

## 1. Einleitung

### 1.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

#### 1.1.1 Allgemeines

Während andere Wachstumsfaktoren pleiotroph wirksam sind, ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ein hochspezifisches Mitogen für Endothelzellen.

Die biologische Bedeutung von VEGF beschränkt sich aber nicht auf die Induktion von Zellproliferation. Über die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle auf Endothel und Zellen des peripheren Blutes fördert der Wachstumsfaktor die Zellmigration und –kommunikation und bildet so mit seinen Rezeptoren ein essentielles Regulationssystem für die Formation von Blutgefäßen während der embryonalen Entwicklung (Leung et al, 1989). Darüberhinaus verfügt VEGF auch über Einfluss auf die Endothelzell-Differenzierung (Carmeliet et al, 1995).

Unterbindet man die Signaltransduktion bei Versuchstieren *in utero*, zeigen die Embryonen keine Endothel- oder hämopoetischen Stammzellen. VEGF ist demnach als entscheidende Determinante der Differenzierung von Hämangioblasten in endotheliale Vorläuferzellen und Stammzellen der Blutbildung anzusehen.

Ausserdem kommt es unter seinem Einfluss durch Einbau von Fenestrierungen in das Endothel sowie durch Formation von Kanälen zu gesteigerter Gefäßpermeabilität (Neufeld et al, 1999).

#### 1.1.2 Die VEGF- Familie

Die Familie des Wachstumsfaktors umfasst neben VEGF auch VEGF-B (Olofsson et al, 1996), -C (Jinkov et al, 1996), -D (Orlandini et al, 1996) und den Placenta Growth Factor (Maglione et al, 1991).

VEGF besitzt allerdings die größte Potenz zur Stimulation von Endothelzellproliferation und –permeabilität. Die Transkription des VEGF-Gens führt über alternatives Splicing zur Bildung von fünf Isoformen, die sich hinsichtlich der Molekülmasse (VEGF<sub>121 / 145 / 165 / 189 / 206</sub>), aber auch in ihren biologischen Eigenschaften unterscheiden. Ein wichtiges Diskriminierungsmerkmal ist ihre Bindungsfähigkeit an Heparin und Heparansulfat.

Während VEGF<sub>121</sub> nicht in der Lage ist, an Proteoglykane der extrazellulären Matrix zu binden, verfügen die anderen Isoformen durchaus über diese Interaktionsmöglichkeit. VEGF<sub>189</sub> und <sub>206</sub> zeigen so starke Bindungsaffinität, dass sie nach Freisetzung nicht in das die

produzierende Zelle umgebene Medium gelangen, sondern sofort durch Anbindung an die Zelloberfläche und die extrazelluläre Matrix sequestriert werden. Somit dienen Heparansulfate auch als ein extrazelluläres Depot. Die Bindungsfähigkeit an Proteoglykane ist deshalb relevant, da hierbei die Sekretion anderer Wachstumsfaktoren gefördert werden kann, z.B. bFGF (beta- Fibroblast Growth Factor), die die Wirkung von VEGF synergistisch beeinflussen. So erklärt sich auch, weshalb die biologischen Effekte von VEGF<sub>121</sub>, das diesen Mechanismus nicht nutzen kann, geringer einzuschätzen sind als die der 165-Isoform. Auch die Bindung an die VEGF-Rezeptoren wird über Heparansulfate gefördert und stabilisiert, so dass sie als wichtige Co-Rezeptoren angesehen werden können.

### 1.1.3 VEGF- Produktion und –Regulation

Die VEGF-Expression in produzierenden Zellen (z.B. arterielle glatte Gefäßmuskelzellen, Keratinozyten, Trophoblastzellen, Astrozyten, renale Mesangiumzellen, glomeruläre Endothelzellen) wird durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert: Zytokine (Interleukin 1 $\beta$  und 6 haben steigernde, Interleukin 10 und 13 hingegen schwächende Wirkung), Wachstumsfaktoren (z.B. FGF, Platelet Derived Growth Factor, Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) und Gonadotropine sind zur Modulation der VEGF-Produktion und so zur indirekten Beeinflussung der Angiogenese befähigt.

Einer der stärksten Stimuli der VEGF-Expression ist Hypoxie und daher wahrscheinlich treibende Kraft für die Einleitung von Angiogenese im Rahmen von Organentwicklung und – wachstum. Der für die gesteigerte Produktion verantwortliche Mechanismus ist dem der Erythropoietinausschüttung vergleichbar:

Die Hypoxie-induzierte Transkription der VEGF-m-RNA wird durch die Interaktion des HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer-Faktor) mit einer spezifischen Bindungsstelle des VEGF-Promoters gesteuert (Levy et al, 1995). Weiterhin kommt es zur Stabilisierung der m-RNA durch Anbindung bestimmter Proteine, beispielsweise des HuR-Proteins, an ihr 3'-Ende (Levy et al, 1998).

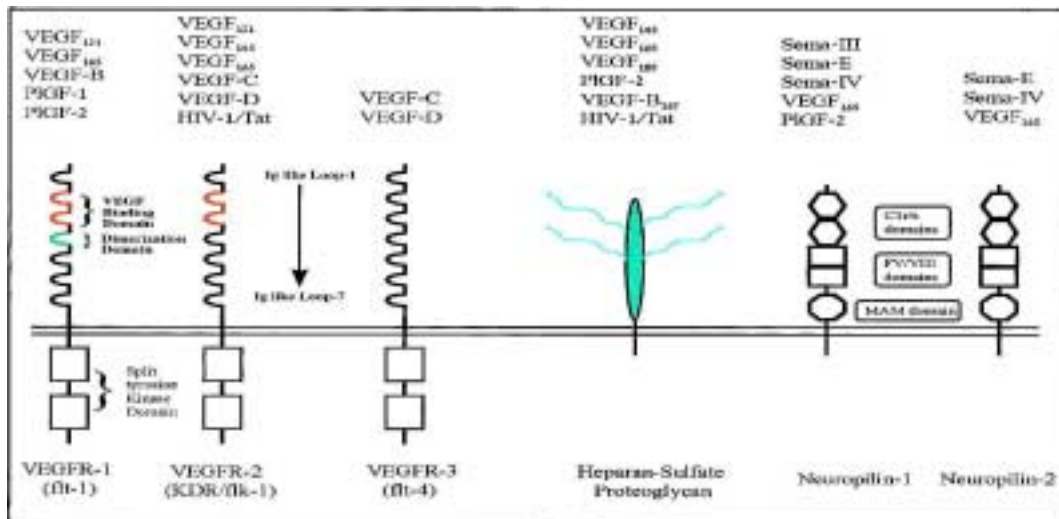
Störungen der VEGF-Produktion haben weitreichende pathologische Konsequenzen. Eine übermäßige Sekretion führt durch unkontrolliertes Wachstum der Gefäße zu Defekten der vaskulären Architektur: Massive Fusion von Gefäßen mit Ausbildung von Aussackungen oder Knoten ist die Folge. Im Gegensatz kann reduzierte oder fehlende VEGF-Synthese den Angiogeneseprozess so stark beeinträchtigen, dass weiteres Organwachstum unterbleibt.

Somit scheinen sowohl Verfügbarkeit als auch Regulation von VEGF Voraussetzung für normale Gefäß- und Organentwicklung zu sein.

## 1.1.4 VEGF- Rezeptoren und ihre biologische Bedeutung

### 1.1.4.1 Tyrosinkinase-Rezeptoren

Für die Signaltransduktion des VEGF-Moleküls stehen zwei Rezeptoren, VEGFR 1, der *fms-like tyrosine kinase receptor* (FLT-1) und VEGFR 2, der *kinase insert domain receptor* (KDR) zur Verfügung. Gemeinsam mit dem FLT-4, der auf Lymphgefäßen exprimiert wird und die Liganden VEGF-C und-D bindet, formen sie eine Subfamilie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Sie besitzen sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen im Extrazellulärbereich, einen membrandurchspannenden hydrophoben Anteil und die intrazellulär liegende Tyrosinkinase-Domäne (Abb.1).



**Abb.1: Wachstumsfaktoren und –rezeptoren der VEGF-Familie.**

Die drei Tyrosinkinase-Rezeptoren (FLT-1, KDR und FLT-4), die akzessorischen, isoformspezifischen Rezeptoren Neuropilin 1 und 2, sowie die VEGF- bindenden Heparansulfat-Proteoglykane sind mit ihren wichtigsten Strukturmerkmalen dargestellt. Ersichtlich wird die strukturelle Homologie der Tyrosinkinase-Rezeptoren mit ihren sieben extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Schleifen, der Transmembran-, sowie der intrazellulären Kinasedomäne. Die Proteoglykane und Neuropiline sind Co-Rezeptoren, die zwar zur Bindung von VEGF, nicht aber zur Signaltransduktion befähigt sind (Neufeld et al, 1999).

Strukturell weisen beide Rezeptortypen starke Homologien auf, rund 44% ihrer Aminosäuresequenzen sind identisch, ihre biochemischen Eigenschaften unterscheiden sich aber deutlich. So zeigt FLT-1 im Vergleich zu KDR eine zehnfach höhere Affinität gegenüber VEGF, seine Kinase-Aktivität ist gleichwohl zehnmal geringer. Dies lässt vermuten, dass die biologischen Funktionen der beiden Rezeptoren im Prozess der Angiogenese nicht übereinstimmen.

Homozygot FLK-1-negative (entspricht dem humanen KDR) Mäuse weisen schwerwiegende strukturelle Mängel bei der Gefäßentwicklung und Beeinträchtigungen der Hämopoese auf, was bereits nach acht Tagen zum Tod der Embryonen *in utero* führt. FLT-1-negative Tiere fallen durch abnorme Organisation der Gefäße mit übermäßigem, Lumen-verlegendem Wachstum endothelähnlicher Zellen auf und überleben ebenfalls nicht länger als acht bis zehn Tage.

Zeigt sich der KDR anhand dieser Erkenntnisse als ein positiver Regulator von Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen, scheint der FLT-1 hingegen für hemmende Effekte auf das Gefäßwachstum verantwortlich zu sein. Seine Rolle im VEGF-System konnten Hiratsuka et al (1998) näher beschreiben, als es ihnen gelang, die Tyrosinkinase-Domäne des FLT-1 ihrer Versuchstiere gezielt auszuschalten. Es ergaben sich keine Einbußen in der Angiogenese, die Embryonen waren lebensfähig

Somit ist FLT-1 das bislang einzige Beispiel eines Tyrosinkinase-Rezeptors, dessen biologische Funktion nicht vorrangig in der Aktivierung bzw. Inaktivierung seiner Tyrosinkinase begründet ist. Vielmehr bedeutet die Rezeptorbindung eine Wirkungseinschränkung seines Liganden durch Veränderung des aktiv vorliegenden Anteils von VEGF.

#### 1.1.4.2 sFLT

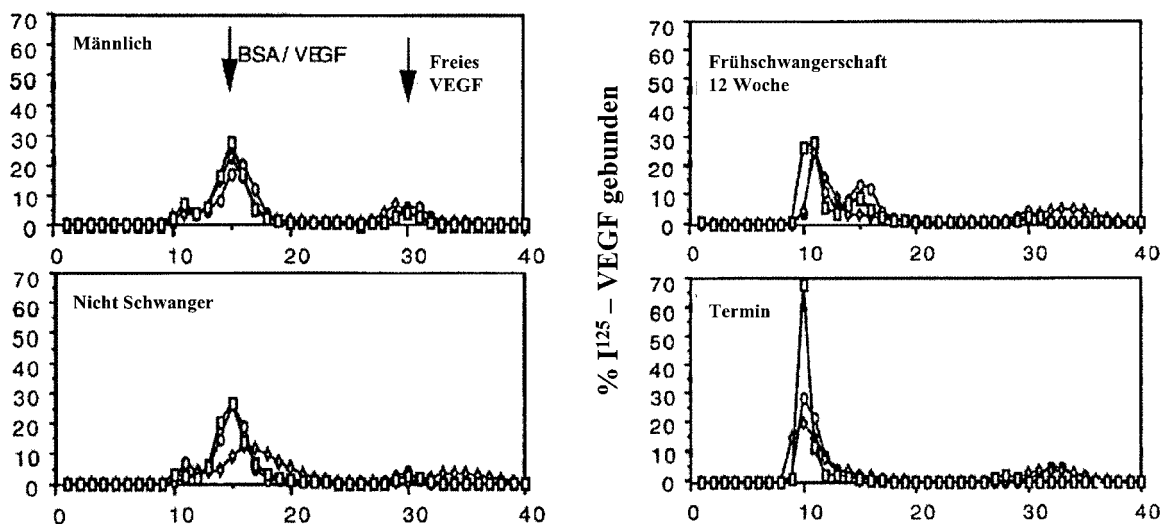
Alternatives Splicing der FLT-1-prä-m-RNA führt zur Bildung von zwei unterschiedlichen Rezeptorformen: der vollständigen, membrandurchspannenden Variante und einer löslichen Form, sFLT (*soluble* FLT). Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich strukturell an ihrem C-terminalen Ende. Während sechs der sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen und somit auch die VEGF-Bindungsstelle, die durch die Schleifen zwei und drei gebildet wird, identisch sind, besitzt sFLT anstelle der siebten, membrannahen Schleifenformation eine spezifische Polypeptidsequenz. Die Transmembran- und die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne fehlen. Die Bindungsfähigkeit und Affinität gegenüber VEGF sind bei FLT-1 und sFLT vergleichbar. Die hochaffine Bindung des Liganden führt beim löslichen Rezeptortyp durch die ausbleibende Signaltransduktion zur Unterdrückung der biologischen Effekte von VEGF.

Die inhibitorische Wirkung von sFLT beschränkt sich nicht auf die Ausschaltung von VEGF. Der lösliche Rezeptor verfügt ebenso wie die Tyrosinkinase-Rezeptoren über die Möglichkeit zur Dimerisation und könnte so durch Bildung non-funktioneller Heterodimere die Aktivität des FLT-1 und des KDR beeinflussen.

Die Produktion alternativer, löslicher Rezeptoren scheint einen spezifischen Mechanismus zur Regulation von Wachstumsfaktoren zu repräsentieren. Neben sFLT wurden auch analoge Rezeptorvarianten für FGF (Fibroblast Growth Factor), den Epidermis-Growth-Factor und den Kolonie-stimulierenden Faktor GM-CSF beschrieben.

Die Bedeutung der hemmenden Einflüsse auf die VEGF-Funktion *in vivo* blieb nach der Entdeckung des sFLT (Kendall et al, 1993) zunächst fraglich. Während der Nachweis der Rezeptor-m-RNA mit Hilfe von *In-situ-Hybridisierung* in Gefäßschnitten verschiedener humaner Gewebeproben (z.B. Niere, Lunge) gelang und Endothelzellen als eine Produktionsquelle identifiziert wurden, konnte das Rezeptorprotein im Serum der Patienten nicht detektiert werden. Die sezernierten Mengen waren offenbar zu gering.

Einen Anhalt über Einflussfaktoren, die zu gesteigerter Expression des Rezeptors führen, lieferten Clark et al (1998), als sie aus dem Serum Schwangerer ein VEGF-bindendes Protein isolieren konnten, das sich als identisch mit dem sFLT erwies (Abb. 2). Hier zeigten sich vor allem Trophoblastzellen in der Plazenta für die Produktion verantwortlich, was nicht ausschließen soll, dass auch in anderen Organen die Bildung des löslichen Rezeptors in der Schwangerschaft erhöht ist.



**Abb.2: Nachweis von sFLT im Serum Schwangerer**

Dargestellt ist eine Gel-Filtrationschromatographie des Serums männlicher, nicht schwangerer sowie schwangerer (12. und 40. Woche) Probanden. Während die Auftrennung für die Proben der Männer und nicht schwangeren Frauen lediglich die niedrigaffine Bindung von VEGF an Serumalbumin (BSA, Fraktion 15) nachweisen konnte, zeigten die Schwangeren zusätzlich ein VEGF-bindendes Protein in den Fraktionen 10 bis 11, das die Albuminbindung im Schwangerschaftsfortschritt zunehmend verdrängte. Der Einsatz rekombinanten sFLT in einer Kontroll-Chromatographie sowie Westernblot-Analyse (Daten nicht abgebildet) identifizierten das VEGF-bindende Protein als sFLT (Clark et al, 1998).

### 1.1.5 Rezeptorexpression

FLT-1 und KDR werden vorherrschend auf Endothelzellen exprimiert, die damit den einzigen Zelltyp darstellen, der über die gleichzeitige Expression beider Rezeptoren verfügt. Andere Zellarten zeigen jeweils nur einen VEGF-Rezeptortyp.

#### 1.1.5.1 Endothelzellen

Das Endothel spielt im Prozess der Angiogenese während der embryonalen Entwicklung eine zentrale Rolle und ist an der strukturellen und funktionellen Regulation von Hämostase und Gewebedurchblutung z.B. über die Einflussgrößen Gefäßtonus und vaskuläre Permeabilität beteiligt.

VEGF induziert und moduliert einige der endothelialen Funktionen:

- Unter dem Einfluß von VEGF kommt es zur Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen, zur Proliferation und Migration im Rahmen von Angiogenese und Vaskulogenese (Carmeliet et al, 1995).
- VEGF regt die Produktion und Sekretion von gerinnungsfördernden Mediatoren wie von-Willebrand-Faktor oder Gewebsthromboplastin an, die die Hämostase durch Stabilisierung, bzw. Aktivierung von Gerinnungsfaktoren beeinflussen.
- VEGF vermittelt dem Endothel sowohl vasokonstriktorische als auch relaxierende Einflüsse. Zum einen unterstützt VEGF die Kontraktionswirkung des Endothelin-Systems durch vermehrte Produktion von Endothelin-1, zum anderen fördert er die Freisetzung des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (Kroll et al, 1999).
- Über die Veränderung der Morphologie des Endothelzellverbandes mit Einbau von Fenestrierungen und Formation von Kanälen, führt VEGF zu erhöhter Gefäßpermeabilität (Neufeld et al, 1999)

Für die Vermittlung dieser Effekte stehen VEGF beide Rezeptortypen, FLT-1 und KDR, auf dem Endothel zur Verfügung. Transfektionsversuche gaben Aufschluss über die Einbindung der einzelnen Rezeptoren in die jeweilige Signaltransduktion. Dazu wurden arterielle Endothelzellen von Schweinen, die über keine endogenen VEGF-Rezeptoren verfügten, so verändert, dass es zu isolierter Expression des FLT-1 oder KDR kam. Es zeigte sich, dass die mitogenen Signale, ebenso wie Chemotaxis und Änderung der Zellmorphologie KDR-vermittelte VEGF-Funktionen sind. Die FLT-1- tragenden Zellen wiesen auf VEGF-Stimulation hin keine signifikanten Unterschiede zu den nicht transfizierten, also rezeptorlosen Zellen auf (Waltenberger et al, 1994).

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen über die Kinase-Aktivität des FLT-1 bestätigen diese Ergebnisse, dass die Bedeutung des FLT-1 für das Endothel nicht in einer positiven Regulation seines Liganden liegt.

#### 1.1.5.2 Trophoblastzellen

*In situ*-Hybridisierung konnte die Expression des VEGF-Rezeptors FLT-1 in plazentarem Gewebe zeigen. Dabei handelt es sich um Anteile des Zytotrophoblasten fetaler Zotten und in deutlich stärkerer Ausprägung um Zellen des extravillösen Trophoblasten.

Die Bedeutung der FLT-1-Expression dieser Zellen liegt offenbar nicht in der Vermittlung mitogener Signale, denn nur eine kleine Population der Trophoblastzellen, die Stammzellen, proliferieren. Die Mehrzahl differenziert zu Zellen des sog. invasiven Trophoblasten. Sie migrieren durch die maternale Dezidua und durchdringen schließlich die uterinen Spiralarterien, deren morphologische Umgestaltung Voraussetzung für die Deckung der Perfusionsbedürfnisse der wachsenden fetoplazentaren Einheit ist.

Bedenkt man, dass Zellmigration, Gefäßpermeabilität sowie Synthese und Sekretion proteolytischer Enzyme VEGF-induzierte Effekte sind, und die Plazenta intensive Expression des Wachstumsfaktors aufweist, scheint dem FLT-1 auf Trophoblastzellen die Funktion der Kontrolle von Migration und Differenzierung zuzukommen. Bei Störungen dieses Systems könnten schwerwiegende Folgen für Fetus und Mutter entstehen: Unzureichende Migration des invasiven Trophoblasten würde mangelhafte Durchblutung der Plazenta und so Beeinträchtigung der fetalen Entwicklung nach sich ziehen. Auch Beteiligung des mütterlichen Kreislaufs, wie es z.B. beim Krankheitsbild der Präeklampsie der Fall ist, ist denkbar (Charnock-Jones et al, 1994).

#### 1.1.5.3 Zellen des peripheren Blutes

Zunächst wurden Monozyten unter den peripheren Blutzellen als Träger des VEGF-Rezeptors FLT-1 identifiziert (Shen et al, 1993), später gelang auch der Nachweis auf neutrophilen Granulozyten.

Erkenntnisse über die Funktion des Rezeptors liegen bislang nur für Monozyten vor. Hier konnte die bereits zuvor beschriebene VEGF-induzierte Chemotaxis der Zellen (Clauss et al, 1990) als ein FLT-1-vermittelter Effekt belegt werden. Es zeigte sich, dass die Migrationsfähigkeit auf eine bestimmte VEGF-Konzentration hin durch Einsatz spezifischer anti-FLT-1-Antikörper zu unterdrücken war (Barleon et al, 1996).

VEGF ist darüberhinaus über seinen Rezeptor in der Lage, die prokoagulatorischen Eigenschaften der Monozyten zu beeinflussen, indem er die Produktion und Sekretion von Gewebsthromboplastin (Tissue Factor) fördert. Dieser Mediator bewirkt die extrinsische Aktivierung der Gerinnungskaskade durch Überführung der Faktoren VII und X in ihre biologisch aktive Form.

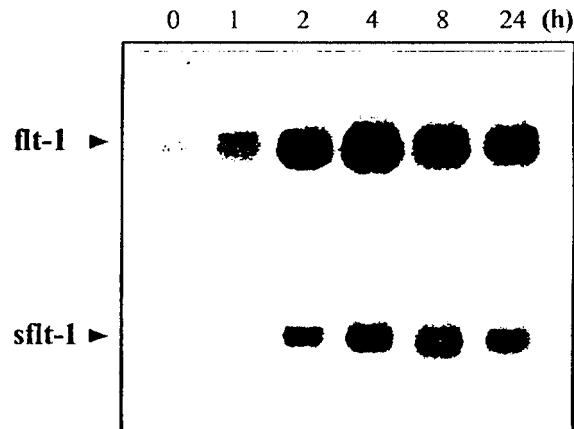
Somit sind hier Folgen einer unphysiologisch gesteigerten Stimulation des FLT-1 im Sinne einer erhöhten Gerinnungsneigung des Blutes zu erwarten.

#### 1.1.5.4 Einflüsse auf die Rezeptorexpression

Die Expression der VEGF-Rezeptoren wird durch Hypoxie beeinflusst, allerdings in geringerem Ausmaß als man es bei der VEGF-Synthese zeigen konnte. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Transkription von FLT-1, nicht aber die des KDR gesteigert. Die KDR-Produktion nimmt zwar ebenfalls zu, der entsprechende Mechanismus scheint aber posttranskriptionalen Ursprungs zu sein (Waltenberger et al, 1996; Gerber et al, 1997).

Als ein weiterer Einflussfaktor auf die Rezeptorexpression erwies sich auch der Ligand VEGF selbst. Der Zusatz von VEGF zu Endothelzellkulturen humaner Nabelschnurvenen (HUVEC) führte zur Expressionssteigerung des FLT-1 sowie seiner löslichen Form sFLT, beeinflusste aber nicht den KDR. Die Verwendung der Rezeptor-spezifischen VEGF-Isoformen Placenta Growth Factor zur Stimulation des FLT-1 und VEGF-D für isolierte Wirkung auf den KDR führte jeweils zu vermehrter Expression von FLT-1 und sFLT (Barleon et al, 1997, Abb.3). Demnach kann VEGF über beide Tyrosinkinase-Rezeptoren die FLT-1- und sFLT-Expression regulieren. Der KDR tritt als konstitutiver Rezeptor in Erscheinung, dessen Expressionsrate unabhängig von der aktuellen VEGF-Konzentration ist.





**Abb.3 : Northernblot- Darstellung der FLT-1- und sFLT-mRNA-Expression nach Stimulation**

Die Endothelzellen wurden mit VEGF<sub>165</sub> über verschiedene Zeiträume (0 bis 24h) stimuliert. Beide Rezeptortypen zeigen gesteigerte Expression nach Zusatz von VEGF zur Kultur (Barleon et al, 1997).

#### 1.1.6 Interaktion von Ligand und Rezeptor

Im VEGF-Molekül sind zwei unterschiedliche Domänen für die Bindung an den FLT-1, bzw. KDR verantwortlich. Die Bindungssequenzen setzen sich für FLT-1 aus den Aminosäuren Aspartat (Position 63), Glutamin (Position 64) und Glutamin (Position 67) zusammen, für den KDR aus Arginin (Position 82), Lysin (Position 84) und Histidin (Position 86). Diese Bindungsdomänen sind an entgegengesetzten Enden des VEGF-Monomers lokalisiert. Im Dimer sind die beiden 23kDa- Untereinheiten in einer „Kopf-zu-Schwanz“-Ausrichtung verknüpft und durch Disulfidbrücken stabilisiert, so dass die Bindungsstellen einander gegenüberliegen.

Die VEGF-Bindungsstelle der Rezeptoren befindet sich in der zweiten und dritten Immunglobulin-ähnlichen Schleife. Die vierte dieser Schleifenformationen enthält eine Domäne für die Rezeptordimerisation. Nicht nur gleichartige Rezeptormoleküle können über eine VEGF-Brücke verbunden werden, auch die Bildung von Heterodimeren ist möglich, deren biologische Bedeutung anscheinend in der Modulation der unterschiedlichen Rezeptorwirkung begründet ist. Eine Kombination von FLT-1 und KDR führte zur Abschwächung der induzierten Proliferationssignale. Auch eine Verknüpfung der Tyrosinkinase-Rezeptoren mit der unvollständigen Rezeptorform sFLT ist denkbar, was ausgeprägte Suppression der VEGF-Funktion zur Folge hätte (Kendall et al, 1993).

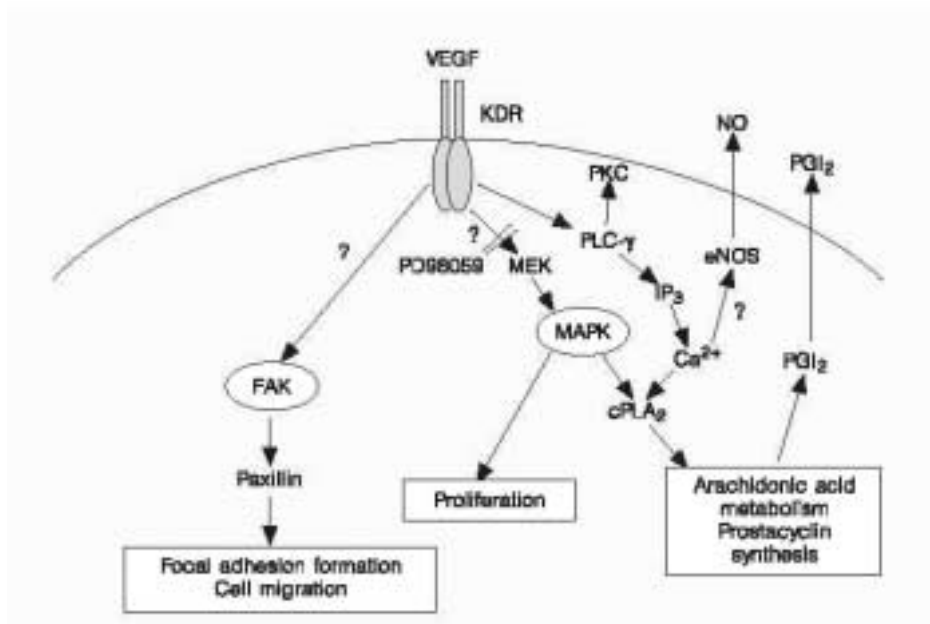
### 1.1.7 Signaltransduktion

Der erste Schritt bei der Liganden-abhängigen Aktivierung der Tyrosinkinase-Rezeptoren ist ihre Dimerisation und Autophosphorylierung, genauer die Übertragung von Phosphatgruppen des einen Rezeptormonomers auf seinen Dimerisationspartner (Transphosphorylierung).

Bei dieser Rezeptorfamilie dienen spezifische phosphorylierte Tyrosinreste als Bindungsstellen für (SH)<sub>2</sub>-Domänen bestimmter intrazellulärer Signalmoleküle, z.B. Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI 3-Kinase), Phospholipase C $\gamma$  oder p120 Guanosinriphosphatase Aktivierendes Protein (GAP).

Die Identifikation der spezifischen Komponenten, die mit den VEGF-Rezeptoren assoziiert sind, war bislang nicht eindeutig möglich, da die entsprechenden Studien zu ganz unterschiedlichen Resultaten gelangten. Während einige VEGF als Aktivator der Phospholipase C $\gamma$  und des p 120 GAP beschrieben (Guo et al, 1995), wiesen andere nur die Beteiligung der PI 3-Kinase nach

(Waltenberger et al, 1994). Eine Arbeitsgruppe konnte die Stimulation der p42/ p44 MAP-Kinasen (ERK 1 und 2) und der Fokalen Adhäsionskinase (FAK), nicht aber der PI 3-Kinase (Abedi et al, 1997, Abb.4) zeigen.



**Abb.4: Zusammenfassung möglicher Signaltransduktionswege des KDR**

FAK= Fokale Adhäsionskinase, MAPK= MAP-Kinase, cPLA<sub>2</sub>= Phospholipase A<sub>2</sub>, PLC $\gamma$ = Phospholipase C $\gamma$ ; PKC= Proteinkinase C, IP<sub>3</sub>= Inositoltrisphosphat, eNOS= endotheliale NO-Synthase, PGI<sub>2</sub>= Prostacyclin (Zachery et al, 1998)

Geht man davon aus, dass das Spektrum der (SH)<sub>2</sub>-Domänen-Proteine, die mit einem Tyrosinkinase-Rezeptor assoziiert sind, als Schlüsseldeterminante für das entstehende intrazelluläre Signal und somit für die biologische Antwort entscheidend sind, kommt für die VEGF-Rezeptoren und die Vielfalt der durch sie induzierten Effekte wahrscheinlich mehr als nur eine Signalkaskade in Betracht:

- Die Annahme der MAP-Kinasen als Vermittler der Proliferations-anregenden Signale könnte erklären, weshalb die beiden Rezeptortypen so unterschiedliche Effizienz aufweisen. Der FLT-1 zeigt deutlich geringere, z.T. keine Potenz zur Stimulation dieser Signalkaskade (Abedi et al, 1997).
- Als Mediator von Chemotaxis ist es für VEGF plausibel, über den Weg der FAK-Aktivierung die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und somit Zellmigration zu induzieren.
- Der Synergismus von VEGF und NO in der Angiogenese ist seit längerem bekannt (Ziche et al, 1997). Ein möglicher Mechanismus, über den VEGF die NO-Produktion reguliert, ist die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern mit nachfolgender Aktivierung der Ca<sup>2+</sup>-sensitiven NO-Synthase (Ahmed et al, 1997).
- Ebenfalls über die Mobilisierung intrazellulären Calciums könnte die VEGF-induzierte Sekretion von von-Willebrandt-Faktor aus Endothelzellen erfolgen (Guo et al, 1995).

## 1.2 Präeklampsie

### 1.2.1 Allgemeines

Präeklampsie ist eine schwangerschaftsspezifische Systemerkrankung des mütterlichen Organismus, die durch Hypertonie (Blutdruckwerte nach Riva Rocci > 140 / 90 mmHg) und Proteinurie (≥ 0,3 g/l im 24h-Sammelurin) gekennzeichnet und häufig vom Auftreten peripherer Ödeme begleitet wird. Sie betrifft 3-10 % aller Schwangerschaften, stellt immer noch eine der Hauptursachen der Müttersterblichkeit in Industrieländern dar (Dekker und Sibai, 1999) und ist auch hinsichtlich perinataler Morbidität und Mortalität von Bedeutung.

Die Charakterisierung bestimmter Risikofaktoren ist für die Präeklampsie bisher nicht gelungen. Zwar gilt als sicher, dass präexistente Hypertonie, Schwangerschafts-unabhängiger Diabetes, Mehrlingsschwangerschaft und Auftreten von Präeklampsie bei früherer Graviddität das Erkrankungsrisiko drastisch erhöhen (Inzidenz gegenüber dem Normalkollektiv um 20 - 25 % erhöht), die betroffenen Patientinnen stellen aber nur etwa 14% aller Krankheitsfälle.

Weitaus häufiger erkranken Erstgebärende, die diesem Risikoprofil nicht entsprechen (Myatt und Miodovnik, 1999).

Auch die Ätiologie der Präeklampsie ist noch ungeklärt. Man geht heute davon aus, daß eine unzureichende Invasion des extravillösen Trophoblasten in die uterinen Spiralarterien als Auslöser der Kaskade fungiert, die zum klinischen Syndrom führt.

### 1.2.2 Vaskuläre Veränderungen in der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft ist ein erhöhter Blutfluss (200- 600 ml/min) in den Gefäßen des Plazentabettes erforderlich. Die uteroplazentare Perfusion erhöht sich in erster Linie durch einen verminderten Gefäßwiderstand in den Spiralarterien, indem das Endothel durch Zellen des endovaskulären Trophoblasten ersetzt wird. Bereits während der initialen Entwicklungsphase der Plazenta migrieren Zellen des Zytotrophoblasten in die Dezidua und durchdringen die Spiralarterien bis zur Media. Diese Invasion führt zur Zerstörung vaskulärer Strukturkomponenten, einschließlich *Elastica interna*, *Muscularis* und Anteilen des sympathischen Nervensystems. Um diese Wandschichten zu ersetzen, fördert der Trophoblast die Bildung fibrinoider Matrix, die die Gefäße auskleidet. So resultiert ein vergrößerter Gefäßdurchmesser und eine konstante Dilatation, die die Aufrechterhaltung des Blutflusses unabhängig von maternalen Regulationsmechanismen gewährleistet (Brockelsby et al, 1999).

Bei Präeklampsie ist die Differenzierung des Trophoblasten gestört, die Zunahme der Expression von Adhäsionsmolekülen unterbleibt. So könnte sich die Unfähigkeit zur Invasion bzw. die geringe Invasionstiefe erklären. Erstrecken sich in der normalen Schwangerschaft die vaskulären Veränderungen bis zum inneren Drittel des Myometriums, bleiben sie bei Präeklampsie auf ein sehr oberflächliches Dezidualegment beschränkt oder ganz aus. Die uterinen Gefäße zeigen sich weitgehend anatomisch intakt. Aus der insuffizienten Trophoblastinvasion ergibt sich also ein geringerer Gefäßdurchmesser, und somit eine inadäquate Durchblutung mit konsekutiver Hypoxie.

### 1.2.3 Aktivierung des mütterlichen Endothels

Der veränderten Funktion des Endothels bei Präeklampsie mag eine Vielzahl von Faktoren zugrundeliegen: Hypoxie, die die Synthese vasoaktiver Mediatoren bedingt, Scherkräfte, die durch Vasospasmus hervorgerufen werden und Lipidperoxidation.

Die anhaltende Endothelaktivierung führt zu einem *Circulus vitiosus* aus Vasokonstriktion, Mikrothrombosierung, verminderter Perfusion und Verlust vaskulärer Integrität.

#### 1.2.3.1 Ausmaß der morphologische Veränderungen des Gefäßsystems

Bei der Präeklampsie sind die Gefäße nahezu aller Organsysteme der Mutter betroffen (Spargo et al, 1976; Shanklin et al, 1990). Der fehlende strukturelle Umbau der uterinen Spiralarterien gilt als dominierender Faktor bei der Entwicklung der plazentaren Insuffizienz. Die klassischen Syndrombestandteile Bluthochdruck, Proteinurie und periphere Ödeme spiegeln die Beteiligung der Widerstandsgefäße, der glomerulären und der subkutanen Gefäßbezirke wider. Andere klinische Manifestationen umfassen zerebrale Ischämie mit Ödembildung, Leckage mesothelialer Gefäße mit Auftreten von Aszites und Pleuraergüssen, sowie Konstriktion hepatischer Arteriolen mit der Konsequenz periportal Hämorrhagien und Leberfunktionsstörungen (Taylor et al., 1998).

Die morphologischen Veränderungen der uterinen Gefäße wurden zunächst als akute Atherose beschrieben (Zeek, Anali, 1950). Weitergehende ultrastrukturelle Untersuchungen (Nadji et al, 1973; de Wolf et al, 1975) zeigten Vakuolisierung der arteriolen Endothelzellen, myointimale Proliferation und Schaumzellinfiltration der Media, die gleichen histologischen Befunde also, die zum Bild der Arteriosklerose gehören.

#### 1.2.3.2 Veränderte Gefäßreaktivität

In der normalen Schwangerschaft wird die Verminderung des peripheren Widerstandes von einer zunehmenden Resistenz der Gefäße gegenüber vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen begleitet. So findet man im Serum Schwangerer zwei- bis dreimal höhere Angiotensin II- Konzentrationen bei gleichzeitig unverändertem oder sogar erniedrigtem systemischem Blutdruck als bei nicht graviden Kontrollen.

Vergleicht man dies mit Präeklampsie-Patientinnen, zeigen sich im ersten Trimenon keine signifikanten Unterschiede. Die *Effective Pressor Dose (EDP)*, die der infundierten Menge an vasokonstriktischer Substanz entspricht, bei der eine Blutdruckerhöhung um 20 mmHg zu verzeichnen ist, reduziert sich im Schwangerschaftsverlauf aber deutlich und sinkt sogar unter die Werte der nicht schwangeren Kontrollen ab. Dies geschieht lange, bevor die Erkrankung klinisch in Erscheinung tritt. Die Hypertension bei Präeklampsie ist demnach nur eine verspätete Manifestation einer vaskulären Veränderung und nicht verantwortlich für die multiplen Dysfunktionen (Brockelsby et al., 1999).

Es steht zur Diskussion, ob die Veränderung der Gefäßreaktivität bei Präeklampsie mit einer intrinsischen Störung des Endothels beginnt oder Folge der Einwirkung eines zirkulierenden Faktors ist. Für letzteres spricht die Tatsache, dass die postpartale Retransfusion vor der Entbindung entnommenen Blutes bei Präeklampsie-Patientinnen erneut zum Blutdruckanstieg führte, während solche Effekte durch Blut normotensiver Schwangerer nicht auszulösen waren (Pirany und MacGillivray, 1975).

Auch im Tierexperiment ließ sich gesteigerte Sensitivität der Gefäße gegenüber Vasokonstriktoren wie Angiotensin II und Norepinephrin verzeichnen, wenn eine Behandlung mit dem Serum von Präeklampsie-Patientinnen vorausging. Das Serum gesunder Schwangerer blieb jeweils ohne Wirkung (Tulenکو et al, 1987; Ezimokhai et al, 1993).

Desweiteren wurden Untersuchungen zur Lokalisation des Ausgangs- bzw. Angriffsortes der gestörten Gefäßreaktivität unternommen. Es zeigte sich, dass bei Entfernen des Endothels die Antwort auf Vasokonstriktoren nun unabhängig vom Zusatz der unterschiedlichen Seren war. In allen Ansätzen war die Relaxationsfähigkeit der Gefäße stark eingeschränkt (Ezimokhai et al, 1995).

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die veränderte vaskuläre Reaktivität bei Präeklampsie auf einer Störung der Endothel-abhängigen Relaxationsfähigkeit der Gefäße beruht. Es bleibt zu klären, ob dies die Folge des Fehlens eines protektiven Faktors ist, der die in der Schwangerschaft physiologische Unempfindlichkeit gegenüber Vasokonstriktoren vermittelt.

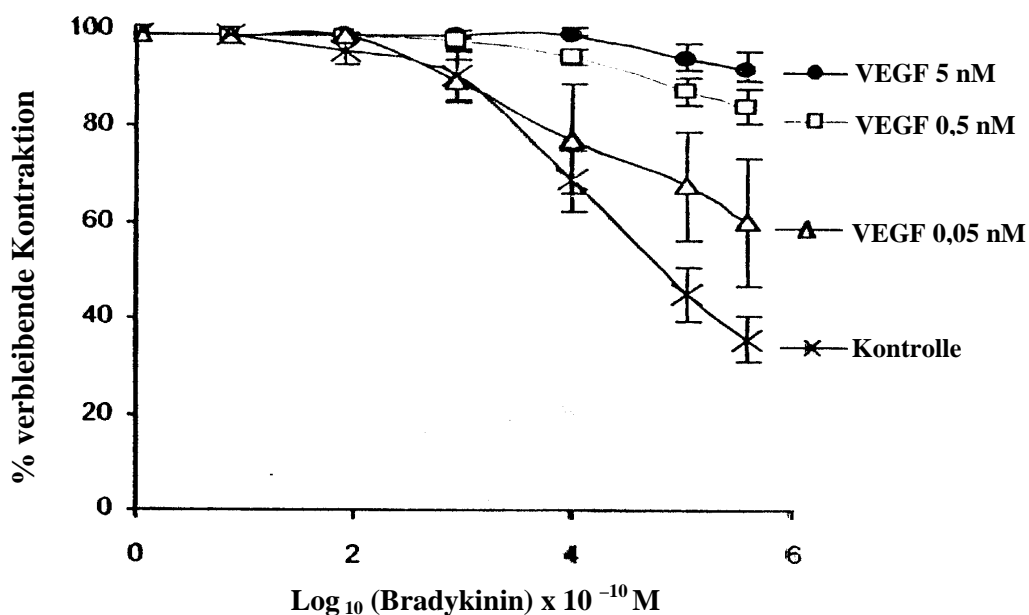
Eine Überlegung betrifft die Rolle der vasoaktiven Substanzen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin. Eine Verminderung ihrer Synthese von seiten des Endothels könnte die Ursache des erhöhten Gefäßtonus sein. Allerdings konnten in mehreren Studien keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Schwangeren und Patientinnen mit Präeklampsie bezüglich der im Urin nachweisbaren Mengen Nitrit/ Nitrat als Hinweis veränderter NO-Produktion gefunden werden (Silver et al, 1996; Kupferminc et al, 1996). Darüberhinaus wurde in Endothelzellkulturen nach Zusatz von Präeklampsie-Plasma eine erhöhte Expression für NO und Prostacyclin beobachtet (Baker et al, 1995; Davidge et al, 1995). Somit scheint nicht die Produktion dieser Faktoren bei Präeklampsie beeinträchtigt, sondern die Abschwächung ihrer Wirkung von Bedeutung zu sein. Ein solcher funktioneller Antagonismus könnte beispielsweise durch Komponenten des Endothelin-Systems verursacht werden. Unter physiologischen Bedingungen sind die sezernierten Mengen dieser Vasokonstriktoren so gering, dass sie zum systemischen Blutdruck kaum beitragen. Bei Präeklampsie aber werden

beispielsweise deutlich erhöhte Serumkonzentrationen für Endothelin-1 (ET-1) gemessen (Clark et al, 1992; Taylor et al, 1998).

Ausserdem besitzt ET-1 ausgeprägte vasokonstriktorische Potenz für das uterine und renale Gefäßbett, zwei Systeme, die bei Präeklampsie von Veränderungen betroffen sind.

Zytokine und Angiogenesefaktoren kommen ebenfalls für die Alteration der Gefäßreaktivität in Betracht. Für VEGF beispielsweise wurden bei Präeklampsie erhöhte Serumkonzentrationen beschrieben und seine Wirkungen auf das Endothel, wie morphologische Veränderungen, Stärkung gerinnungsfördernder Eigenschaften und Permeabilitätssteigerung würden durchaus in die Pathophysiologie der Erkrankung passen.

An isolierten Widerstandsgefäßen normotensiver Schwangerer konnte nach Behandlung mit dem Plasma von Präeklampsie-Patientinnen ebenfalls eine Änderung der Reaktivität mit empfindlicherem Ansprechen auf Zusatz von Angiotensin II und Einschränkung der anschließenden Relaxation auf Applikation von Bradykinin festgestellt werden (Ashworth et al, 1997, Abb.5). Die gleichen Ergebnisse wurden auch durch Zugabe des reinen VEGF<sub>165</sub> erzielt.



**Abb. 5: Relaxationsverhalten von Widerstandsgefäßen normotensiver Schwangerer nach Zusatz von VEGF.**

Die Gefäße wurden nach 12stündiger Inkubation mit VEGF der Konzentrationen 0,05-5 nM mit Angiotensin II zur Kontraktion gebracht. Nach dem anschließenden Zusatz von Bradykinin wurde die verbleibende Kontraktion gemessen. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle zeigten die mit VEGF-stimulierten Gefäße eingeschränkte Relaxationsfähigkeit, die Abhängigkeit von der VEGF-Konzentration aufwies. Bei 5 nM konnte praktisch kein Nachlassen der Kontraktion mehr festgestellt werden (Ashworth et al, 1997).

Diese Effekte waren reversibel, nachdem der Wachstumsfaktor durch wiederholtes Spülen mit Medium aus dem Versuchsansatz entfernt wurde, und durch Einsatz VEGF-spezifischer Antikörper komplett zu supprimieren (Brockelsby et al, 1999).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass VEGF für die veränderte Gefäßreaktivität bei Präeklampsie von entscheidender Bedeutung ist. Darüberhinaus zeigt sich VEGF auch für die Beeinflussung des Gefäßtonus durch andere Mediatoren verantwortlich. Die gesteigerte Expression des Enzyms, das die Konvertierung von *prä-pro-* zu *pro*-Endothelin bewirkt, ist ein VEGF-induzierter Effekt und kommt im Krankheitsbild der Präeklampsie zum Tragen.

Auch in der Synthese und Freisetzung von NO spielt VEGF eine Rolle: über seinen KDR-Rezeptor stimuliert VEGF die eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase)-Expression in Endothelzellen. Die NO-Sekretion aus Trophoblastzellen, entscheidend für die Beeinflussung von Thrombozytenaggregation, Endothelpermeabilität und Zellproliferation in der Plazenta, wird über den FLT-1-Rezeptor vermittelt (Kroll et al, 1999).

Unter physiologischen Bedingungen reguliert VEGF den Gefäßtonus anscheinend über eine Balance von Agonisten und Antagonisten der Vasokonstriktion. Bei Präeklampsie besteht dieses Gleichgewicht offensichtlich nicht mehr. Hier zeigt sich ein deutliches Überwiegen der gefäßverengenden Mediatoren.

### 1.2.3.3 Affektion des Gerinnungssystems

Präeklampsie ist auch durch erhöhte Gerinnungsneigung des mütterlichen Blutes gekennzeichnet, regelmäßig treten Mikrothrombosierungen in zahlreichen Organkreisläufen auf. Als schwerste Ausprägung kommt es mitunter zur disseminierten intravasalen Gerinnung. Die verstärkte Gerinnungsneigung wird zum einen durch die gesteigerte Expression prokoagulatorisch wirkender Proteine (Tissue-Faktor, von-Willebrand-Faktor, Platelet-activating-factor und  $\beta$ -Thrombomodulin) von seiten des Endothels bedingt, zum anderen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Antagonisten der Gerinnungskaskade (Antithrombin III, Protein S und C). Welche Bedeutung dieser Imbalance zukommt, wird bei der erblichen APC-Resistenz, der Faktor V- Leiden- Mutation deutlich. Die betroffenen Patientinnen haben eine gegenüber dem Normalkollektiv stark erhöhte Prävalenz für die Entwicklung einer schweren Präeklampsie mit früher Manifestation im Schwangerschaftsverlauf.



#### 1.2.3.4 Träger und Marker der gestörten maternalen Endothelfunktion

Die Tatsache, dass die Präeklampsie eine schwangerschaftsinduzierte Erkrankung ist, die mit der Entbindung sistiert, lässt die Plazenta als das Organ annehmen, das für Auslösung und Unterhaltung der Pathophysiologie von entscheidender Bedeutung ist. Die aus der plazentaren Minderdurchblutung resultierende Hypoxie führt vermutlich zur Sekretion der Mediatoren, die im mütterlichen Kreislauf die Endothelaktivierung verursachen.

Als Indikator für die Aktivierung des Endothels gelten erhöhte Serumkonzentrationen bestimmter Substanzen. Diese Marker geben aber nicht nur Auskunft über den endothelialen Aktivitätszustand, sondern sind selbst auch in der Lage, das Krankheitsgeschehen zu beeinflussen. Beispiele solcher Substanzen sind:

- von-Willebrand-Faktor

der gerinnungsfördernde Faktor ist Bestandteil der Hyperkoagulabilität bei Präeklampsie

- Endothelin

die Konzentrationszunahme ist Ausdruck der vermehrten vasokonstriktorisches Einflüsse auf das Endothel

- zirkulierende Adhäsionsmoleküle, z.B. VCAM

verstärkte Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle unterstützt die Rekrutierung peripherer Effektorzellen (Granulozyten, Lymphozyten)

- Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF

erhöhte Aktivität von Wachstumsfaktoren beeinflusst Endothelfunktionen wie Permeabilität und Chemotaxis

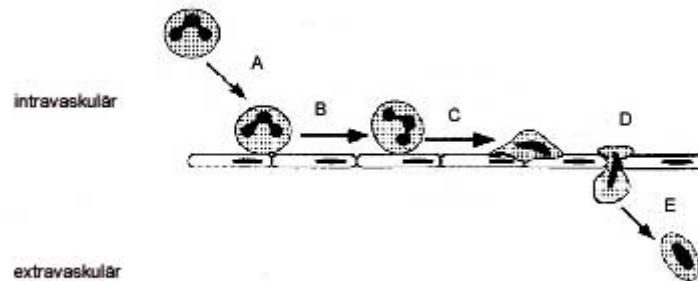
Diese Reaktionen sind auch Bestandteile der physiologischen Antwort des Endothels auf inflammatorische Reize. So lässt sich vermuten, dass bei Präeklampsie ebenfalls eine inadäquate Aktivierung und Unterhaltung des Entzündungsprozesses zum Tragen kommt. In diesem Zusammenhang ist dann auch die Rolle von Effektorzellen, vor allem die der neutrophilen Granulozyten interessant.

### 1.3 Neutrophile Granulozyten

#### 1.3.1 Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bei Entzündungsreaktionen

Während inflammatorischer Prozesse kommt es zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Dies schließt Bindung und Transmigration der Granulozyten durch das

Endothel mit ein und bedarf der Interaktion endothelialer Adhäsionsmoleküle mit Oberflächenrezeptoren der Neutrophilen (Abb.6).



#### **Abb.6: Interaktion zwischen Endothel und neutrophilen Granulozyten**

Die Interaktion vollzieht sich in den Schritten a) Anbindung b) Rolling c) Aktivierung und feste Adhäsion d) Migration durch das Endothel und e) Chemotaxis zum Ort der Degranulation (Clark et al, 1998).

Die Aktivierung und Migration vollzieht sich in mehreren Schritten (Tailor und Granger, Review, 2000):

- sog. „Rolling“:

Bevor es zur festen Bindung an das Endothel kommt und die Neutrophilen in das perivaskuläre Gewebe überwechseln, gleiten sie an der luminalen Oberfläche des Endothelzellverbandes entlang. Dieser Prozess wird über Selektine, eine Gruppe transmembranöser endothelialer Adhäsionsmoleküle vermittelt. Besondere Bedeutung haben hierbei Selektine vom Typ P und E. Sie werden nach Stimulation des Endothels durch eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren (Histamin, Tumornekrosefaktor $\alpha$ , Komplementfaktoren) zur Oberfläche transloziert, die dadurch adhäsive Eigenschaften erhält.

- Aktivierung/ Adhäsion:

Die Aktivierung der Neutrophilen setzt Bindung zwischen P- Selektinen und Sialyl-Lewis bzw. verwandten Kohlenwasserstoffkomplexen auf der Oberfläche der Granulozyten voraus. Es kommt zur vermehrten Expression der CD-Antigene 11b und 18, die zu den Intergrinen gehören und die Interaktion mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) des Endothels ermöglichen.

- Transendotheliale Migration:

Die Migration durch die Gefäßwand erfolgt entlang eines chemotaktischen Gradienten, der unterschiedlichen Ursprungs sein kann. Interleukin-8 und PECAM-1 (Plättchen-

Endotheliales- Adhäsionsmolekül-1) sind beispielsweise beteiligt. Für die Interleukin-8-Produktion scheint dabei eine direkte funktionelle Verknüpfung mit der Neutrophilen-Adhäsion vorzuliegen. Die Aggregation von CD 11b/ CD 18 zeigte sich als Induktionsfaktor der Zytokinsynthese (Abb.6).

- Degranulation:

Schließlich kommt es zur Freisetzung von Proteasen und reaktiver Sauerstoffspezies aus den neutrophilen Granula. Zerstörung vaskulärer Membranstrukturen, subendothelialer Matrix und Lyse von Endothelzellen sind die Folge. Dies unterhält weitere Aktivierungsprozesse des Endothels, die durch gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. VCAM-1, ICAM-1) gekennzeichnet sind und wiederum zur Interaktion mit peripheren Blutzellen führen.

### 1.3.2 Neutrophile als Effektorzellen bei Präeklampsie

Bereits in der normalen Schwangerschaft finden wir Neutrophilie und milde Aktivierung der Granulozyten. Bei der Präeklampsie sind beide Phänomene deutlich gesteigert. Die vermehrte Aktivierung der Neutrophilen zeigt sich in einem Anstieg des freien intrazellulären Calciums, einer Zunahme der induzierten Superoxidproduktion und im Nachweis höherer Serumkonzentrationen ihrer Degranulationsprodukte, z. B. Elastase (Tsukimori et al, 1993).

In der Pathogenese der Präeklampsie könnten neutrophile Granulozyten ein Verbindungsstück zwischen intervillösem Raum und mütterlichem Gefäßendothel repräsentieren und somit eine wichtige Rolle bei der Unterhaltung der gestörten endothelialen Funktionen spielen, die das Syndrom charakterisieren.

### 1.3.3 Mechanismen der Aktivierung bei Präeklampsie

Für die Granulozyten-Aktivierung bei Präeklampsie sind verschiedene Mechanismen denkbar:

- Reaktionen an der Kontaktfläche des mütterlichen Blutes mit der Plazenta durch lokal sezernierte Faktoren oder Gewebsfragmente,
- Beeinflussung durch Mediatoren im systemischen Kreislauf oder
- Interaktion mit dem aktivierten maternalen Endothel.

Wahrscheinlich handelt es sich aber um eine Kombination aller genannten Vorgänge.

### 1.3.3.1 Adhäsionsmoleküle

Die Aktivierung von Neutrophilen wird durch zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAMs) vermittelt. Für diese Moleküle wird bei Präeklampsie sowohl eine gesteigerte Expression auf der endothelialen Oberfläche beschrieben, als auch der Nachweis erhöhter Serumkonzentrationen der löslichen Formen.

Während ICAM-1 direkt Adhäsion und Aktivierung Neutrophiler bewirkt, ist diese Beeinflussung durch VCAM-1 nicht möglich, da die Granulozyten nur in sehr geringem Umfang den korrespondierenden Liganden präsentieren. Vielmehr fördert VCAM-1 über Rekrutierung von Lympho- und Monozyten die Entstehung von Gefäßveränderungen im Sinne einer akuten Atherosose und verleiht dem Endothel so adhäsive Eigenschaften gegenüber neutrophilen Granulozyten.

Die Ursache der Expressionszunahme der CAMs ist unklar. Man weiss aber, dass Zytokine und Wachstumsfaktoren an der Regulation beteiligt sind und dass auch diese Substanzen bei Präeklampsie vermehrt im Serum nachgewiesen werden können.

### 1.3.3.2 Endothelin

Endothelin, dessen Produktion durch aktivierte Thrombozyten induziert wird, wirkt nicht nur vasokonstriktorisch, sondern beeinflusst auch die Funktion der Granulozyten. Es fördert die Zellaggregation und -adhäsion am Endothel. Über die Stimulation der Interleukin-8-Sekretion durch Monozyten ist Endothelin auch ein wichtiger Faktor für die Transmigration der Granulozyten. Seine eigene Freisetzung kann Endothelin durch Unterdrückung der Neutrophilen-abhängigen Inaktivierung von Thrombozyten steigern, woraus eine sich selbstunterhaltende Verknüpfung humoral- und zellulärbedingter Endothelschädigung entsteht.

Auch andere lösliche Mediatoren kommen für die Aktivierung von Neutrophilen in Betracht, so z. B. Interleukin-6, das eine Beschleunigung der Rezeptor- vermittelten Superoxidproduktion bewirkt und die Interaktion mit dem Endothel durch Stimulation der E-Selektin-Expression verbessert, oder auch Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , der ebenfalls die CAM-Expression steigert und in der Lage ist, Neutrophile direkt zu aktivieren. Für diese Substanzen liegt allerdings kein Hinweis für eine erhöhten Serumkonzentration bei Präeklampsie im Vergleich zu normaler Schwangerschaft vor (Sabatier et al, 2000).