

Aus der Klinik für Geburtsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Plazentare Expression von sFlt-1 und PlGF bei Patientinnen mit
Präeklampsie und IUGR**

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Laura Ehrlich
aus Erfurt

Datum der Promotion: 23.06.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
1.1. Abstracts	3
1.1.1. Abstract Deutsch	3
1.1.2. Abstract Englisch	4
1.2. Einleitung.....	5
1.3. Methodik.....	6
1.3.1. Definitionen.....	6
1.3.2. Studienpopulation.....	6
1.3.3. Probensammlung.....	6
1.3.4. Analyse.....	7
1.3.5. Statistik.....	9
1.4. Ergebnisse.....	11
1.4.1. sFlt-1 und Flt-1 in maternalem Serum und Plazenta.....	11
1.4.2. PlGF in maternalem Serum und Plazenta	11
1.4.3. sFlt-1/PlGF in maternalem Serum und Plazenta	12
1.4.4. Referenzwerte der sFlt-1/PlGF-Werte bei gesunden Schwangeren	12
1.4.5. Ergebnisse der ROC Kurve, sowie Definition von Cut-Off-Werten	13
1.5. Diskussion	14
1.6. Literaturverzeichnis	18
2. Eidesstattliche Versicherung.....	22
3. Anteilserklärung.....	23
4. Publikationen	24
4.1. Publikation 1	24
4.2. Publikation 2.....	36
4.3. Publikation 3.....	47
5. Lebenslauf.....	53
6. Publikationsliste.....	54
7. Danksagung.....	55

1. Zusammenfassung

1.1. Abstracts

1.1.1. Abstract Deutsch

Die Messung von soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) und placental growth factor (PlGF) ist mittlerweile in der klinischen Praxis der Diagnose und Prognose von Präeklampsie (PE) und intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR) angekommen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von sFlt-1 und PlGF in Plazenten von Patientinnen mit PE und IUGR mit den Plazenten von gesunden Schwangeren zu vergleichen - zum einen bei früher Gestation bis zur 34. SSW, zum anderen bei später Gestation ab der 38. Schwangerschaftswoche (SSW). Zusätzlich wurde die diagnostische Genauigkeit des Kryptor® assays charakterisiert.

Methodik: Für die Studien wurden jeweils von 19 Schwangeren die Plazenten und Sera der jeweiligen Gestationsalter gesammelt und auf RNA-Ebene mittels Polymerase-Kettenreaktion, auf Proteinebene mittels Elecsys® assay und immunhistochemisch auf sFlt-1/Flt-1 und PlGF untersucht. Zudem wurden 235 Serumproben von Schwangeren im dritten Trimester mit und ohne PE mittels Kryptor® assay auf sFlt-1 und PlGF untersucht. Hier wurden Cut-Off-Werte ermittelt und die diagnostische Genauigkeit bestimmt.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass sich das intraplazentare PlGF sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bei früher und bei später plazentarer Dysfunktion nicht verändert. Allerdings zeigte sich bezüglich PlGF bei der späten Präeklampsie eine vermehrte trophoblastäre Färbung. Die mit dem Kryptor® assay gemessenen Werte im Längsreferenzbereich zeigten die gleichen sFlt-1- und PlGF-Konzentrationen, welche mit anderen Immunoassays gemessen wurden. Beim Vergleich des sFlt-1/PlGF-Quotienten zwischen gesunden Schwangeren und mit Präeklampsie vergesellschafteten Erkrankungen zeigt sich eine hohe diagnostische Genauigkeit.

Zusammenfassung: Verringerte maternale Serumkonzentrationen von PlGF lassen sich nicht auf verminderte plazentare Expression zurückführen und könnten aufgrund von erhöhten sFlt-1-Konzentrationen erniedrigt sein. Das gilt für die frühen, aber auch für die späten plazentaren Dysfunktionen. Die klinische Performance des Kryptor® assays lässt sich mit der etablierter Systeme vergleichen und stellt damit eine Alternative im klinischen Alltag dar.

1.1.2. Abstract Englisch

Measuring soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and placental growth factor (PlGF) is applied in clinical routine for detection and progress of placental dysfunctions like preeclampsia (PE) or intrauterine growth restriction (IUGR) in pregnant women.

The aim of this study was to compare the placental expression of sFlt-1 and PlGF in the maternal serum of patients with PE and IUGR with healthy pregnancies, considering the early gestational age before the 34th week of gestation and data from patients delivering after 38 weeks of gestation. Additionally, the diagnostic accuracy of the Kryptor® assay was assessed.

Methods: Samples of placentas and serums from nineteen patients of respective gestational age were analyzed using RT-qPCR (mRNA) and Elecsys® assay (protein) for expression of sFlt-1 and PlGF. Immunohistochemistry and immunofluorescence staining of the placental samples were performed to determine the expression and localization of sFlt-1 and PlGF (semiquantitative). In addition, 235 serum samples of pregnant women in the third trimester with and without PE were tested for sFlt-1 and PlGF using Kryptor® assay. Cut-off values and diagnostic accuracy were identified.

Results: It could be seen that the placental PlGF is not altered on both RNA and protein levels in early and late placental dysfunction. However, in the case of late preeclampsia, an increased PlGF staining of villous trophoblast was found. The results measured with the Kryptor® assay showed the same sFlt-1 and PlGF concentrations in the longitudinal reference range as other immunoassays. When comparing the sFlt-1/PlGF ratio between healthy pregnant women and preeclampsia, a high diagnostic accuracy has been observed.

Summary: Reduced maternal serum concentrations of PlGF cannot be attributed to decreased placental expression. The reduced PlGF serum concentration may therefore be attributed to the increased sFlt-1 concentration. This applies to the early- as well as to the late-onset placental dysfunctions. The clinical performance of the Kryptor® assay is comparable to established systems and thus presents an alternative in clinical practice.

1.2. Einleitung

In den Entwicklungsländern der Welt steigt die Müttersterblichkeit von 0,05% bei Frauen ohne Präeklampsie auf 0,43% bei Frauen mit Präeklampsie [1]. Auch in entwickelten Ländern sterben noch 0,69% der Neugeborenen aufgrund von spät aufgetretener Präeklampsie [2]. Damit hat diese Multisystemerkrankung nicht an Aktualität verloren. Die Präeklampsie ist ebenso wie die intrauterine Wachstumsretardierung eine mögliche Folge einer plazentaren Dysfunktion, deren Pathophysiologie bisher nicht geklärt werden konnte [3]. Jedoch spricht zunehmend mehr für eine Bedeutung von soluble fms-like kinase-1 (sFlt-1) und plazental growth factor (PlGF) bei der Entstehung dieser plazentaren Störungen [4] [5]. PlGF ist hierbei das plazentare Analog des vascular endothelial growth factor (VEGF) und hat angiogene und entzündungsfördernde Wirkungen [6]. Ein Produkt des Spleißens des VEGF-Rezeptors 1 (Flt-1) ist sFlt-1, ein Antagonist von VEGF und PlGF. Der lösliche Rezeptor sFlt-1 bindet zwar VEGF und PlGF, aber löst keine Signalkaskade aus [7]. Bei Patientinnen mit Präeklampsie treten erhöhte sFlt-1-Werte bei gleichzeitig verminderten PlGF-Werten im mütterlichen Serum auf [8]. Somit kann der sFlt-1/PlGF-Quotient bei Präeklampsie in der klinischen Praxis diagnostisch und prognostisch hilfreich sein [9]. Das Gleiche gilt für Patientinnen mit IUGR [10]. Der Effekt ist bei Patientinnen mit PE und IUGR [11] und bei Erkrankungen vor der 34. SSW [12] stärker ausgeprägt.

Durch zahlreiche Studien wurden Cut-off-Werte zur Diagnose und Prognose der Präeklampsie mit dem Immunoassay Elecsys® von Roche etabliert [13] [14] [15] und in den klinischen Alltag eingeführt [16].

Ziel der Studien von Höller *et al.* [17] und Ehrlich *et al.* [18] war es, den sFlt-1/PlGF-Quotienten im maternalen Serum und dem plazentaren Gewebe zwischen gesunden Schwangeren, Patientinnen mit PE und IUGR vor der 34. SSW [17] und nach der 38. SSW [18] zu vergleichen. Zudem sollte in einer dritten Studie von Dröge *et al.* [19] der Referenzbereich des Kryptor® Immunoassay bei gesunden Schwangeren ermittelt und Cut-off-Werte und ihre Genauigkeit zur Diagnose der PE berechnet werden.

1.3. Methodik

1.3.1. Definitionen

PE wird als neu aufgetretene Hypertonie und Proteinurie nach mindestens 20 Schwangerschaftswochen (SSW) definiert. Eine Hypertonie wurde festgestellt, wenn der Blutdruck mehr als zweimal innerhalb von drei Tagen über 140 mmHg systolisch und 90 mmHg diastolisch anstieg. Die Proteinurie definierte eine erhöhte Proteinausscheidung von über 300 mg innerhalb eines Tages oder ein U-Stix mit 2 + oder höher. Ein chronischer Hypertonus mit neu aufgetretener Proteinurie wurde als Pfropf-PE definiert.

Das HELLP-Syndrom ist eine Kombination aus erhöhten Transaminasen (mehr als zweifache Erhöhung der Referenzwerte), reduzierter Thrombozytenzahl ($<100000/\mu\text{l}$) und Hämolysezeichen (Laktatdehydrogenase mehr als verdoppelter Referenzbereich), Erhöhung des indirekten Bilirubins ($>1,2\text{ mg/l}$) oder verminderte Haptoglobinkonzentration ($<0,3\text{ l}$).

IUGR, oder auch fetal growth restriction (FGR), wurde als ein erwartetes Geburtsgewicht unter der 5. Perzentile mit einem neu aufgetretenen Oligohydramnion (Fruchtwasser-Index unter der 10. Perzentile) oder einem Pulsatilitätsindex in der *Arteria umbilicalis* über der 95. Perzentile definiert.

Die Kontrollgruppen bildeten Patienten, welche nicht unter PE oder IUGR litten.

1.3.2. Studienpopulation

Für die Studien von Höller *et al.* [17] und Ehrlich *et al.* [18] wurden sechs bzw. sieben Plazenten von Patientinnen mit PE, sieben bzw. sechs mit IUGR und sechs bzw. sieben von Patientinnen ohne placentare Dysfunktion mit einem Schwangerschaftsalter vor der 34. SSW [17] und nach der 38. SSW [18] gesammelt. Die Proben wurden zwischen März 2013 und Oktober 2014 in der Klinik für Geburtsmedizin des Virchow Klinikums der Charité Universitätsmedizin Berlin erhoben. Die Studie von Dröge *et al.* [19] verwendete zusätzlich Proben, welche von September 2007 bis Juni 2010 gesammelt wurden. In dieser Studie [19] wurden 235 Serumproben ausgewertet: 169 von gesunden Schwangeren im ersten Studienarm und in einem zweiten Studienarm 46 Patientinnen mit placentarer Dysfunktion und 33 Patientinnen mit isolierter Präeklampsie im Vergleich mit 167 bzw. 132 gesunden Schwangeren mit entsprechendem Schwangerschaftsalter.

1.3.3. Probensammlung

Die Ethikkommission genehmigte die Studien und jede Patientin unterzeichnete nach ausführlicher Aufklärung eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. In allen

Studien wurde den Patientinnen beim Erstkontakt, sowie peripartum, peripher venöses Blut entnommen.

Für die Studien von Höller *et al.* [17] und Ehrlich *et al.* [18] wurde zudem innerhalb von 30 min postpartum plazentares Gewebe gesammelt, sowie, wenn möglich, venöses Nabelschnurblut entnommen. Die Plazenta wurde mit der schmalsten Stelle zwischen Chorda umbilicalis und plazentarem Rand nach oben als geachtelter Kreis betrachtet. Fortlaufend von Sammlung zu Sammlung wurden das jeweils folgende Achtel der Plazenta ausgewählt und aus diesem peripher, mittig und zentral, sowie periumbilical (falls dies nicht mit einem anderen Ort zusammenfiel) je eine größere Probe (ca. 3 cm³) für die immunohistochemische Analyse gesammelt und in Formalin fixiert. Zudem wurden acht kleinere Proben (ca. 0,5 cm³) pro Entnahmeort sofort in flüssigem Stickstoff für die weitere Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) schockgefrostet.

1.3.4. Analyse

Ein Teil des maternalen venösen Blutes und der venösen Nabelschnurblutproben wurden sofort auf sFlt-1 und PlGF mittels der ELISAs Elecsys®sFlt-1 und Elecsys®PlGF (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) untersucht [17] [18]. Weitere 10 ml wurden mit 3500 x g für 10 min zentrifugiert und das Plasma bei -80°C tiefgekühlt, um später mittels der Kryptor® Immunoassays (Thermo Fisher Scientific, Henningsdorf, Deutschland) auf sFlt-1 und PlGF untersucht zu werden [19].

Für die Studien von Höller *et al.* [17] und Ehrlich *et al.* [18] wurde von einer zufälligen Probe pro Entnahmeort (3-4 pro Plazenta) die vollständige RNA mittels Qiagen RNeasy mini kit und RNaseFree DNase set (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Mit Hilfe des NanoDrop UV/VIS-Spectrometer (PeqLab, Erlangen, Deutschland) wurde die RNA-Menge quantifiziert und anschließend wurden 10 bis 20 µg in cDNA mittels des HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) transkribiert. Durch Verdünnung wurde eine Konzentration von 10 ng/µl erreicht. Die cDNA wurde zweifach mit Hilfe des Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR-System analysiert und 18S ribosomale RNA als endogene Kontrolle genutzt. Die Primer wurden mit PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems) designt.

Für die Untersuchungen mittels ELISA wurden 0,1 bis 0,35 g einer zufälligen Probe pro Plazenta in 500 µl Lysepuffer lysiert, mittels Precelly 24 (PeqLab) homogenisiert und bei 4°C und 12000 x g für 11 min zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit der Proteinquantifikation nach Bradford ermittelt und auf 1µg/µl Protein verdünnt. Anschließend

wurde die Konzentration von sFlt-1 und PlGF in der Proteinlösung mittels der ELISA Elecsys® gemessen.

Für die immunohistochemische Analyse wurden aus den in Paraffin eingebetteten Proben 4 µm Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgebracht, entwachst und rehydriert. Es folgte das Erhitzen in Citratpuffer (pH 6) bei 120°C für 7 min zur Antigendemaskierung und der Transfer in 10% Tris gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween 20 (TBS/T, Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Immunohistochemie wurde mit Hilfe des Lab Vision Autostainer™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Endogene Peroxidasen wurden mit dem hydrogen peroxidase block (UltraVision, Thermo Scientific) für 10 min geblockt. Nach einem weiteren Waschgang mit TBS/T und Proteinblock (Ultra Vision) für 10 min wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper gegen den C-Terminus von Flt-1 (0.33 µg/ml, rabbit poly-clonal anti-human, Acris Antibodies, Herford, Deutschland) oder PlGF (2.47 µg/ml, rabbit poly-clonal anti-human, proteintech, Manchester, Großbritannien), welche in Antibody Diluent (Dako, Carpinteria, CA, USA) verdünnt wurden, für 45 min bei 20°C inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS/T wurde das UltraVision detection system horse radish peroxidase polymer kit benutzt. Die Visualisierung der positiven Immunreaktion wurde durch Inkubation mit AEC chromogen single solution für 10 min erreicht. Anschließend folgte die Gegenfärbung der Schnitte mit Hamalaun und die Übertragung auf Kaisers Glycerin Gelatine. Die primären Antikörper wurden in negativen Kontrollen durch rabbit IgG negative control antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ersetzt. Von den verblindeten Proben wurden systematisch und zufällig 20 Bilder mittels des Leica DM 6000B microscope (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) mit der Olympus DP 72 Kamera (Olympus Scientific Solutions, Waltham, MA, USA) und der Visiomorph software (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) aufgenommen. Je Probe wurde die Intensität der Färbung des villösen Trophoblasten auf acht Bildern mittels eines Punktgitters mit 16 mal 12 Punkten ermittelt. Jeder Punkt wurde einer der folgenden Kategorien zugeordnet: stark gefärbter villöser Trophoblast (+++), moderat gefärbter villöser Trophoblast (++), schwach gefärbter villöser Trophoblast (+), nicht gefärbter villöser Trophoblast (-), Stroma oder intervillöser Raum. Für jedes Bild wurde eine Semiquantifikation durchgeführt. Die verschiedenen Intensitäten der trophoblastären Färbung wurden berechnet durch die Multiplikation der Anzahl der Punkte, welche in die jeweilige Kategorie fielen, mit dem Quotienten aller trophoblastären Punkte im Bild durch die Anzahl der Punkte im Bild (192).

$$vTr^{+++} = n(vTr^{+++}) \times \frac{n(vTr^{+++} + vTr^{++} + vTr^{+} + vTr^{-})}{192}$$

$$vTr^{++} = n(vTr^{++}) \times \frac{n(vTr^{+++} + vTr^{++} + vTr^{+} + vTr^{-})}{192}$$

$$vTr^{+} = n(vTr^{+}) \times \frac{n(vTr^{+++} + vTr^{++} + vTr^{+} + vTr^{-})}{192}$$

$$vTr^{-} = n(vTr^{-}) \times \frac{n(vTr^{+++} + vTr^{++} + vTr^{+} + vTr^{-})}{192}$$

Die Demaskierung der Antikörper erfolgt wie zuvor beschrieben. Zum Waschen und zur Verdünnung wurde 10% Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (PBS/T) verwendet. Nach Blockung der Proteine mit Proteinblock (UltraVision) für 5 min, wurden die Schnitte für 45 min bei 20°C mit den Primärantikörpern gegen Flt-1 (6.6 µg/ml) oder PlGF (2.47 µg/ml) in Kombination mit CD34 (0.23 µg/ml, monoclonal mouse anti-human, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) zur Färbung von Endothelien, CD163 (20 µg/ml, monoclonal mouse anti-human, Thermo Scientific) zur Identifikation von Hofbauerzellen oder Zytokeratin 7 (CK7) (1 µg/ml, monoclonal mouse anti-human, Thermo Scientific) zur Visualisierung der Trophoblasten inkubiert. Anschließend folgte eine weitere Inkubation der Schnitte für 30 min mit den fluoreszierenden Sekundärantikörpern goat anti-mouse (10 µg/ml, Alexa Fluor 555 conjugate, Thermo Scientific) und goat anti-rabbit (10 µg/ml, Alexa Fluor 488 conjugate, Thermo Scientific). Die Zellkerne wurden mit DAPI (2.5 µl/ml, Invitrogen, Thermo Scientific) für 7 min gefärbt. Nach wiederholten Waschungen wurden die Schnitte für 20 min bei 20°C in einer Dunkelkammer getrocknet und in ProLongGold Antifade Mountant (Lifetechnologies, Thermo Scientific) übertragen. Die Schnitte wurden für 24 h bei 20°C und hiernach zur Langzeitaufbewahrung bei 4°C gelagert.

1.3.5. Statistik

Die Daten aller Studien wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung untersucht. Die dargestellten Daten zeigen den Mean ± SD bei stetigen Daten sowie die Frequenzen und Prozentsätze bei kategorialen Daten.

Die Statistik der Studien von Höller *et al.* [17] und Ehrlich *et al.* [18] wurde mittels GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) analysiert. Hier wurden normalverteilte Daten mit dem One-Way-ANOVA und Turkey- oder Dunetts-Posttest getestet. Alternativ wurde der Dunn's Test angewandt.

In der Studie von Dröge *et al.* [19] wurde die Statistik mittels Statistical Package for Social Sciences 22 (SPSS) durchgeführt. Zusätzlich wurden hier der Median und die Interquartilen (IQ) der Serenspiegel von sFlt-1, PlGF und dem sFlt-1/PlGF-Quotienten dargestellt. Im longitudinalen Arm wurden die sFlt-1/PlGF-Level von gesunden Schwangeren in Perzentilen (5./10./50./90./95.) dargestellt. Im zweiten Arm der Studie wurden Schwangere mit PE mit gesunden Schwangeren gepaart. Für jede Patientin des longitudinalen Arms wurde nur die letzte Probe der Schwangerschaft zum Vergleich genutzt. Die Anzahl der Patientinnen in den Gruppen variiert zwischen den Analysen, da die Gestationsalter unterschiedlich sind.

In dieser Studie wurde bei nicht normalverteilten, kategorialen Daten in beiden Analysen mit dem exakten Fisher-Test analysiert. Kontinuierliche Daten wurden mit dem Mann-Whitney-Test getestet. Um den Cut-Off-Wert für den sFlt-1/PlGF-Quotienten für PE und mit PE korrelierende Erkrankungen verglichen mit gesunden Schwangeren zu berechnen, wurde eine Receiver Operating Curve (ROC) erstellt und die Area under the curve (AUC) ermittelt. Der Schnittpunkt der maximalen Sensitivität und Spezifität wurde als Cut-Off-Wert definiert. Zudem wurden die positive und negative Wahrscheinlichkeit bestimmt. Die P-Werte aller Tests waren zweiseitig und $p \leq 0.005$ wurde als statistische Signifikanz interpretiert. Die Konfidenzintervalle wurden auf 95% festgelegt.

1.4. Ergebnisse

1.4.1. sFlt-1 und Flt-1 in maternalem Serum und Plazenta

Im maternalen Serum wurde ein signifikanter Anstieg der sFlt-1-Konzentrationen bei Patientinnen mit Präeklampsie verglichen mit denen gesunder Kontroll-Gruppen in allen 3 Studien festgestellt [17] [18] [19]. Ehrlich *et al.* stellten dies bei Patientinnen mit spät einsetzender Präeklampsie (Grafik 1A aus [18]) im Vergleich zu IUGR und gesunden Schwangeren des gleichen Gestationsalters fest.

Auf RNA-Ebene konnte derselbe Effekt im Vergleich zwischen Patientinnen mit späteinsetzender Präeklampsie mit Patientinnen mit später IUGR und gesunden Schwangeren nachgewiesen werden (Grafik 1B aus [18]). Die sFlt-1-RNA-Konzentration früher Präeklampsien war hingegen nur im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht [17].

Bei späteinsetzenden plazentaren Dysfunktionen konnte keine Signifikanz hinsichtlich der Proteinkonzentration von sFlt-1 ermittelt werden, auch wenn die Proteinkonzentrationen von sFlt-1 und Flt-1 bei präeklampsischen Plazenten mehr als zweifach erhöht waren (Grafik 1C aus [18]). Vergleicht man die Proteinkonzentration von sFlt-1 bei früh einsetzender IUGR mit der Kontrollgruppe, so lässt sich eine signifikante Erhöhung detektieren [17].

In der plazentaren Färbung zeigte eine unregelmäßige Verteilung des Flt-1 im villösen Trophoblasten der Plazenten aller Gruppen. Während sich in kleinen fetalen Blutgefäßen kein Flt-1 fand, zeigte sich in einigen größeren fetalen Gefäßen eine Kolokalisation. Bei Hofbauerzellen hingegen konnte keine Kolokalisation nachgewiesen werden. Es gab einige uncharakterisierte Stromazellen, welche Flt-1 exprimierten (Grafik 2 aus [18]).

In der semiquantitativen Auswertung der plazentaren Färbung mit dem Flt-1-Antikörper zeigten sich eine gleichmäßige Färbung in allen Gruppen der späten Kohorten ohne signifikante Unterschiede in der Intensität (Grafik 3 aus [18]). Die frühe Kohorte von Höller *et al.* zeigte dieselben Ergebnisse [17].

1.4.2. PlGF in maternalem Serum und Plazenta

Die Konzentration von PlGF im maternalen Serum war in der späten Kohorte (Grafik 4A aus [18]) in den Kontrollgruppen signifikant im Vergleich mit den präeklampsischen Plazenten erhöht. Dies konnten auch Höller *et al.* [17] und Dröge *et al.* [19] in ihrer Studie nachweisen. Bei früh

einsetzender plazentarer Dysfunktion zeigte sich zusätzlich auch im Vergleich der Kontrollgruppe mit der IUGR-Gruppe eine signifikante Erhöhung.

Betrachtet man hingegen die plazentaren RNA- und Protein-Konzentrationen von PlGF, so lassen sich in der späten Kohorte (Grafik 4B und C aus [18]) keine Unterschiede zwischen Kontroll-, PE- und IUGR-Gruppe feststellen. Diesen Effekt zeigten auch Höller *et al.* in der frühen Kohorte [17]. Eine Kolokalisation zwischen Hofbauerzellen und PlGF konnte ausgeschlossen werden. Hingegen ließ sich vereinzelt PlGF in Endothelzellen nachweisen. Die Lokalisation von PlGF in den Plazenten zeigte eine schwache Kolokalisation zwischen PlGF und Trophoblastzellen. Diese war in der PE- und IUGR-Gruppe stärker ausgeprägt, als in der Kontrollgruppe (Grafik 5 aus [18]). Ähnliche Ergebnisse zeigten Höller *et al.* in der frühen Kohorte. Einzig zeigte sich dort kein PlGF in den Endothelzellen [17].

Dieser Effekt ließ sich auch in der semiquantitativen Analyse der Färbungen nachweisen (Grafik 6 aus [18]). Hier war die Intensität der Färbung mit PlGF in der PE-Gruppe signifikant zur Intensität der PlGF-Färbung in der Kontrollgruppe erhöht (Grafik 6D aus [18]). Dieser Effekt zeigte sich auch in der frühen Kohorte, hier allerdings ohne Signifikanz.

1.4.3. sFlt-1/PlGF in maternalem Serum und Plazenta

Die errechneten sFlt-1/PlGF-Quotienten zeigten eine signifikante Steigerung des Quotienten bei Frauen mit PE im Vergleich zu gesunden Schwangeren. In der frühen Kohorte lässt sich dies zusätzlich auch zwischen Frauen mit IUGR und gesunden Schwangeren beschreiben [17].

Auch Dröge *et al.* [19] zeigten in beiden Studienarmen eine signifikante Erhöhung des sFlt-1/PlGF-Quotienten sowohl in der PE-Gruppe als auch in der Gruppe mit plazentaren Dysfunktionen zu den jeweiligen Kontroll-Gruppen.

Auch auf plazentarer RNA-Ebene war der sFlt-1/PlGF-Quotient in beiden PE-Gruppen signifikant zu den Kontroll-Gruppen erhöht. In der späten Kohorte hat zudem die PE-Gruppe auch einen signifikant erhöhten sFlt-1/PlGF-Quotienten im Vergleich zur IUGR-Gruppe (Grafik 7B aus [18]). Betrachtet man die Proteinkonzentration des sFlt-1/PlGF-Quotienten zeigte sie ähnliche Tendenzen in beiden Studien, allerdings ohne Signifikanz (Grafik 7C aus [18]).

1.4.4. Referenzwerte der sFlt-1/PlGF-Werte bei gesunden Schwangeren

Die maternalen sFlt-1-Werte waren relativ stabil bis zur 33. Schwangerschaftswoche (50. Perzentile zwischen 1028 und 1501) und stiegen dann an (50. Perzentile bis 3255 nach der 37. SSW). PlGF hingegen sank nach anfänglichem Anstieg im mütterlichen Serum ab der 29. SSW wieder ab, woraus sich ein Anstieg des sFlt-1/PlGF-Quotienten ab der 29.-33. SSW ergab. Daraus

folgend stieg der Median des sFlt-1/PIGF-Quotienten von 4,6 ab der 20.SSW auf 33,5 nach der 37. SSW bei gesunden Schwangeren (Tabelle 1 aus [19]).

1.4.5. Ergebnisse der ROC Kurve, sowie Definition von Cut-Off-Werten

Dröge *et al.* [19] erstellten eine ROC-Kurve zur Bestimmung von Cut-off-Werten für die Diagnose der PE beziehungsweise für mit PE verwandten Krankheiten. Diese ROC-Analyse ergab eine AUC von 0,917 bei der Analyse des sFlt-1/PIGF Quotienten zwischen Kontrollen und PE verwandten Krankheiten. Vergleich man die Werte der Kontrollpatientinnen mit nur an PE erkrankten Patientinnen, so erhielt man eine AUC von 0,919.

Daraus wurde der optimale Cut-Off-Wert der Messung mit dem Kryptor® assay für beide Gruppen ermittelt. Er beträgt in beiden Gruppen 103 und weist eine Spezifität von 93,41% und eine Sensitivität von 84,78% bei den PE verwandten Erkrankungen auf. Bei der reinen PE hingegen beträgt die Spezifität 91,67% und die Sensitivität 87,88% (Tabelle 3 aus [19]).

1.5. Diskussion

Ziel der Studien von Höller *et al.* [17] und Ehrlich *et al.* [18] war der Vergleich der maternalen und plazentaren Konzentrationen von sFlt-1 und PlGF zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen der plazentaren Dysfunktion, zum einen bei Patientinnen mit Präeklampsie und zum anderen bei Patientinnen mit IUGR, mit einer Kontrollgruppe. Während sich die Studie von Höller *et al.* [17] mit Patientinnen mit Entbindungszeitpunkt unter 34. SSW beschäftigte, ermittelte die Studie von Ehrlich *et al.* [18] diese Werte bei Patientinnen, die nach der 38. SSW entbunden haben.

In diesen beiden Studien wurden die sFlt-1- und PlGF-Messungen mittels dem Elecsys® assay durchgeführt. Ziel der Studie von Dröge *et al.* [19] war es Referenzwerte für einen anderen Assay, den Immunoassay Kryptor®, zu ermitteln und damit eine weitere Möglichkeit der Diagnostik zur Verfügung zu stellen.

Zahlreiche Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen zeigen die diagnostische oder prognostische Bedeutung der Messung des sFlt-1/PlGF-Quotienten im maternalen Serum für Präeklampsie ([8] [12] [20] [21] [22]). Auch die Studien von Höller *et al.* [17] und Ehrlich *et al.* [18] konnten nachweisen, dass der sFlt-1/PlGF-Quotient im maternalen Serum bei Präeklampsie sowohl vor der 34. SSW als auch nach der 38. SSW signifikant erhöht ist. Die Studie von Dröge *et al.* [19] hingegen hat den Verlauf von sFlt-1 und PlGF ab der 20. SSW sowohl bei gesunden Schwangeren als auch bei Patientinnen mit Präeklampsie mit Hilfe des Kryptor® assays ermittelt.

Es zeigten sich bei gesunden Schwangeren steigende Konzentrationen von sFlt-1 und sFlt-1/PlGF und fallende Konzentrationen von PlGF im Verlauf der Schwangerschaft, wie bereits in der Literatur beschrieben [23]. Die medianen Konzentrationen der mittels Kryptor® assay ermittelten Faktoren sind denen der Studien von Salahuddin *et al.* [24] und Andersen *et al.* [25] ähnlich. Diese Studiengruppen betrachteten auch sFlt-1- und PlGF-Werte von an PE erkrankten Frauen. Ein Vergleich gestaltet sich schwieriger, da die von Dröge *et al.* ermittelten sFlt-1- und PlGF-Werte sich zwar mit denen von Salahuddin *et al.* vor der 34. SSW decken, allerdings der sFlt-1/PlGF-Quotient nach der 34. SSW von an PE erkrankten Frauen hier kleiner ist. Eine mögliche Ursache ist die unterschiedliche Zusammensetzung der Fallgruppen: Salahuddin *et al.* schloss nicht nur PE erkrankte Schwangere, sondern auch solche mit anderen hypertensiven Erkrankungen der Schwangerschaft ein. Allerdings unterscheiden sich die ermittelten medianen Werte von sFlt-1 und PlGF von Frauen mit Präeklampsie auch von denen, welche in unserer Arbeitsgruppe mit dem Elecsys® assay gemessen wurden [12]. Dies zeigt, dass die bekannten Cut-off-Werte von 85 bzw. die verschiedenen Cut-off-Bereiche von 33-85 bei früh einsetzender PE

und 33-110 bei spät einsetzender PE des Elecsys® assays [14], nicht einfach auf den Kryptor® assay übernommen werden können. Daher folgte die Bestimmung eines Cut-off-Wertes für den Kryptor® assay und eine Einschätzung der Genauigkeit. Unsere AUC beträgt 0,919, was für eine Genauigkeit spricht, die mit der des Elecsys® assays zu vergleichen ist. Auch die Sensitivität und Spezifität sind der einer Messung mit dem Elecsys® assay ähnlich. Beim von Dröge *et al.* ermittelten Cut-off von 103 für den Kryptor® assay, beträgt die Sensitivität 88% und die Spezifität 92%. Dies ist vergleichbar mit der Sensitivität von 75,9% und einer Spezifität von 95,5%, welche der Elecsys® assay bei einem Cut-off von 85 hat. Einen direkten Vergleich des Kryptor® und Elecsys® assays führten Van Helden *et al.* durch. Sie publizierten einen Cut-off von 99 des Kryptor® assays mit einer Sensitivität 92% von und einer Spezifität von 100% [26]. In Zusammenschau der Ergebnisse von Dröge *et al.* und der Literatur kann kein qualitativer Unterschiede zwischen den beiden Tests bei der Detektion von sFlt-1 und PlGF im Serum zur Diagnostik von PE oder ähnlichen Erkrankungen festgestellt werden.

Auf placentarer Ebene konnten erhöhte mRNA-Konzentrationen von sFlt-1 in Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen sowohl vor der 34. SSW [17] als auch nach der 38. SSW [18] nachgewiesen werden. Dies entspricht der Studienlage [4] [27] [28] [29]. Während Ehrlich *et al.* zeigten, dass bei den später gebärenden Präeklampsie-Patientinnen die sFlt-1-Konzentration auch in Vergleich zu Patientinnen mit IUGR signifikant erhöht ist [18], konnten Höller *et al.* diesen Effekt vor der 34. SSW nicht nachweisen [17]. Tsatsaris *et al.* zeigt ähnliche Ergebnisse. Allerdings wies diese Studie auch eine signifikante Erhöhung der placentaren sFlt-1-mRNA-Konzentration bei Patientinnen mit IUGR im Vergleich zur Kontrollgruppe auf [28].

Shibata *et al.* wies eine signifikante Erhöhung der sFlt-1-Proteinkonzentration bei IUGR-Plazenten im Vergleich zu Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen nach [27]. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Kohorte von Höller *et al.*. Die sFlt-1-Proteinkonzentration bei IUGR-Patientinnen war vor der 34. SSW im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht [17]. Hingegen war bei Plazenten, die nach der 38. SSW geboren wurden, nur eine leichte Erhöhung der sFlt-1-Proteinkonzentration im Vergleich zur Kontroll- und IUGR-Gruppe zu sehen [18]. Rolfo *et al.* [30] und Shibata *et al.* [27] konnten dies signifikant nachweisen.

Der Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse gestaltet sich schwieriger. Es gibt bisher keinen Standard zur semiquantitativen Auswertung immunhistochemischer Bilder. Die Flt-1-Expression war sowohl innerhalb einer Plazenta, als auch zwischen den Plazenten durchgehend inhomogen. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei vor der 34. SSW geborenen [17], als auch bei Plazenten von Patientinnen, die nach der 38. SSW entbunden haben [18], in jeweils allen 3 Gruppen. Innerhalb der jeweiligen Studie konnte zwischen den Gruppen keine Unterschiede

detektiert werden. Andere Studien wiesen eine verstärkte Flt-1-Färbung der präeklampsischen Plazenten nach [31] [32] [33]. Allerdings spezifizierten Gu *et al.* und Rajakumar *et al.* nicht das Gestationsalter ihrer Plazenten und zusätzlich wies Rajakumar *et al.*, im Gegensatz zu den hier vorgestellten Studien, neben Flt-1 auch sFlt-1 nach. Die Studiengruppe analysierte zudem auch die Syncialknoten, während sich unsere Arbeitsgruppe auf den villösen Trophoblasten beschränkte [32]. Auch Helske *et al.* analysierten die Flt-1-Expression in der kompletten Plazenta und verglichen zudem Plazenten von Patientinnen mit früh einsetzender Präeklampsie mit gesunden Plazenten nach der 38. SSW [33].

Als zweiter Faktor wurde PIGF in der Plazenta untersucht. Sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene wurde festgestellt, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von PIGF zwischen den drei Vergleichsgruppen vor der 34. SSW [17] wie auch nach der 38. SSW [18] gibt. In der Literatur finden sich viele verschiedene Ergebnisse zur Expression von PIGF in der Plazenta. Tsatsaris *et al.* [28] und Bersinger *et al.* [34] stützen auf mRNA-Ebene die Ergebnisse der Studien und zeigen keine Unterschiede zwischen Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie-, IUGR- oder Kontrollplazenten. Andraweera *et al.* [35] hingegen beschrieb eine verminderte plazentare PIGF-mRNA-Expression bei präeklampsischen Plazenten.

Während Bersinger *et al.* [34] auch auf Proteinebene keine signifikanten Veränderungen in der PIGF-Konzentration von Präeklampsie-Patientinnen sehen, beschrieben Shibata *et al.* [27] und Weed *et al.* [36] eine erniedrigte PIGF-Proteinkonzentration in diesen Plazenten.

In gesunden Plazenten befindet sich das PIGF vor allem im Stroma, wie in den Studien von Ehrlich *et al.* [18] und Höller *et al.* [17] beschrieben. Insbesondere bei Plazenten, die nach der 38. SSW geboren wurden und von präeklampsischen Patientinnen stammen, konnte eine höhere Expression von PIGF im villösen Trophoblasten im Vergleich zu Kontrollplazenten gleichen Gestationsalters nachgewiesen werden. Die Tendenz ist aber auch bei vor der 34. SSW geborenen präeklampsischen Plazenten, sowie bei Plazenten von IUGR-Patientinnen zu sehen. Diese Ergebnisse widersprechen sich mit denen von Gu *et al.* [31], welche publizierten, dass PIGF in präeklampsischen Plazenten vermindert exprimiert wird. Allerdings beobachtete die Studiengruppe ihre immunohistochemischen Ergebnisse nur qualitativ und nicht semi-quantitativ. Zusammengefasst wurde eine Zunahme der maternalen Serum sFlt-1-Konzentration bei gleichzeitiger Zunahme der plazentaren sFlt-1-RNA-Konzentration bei Schwangeren mit Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren festgestellt. Hingegen wichen die Werte bei Patientinnen mit IUGR kaum von denen der Kontrollgruppe ab.

Betrachtet man die plazentaren PIGF-RNA- und Protein-Konzentrationen von Patientinnen mit plazentarer Dysfunktion, so unterscheiden sie sich nicht von denen gesunder Schwangerer.

Dennoch kam es, besonders bei präeklampsischen Plazenten, die nach der 38. SSW geboren wurden, zu einer intensiveren PIGF-Färbung in villösen Trophoblasten. Und das obwohl sich im maternalen Serum bei Frauen mit plazerarer Dysfunktion weniger PIGF befindet.

Daraus folgt, dass die bei plazerarer Dysfunktion verringerten maternalen Serumkonzentrationen von PIGF nicht auf verminderte plazerare Expression zurückgeführt werden können. Möglicherweise liegt der Erniedrigung der PIGF-Konzentration im Serum also eine erhöhte sFlt-1-Konzentrationen in Serum zu Grunde.

Zudem konnten Dröge *et al.* zeigen, dass die Genauigkeit und des Kryptor® assays sich mit der des etablierten Elecsys® assays vergleichen lässt. Durch Ermittlung eines testspezifischen Cut-off-Wertes lässt sich der Kryptor® assay gleichwertig im klinischen Alltag einsetzen.

1.6. Literaturverzeichnis

- [1] E. Abalos, C. Cuesta, G. Carroli, Z. Qureshi, M. Widmer, J. P. Vogel, J. P. Souza, W. H. O. M. S. o. M. und N. H. R. Network, „Pre-eclampsia, eclampsia and adverse maternal and perinatal outcomes: a secondary analysis of the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health.,“ *BJOG*, Bd. 121 Suppl 1, pp. 14-24, Mar 2014.
- [2] S. Lisonkova und K. S. Joseph, „Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease.,“ *Am J Obstet Gynecol*, Bd. 209, pp. 544.e1--544.e12, Dec 2013.
- [3] J. L. James, G. S. Whitley und J. E. Cartwright, „Pre-eclampsia: fitting together the placental, immune and cardiovascular pieces.,“ *J Pathol*, Bd. 221, pp. 363-378, Aug 2010.
- [4] S. E. Maynard, J.-Y. Min, J. Merchan, K.-H. Lim, J. Li, S. Mondal, T. A. Libermann, J. P. Morgan, F. W. Sellke, I. E. Stillman, F. H. Epstein, V. P. Sukhatme und S. A. Karumanchi, „Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia.,“ *J Clin Invest*, Bd. 111, pp. 649-658, Mar 2003.
- [5] S. Rana, C. E. Powe, S. Salahuddin, S. Verlohren, F. H. Perschel, R. J. Levine, K.-H. Lim, J. B. Wenger, R. Thadhani und S. A. Karumanchi, „Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia.,“ *Circulation*, Bd. 125, pp. 911-919, Feb 2012.
- [6] N. Vrachnis, E. Kalampokas, S. Sifakis, N. Vitoratos, T. Kalampokas, D. Botsis und Z. Iliodromiti, „Placental growth factor (PlGF): a key to optimizing fetal growth.,“ *J Matern Fetal Neonatal Med*, Bd. 26, pp. 995-1002, Jul 2013.
- [7] N. Ferrara, H.-P. Gerber und J. LeCouter, „The biology of VEGF and its receptors.,“ *Nat Med*, Bd. 9, pp. 669-676, Jun 2003.
- [8] S. Verlohren, H. Stepan und R. Dechend, „Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia.,“ *Clin Sci (Lond)*, Bd. 122, pp. 43-52, Jan 2012.
- [9] H. Stepan, W. Schaarschmidt, A. Jank, S. Verlohren und J. Kratzsch, „Angiogene Faktoren zur Diagnosesicherung bei Praeeklampsie in der klinischen Routine: erste Erfahrungen.,“ *Z Geburtsh Neonatol*, Bd. 214, pp. 234-238, 2010.
- [10] I. Herraiz, L. A. Dröge, E. Gómez-Montes, W. Henrich, A. Galindo und S. Verlohren, „Characterization of the soluble fms-like tyrosine kinase-1 to placental growth factor ratio in pregnancies complicated by fetal growth restriction.,“ *Obstet Gynecol*, Bd. 124, pp. 265-273, Aug 2014.
- [11] L. J. Vatten, B. O. Åsvold und A. Eskild, „Angiogenic factors in maternal circulation and preeclampsia with or without fetal growth restriction.,“ *Acta Obstet Gynecol Scand*, Bd. 91, pp. 1388-1394, Dec 2012.

- [12] S. Verlohren, A. Galindo, D. Schlembach, H. Zeisler, I. Herraiz, M. G. Moertl, J. Pape, J. W. Dudenhausen, B. Denk und H. Stepan, „An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia.,“ *Am J Obstet Gynecol*, Bd. 202, pp. 161.e1--161.e11, Feb 2010.
- [13] C. E. Powe, R. J. Levine und S. A. Karumanchi, „Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease.,“ *Circulation*, Bd. 123, pp. 2856-2869, Jun 2011.
- [14] S. Verlohren, I. Herraiz, O. Lapaire, D. Schlembach, H. Zeisler, P. Calda, J. Sabria, F. Markfeld-Erol, A. Galindo, K. Schoofs, B. Denk und H. Stepan, „New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia.,“ *Hypertension*, Bd. 63, pp. 346-352, Feb 2014.
- [15] T. Engels, J. Pape, K. Schoofs, W. Henrich und S. Verlohren, „Automated measurement of sFlt1, PlGF and sFlt1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders.,“ *Hypertens Pregnancy*, Bd. 32, pp. 459-473, Nov 2013.
- [16] D. G. für Gynäkologie und Geburtshilfe, „S1-Leitlinie: Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen,“ 2013.
- [17] A. Hoeller, L. Ehrlich, M. Golic, F. Herse, F. H. Perschel, M. Siwetz, W. Henrich, R. Dechend, B. Huppertz und S. Verlohren, "Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies," *Hypertension In Pregnancy*, Feb 2017.
- [18] L. Ehrlich, A. Hoeller, M. Golic, F. Herse, F. H. Perschel, W. Henrich, R. Dechend, B. Huppertz und S. Verlohren, „Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia,“ *Hypertension in Pregnancy*, May 2017.
- [19] L. A. Dröge, A. Höller, L. Ehrlich, S. Verlohren, W. Henrich and F. H. Perschel, "Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/PlGF ratio: Diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®.," *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, vol. 8, pp. 31 - 36, Apr 2017.
- [20] D. Borrás, A. Perales-Puchalt, N. Ruiz Sacedón und A. Perales, „Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction.,“ *J Obstet Gynaecol*, Bd. 34, pp. 218-220, Apr 2014.
- [21] K. Schoofs, U. Grittner, T. Engels, J. Pape, B. Denk, W. Henrich und S. Verlohren, „The importance of repeated measurements of the sFlt-1/PlGF ratio for the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction.,“ *J Perinat Med*, Bd. 42, pp. 61-68, Jan 2014.
- [22] S. Rana, M. R. Hacker, A. M. Modest, S. Salahuddin, K.-H. Lim, S. Verlohren, F. H. Perschel und S. A. Karumanchi, „Circulating angiogenic factors and risk of adverse

maternal and perinatal outcomes in twin pregnancies with suspected preeclampsia.," *Hypertension*, Bd. 60, pp. 451-458, Aug 2012.

- [23] C. Hirashima, A. Ohkuchi, F. Arai, K. Takahashi, H. Suzuki, T. Watanabe, K. Kario, S. Matsubara und M. Suzuki, „Establishing reference values for both total soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and free placental growth factor in pregnant women.," *Hypertension Research*, Bd. 28, Nr. 9, pp. 727-732, 2005.
- [24] S. Salahuddin, J. B. Wenger, D. Zhang, R. Thadhani, S. A. Karumanchi und S. Rana, „KRYPTOR-automated angiogenic factor assays and risk of preeclampsia-related adverse outcomes.," *Hypertension in pregnancy*, Bd. 35, Nr. 3, pp. 330-345, #aug# 2016.
- [25] L. B. Andersen, B. Frederiksen-Møller, K. Work Havelund, R. Dechend, J. S. Jørgensen, B. L. Jensen, J. Nielsen, S. Lykkedegn, T. Barington und H. T. Christesen, „Diagnosis of preeclampsia with soluble Fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio: an inter-assay comparison.," *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*, Bd. 9, Nr. 2, pp. 86-96, #feb# 2015.
- [26] J. van Helden und R. Weiskirchen, „Analytical evaluation of the novel soluble fms-like tyrosine kinase 1 and placental growth factor assays for the diagnosis of preeclampsia.," *Clinical biochemistry*, Bd. 48, Nr. 16-17, pp. 1113-1119, #nov# 2015.
- [27] E. Shibata, A. Rajakumar, R. W. Powers, R. W. Larkin, C. Gilmour, L. M. Bodnar, W. R. Crombleholme, R. B. Ness, J. M. Roberts und C. A. Hubel, „Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor.," *J Clin Endocrinol Metab*, Bd. 90, pp. 4895-4903, Aug 2005.
- [28] V. Tsatsaris, F. Goffin, C. Munaut, J.-F. Brichant, M.-R. Pignon, A. Noel, J.-P. Schaaps, D. Cabrol, F. Frankenne und J.-M. Foidart, „Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences.," *J Clin Endocrinol Metab*, Bd. 88, pp. 5555-5563, Nov 2003.
- [29] M. Semczuk, A. Borczynska, M. Bialas, N. Rozwadowska, A. Semczuk-Sikora, A. Malcher und M. Kurpisz, „Expression of genes coding for proangiogenic factors and their receptors in human placenta complicated by preeclampsia and intrauterine growth restriction.," *Reprod Biol*, Bd. 13, pp. 133-138, Jun 2013.
- [30] A. Rolfo, D. Giuffrida, A. M. Nuzzo, D. Pierobon, S. Cardaropoli, E. Piccoli, M. Giovarelli und T. Todros, „Pro-inflammatory profile of preeclamptic placental mesenchymal stromal cells: new insights into the etiopathogenesis of preeclampsia.," *PLoS One*, Bd. 8, p. e59403, 2013.
- [31] Y. Gu, D. F. Lewis und Y. Wang, „Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies.," *J Clin Endocrinol Metab*, Bd. 93, pp. 260-266, Jan 2008.
- [32] A. Rajakumar, A. S. Cerdeira, S. Rana, Z. Zsengeller, L. Edmunds, A. Jeyabalan, C. A. Hubel, I. E. Stillman, S. M. Parikh und S. A. Karumanchi, „Transcriptionally active

syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia.," *Hypertension*, Bd. 59, pp. 256-264, Feb 2012.

- [33] S. Helske, P. Vuorela, O. Carpén, C. Hornig, H. Weich und E. Halmesmäki, „Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies.," *Mol Hum Reprod*, Bd. 7, pp. 205-210, Feb 2001.
- [34] N. A. Bersinger, N. Groome und S. Muttukrishna, „Pregnancy-associated and placental proteins in the placental tissue of normal pregnant women and patients with pre-eclampsia at term.," *Eur J Endocrinol*, Bd. 147, pp. 785-793, Dec 2002.
- [35] P. H. Andraweera, G. A. Dekker, J. A. Laurence und C. T. Roberts, „Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes.," *Placenta*, Bd. 33, pp. 467-472, Jun 2012.
- [36] S. Weed, J. A. Bastek, L. Anton, M. A. Elovitz, S. Parry und S. K. Srinivas, „Examining the correlation between placental and serum placenta growth factor in preeclampsia.," *Am J Obstet Gynecol*, Bd. 207, pp. 140.e1--140.e6, Aug 2012.

2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Laura Ehrlich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Plazentare Expression von sFlt-1 und PlGF bei Patientinnen mit Präeklampsie und IUGR“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

3. Anteilserklärung

Publikation 1: Ehrlich, Hoeller, Golic, Herse, Perschel, Henrich, Dechend, Huppertz, Verlohren: *Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia*, Hypertension in Pregnancy, 2017

Beitrag im Einzelnen: Inklusion geeigneter Patienten, Organisation der Patientenaufklärung, Probengewinnung, laborchemische Probenbearbeitung, Datensammlung, Datenauswertung inkl. statistischer Auswertung, Literaturrecherche, Dateninterpretation, Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts

Publikation 2: Hoeller, Ehrlich, Golic, Herse, Perschel, Siwetz, Henrich, Dechend, Huppertz, Verlohren: *Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies*, Hypertension in Pregnancy, 2017

Beitrag im Einzelnen: Inklusion geeigneter Patienten, Organisation der Patientenaufklärung, Probengewinnung, laborchemische Probenbearbeitung, Datensammlung, Aufarbeitung der Rohdaten als Vorbereitung für die Auswertung, kritische Durchsicht des Manuskripts

Publikation 3: Dröge, Höller, Ehrlich, Verlohren, Henrich, Perschel: *Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/PlGF ratio: Diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®*, Pregnancy Hypertension, 2017

Beitrag im Einzelnen: Inklusion geeigneter Patienten, Organisation der Patientenaufklärung, Probengewinnung, Datensammlung, kritische Durchsicht des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

4. Publikationen

4.1. Publikation 1

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

Laura Ehrlich, Alice Hoeller, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2017.1291673>

4.2. Publikation 2

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, *Hypertension in Pregnancy*

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, *Hypertension in Pregnancy*

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, *Hypertension in Pregnancy*

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, *Hypertension in Pregnancy*

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, *Hypertension in Pregnancy*

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, *Hypertension in Pregnancy*

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

Alice Hoeller, Laura Ehrlich, Michaela Golic, Florian Herse, Frank H. Perschel, Monika Siwetz, Wolfgang Henrich, Ralf Dechend, Berthold Huppertz & Stefan Verlohren (2017): Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies, Hypertension in Pregnancy

<http://dx.doi.org/10.1080/10641955.2016.1273363>

4.3. Publikation 3

Lisa Antonia Dröge, Alice Höller, Laura Ehrlich, Stefan Verlohren, Wolfgang Henrich, Frank Holger Perschel (2017): Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/PIGF ratio: Diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®, Pregnancy Hypertension

<http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2017.02.005>

Lisa Antonia Dröge, Alice Höller, Laura Ehrlich, Stefan Verlohren, Wolfgang Henrich, Frank Holger Perschel (2017): Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/PIGF ratio: Diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®, Pregnancy Hypertension

<http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2017.02.005>

Lisa Antonia Dröge, Alice Höller, Laura Ehrlich, Stefan Verlohren, Wolfgang Henrich, Frank Holger Perschel (2017): Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/PIGF ratio: Diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®, Pregnancy Hypertension

<http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2017.02.005>

Lisa Antonia Dröge, Alice Höller, Laura Ehrlich, Stefan Verlohren, Wolfgang Henrich, Frank Holger Perschel (2017): Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/PIGF ratio: Diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®, Pregnancy Hypertension

<http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2017.02.005>

Lisa Antonia Dröge, Alice Höller, Laura Ehrlich, Stefan Verlohren, Wolfgang Henrich, Frank Holger Perschel (2017): Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/PIGF ratio: Diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®, Pregnancy Hypertension

<http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2017.02.005>

Lisa Antonia Dröge, Alice Höller, Laura Ehrlich, Stefan Verlohren, Wolfgang Henrich, Frank Holger Perschel (2017): Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/PIGF ratio: Diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®, Pregnancy Hypertension

<http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2017.02.005>

5. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

6. Publikationsliste

Originalarbeiten:

- Ehrlich, Hoeller, Golic, Herse, Perschel, Henrich, Dechend, Huppertz, Verlohren: *Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia*, Hypertension in Pregnancy, 2017
- Hoeller, Ehrlich, Golic, Herse, Perschel, Siwetz, Henrich, Dechend, Huppertz, Verlohren: *Placental expression of sFlt-1 and PlGF in early preeclampsia vs. early IUGR vs. age-matched healthy pregnancies*, Hypertension in Pregnancy, 2017
- Dröge, Höller, Ehrlich, Verlohren, Henrich, Perschel: *Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/PlGF ratio: Diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®*, Pregnancy Hypertension, 2017

Kongressbeiträge:

- Posterpräsentation mit dem Titel „Plazentare Expression angiogener und antiangiogener Faktoren bei Patientinnen mit late-onset Präeklampsie: Vergleich mit gesunden Schwangeren“ im Rahmen des 60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in München, 08.-11.10.2014
- Posterpräsentation mit dem Titel „Placental expression of angiogenic and antiangiogenic factors in patients with late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction – comparison with healthy pregnant women“ im Rahmen des 8. International DIP Symposiums (Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome & Pregnancy) in Berlin, 15.-18.04.2015
- Posterpräsentation mit dem Titel „Plazentare Expression angiogener und antiangiogener Faktoren bei Patientinnen mit late-onset Präeklampsie und später intrauteriner Wachstumsretardierung – Vergleich mit gesunden Schwangeren“ im Rahmen des 16. Deutscher Gestose-Kongresses in Leibnitz (AT), 24.-25.04.2015

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Henrich danke ich für die Möglichkeit an seiner Klinik wissenschaftlich zu arbeiten.

Besonders möchte ich Herrn PD Dr. Stefan Verlohren danken. Ohne Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und Zurverfügungstellung des Themas, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Er hat mir erste Eindrücke des wissenschaftlichen Arbeitens vermittelt und mir die Möglichkeit gegeben auf Kongressen mein Wissen zu mehren. Seine wissenschaftliche Expertise hat mich und meine Arbeit immer in die richtige Richtung geleitet. Ich danke ihm für die Anmerkungen und Kritik, die zur Verbesserung der Qualität meiner Arbeit beitrugen.

Alice Höller möchte ich für die Zusammenarbeit danken. Ich hätte mir keine Bessere vorstellen können. Danke für die Einarbeitung, für das stets offene Ohr, für die gute Arbeitsteilung, für die sehr gute gemeinsam verbrachte Zeit. Zusammen haben wir diese Arbeit geformt und ohne Alice Höller wäre dies nur halb so gut geworden.

Ich danke der Arbeitsgruppe von Ralf Dechend die großartige Unterstützung bei der Laborarbeit. Insbesondere PD Dr. Florian Herse für die Ideenfindung der methodischen Herangehensweise und Hilfestellung bei der Auswertung und Juliane Anders für die Einarbeitung und Hilfestellung bei der praktischen Arbeit.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Braun möchte ich für die Expertise des Plazenten-Sammelns und die Vorbereitung der immunhistochemischen Schnitte danken. Insbesondere Loreen Ehrlich, Kerstin Melchior und Thomas Ziska hatten immer ein offenes Ohr für unsere Sorgen und haben uns durch Materialbeschaffung und die Zurverfügungstellung von Ressourcen das Sammeln der Plazenten sehr erleichtert.

Meiner Schwester Lisa Ehrlich und meiner Freundin Daniela Becker danke ich für das aufmerksame Lesen und die Verständlichkeitsprüfung der Arbeit, aber auch für die steten emotionalen Ermutigungen.

Abschließend möchte ich meinem Mann Jens Ehrlich für seine realistische Einschätzung jeder Situation und seine liebevolle Unterstützung danken.