(1993)47: 213-21.
- Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S.Bernstein, K. E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature.*(1991)351: 233-6.
- Mutasim, D. F. Management of autoimmune bullous diseases: pharmacology and therapeutics. *J Am Acad Dermatol.*(2004)51: 859-77; quiz 878-80.
- Mutter, W. P.Karumanchi, S. A. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res.*(2007).
- Norwitz, E. R.Repke, J. T. Preeclampsia prevention and management. *J Soc Gynecol Investig.*(2000)7: 21-36.
- Okruhlicova, L., Morwinski, R., Schulze, W., Bartel, S., Weismann, P., Tribulova, N.Wallukat, G. Autoantibodies against G-protein-coupled receptors modulate heart mast cells. *Cell Mol Immunol.*(2007)4: 127-33.

- Paternoster, D. M., Fantinato, S., Stella, A., Nanhorngue, K. N., Milani, M., Plebani, M., Nicolini, U. Girolami, A. C-reactive protein in hypertensive disorders in pregnancy. *Clin Appl Thromb Hemost.*(2006)12: 330-7.
- Poulsen, K. Jorgensen, J. An easy radioimmunological microassay of renin activity, concentration and substrate in human and animal plasma and tissues based on angiotensin I trapping by antibody. *J Clin Endocrinol Metab.*(1974)39: 816-25.
- Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M. Fisher, S. J. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.*(2004)114: 744-54.
- Redman, C. W. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta.*(1991)12: 301-8.
- Redman, C. W. Sargent, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.*(2005)308: 1592-4.
- Roberts, J. M. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semin Perinatol.*(2000)24: 24-8.
- Roberts, J. M. Cooper, D. W. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet.*(2001)357: 53-6.
- Roberts, J. M. Gammill, H. Pre-eclampsia and cardiovascular disease in later life. *Lancet.*(2005)366: 961-2.
- Roberts, J. M. Gammill, H. S. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension.*(2005)46: 1243-9.
- Roberts, J. M., Pearson, G., Cutler, J. Lindheimer, M. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension.*(2003)41: 437-45.
- Robertson, W. B., Brosens, I. Landells, W. N. Abnormal placentation. *Obstet Gynecol Annu.*(1985)14: 411-26.
- Rogers, M. S., Mongelli, J. M., Tsang, K. H., Wang, C. C. Law, K. P. Lipid peroxidation in cord blood at birth: the effect of labour. *Br J Obstet Gynaecol.*(1998)105: 739-44.
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Mezzano, S., Plaza, J. J. Egido, J. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension.*(2001)38: 1382-7.
- Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. Inagami, T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature.*(1991)351: 230-3.

- Schieffer, B., Schieffer, E., Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Kovanen, P. T., Kaartinen, M., Nussberger, J., Harringer, W., Drexler, H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*.(2000)101: 1372-8.
- Shah, D. M. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol*.(2005)288: F614-25.
- Shah, D. M. The role of RAS in the pathogenesis of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep*.(2006)8: 144-52.
- Shah, D. M., Banu, J. M., Chirgwin, J. M., Tekmal, R. R. Reproductive tissue renin gene expression in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*.(2000)19: 341-51.
- Shaw, K. J., Do, Y. S., Kjos, S., Anderson, P. W., Shinagawa, T., Dubeau, L., Hsueh, W. A. Human decidua is a major source of renin. *J Clin Invest*.(1989)83: 2085-92.
- Sibai, B., Dekker, G., Kupferminc, M. Pre-eclampsia. *Lancet*.(2005)365: 785-99.
- Stevens, J. M. Gynaecology from ancient Egypt: The papyrus Kahun: A translation of the oldest treatise on gynaecology that has survived from the ancient world. *Med J Aust*.(1975)2: 949-52.
- Stoeckert, C. J., Jr., Causton, H. C., Ball, C. A. Microarray databases: standards and ontologies. *Nat Genet*.(2002)32 Suppl: 469-73.
- Symonds, E. M., Stanley, M. A., Skinner, S. L. Production of renin by in vitro cultures of human chorion and uterine muscle. *Nature*.(1968)217: 1152-3.
- Talledo, O. E. O: Renin-angiotensin system in normal and toxemic pregnancies. IV. Inactivation of angiotensin in toxemic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*.(1968)101: 254-6.
- Thway, T. M., Shlykov, S. G., Day, M. C., Sanborn, B. M., Gilstrap, L. C., 3rd, Xia, Y., Kellems, R. E. Antibodies from preeclamptic patients stimulate increased intracellular Ca²⁺ mobilization through angiotensin receptor activation. *Circulation*.(2004)110: 1612-9.
- Trupin, L. S., Simon, L. P., Eskenazi, B. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology*.(1996)7: 240-4.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K. H., Yuan, H. T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M., Karumanchi, S. A. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*.(2006)12: 642-9.
- Wallukat, G., Homuth, V., Fischer, T., Lindschau, C., Horstkamp, B., Jupner, A., Baur, E., Nissen, E., Vetter, K., Neichel, D., Dudenhausen, J. W., Haller, H., Luft, F. C.

- Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest.*(1999)103: 945-52.
- Wallukat, G., Wollenberger, A., Morwinski, R., Pitschner, H. F. Anti-beta 1-adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: mapping of epitopes in the first and second extracellular loops. *J Mol Cell Cardiol.*(1995)27: 397-406.
- Walther, T., Wallukat, G., Jank, A., Bartel, S., Schultheiss, H. P., Faber, R., Stepan, H. Angiotensin II type 1 receptor agonistic antibodies reflect fundamental alterations in the uteroplacental vasculature. *Hypertension.*(2005)46: 1275-9.
- Weinberger, M. H., Kramer, N. J., Grim, C. E., Petersen, L. P. The effect of posture and saline loading on plasma renin activity and aldosterone concentration in pregnant, non-pregnant and estrogen-treated women. *J Clin Endocrinol Metab.*(1977)44: 69-77.
- Wellner, M., Dechend, R., Park, J. K., Shagdarsuren, E., Al-Saadi, N., Kirsch, T., Gratze, P., Schneider, W., Meiners, S., Fiebeler, A., Haller, H., Luft, F. C. Muller, D. N. Cardiac gene expression profile in rats with terminal heart failure and cachexia. *Physiol Genomics.*(2005)20: 256-67.
- Witlin, A. G., Sibai, B. M. Hypertension in pregnancy: current concepts of preeclampsia. *Annu Rev Med.*(1997)48: 115-27.
- Wolf, G., Wenzel, U., Stahl, R. A., Huneke, B. [Hypertensive disorders in pregnancy]. *Med Klin (Munich).*(2001)96: 78-86.

8 Publikationsliste

- Wenzel K, Daskalow K, Herse F, Seitz S, Zacharias U, Schenk JA, Schulz H, Hubner N, Micheel B, Schlag PM, Osterziel KJ, Ozcelik C, Scherneck S, Jandrig B.
Expression of the protein phosphatase 1 inhibitor KEPI is downregulated in breast cancer cell lines and tissues and involved in the regulation of the tumor suppressor EGR1 via the MEK-ERK pathway.
Biol Chem. 2007 May;388(5):489-95.
PMID: 17516844
- Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F, Hering L, Muller DN, Luft FC, Staff AC.
Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia.
Hypertension. 2007 Mar;49(3):604-11. Epub 2007 Jan 29.
PMID: 17261642
- Hubel CA, Wallukat G, Wolf M, Herse F, Rajakumar A, Roberts JM, Markovic N, Thadhani R, Luft FC, Dechend R.
Agonistic angiotensin II type 1 receptor autoantibodies in postpartum women with a history of preeclampsia.
Hypertension. 2007 Mar;49(3):612-7. Epub 2007 Jan 8.
PMID: 17210828
- Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Feldpausch M, Heintze U, Bohnke J, Wellner M, Herse F, Lassalle P, Luft FC, Sharma AM.
Adipose tissue and circulating endothelial cell specific molecule-1 in human obesity.
Horm Metab Res. 2006 Jan;38(1):28-33.
PMID: 16477537
- Wellner M, Herse F, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Bechart D, Lasalle P, Luft FC, Sharma AM.
Endothelial cell specific molecule-1--a newly identified protein in adipocytes.
Horm Metab Res. 2003 Apr;35(4):217-21.
PMID: 12778364

8.1 Beiträge

- Herse F, Wellner M, Engeli S, Gorzelniak K, Janke J, Luft FC, Sharma AM
Regulation und zelluläre Lokalisation von ESM-1, einem neuen Adipocytären Protein.
18. Jahrestagung der Deutschen Adipositas-Gesellschaft; 2002; Dresden, Deutschland
- Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F, Hering L, Muller DN, Luft FC, Staff AC.
Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia.
The 15th World Congress Of The International Society For The Study Of Hypertension In Pregnancy; 2006; Lisbon, Portugal
- Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F, Hering L, Muller DN, Luft FC, Staff AC.
Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia.
56.Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe; 2006; Berlin, Deutschland
- Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F, Hering L, Muller DN, Luft FC, Staff AC.
Dysregulation des zirkulären und lokalen Renin-Angiotensin System in Präeklampsie.
30. Wissenschaftlicher Kongress Hypertonie 2006, Deutsche Hochdruckliga; 2006; München, Deutschland
- Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F, Hering L, Muller DN, Luft FC, Staff AC.
Dysregulation des zirkulären und lokalen Renin-Angiotensin System in Präeklampsie.
73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie; 2007; Mannheim, Deutschland
- Herse F, Hering L, Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Kittelsen Harsem N, Jordan J, Luft FC, Staff AC, Muller DN, Dechend R
Adipocytes produce the angiogenesis inhibitor, soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt-1).
61st Annual High Blood Pressure Research Conference; 2007; Tuscon, USA
- Herse F, Hering L, Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Kittelsen Harsem N, Jordan J, Luft FC, Staff AC, Muller DN, Dechend R
Adipocytes produce the angiogenesis inhibitor, soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt1).
Scientific Sessions 2007, American Heart Association; 2007; Orlando, USA

9 Abkürzungen

µg	Mikrogramm
ACE	Angiotensin converting enzyme
AGT	Angiotensinogen
Ald	Aldosteron
AngI	Angiotensin I
AngII	Angiotensin II
AP-1	Activator protein 1
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
AT1-AA	Angiotensin II-Rezeptor 1-Autoantikörper
AT1-R	Angiotensin II-Rezeptor 1
AT2-R	Angiotensin II-Rezeptor 2
BDKRB2	Bradykinin-Rezeptor B2
BMI	Body-Mass-Index
Cyp11B2	Aldosteron-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF-R	Epidermal growth factor-Rezeptor
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinasen
g	Gramm
GPCR	G-protein coupled receptor
His	Histidin
Ile	Isoleucin
IUGR	Intrauterine growth restriction
kDa	kilo Dalton
kg	kilo Gramm
MAPKinase	mitogen-activated protein-Kinase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-kB	Nuclear factor-kB
Phe	Phenylalanin
PKC	Protein-Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RAS	Renin-Angiotensin System
Renin-R	Renin-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
Ro 42	Remikirin
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Doktorarbeit am Institut für Biotechnologie an der TU Berlin zu übernehmen. Zudem hat er mir mit seinem Rat bei der Zusammenstellung der Ergebnisse zur Seite gestanden.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ralf Dechend und MD PhD Anne Cathrine Staff, die dieses Projekt erst ermöglicht haben, mir jederzeit eine große Hilfe waren und mit Anregungen und viel Spaß zur Seite standen. Egal ob in Oslo, Berlin oder auf Kongressen, sie waren mir immer eine große Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Friedrich C. Luft und PD Dr. Dominik N. Müller danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die jahrelange Betreuung.

Ebenfalls seit vielen Jahren eine große Hilfe ist mir das gesamte Team der Firma CellTrend, wo ich mich vor allem bei Melanie Soosten für die tatkräftige Unterstützung bedanken möchte.

Weiterhin gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von Dr. Gerd Wallukat am MDC-Berlin für die Unterstützung bei dem Bioassay.

Eine große Hilfe im Alltag war mir natürlich die ganze Arbeitsgruppe mit ihrer Unterstützung, Gabi N'Diaye, May-Britt Köhler, Mathilde Schmidt, Anette Fiebeler, Fatimunnisa Qadri, Jürgen Janke, Henning Damm, Maren Wellner, Ute Gerhard, Jana Czychi und besonders der täglich erfrischende Gedankenaustausch mit Lydia Hering, Sandra Feldt, Ulrike Maschke und Petra Gratze.

Außerdem danken möchte ich MD Gergö Molnar für seine Hilfe bei der Statistik und MD Nina Kittelsen Harsem für die tatkräftige Unterstützung bei den Patientenproben.

An allererster Stelle möchte ich jedoch meiner Familie danken, die immer für mich da ist und die ich in allen Lebenssituationen an meiner Seite weiß. Danke!