

5. Diskussion

Die Pathogenese der Präeklampsie ist noch immer weitgehend unverstanden. Eine Vielzahl von Faktoren kommt für die Unterhaltung des Krankheitsgeschehens in Betracht.

Ein wichtiger Mediator ist sicherlich der Wachstumsfaktor VEGF mit seinem Rezeptorsystem (Ezimokhai et al, 1995; Hunter et al, 2000; McCarthy et al, 1993, Sharkey et al, 1996).

Die vorgelegte Arbeit konnte zeigen, dass sich die Expression des VEGF-Rezeptors FLT-1 auf maternalen neutrophilen Granulozyten im Verlauf der normotensiven Schwangerschaft und bei Präeklampsie deutlich unterscheiden. Darüber hinaus war es erstmals möglich, die Granulozyten als eine Produktionsquelle der löslichen Rezeptorvariante sFLT zu identifizieren.

5.1 FLT-1-Expression neutrophiler Granulozyten im Verlauf normotensiver und durch Präeklampsie komplizierter Schwangerschaft

Die FACS-Analyse der FLT-1-Expression auf den Neutrophilen normotensiver Schwangerer zeigte zum einen erhöhte Werte gegenüber den nicht schwangeren Kontrollen, als auch Veränderungen in Abhängigkeit vom jeweiligen Gestationsalter.

Der Verlauf der Rezeptorexpression lässt Parallelen zur Reifung der Plazenta erkennen, die in den ersten zwei Schwangerschaftsdritteln ein kontinuierliches Wachstum erfährt, im letzten Trimenon ihr Optimum an Größenzunahme und endokriner Funktion überschreitet und anschließend von regressiven Veränderungen betroffen ist. Als ein serologischer Indikator für die Plazentafunktion wird häufig das humane Plazentalaktogen (HPL), ein vermutlich von Synzytiotrophoblastzellen synthetisiertes Proteohormon, herangezogen (Keck, Neulen, Breckwoldt, Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, 1997). Seine Serumkonzentration im Verlauf der Schwangerschaft zeigt Ähnlichkeiten zur FLT-1-Expression in den einzelnen Gestationsabschnitten (Abb.31).

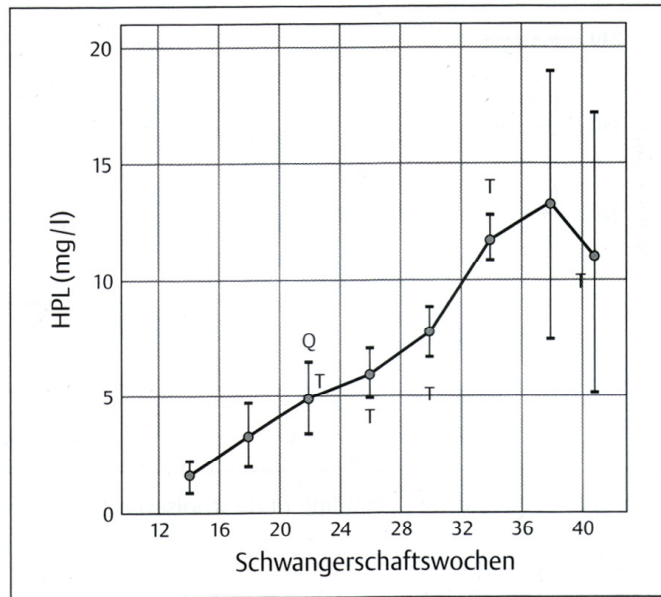


Abb.31: Mittlere HPL-Serumkonzentration im Laufe der Schwangerschaft

(aus Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Keck, Neulen, Breckwoldt, 1997)

Besonders deutlich wird diese Korrelation bei der Betrachtung der Expressionsanalysen von dichorialen Geminischwangerschaften, die in ihren Fluoreszenzwerten weit über den Ergebnissen monoplazentarer Schwangerschaften des gleichen Gestationsalters lagen.

Somit wird die Annahme der Plazenta als das endokrine Organ, das über die Sekretion bestimmter Faktoren für die Veränderung der FLT-1-Expression verantwortlich ist, wahrscheinlich.

Die Datenanalyse der Patientinnen mit durch Präeklampsie kompliziertem Schwangerschaftsverlauf zeigte verminderte Expression des VEGF-Rezeptors FLT-1, die in allen untersuchten Gestationsaltern eindeutig hinter den gesunden Schwangeren zurückblieb.

Bei dem zur Markierung des FLT-1 eingesetzten Antikörper handelt es sich um ein Produkt polyklonalen Ursprungs, daher wurde vor dem Beginn der Studie seine Spezifität mit Hilfe eines Verdrängungspeptids überprüft. Die auf den Einsatz dieses Peptids folgende Intensitätsminderung des FLT-1-Signals bzw. seine vollständige Unterdrückung bei äquivalenten Mengen von Antikörper und Peptid bestätigte die spezifische Markierung des VEGF-Rezeptors.

Die eindeutige Charakterisierung der Granulozytenpopulation als Träger des FLT-1-Signals war durch die zusätzliche Markierung der Oberflächenepitope CD11b (MAC-1) und CD16 (FC Rezeptor IIIb), die in dieser Kombination als Neutrophilen-spezifisch angesehen werden können (Clark et al, 1998), möglich.

Wir können also davon ausgehen, dass in den FACS-Analysen bei allen untersuchten Proben ausschließlich der VEGF-Rezeptor FLT-1 der neutrophilen Granulozyten erkannt wurde. Somit sind auch die nachgewiesenen Differenzen zwischen den einzelnen Kollektiven als spezifisch anzusehen.

Die Kontrollgruppe der nicht schwangeren Frauen lag bezüglich der FLT-1-Expression unter den Werten der normotensiven Schwangeren, zeigte jedoch deutliche interindividuelle und bei Wiederholungsmessungen auch intraindividuelle Schwankungen.

Die Frage nach Veränderungen der Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im Verlauf des weiblichen Zyklus wurde bislang kontrovers diskutiert, was z.T. auf unterschiedliche Nachweismethoden (Immunhistochemie, RT-PCR und Northern-Blot) und Schwierigkeiten in der Gewinnung endometrialen Gewebes mit genauer Zuordnung zu den einzelnen Zyklusphasen, sowie Verwendung von Tiermodellen anstelle humaner Proben zurückzuführen ist (Sugino et al, 2002; Meduri et al, 2000; Krüssel et al, 1999).

Eine mögliche Abfolge der zyklussynchronen Variationen des VEGF-Systems ergibt sich aus den Studienergebnissen von Meduri et al (2000) und Graubert et al (2001):

- Als Folge von Hypoxie, die als stärkster Stimulus der VEGF-Sekretion gilt, und Sekretion bestimmter Zytokine, z.B. TGF α und IL 1 β , werden zu Beginn der Menstruation deutlich erhöhte m-RNA-Level für VEGF nachgewiesen.
- Die maximale Aktivität des KDR-Rezeptors (gemessen an der Rezeptorphosphorylierung) während des gesamten Zyklus schließt sich an, es beginnt die Proliferationsphase des Endometriums.
- Die stärkste Endothelzellproliferation findet in der frühen Proliferationsphase statt, wobei ihr Ausmaß von der jeweiligen VEGF-Konzentration (charakterisiert durch die mRNA-Expression) und von der KDR-Aktivität (je ausgeprägter die Rezeptoraktivität desto stärker auch die Proliferation) abhängig ist.
- In der späten Proliferationsphase kommt es zu gesteigerter Expression von FLT-1 und sFLT, wobei sowohl die Anzahl der für FLT-1-Expression positiven Kapillaren als auch die Signalintensität, die mit der Expressionsrate gleichzusetzen ist, zunehmen. Berücksichtigt man die höhere Bindungsaffinität des FLT-1-Rezeptors zu seinem Liganden ist anzunehmen, dass FLT-1 in dieser Zyklusphase als Regulator der biologischen Wirksamkeit von VEGF fungiert, indem er sowohl das Wachstum als auch

den Umfang der strukturellen Veränderungen der Kapillaren (Dilatation und Permeabilitätszunahme) begrenzt.

Zur Veranschaulichung wurden diese Ergebnisse in der folgenden Abbildung (Abb.32) von mir zusammengefasst.

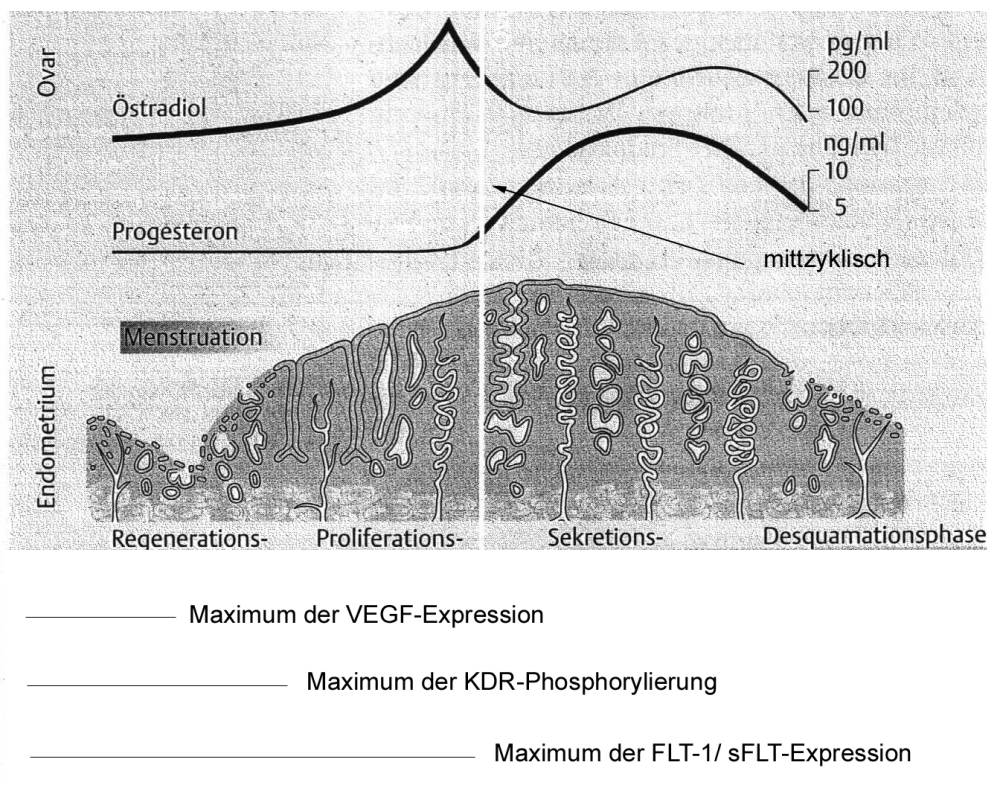


Abb.32: Darstellung der zyklussynchronen Veränderungen des Endometriums, sowie Zuordnung der Variabilität des VEGF-Systems zu den entsprechenden Zyklusphasen.

(modifiziert aus Gynäkologie und Geburtshilfe, Pfeleiderer, Breckwoldt, Martius, 4. Auflage, 2001)

Die zyklischen Veränderungen der Rezeptoraktivität und -expression machen die Frage nach Beeinflussung des VEGF-Systems durch die Steroidhormone Östrogen und Progesteron interessant. Tatsächlich zeigten *in-vitro*-Untersuchungen an isolierten endometrialen Stromazellen eine dosisabhängige Steigerung der Expression von VEGF nach Behandlung mit Ethinylestradiol (Charnock et al, 1993). Stimulation humaner Myometriumzellen durch 17β -Estradiol führte zu verstärkter Expression des FLT-1-Rezeptors (Gargett et al, 2002). Dieser Effekt war durch Einsatz des Antiöstrogens ICI 182.780 vollständig zu unterdrücken.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Östrogene bezüglich der VEGF- Expression über modulatorische Potenz verfügen. Obwohl bislang keine Consensus-Sequenz für ein estrogen-responsive-element in den Promoterregionen von FLT-1 und KDR identifiziert werden konnte, lassen die *in-vitro*-Daten eine Beeinflussung der Rezeptoren durch Estradiol vermuten. Es ist denkbar, dass Östrogene beispielsweise über die Induktion bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie Ets-1, zu gesteigerter Expression der VEGF-Rezeptoren führen (Lincoln et al, 2003).

Auch die Schwangerschaft ist eine Phase erhöhter Östrogenkonzentration. Eine Beeinflussung der VEGF-Rezeptorexpression im Schwangerschaftsverlauf durch das Steroidhormon ist also wahrscheinlich. Veranschaulicht man sich die gestationsbedingten Veränderungen der Östrogenkonzentration werden wiederum Parallelen zum VEGF-System deutlich (Abb.33).

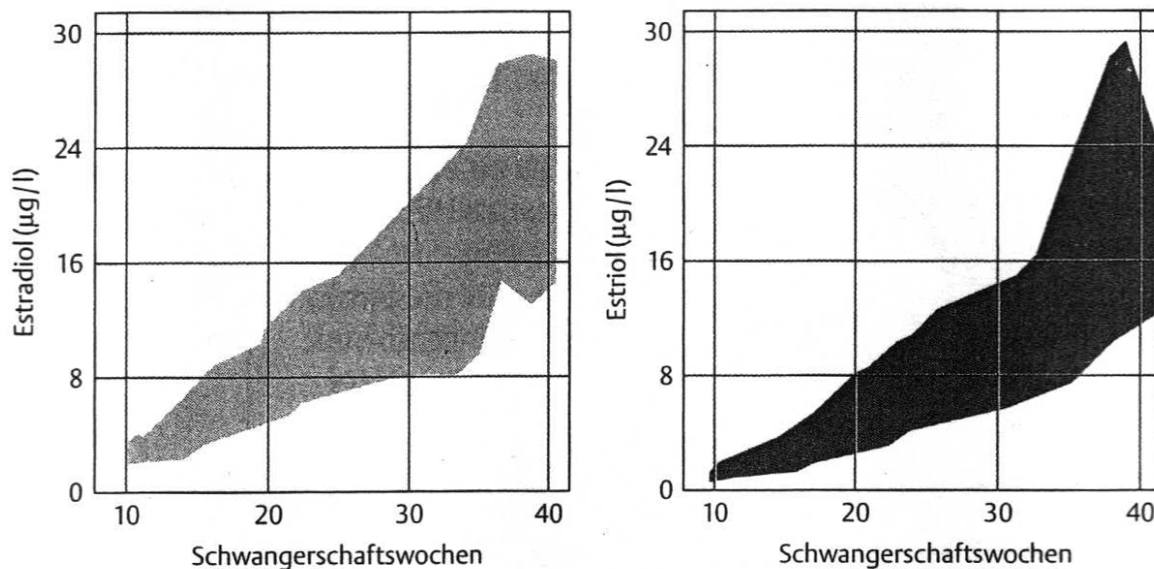


Abb.33: Estradiol- und Estriolserumkonzentrationen in der Schwangerschaft.

(aus Endokrinologie und Reproduktionsmedizin; Keck, Neulen, Breckwoldt; 1997)

5.2 Ergebnisse der RT-PCR-Analyse der FLT-1/sFLT-Expression

Die in der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten über die FLT-1-Expression im Verlauf normo- und hypertensiver Schwangerschaften konnten in der semi-quantitativen RT-PCR auf die Ebene der Transkription übertragen werden.

Es zeigten sich vergleichbare Veränderungen des FLT-1-Signals in den einzelnen Gestationsabschnitten (Zunahme der Bandenintensität von der Frühschwangerschaft bis zu einem Maximum im dritten Trimenon und anschließender Reduktion des Signals bis zum Termin und noch ausgeprägter postpartal). Alle untersuchten Präeklampsie-Proben zeigten spezifische FLT-1-Banden von geringerer Intensität als die Kontrollen, wohingegen die Expression von β -actin bei allen Proben annähernd gleich ausfiel.

Schwäche dieser Untersuchung und damit auch ihrer Aussagekraft ist sicherlich die Art der semiquantitativen Methode. Zum Zeitpunkt meiner Studie bestand keine Möglichkeit, eine sogenannte Realtime-PCR durchzuführen, da kein für diese Anwendung geeignetes Gerät zur Verfügung stand. Dies soll nun mit Hilfe des *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System* nachgeholt werden.

Auf Alternativen zur Bestimmung der mRNA-Expression (z.B. Northern Blot oder Ribonucleid Protection Assay, RPA) konnte nicht zurückgegriffen werden, da die aus den isolierten Granulozyten gewonnene Menge an mRNA zu gering ausfiel, um diese Verfahren durchführen zu können.

Dennoch ist bemerkenswert, dass die dargestellten Ergebnisse mehrfach reproduzierbar waren (normotensive Schwangerschaften n= 45 ; Präeklampsie n= 17). Alle Probenansätze wurden im gleichen PCR-Cycler nach identischem Protokoll bearbeitet. Die Proben wurden bei ihrem Eingang nummeriert und diese Verschlüsselung erst nach der Analyse aufgehoben, somit erfolgte die Bearbeitung ohne Informationen über die Kollektivzugehörigkeit der Proben. Unspezifische RT-PCR-Amplifikate wurden in Negativkontrollen (-RT-Ansätze) ausgeschlossen.

Bei der verminderten Expression des FLT-1 bei Präeklampsie scheint es sich also nicht um eine Störung auf der Ebene des Rezeptorproteins (z.B. durch Degradation) zu handeln, sondern vielmehr um eine veränderte Transkription.

Weiterhin konnte im Rahmen unserer RT-PCR-Untersuchungen erstmals die mRNA der löslichen Form des VEGF-Rezeptors-1, sFLT, in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Die Proben beider Kollektive zeigten spezifische Banden mit einer Größe von 524 Basenpaaren.

FLT-1 und sFLT entstehen durch alternatives Splicing derselben mRNA. In der RT-PCR wurden die beiden Formen spezifisch erkannt, da die Primer so gewählt wurden, dass ein

Oligonukleotid dem homologen DNA-Abschnitt entstammt, während der andere Primer eine FLT-1, bzw. sFLT-spezifische Sequenz darstellt. Zudem wurde die Spezifität des cDNA-Amplifikats durch Sequenzierung (Automatischer Sequencer, ABI 377) bestätigt.

In der Gegenüberstellung verschiedener Gestationsalter normotensiver Schwangerer ergaben sich Bandenintensitäten, die in ihrem Expressionsmuster den Ergebnissen des transmembranösen VEGF-Rezeptors FLT-1 vergleichbar waren. Die untersuchten Proben präeklampsischer Frauen zeigten auch hier deutlich verminderte Expression.

Eine mögliche Bedeutung der zunehmenden Expression von sFLT im Gestationsverlauf ist die Ausbildung eines endogenen Schutzmechanismus.

Das intensive Wachstum plazentarer und fetaler Gewebe verlangt nach lokal gesteigerter vaskulärer Expansion, aber ebenso nach angemessener Regulation. Würde der für die Veränderungen im plazentaren Gefäßbett und die embryonale Angiogenese essentielle Faktor VEGF seine Wirkung auch ungehemmt im mütterlichen Kreislauf entfalten, wären durchaus schwerwiegende Folgen, wie Ödembildung durch erhöhte Endothelpermeabilität oder Gerinnungsneigung durch Aktivierung von Monozyten denkbar.

Die vermehrte Sekretion des Antagonisten sFLT ist somit eine notwendige Reaktion. Der lösliche Rezeptor verfügt im Vergleich zum KDR über erhöhte Affinität zu seinem Liganden, eine Anbindung von VEGF zieht allerdings bei fehlender Transmembran-Domäne keine Signaltransduktion nach sich. So ist sFLT in der Lage, die biologischen Effekte des Wachstumsfaktors im mütterlichen Organismus zu limitieren.

Verschiedene Studien (Hunter et al 2000; Sharkey et al, 1996; Kupferminc et al, 1997) konnten belegen, dass Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zur normotensiven Gravidität ab der 30. Schwangerschaftswoche deutlich erhöhte VEGF-Serumwerte entwickelten, die bis zur Entbindung noch weiter anstiegen (Abb.34). Die Zunahme der VEGF-Konzentration ging der klinischen Manifestation der Erkrankung zumeist um Wochen voraus.

Bei verringerter Expression von FLT-1 und sFLT ist die erhöhte VEGF-Konzentration bei Präeklampsie somit mit einer deutlich herabgesetzten Verfügbarkeit der Antagonisten verbunden.

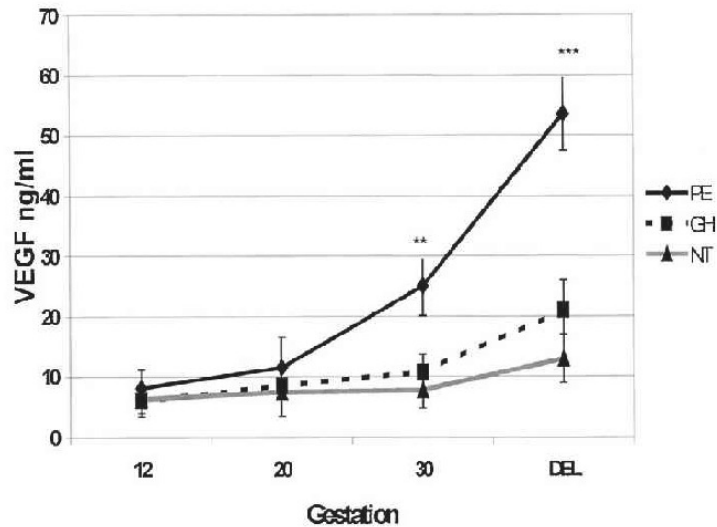


Abb.34: Veränderung der VEGF-Serumkonzentration im Verlauf normo- und hypertensiver Schwangerschaft sowie bei Präeklampsie

In den ersten 20 Schwangerschaftswochen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kollektiven (PE= Präeklampsie; GH= Gestationshypertonus; NT= normotensive Schwangerschaft). Ab der 30. Woche ist die VEGF-Serumkonzentration der Präeklampsie-Gruppe deutlich erhöht und steigt bis zum Entbindungstermin (DEL) noch an.

Die Werte bei Gestationshypertonus (in dieser Studie definiert als Blutdruckerhöhung >140/90 mmHg ohne Nachweis einer Proteinurie) waren, anders als bei der Präeklampsie, gegenüber dem normotensiven Kollektiv nur geringfügig erhöht. Dies verdeutlicht, dass, obwohl beide Erkrankungen im Hinblick auf die Blutdruckveränderungen ein ähnliches Erscheinungsbild aufweisen, ihnen doch offensichtlich ganz unterschiedliche pathophysiologische Ursachen zu Grunde liegen (Hunter et al, 2000)

5.3 Veränderung der FLT-1-Expression durch Stimulation der Granulozyten mit VEGF

Die vorgelegte Arbeit konnte nachweisen, dass neutrophile Granulozyten normotensiver Schwangerer auf erhöhte VEGF-Serumkonzentration mit einem Anstieg der FLT-1-Expression reagieren und so die bei kultivierten Endothelzellen gewonnenen Erkenntnisse über einen positiven Feedbackmechanismus zwischen Ligand und Rezeptor bestätigen (Barleon et al, 1997, vgl. Abb.3).

Bei Präeklampsie scheint diese Rückkopplung aufgehoben. VEGF ist hier nicht mehr in der Lage, die Expression seines Rezeptors zu beeinflussen. Damit ist eine wichtige Komponente des Regulationssystems verloren.

Sind die anhand der Neutrophilen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der FLT-1- und sFLT-Expression repräsentativ für VEGF-Rezeptor-tragende Zellgruppen lässt sich ein Pathogenesemodell der Präeklampsie entwerfen (Abb.35):

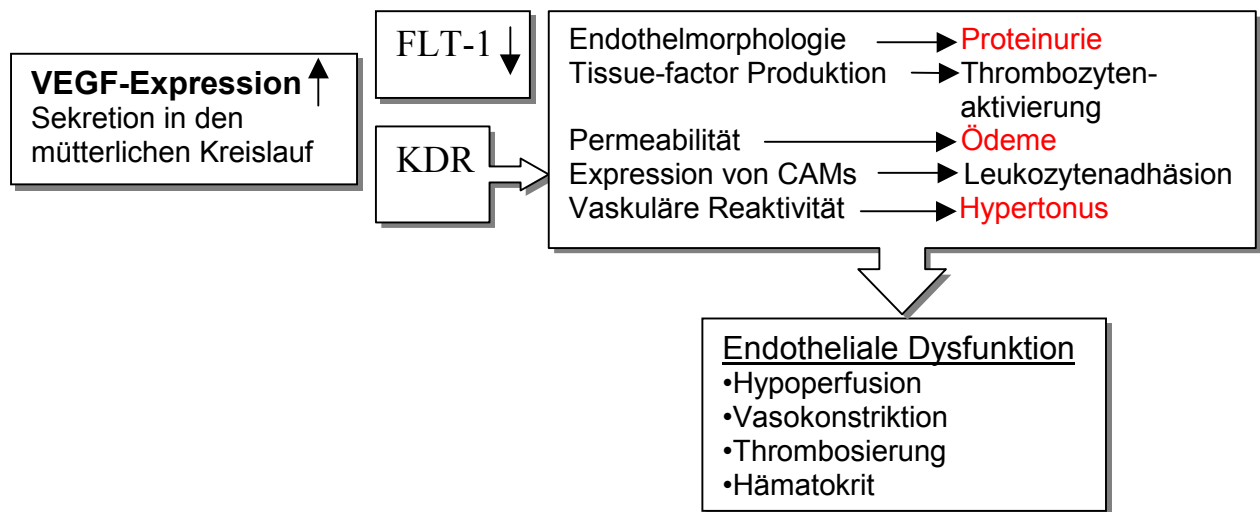


Abb.35: Pathogenese-Modell der Präeklampsie.

Die in zahlreichen Studien bestätigte erhöhte maternale VEGF-Serumkonzentration (vgl. Abb 34) bei Patientinnen mit Präeklampsie trafe auf eine ungünstige Rezeptorkonstellation mit verminderter Expression der endogenen VEGF-Antagonisten FLT-1 und sFLT ohne die Möglichkeit der Anpassung an die erhöhte Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors. Wie die Untersuchungen von Barleon et al (1997) zeigen konnten, bliebe die Expression des KDR-Rezeptors hingegen von einer erhöhten VEGF-Konzentration unbeeinflusst auf stationärem Niveau. Auswirkungen, die sich aus verstärkter Stimulation dieses Rezeptortyps durch VEGF ergeben, umfassen Veränderungen der Endothelmorphologie, der Gefäßpermeabilität und der vaskulären Reaktivität mit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber vasokonstriktorischen Einflüssen (Brockelsby et al, 1999; Neufeld et al, 1999; Ashworth et al, 1997; Waltenberger et al, 1994). Die daraus resultierenden klinischen Manifestationen als Ödeme, Proteinurie und Hypertonus sind nicht nur entscheidende Bestandteile des Krankheitsbildes der Präeklampsie, sondern auch Ausdruck der generalisierten endothelialen Dysfunktion des maternalen Gefäßsystems.

5.4 Migrationsassay

Der funktionelle Aspekt des FLT-1 auf Zellen des peripheren Blutes ist für Monozyten bereits untersucht. VEGF-induzierte Chemotaxis und gesteigerte Produktion gerinnungsfördernder Mediatoren, wie Tissue Factor, sind als FLT-1-vermittelte Effekte erkannt worden (Barleon et al, 1997).

Unsere Migrationsexperimente belegen, dass auch Neutrophile auf einen VEGF-Gradienten hin migrieren. Diese Fähigkeit zeigte einen Zusammenhang mit der gegebenen VEGF-Konzentration. Der Anteil der wandernden Zellen konnte durch Erhöhung der eingesetzten VEGF-Konzentration gesteigert werden.

Gleichzeitig kam es zu vermehrter Expression des FLT-1-Rezeptors auf den Neutrophilen, so dass angenommen werden kann, dass dieser die chemotaktische Wirkung von VEGF auf die Granulozyten vermittelt.

Beim Aufbau unserer Versuche orientierten wir uns bezüglich der eingesetzten Zellzahlen, der Versuchsdauer und der verwendeten VEGF-Konzentrationen an bereits etablierten Untersuchungen der Migration von Monozyten (Barleon et al, 1996). Zusätzlich variierten wir die Konzentrationen, um auch eine mögliche Dosisabhängigkeit der VEGF-Wirkung erkennen zu können.

Blockierungsversuche in diesem Zusammenhang sind nicht unternommen worden. Die parallele Durchführung von Migrationsversuchen ohne VEGF (Ansätze mit Aqua bidest. und fMLP) zeigten jedoch deutlich abweichende Ergebnisse sowohl bezüglich der Gesamtzahl migrierter Zellen, als auch der anschließenden FACS-Analyse der Rezeptorexpression, so dass wir davon ausgehen, dass es sich hier tatsächlich um VEGF-spezifische Veränderungen handelte.

Die Ergebnisse der Migrationsassays bei Granulozytenisolaten von Präeklampsie-Patientinnen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen mit und ohne VEGF, auch eine Zunahme der Wanderung unter erhöhter VEGF-Konzentration war nicht zu verzeichnen.

Die Frage, ob die Migrationsfähigkeit der Neutrophilen bei Präeklampsie allgemein eingeschränkt ist, konnten Versuche klären, bei denen fMLP als chemotaktische Substanz eingesetzt wurde. Hier unterschied sich die Zahl der migrierenden Zellen signifikant von den Versuchsreihen mit Zusatz von Aqua bidest. und VEGF. Somit wird einerseits deutlich, dass VEGF und fMLP ihre chemotaktische Wirkung über unterschiedliche Rezeptoren entfalten, andererseits scheinen beide Systeme bei Präeklampsie nicht gleichermaßen verändert zu sein.

Für die Rolle der Neutrophilen als Effektorzellen bei Präeklampsie ist zu folgern, dass die Wirkungen, die sie über die Interaktion mit dem maternalen Endothel entfalten, offenbar nicht von FLT-1, sondern von anderen adhäsions- und migrationsfördernden Rezeptoren vermittelt sein müssen. Es bleibt fraglich, in welcher Weise das VEGF-System auf Zellen des peripheren Blutes im Rahmen der Pathogenese der Präeklampsie von Bedeutung ist.

In Anbetracht der Erkenntnisse über den Rezeptor auf Endothelzellen sollte man seine Funktion auf neutrophilen Granulozyten sicherlich nicht auf die Vermittlung von Migration beschränken. Vielleicht steht hier tatsächlich die Rolle als endogener Antagonist gegenüber VEGF im Vordergrund, zumal mit Neutrophilen bei physiologischem Schwangerschaftsverlauf auch eine beträchtliche Produktionsquelle der löslichen Rezeptorvariante sFLT zur Verfügung steht.

Für die Präeklampsie lässt sich zusammenfassend festhalten, die verringerte FLT-1-Expression geht mit eingeschränkter Migrationsfähigkeit der Rezeptor-tragenden Zellen einher, darüberhinaus sind die Möglichkeiten zur Antagonisierung systemischer VEGF-Wirkungen gegenüber der normotensiven Schwangerschaft deutlich reduziert.

Wenn auch die eigentliche Ursache der Präeklampsie als ungeklärt gilt, so konnten in den letzten Jahren interessante Zusammenhänge zwischen der Implantation sowie der Plazentaentwicklung einerseits und der Präeklampsie andererseits nachgewiesen werden.

Ausgehend von Plazentabettbiopsien haben *in-vitro*-Untersuchungen eine Assoziation zwischen Störungen der Invasion der Dezidua durch extravillöse Trophoblastzellen und der Entstehung des Krankheitsbildes gezeigt (Charnock-Jones et al, 1994)

Warum es bei Präeklampsie zu eingeschränkter Migrationsfähigkeit der Trophoblastzellen kommt, ist noch nicht sicher. Man weiß, dass es zu Beginn der Trophoblastinvasion zu verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche kommt, um neben der Migration auch die Interaktion mit den Gefäßstrukturen zu ermöglichen. An diesem Differenzierungsprozess sind verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, auch VEGF, beteiligt. Unter seinem Einfluss kommt es zur Expression von $\alpha_5\beta_3$ -Integrin, welches vor allem für die Invasionstiefe verantwortlich ist (Dekker und Sibai, 1999). Da Trophoblastzellen den VEGF-Rezeptor-1 (FLT-1) tragen, muss dieser wohl den Stimulus zur Differenzierung vermitteln.

Bisher existieren keine Daten über mögliche Veränderungen der FLT-1-Expression auf Zellen des extravillösen Trophoblasten bei Präeklampsie, was vor allem an der Schwierigkeit der Probengewinnung liegen dürfte.

Sollte es möglich sein, unsere Erkenntnisse über die FLT-1-Expression auf den neutrophilen Granulozyten auf andere FLT-1-positive Zellgruppen auszuweiten, könnte man hieraus eine Erklärung für die herabgesetzte Einwanderung des Trophoblasten und gleichzeitig zumindest Hinweise auf die Pathogenese der Präeklampsie erhalten (Abb.36): Eine reduzierte FLT-1-Expression der Trophoblastzellen würde auch eine verminderte VEGF-vermittelte Migration und Invasion nach sich ziehen. Als Folge bliebe der Umbau der uterinen Spiralarterien gering ausgeprägt oder sogar ganz aus. Im weiteren Schwangerschaftsverlauf würde eine unvollständige Adaptation der Gefäße mit Limitierung des Zustroms von mütterlichem Blut in den intervillösen Raum einhergehen. Hypoperfusion oder Wechsel von Ischämie und Reperfusion könnten zu lokalen Schäden der Plazenta und über die Sekretion von verschiedenen Mediatoren, zur direkten Beeinflussung des mütterlichen Endothels führen.

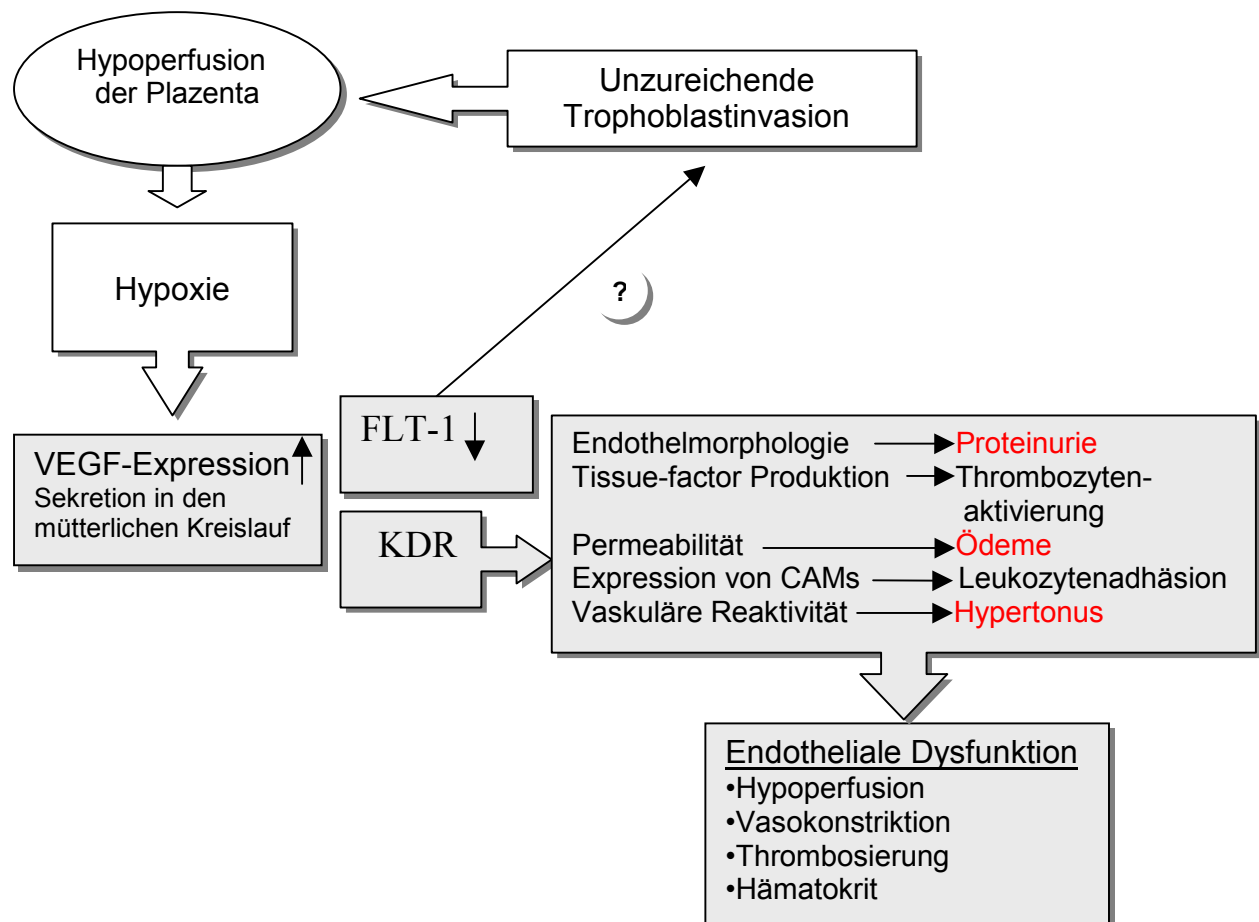


Abb.36: Erweitertes Pathogenese-Modell

5.5 Ausblick auf weiterführende Untersuchungen

Die Frage nach der Ursache der verminderten FLT-1/sFLT-Expression können wir noch nicht beantworten.

Die vorliegende Studie konnte aber verdeutlichen, dass es sich nicht um eine Ligandenbedingte Downregulation als Reaktion auf erhöhte VEGF-Serumwerte handeln kann, da offensichtlich jegliche Beeinflussung der Rezeptorexpression durch VEGF aufgehoben ist. Unabhängig von der angebotenen Konzentration blieb bei Präeklampsie das Expressionsniveau des FLT-1-Rezeptors unverändert.

Eine mögliche Erklärung der Rezeptorkonstellation bei Präeklampsie schließt Störungen im Bereich der Transkriptionsregulation des FLT-1 mit ein. In weiteren Untersuchungen soll nun geklärt werden, ob sich bei Patientinnen mit Präeklampsie im Bereich des FLT-1-Promoters Polymorphismen nachweisen lassen, die als Ursache einer verminderten Genaktivität in Frage kommen könnten.

Die FLT-1-Promoterregion enthält verschiedene Transkriptionsfaktoren- bindende Elemente, wie CREBP/ ATF (cAMP response element binding protein / activating transcription factor) und mehrere Ets-Motive.

Das CREBP /ATF- Element ist essenziell für die basale Transkription des FLT-1, aber offenbar nicht an der Regulation der Rezeptorexpression beteiligt. Versuche zur Transaktivierung des Promoters als Antwort auf erhöhte cAMP-Konzentrationen scheiterten.

Ein weiteres wichtiges Merkmal des FLT-1-Promoters ist die Existenz der Ets-Bindungsstellen. Die Familie der Ets-Proteine ist an der Genregulation im Rahmen wichtiger biologischer Prozesse beteiligt, so z.B. beim Zellwachstum und der Differenzierung hämatopoetischer und endothelialer Zellen.

Das Ets-Motiv des FLT-1- Promoters zwischen den Basen -54 bis -51 wirkt als positiver Regulator der Transkription. Es ist erwiesen, dass Störungen dieser Komponente mit stark herabgesetzter Genaktivität einhergehen.

Des Weiteren wurden hochsignifikante Korrelationen zwischen den Expressionsmustern von Ets-1 und FLT-1 bei kultivierten Endothelzellen gefunden, so dass vermutet werden kann, dass Ets-1 als Aktivator bei der Transkription des VEGF- Rezeptors wirkt.

Im Bezug auf die Pathogenese der Präeklampsie ist nun zu überprüfen, ob sich im Bereich der Ets-Motive des FLT-1-Promoters Veränderungen als mögliche Ursache der herabgesetzten Rezeptorexpression nachweisen lassen. Zudem ist auch die Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 von Interesse. Es ist denkbar, dass Ets-1 bei Präeklampsie

gleichsinnigen Veränderungen wie FLT-1 unterworfen ist, so dass in diesem Fall ein geringeres Vorkommen des positiven Regulators und nicht Mutationen im Bereich seiner Bindungsstelle die Ursache der herabgesetzten FLT-1-Expression wäre.

6. Zusammenfassung

Präeklampsie ist eine schwangerschaftsspezifische Systemerkrankung, die mit Hypertonus, Proteinurie und häufig auch mit peripheren Ödemen klinisch in Erscheinung tritt, deren Ätiologie aber bis heute noch weitgehend ungeklärt ist.

Wahrscheinlich ist eine insuffiziente Invasion des Trophoblasten in das uterine Gefäßbett Auslöser einer Kaskade, die letztendlich zur Entstehung des Krankheitsbildes führt.

Zahlreiche Faktoren sind an der Pathogenese der Präeklampsie beteiligt, so auch der Wachstumsfaktor VEGF, der für Veränderungen der vaskulären Reaktivität und der Endothelmorphologie sowie für Aktivierung verschiedener Zellgruppen (z.B. Thrombozyten, Leukozyten) im mütterlichen Kreislauf verantwortlich gemacht wird. Sein Rezeptorsystem, vor allem der Tyrosinkinase-Rezeptor FLT-1, der als einziger VEGF-Rezeptor auf Zellen des peripheren Blutes exprimiert wird, und seine lösliche Variante sFLT standen im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Während die Funktion des FLT-1 auf Monozyten bereits beschrieben wurde (hier vermittelt er VEGF-induzierte Chemotaxis und Tissue-factor-Produktion), war bislang unklar, welche Bedeutung ihm bei neutrophilen Granulozyten zukommt, die als Effektorzellen bei Präeklampsie in ihrer Interaktion mit dem mütterlichen Endothel von Interesse sind.

Auch sollte untersucht werden, ob die Expression des Rezeptors auf diesen Zellen durch seinen Liganden VEGF beeinflusst werden kann und ob eine solche Rückkoppelung möglicherweise bei Präeklampsie oder auch im Verlauf unkomplizierter Schwangerschaften zum Tragen kommt.

Deshalb wurde die FLT-1 Expression der neutrophilen Granulozyten normotensiver Schwangerer und Präeklampsie-Patientinnen sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei kamen die Durchflusszytometrie und RT-PCR zum Einsatz. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Kollektiven ($p < 0,001$). Während die Probandinnen mit normalem Schwangerschaftsverlauf eine mit dem Gestationsalter zunehmende Expression des VEGF-Rezeptors aufwiesen, blieben die Ergebnisse bei Präeklampsie ohne erkennbare Anpassung an den Schwangerschaftsfortschritt auf stationär

niedrigem Niveau (der Median der in der Durchflusszytometrie ermittelten FLT-1-Expression in der 32. Woche lag bei normotensiver Schwangerschaft bei 463, betrug in der Präeklampsie-Gruppe aber nur 357).

In dieser Arbeit gelang es erstmals nachzuweisen, dass neutrophile Granulozyten an der Produktion der löslichen Rezeptorvariante sFLT beteiligt sind. Dabei war die Expression der mRNA in beiden Kollektiven dem vollständigen Rezeptor vergleichbar.

Zur Klärung der Liganden-Rezeptor-Interaktion wurden *in-vitro*-Stimulationsversuche unternommen, bei denen die FLT-1-Expression der in Zellkultur überführten Granulozyten vor und nach 24h Inkubation mit VEGF bestimmt wurde. Hierbei zeigte sich, dass bei Präeklampsie jegliche Anpassung der Rezeptorexpression an die vorliegende Konzentration des Liganden aufgehoben ist. Bei normotensiver Schwangerschaft hingegen folgte auf erhöhte VEGF-Konzentration auch eine Steigerung der FLT-1-Expression.

Da die funktionellen Aspekte des VEGF-Rezeptorstatus der Granulozyten noch ungeklärt waren, etablierten wir in Anlehnung an die in der Literatur für Monozyten beschriebenen Versuchsreihen einen für neutrophile Granulozyten geeigneten Migrationsassay. Es stellte sich heraus, dass die VEGF-induzierte Migration auch bei dieser Zellart ein FLT-1-vermittelter Effekt ist. Bei normotensiver Schwangerschaft zeigte sich eine von der jeweiligen VEGF-Konzentration positiv abhängige Migrationsfähigkeit. Hingegen unterschieden sich bei Präeklampsie die Zahlen der unter VEGF-Einfluss gewanderten Zellen gegenüber den ohne chemotaktische Substanz durchgeführten Kontrollen nicht signifikant, auch eine Modifikation der eingesetzten VEGF-Konzentration blieb ohne Effekt. Dabei kann ausgeschlossen werden, dass diese Resultate Ausdruck einer bei Präeklampsie generell eingeschränkten Migrationsfähigkeit der Granulozyten handelt. In parallelen Versuchsreihen mit der unabhängig von VEGF-Rezeptoren chemotaktisch wirkenden Substanz fMLP wanderten die Zellen den gesunden Kontrollen entsprechend.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Pathogenese der Präeklampsie könnte sich aus den besonderen Eigenschaften der Rezeptoren FLT-1 und sFLT ableiten. Während sFLT mit dem Verlust der Transmembran- und Tyrosinkinasedomäne die Möglichkeit zur Vermittlung biologischer Effekte gänzlich eingebüßt hat, scheint auch bei FLT-1 die Potenz zur Mediation VEGF-induzierter Signale eingeschränkt. Vielmehr fungieren beide Rezeptortypen als endogene Antagonisten des Wachstumsfaktors VEGF, die seine Auswirkungen auf den Organismus limitieren.

In der Schwangerschaft bedarf es im Rahmen des Wachstums der fetoplazentaren Einheit lokal gesteigerter Angiogenese. Erhöhte Konzentrationen von VEGF sind daher physiologisch, gleichzeitig für den maternalen Kreislauf aber nicht unproblematisch, würde der Wachstumsfaktor seine Effekte „ungebremst“ entfalten können: Endotheliale Dysfunktion mit Hypertonie, Proteinurie und dem Auftreten von Ödemen als Ausdruck veränderter Reaktivität, Morphologie und Permeabilität wären die Folge. Ein intaktes System von antagonistischen Einflüssen ist demnach sinnvoll. Bei Präeklampsie zeigen sich aber deutliche Störungen dieses Systems. FLT-1 und sFLT werden gegenüber den Kontrollen vermindert exprimiert und wie die Stimulationsversuche dieser Arbeit zeigen, kann auch keine Anpassung der Rezeptorexpression mehr erfolgen. Die normotensiven Schwangeren hingegen reagierten auf erhöhte Verfügbarkeit von VEGF mit gesteigerter FLT-1-Expression und stärkten so die Annahme eines endogenen Schutzmechanismus.

Die eingeschränkte VEGF-induzierte Migration der Granulozyten bei Präeklampsie ist besonders von Interesse, erlaubt man sich den Ausblick auf andere FLT-1-tragende Zellarten. So exprimieren beispielsweise auch Trophoblastzellen den VEGF-Rezeptor. Sollten sich hier in quantitativer und funktioneller Hinsicht Parallelen zum Rezeptorstatus der neutrophilen Granulozyten ergeben, ist es denkbar, dass die verminderte Migrations- und Invasionsfähigkeit des Trophoblasten, die am Anfang der Pathogenese der Präeklampsie steht, auf der Alteration des VEGF-Rezeptorsystems beruht.