

Aus der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Erich-Franz Solomayer

Vergleich der maternalen Serumspiegel von DKK1 und die Expression von DKK1 und β -Catenin in der Plazenta bei präeklampsischen und normalen Schwangerschaften

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2021

vorgelegt von
Lena Fackiner
geb.: 06.04.1992 in Frankenberg

Tag der Promotion: 17.12.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Erich-Franz Solomayer

Prof. Dr. med. Kerstin Junker

Für Opa & Steffen

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS.....	IX
1 Zusammenfassung	- 1 -
1.1 Zusammenfassung.....	- 1 -
1.2 Abstract.....	- 3 -
2 Einleitung	- 5 -
2.1 Präeklampsie.....	- 5 -
2.1.1 Epidemiologie und Komplikationen	- 5 -
2.1.2 Definition.....	- 6 -
2.1.3 Risikofaktoren und Wiederholungsrisiko	- 7 -
2.1.4 Pathogenese	- 9 -
2.1.4.1 <i>Histopathologische Veränderungen in der Plazenta.....</i>	<i>- 12 -</i>
2.1.5 Diagnostik und Screening.....	- 13 -
2.1.6 Prävention	- 15 -
2.1.7 Therapie.....	- 15 -
2.2 Der Wnt-Signalweg	- 18 -
2.2.1 β -Catenin.....	- 18 -
2.2.2 Dickkopf-1 (DKK1).....	- 19 -
2.2.3 Der kanonische, β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg.....	- 19 -
2.2.3.1 <i>Der kanonische, β-Catenin-abhängige Wnt-Signalweg in Trophoblasten.....</i>	<i>- 21 -</i>
2.3 Zielsetzung und Fragestellungen	- 24 -
3 Methodik.....	- 26 -
3.1 Studiendesign und Untersuchungskollektiv	- 26 -
3.1.1 Diagnosestellung einer Präeklampsie.....	- 27 -
3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	- 27 -
3.2 Material und Geräte.....	- 29 -
3.2.1 Reagenzien.....	- 29 -
3.2.2 Kits.....	- 29 -
3.2.3 Lösungen.....	- 30 -
3.2.4 Verbrauchsmaterialien	- 30 -
3.2.5 Geräte	- 31 -
3.2.6 Software	- 31 -
3.3 Probensammlung.....	- 32 -
3.4 Laborbestimmungen.....	- 33 -

3.4.1	Serumanalyse.....	- 34 -
3.4.2	Histologische Untersuchung der Plazenta gewebeproben.....	- 35 -
3.4.3	Gewebeextraktion.....	- 37 -
3.4.4	Bioanalyser.....	- 39 -
3.4.5	Ausschluss von DNA-Anteilen in den RNA-Proben.....	- 40 -
3.4.6	Reverse Transkription der RNA.....	- 41 -
3.4.7	Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR).....	- 42 -
3.5	Statistische Methoden.....	- 45 -
4	Ergebnisse.....	- 46 -
4.1	Charakteristika der Studienpopulation.....	- 46 -
4.1.1	Gesunde Schwangere vs. Präeklampsie.....	- 47 -
4.1.1.1	<i>Klinische Charakteristika.....</i>	<i>- 47 -</i>
4.1.1.2	<i>Laborparameter.....</i>	<i>- 52 -</i>
4.2	DKK1 im Serum.....	- 53 -
4.2.1	Nicht schwangere Frauen vs. Alle Schwangere.....	- 53 -
4.2.2	Nicht schwangere Frauen vs. Gesunde Schwangere vs. Präeklampsie.....	- 54 -
4.2.3	Subgruppenanalyse.....	- 55 -
4.2.4	Korrelationsanalyse.....	- 56 -
4.3	Plazentamorphologie.....	- 59 -
4.4	Genexpression von DKK1 und β-Catenin im Plazentagewebe.....	- 64 -
5	Diskussion.....	- 67 -
5.1	DKK1-Serumkonzentration bei gesunden, nicht schwangeren Frauen, gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie.....	- 68 -
5.1.1	Die DKK1-Serumkonzentration ist bei Schwangeren mit Präeklampsie höher als bei gesunden Schwangeren und bei gesunden, nicht schwangeren Frauen.....	- 68 -
5.2	DKK1-Expressionsniveaus im Plazentagewebe bei gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie.....	- 71 -
5.2.1	Die plazentare DKK1-Genexpression ist bei Schwangeren mit Präeklampsie höher als bei gesunden Schwangeren.....	- 71 -
5.3	CTNNB1-Expressionsniveaus im Plazentagewebe bei gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie.....	- 73 -
5.3.1	Die plazentare β -Catenin-Genexpression ist bei Schwangeren mit Präeklampsie niedriger als bei gesunden Schwangeren.....	- 73 -
5.4	Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	- 74 -
5.4.1	DKK1 als potenzieller Prädiktor einer Präeklampsie.....	- 74 -
5.5	Methodenkritik.....	- 76 -
5.5.1	Probandinnenkollektiv.....	- 76 -
5.5.2	Datengewinnung.....	- 77 -
5.5.3	Probengewinnung.....	- 77 -
6	Zusammenfassende Beurteilung.....	- 79 -

7	Literaturverzeichnis	- 80 -
8	Anhang.....	- 95 -
	8.1 Aufklärung und Einverständniserklärung zur Studienteilnahme	- 95 -
	8.2 Posterpräsentation.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9	Danksagung	- 102 -
10	Lebenslauf.....	- 103 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

A.	<i>Arteria</i> (Arterie)
Aa.	<i>Arteriae</i> (Arterien)
ACTB	beta-Actin
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	<i>Adenomatous-polyposis-coli</i> ; Tumorsuppressorgen
arm	armadillo; Segmentpolaritätsgen bei <i>Drosophila</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
AV	<i>anchoring villi</i> (Verankerungszotten)
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften

B

β-Cat	beta-Catenin
BMI	Body-Mass-Index

C

°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CCT	<i>cell column trophoblast</i>
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CK1	Caseinkinase 1
cm	Zentimeter
C _t	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwertzyklus); relatives Maß zur Quantifizierung von DNA-Molekülen in einer PCR-Reaktion
CTG	Kardiotokographie
CTNNB1	Catenin, beta-1; Segmentpolaritätsgen beim Menschen

D

Δ	Delta
d	<i>day</i> (Tag)
dest.	destilliert
DIC	<i>Disseminated Intravascular Coagulation</i> (Disseminierte intravasale Koagulopathie)
DKK	Dickkopf
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate</i> (Desoxyribonukleosidtriphosphat)
Dvl	<i>Dishevelled</i> ; zytoplasmatisches Protein

E

eCTB	endovaskulärer Zytotrophoblast
ECTB	extravillöser Zytotrophoblast
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>

F

FU	<i>Fluorescence Units</i> (Fluoreszenzeinheiten)
FV	<i>floating villi</i> (Gleitzotten)
FZD	<i>Frizzled</i> ; G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren

G

g	Gramm
<i>g</i>	Gewichtskraft
Gpt	Gigapartikel
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase 3beta

H

h	<i>hour</i> (Stunde)
HELLP	Akronym aus <i>Heamolysis, Elevated Liver enzyme levels, Low Platelet count</i> (Hämolyse, erhöhte Leberenzyme, Thrombozytopenie)

Hz Hertz

I

iCTB interstitieller Zytotrophoblast

IGF *Insulin-like growth factor*

IUGR *Intrauterine Growth Restriction* (intrauterine Wachstumsretardierung)

K

Krm Kremen; Transmembranrezeptoren

L

l Liter

LDH Laktatdehydrogenase

LEF *lymphoid enhancer-binding factor*; Transkriptionsfaktor

LRP *low-density lipoprotein receptor-related protein*; zellulärer Membranrezeptor

M

µl Mikroliter

M Mitte (der Plazenta)

MAD mittlere arterielle Druck

mg Milligramm

ml Milliliter

mm³ Kubikmillimeter

mmHg Millimeter-Quecksilbersäule

mmol Millimol

mRNA *messenger* Ribonukleinsäure

N

N Stichprobenumfang

nm Nanometer

NS nicht signifikant

O

o.g. oben genannt

P

p p-Wert (Signifikanzwert)
P Phosphorylierung
PAPP-A *pregnancy-associated plasma protein A*
PCP *planar cell polarity*
PCR *Polymerase Chain Reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
PE Präeklampsie
PI Pulsatilitätsindex
PIGF *placental growth factor* (plazentarer Wachstumsfaktor)

R

R *rotation* (Umdrehung)
RF Risikofaktor
RIN *RNA Integrity Number*
Rn normalisiertes Reportersignal
RNA *ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
rpm *revolutions per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RR Riva-Rocci; Abkürzung für die Blutdruckmessung
RT Reverse Transkriptase
rt-PCR *real-time Polymerase Chain Reaction* (Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit)

S

s Sekunden
SAP Softwarekonzern (Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung)
sFlt-1 *soluble fms-like tyrosinkinase-1*
SGA *Small for Gestational Age*
SIH schwangerschaftsinduzierte Hypertonie
s.o. siehe oben
sPE schwere Präeklampsie
SSW Schwangerschaftswoche

s.u. siehe unten

T

TCF *T-cell-factor*; Transkriptionsfaktor

U

u.a. unter anderem

UKS Universitätsklinikum des Saarlandes

V

v.a. vor allem

vs. versus

VLDL *very-low-density-lipoprotein*

W

WHO Weltgesundheitsorganisation

Wnt *Wingless + Int-1*; Signalprotein

Z

Z.n. Zustand nach

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Entwicklung der verschiedenen extravillösen Trophoblasten-Subtypen und deren Funktion.....	- 10 -
Abbildung 2. Darstellung einer pathologisch verlaufenden Transformation der Spiralarterien bei gesunden Schwangeren im Vergleich zum Ablauf bei Präeklampsie	- 11 -
Abbildung 3. Darstellung des kanonischen, β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs.....	- 21 -
Abbildung 4. Beispielbilder einer Plazenta gewebeentnahme.....	- 33 -
Abbildung 5. Graphische Darstellung des „Sandwich-ELISA“-Verfahrens mit DKK1 als Antigen.....	- 35 -
Abbildung 6. Beispiel einer Bioanalyser-Messung von drei RNA-Proben einer gesunden Schwangeren.....	- 40 -
Abbildung 7. Beispiel einer Bioanalyser-Messung von drei RNA-Proben einer PE-Patientin.....	- 40 -
Abbildung 8. Zyklus einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 42 -
Abbildung 9. Ergebnisse einer rt-PCR zur Genanalyse.....	- 44 -
Abbildung 10. Altersverteilung.....	- 46 -
Abbildung 11. Vergleich der Gravität zwischen den gesunden Schwangeren und den Schwangeren mit Präeklampsie	- 50 -
Abbildung 12. Vergleich der Parität zwischen den gesunden Schwangeren und den Schwangeren mit Präeklampsie	- 50 -
Abbildung 13. DKK1-Serumkonzentration bei gesunden, nicht schwangeren Frauen und allen Schwangeren.....	- 53 -
Abbildung 14. DKK1-Serumkonzentration bei gesunden, nicht schwangeren Frauen, gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie.....	- 54 -
Abbildung 15. Subgruppenanalyse - DKK1-Serumkonzentration bei gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie.....	- 55 -
Abbildung 16. Korrelation zwischen DKK1-Serumkonzentration bei Schwangeren mit Präeklampsie und Vorhandensein von auf Präeklampsie-hinweisenden Symptomen.....	- 57 -
Abbildung 17. Korrelation zwischen DKK1-Serumkonzentration bei Schwangeren mit Präeklampsie und IUGR	- 58 -
Abbildung 18. Hämotoxylin-Eosin Plazentaschnitte verschiedener Stellen einer gesunden Schwangeren (SSW: 38+1).....	- 60 -
Abbildung 19. Hämotoxylin-Eosin Plazentaschnitte verschiedener Stellen einer Schwangeren mit Präeklampsie (SSW: 36+1).....	- 62 -
Abbildung 20. Genexpressionsniveaus von DKK1 in Plazenta gewebeproben.....	- 65 -
Abbildung 21. Genexpressionsniveaus von CTNNA1 in Plazenta gewebeproben.....	- 66 -

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Anamnestiche und schwangerschaftsspezifische Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie.....	- 8 -
Tabelle 2. Geeignete orale Antihypertensiva	- 16 -
Tabelle 3. Ungeeignete orale Antihypertensiva	- 16 -
Tabelle 4. Reagenzien.....	- 29 -
Tabelle 5. Kits.....	- 29 -
Tabelle 6. Lösungen.....	- 30 -
Tabelle 7. Verbrauchsmaterialien	- 30 -
Tabelle 8. Geräte	- 31 -
Tabelle 9. Software	- 31 -
Tabelle 10. Ergebnisse der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von zellulären Strukturen	- 36 -
Tabelle 11. Konditionen des <i>ThermoCyclers</i> bei der reversen Transkription der RNA	- 41 -
Tabelle 12. <i>TaqMan Gene Expression Assays</i> für die quantitative rt-PCR.....	- 43 -
Tabelle 13. Gesunde Schwangere vs. Präeklampsie - Klinische Charakteristika	- 48 -
Tabelle 14. Gesunde Schwangere vs. Präeklampsie - Laborparameter.....	- 52 -

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Zusammenfassung

Titel: Vergleich der maternalen Serumspiegel von DKK1 und die Expression von DKK1 und β -Catenin in der Plazenta bei präeklampsischen und normalen Schwangerschaften

Theoretischer Hintergrund: Präeklampsie zählt zur Gruppe der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen und stellt weltweit eine Hauptursache für maternale und fetale Mortalität und Morbidität dar. Trotz vieler bereits durchgeführter Studien, die die Pathogenese der Präeklampsie zu erklären versuchen, bleibt die genaue Ursache der Erkrankung weiterhin unklar. Der kanonische, β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg ist eine Signaltransduktionskaskade, die nachweislich maßgeblich an der Invasion und Migration von Trophoblasten beteiligt ist. Dickkopf-1 (DKK1) fungiert als spezifischer Antagonist des Wnt-Signalwegs, indem es die Expression von β -Catenin hemmt und die Signaltransduktion blockiert. Über die Rolle dieses Signalwegs bei Präeklampsie ist bisher wenig bekannt.

Zielsetzung: In der folgenden Studie soll untersucht werden, inwieweit der kanonische, β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg und dessen Mediatoren DKK1 und β -Catenin in der Pathogenese der Präeklampsie involviert sind und ob Serum-DKK1 als Biomarker zur Vorhersage einer Präeklampsie geeignet sein könnte.

Methoden: In dem Zeitraum von 2014 bis 2016 wurden insgesamt $N = 90$ Frauen zwischen 28 und 42 Jahren in die vorliegende prospektive Kohortenstudie eingeschlossen, darunter 30 gesunde, nicht schwangere Frauen, 30 Frauen mit normaler Schwangerschaft zwischen der 37+1 und 39+4 SSW und 30 Frauen mit präeklampsischer Schwangerschaft zwischen der 26+4 und 40+2 SSW. Ziel dieser Arbeit war es, die Serumspiegel des DKK1-Proteins bei gesunden, nicht schwangeren Frauen, gesunden Schwangeren und präeklampsischen Schwangeren bzw. die plazentare Transkription von DKK1- und β -Catenin-Genen sowohl in der normalen als auch in der präeklampsischen Schwangerschaft zu bestimmen. Pro Schwangere erfolgte direkt pränatal eine venöse Blutentnahme und direkt postnatal wurden jeweils fünf Plazentaprobe entnommen. Die Blutentnahme der nicht schwangeren Frauen erfolgte im Rahmen von Routinebesuchen in unserer Klinik. Die DKK1-Serumspiegel wurden mittels ELISA gemessen. Die plazentare Transkription von DKK1- und β -Catenin-Genen wurde mittels Real-Time-PCR nachgewiesen. Ferner erfolgte die Anfertigung von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Plazentabiopsien von fünf Präeklampsie-Patientinnen und fünf Kontrollprobandinnen. Die Daten wurden mithilfe der SPSS Software Version 21 analysiert und ausgewertet.

Ergebnisse: Die Serumspiegel von DKK1 waren in der Gruppe der normalen Schwangerschaft sowie in der Gruppe der präeklampsischen Schwangerschaft im Vergleich zur Gruppe der gesunden, nicht

schwangeren Frauen signifikant erhöht (Median [Spannweite]: 2403 [1070-4717] pg/ml bzw. 2321 [985-4161] pg/ml vs. 1971 [1073-2637] pg/ml; $p=0.001$ bzw. $p=0.006$). Es wurden keine Unterschiede zwischen den zwei Gruppen der schwangeren Frauen berichtet. Bei den präeklampsischen Schwangeren waren erniedrigte DKK1-Spiegel mit der Anwesenheit von auf Präeklampsie-hinweisenden Symptomen (Median [Spannweite]: 2020 [985-2872] pg/ml vs. 2430 [2267-4161] pg/ml; $p=0.012$) und einer intrauterinen Wachstumsretardierung (Median [Spannweite]: 1884 [985-2872] pg/ml vs. 2377 [1764-4161] pg/ml; $p=0.048$) verbunden. Auf mRNA-Ebene waren die Plazenta-Genexpressionsniveaus von DKK1 in der Gruppe der präeklampsischen Schwangerschaft im Vergleich zur Gruppe der normalen Schwangerschaft signifikant verringert (Median [Spannweite]: ΔC_t : 6,3 [3,5-7,7] vs. 5,4 [2,7-7,5]; $p=0.029$). Die Plazenta-Genexpressionsniveaus von β -Catenin zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied.

Diskussion: Aberrante Wnt/ β -Catenin-Signale könnten einen plausiblen Mechanismus für die Pathogenität der Präeklampsie darstellen. Eine dysregulierte Expression von DKK1 auf Genebene in der Plazenta, jedoch nicht auf Proteinebene im maternalen Serum könnte die Annahme bestätigen, dass die Ursache der Präeklampsie in einem plazentaren Ursprung liegt. Bei sowohl dysregulierter Expression von DKK1 auf Gen- und Proteinebene könnte über die Verwendung von DKK1 im Serum als Screening-Parameter diskutiert werden, um die Erkrankung frühzeitig detektieren und behandeln zu können.

1.2 Abstract

Title: Comparison of the maternal serum levels of DKK1 and the expression of DKK1 and β -catenin in the placenta in preeclamptic and normal pregnancies

Background: Preeclampsia belongs to the group of hypertensive gestational diseases and continues to be a major cause of maternal and fetal mortality and morbidity worldwide. Despite many studies that have already been carried out to explain the pathogenesis of preeclampsia, the exact cause of the disease remains unclear. The canonical, β -catenin-dependent Wnt signaling pathway is a signal transduction cascade that has been shown to be critically involved in the invasion and migration of trophoblasts. Dickkopf-1 (DKK1) acts as a specific antagonist of the Wnt signaling pathway by inhibiting the expression of β -catenin and blocking signal transduction. Little is known about the role of this pathway in preeclampsia.

Purpose: The following study aims to investigate to what extent the canonical, β -catenin-dependent Wnt signaling pathway and its mediators DKK1 and β -catenin are involved in the pathogenesis of preeclampsia and whether serum DKK1 could be suitable as a biomarker for predicting preeclampsia.

Methods: In the period from 2014 to 2016 a total of $N = 90$ women between 28 and 42 years were included in the present prospective cohort study, including 30 healthy, non-pregnant women, 30 women with normal pregnancy between 37+1 and 39+4 weeks and 30 women with preeclamptic pregnancy between 26+4 and 40+2 weeks. The aim of this work was to determine the serum levels of the DKK1 protein in healthy, non-pregnant women, healthy pregnant women and preeclamptic pregnant women and the placental transcription of DKK1 and β -catenin genes in normal as well as in preeclamptic pregnancy. A venous blood sample was taken prenatally from each pregnant woman and five placenta samples were taken immediately postnatally. The blood drawn from the non-pregnant women was carried out as part of routine visits to our clinic. DKK1 serum protein levels were measured by ELISA. The placental transcription of DKK1 and β -catenin genes was detected using real-time PCR. In addition, hematoxylin-eosin stains were made of placenta biopsies from five preeclampsia patients and five control subjects. The data were analyzed and evaluated using SPSS software version 21.

Results: Serum levels of DKK1 were significantly increased in the normal pregnancy group and in the preeclamptic pregnancy group compared to the group of healthy, non-pregnant women (mean [range]: 2403 [1070-4717] pg/ml respectively 2321 [985-4161] pg/ml vs. 1971 [1073-2637] pg/ml; $p = 0.001$ respectively $p = 0.006$). No differences were reported between the two groups of pregnant women. However, within preeclampsia cases, decreased Dkk1 levels were associated with the presence of symptoms suggestive of preeclampsia (mean [range]: 2020 [985-2872] pg/ml vs. 2430 [2267-4161] pg/ml; $p = 0.012$) and intrauterine growth restriction (mean [range]: 1884 [985-2872] pg/ml vs. 2377 [1764-4161] pg/ml; $p = 0.048$). On mRNA level, DKK1 gene transcripts were significantly reduced in

placenta tissues from preeclampsia cases compared with those in normal pregnancy cases (mean [range]: ΔC_t : 6,3 [3,5-7,7] vs. 5,4 [2,7-7,5]; $p = 0.029$). β -catenin gene transcripts showed no significant difference.

Discussion: Aberrant Wnt/ β -catenin signals might present a plausible mechanism in preeclampsia pathogenicity. Dysregulated expression of DKK1 at gene level in the placenta, but not at protein level in the maternal serum, could confirm the assumption that the cause of preeclampsia is of a placental origin. With both dysregulated expression of DKK1 at gene and protein level, the use of serum DKK1 as a screening parameter could be discussed in order to be able to detect and treat the disease at an early stage.

2 EINLEITUNG

2.1 Präeklampsie

2.1.1 Epidemiologie und Komplikationen

Präeklampsie (PE) ist eine Multisystemerkrankung, die zur Gruppe der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen gehört. Die hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen treten weltweit in 6-8% aller Schwangerschaften auf und zählen mit 20-25% zu den Hauptursachen perinataler Mortalität. Die Präeklampsie nimmt darunter eine Sonderstellung ein, da die Präeklampsie, oder die als Komplikation gefürchtete Eklampsie, mit 10-15% dieser Todesfälle assoziiert sind (Stephan et al., 2005). In den westlichen Ländern stehen die hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen mit ca. 16% sogar an erster Stelle der maternalen Todesursachen, wohingegen in den Entwicklungsländern die meisten Mütter an postpartalen Blutungen versterben (Lo et al., 2013). Allerdings ist hervorzuheben, dass die perinatale Sterblichkeitsrate in den Entwicklungsländern im Vergleich zu den Industrienationen deutlich höher ist, sodass nach einer Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die absolute Anzahl der mit hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen in Zusammenhang stehenden Todesfälle annähernd gleich hoch ist (Khan et al., 2006). Daher ist den hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen sowohl in den Industrienationen als auch in den Entwicklungsländern eine hohe Bedeutung beizumessen. Besonderes Augenmerk ist neben der maternalen Mortalität auf die maternale Morbidität zu legen. Viele Studien betonen den Zusammenhang zwischen hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen und anderen chronischen Krankheiten. Präeklampsie kann einerseits kardiovaskuläre Ereignisse wie einen chronischen Hypertonus, einen Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall triggern. Nach Wu und Kollegen ist die Präeklampsie mit einem 4-fachen Anstieg einer künftig auftretenden Herzinsuffizienz und einem 2-fach erhöhten Risiko für koronare Herzkrankheiten, Schlaganfälle und Todesfälle aufgrund von koronaren Herz- oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen verbunden (Wu et al., 2017). Darüber hinaus kann es zu Problemen in multiplen anderen Organen wie Leber oder Nieren kommen. Einer jüngsten Studie zufolge haben Frauen mit Präeklampsie ein 5-fach erhöhtes Risiko für eine chronische Nierenerkrankung im Vergleich zu gesunden Schwangeren (Khashan et al., 2019). Ebenso haben Frauen mit Präeklampsie ein höheres Risiko postpartal an Diabetes mellitus zu erkranken, selbst wenn kein Gestationsdiabetes vorlag (Carr et al., 2009). Seltener, aber dafür umso gravierender, ist das Auftreten einer Eklampsie, eines HELLP-Syndroms (Hämolyse, Anstieg der Leberwerte, Thrombozytopenie) oder einer DIC (Disseminierte intravasale Koagulopathie) (MacKay et al., 2001).

Des Weiteren bestehen erhöhte Risiken für das ungeborene Kind. Am häufigsten zeigen sich eine IUGR (Intrauterine Wachstumsretardierung) sowie eine Frühgeburtlichkeit (Meads et al., 2008). Solche Kinder betroffener präeklampsischer Mütter weisen eine unterdurchschnittliche Geburtsgröße auf und

entwickeln im Erwachsenenalter häufiger Bluthochdruck und Diabetes mellitus. Die Auftretenswahrscheinlichkeit von Schlaganfällen und koronaren Herzkrankheiten ist erhöht (Barker, 2006; Crispi et al., 2018).

2.1.2 Definition

Die folgenden Diagnosekriterien der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen richten sich nach den AWMF-Leitlinien von 2019 (Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019):

- Gestationshypertonie: Neu auftretende Blutdruckwerte ≥ 140 mmHg systolisch und ≥ 90 mmHg diastolisch nach der abgeschlossenen 20. Schwangerschaftswoche (SSW) bei einer zuvor normotensiven Schwangeren. Kriterien für das Vorliegen einer Präeklampsie finden sich nicht (s.u.). Der Bluthochdruck bildet sich innerhalb von 12 Wochen post partum zurück.
- Präeklampsie: (Vorbestehender) Bluthochdruck $\geq 140/90$ mmHg in der Schwangerschaft mit:
 - mindestens einer neu aufgetretenen Organmanifestation
 - oder pathologischen angio- und antiangiogenetischen Markern im Serum (u.a. PlGF [*Placental Growth Factor*], VEGF [*Vascular Endothelial Growth Factor*], sFlt-1 [*Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1*] und PAPP-A [*Pregnancy-associated plasma protein A*]).

Meistens betrifft die Organmanifestation die Niere, die laborchemisch als Proteinurie nachweisbar ist. Die Proteinurie ist definiert als Nachweis einer Proteinausscheidung von ≥ 300 mg/24h im 24h-Sammelurin oder ≥ 30 mg/mmol Protein-Kreatinin-Ratio im Spontanurin. Bei Abwesenheit einer Proteinurie ist von einer Präeklampsie auszugehen, wenn es neben der Hypertonie zu einer neuen Funktionseinschränkung in einem der folgenden Organe kommt: Leber, respiratorisches System, hämatologisches System, Plazenta (SGA/IUGR) oder zentrales Nervensystem. Darüber hinaus wird eine Präeklampsie auch ohne Vorhandensein von Organmanifestationen diagnostiziert, wenn zusätzlich zur Hypertonie pathologische Befunde der angio- bzw. antiangiogenetischen Marker bestehen (s.o.).

Es wird weiterhin zwischen frühaufretender (*early-onset*; Manifestation < 34 . SSW) und spätaufretender (*late-onset*; Manifestation ≥ 34 . SSW) PE unterschieden.

Des Weiteren grenzt man von der milden Präeklampsie die schwere Präeklampsie (sPE) ab, die bei Bestehen von mindestens einem der folgenden Kriterien diagnostiziert werden kann:

- Blutdruck $\geq 160/110$ mmHg
- Nierenfunktionsminderung (Serumkreatinin > 80 $\mu\text{mol/l}$) oder Oligurie (< 500 ml/24h)

- Leberbeeinträchtigung (Transaminasenanstieg, Oberbauchschmerzen)
 - Lungenödem
 - Störungen im hämatologischen System (Thrombozytopenie < 100 Gpt/l, Hämolyse)
 - Neurologische Auffälligkeiten (starke Kopfschmerzen, Augenflimmern)
 - IUGR
 - fetales Schätzwicht $< 10.$ Perzentile und/oder nicht Perzentilen-gerechtes Wachstum im Verlauf und
 - pathologische Dopplersonographie der A. umbilicalis oder der Aa. uterinae oder Nachweis eines Oligohydramnions
- Chronische Hypertonie: Bereits vor der Schwangerschaft bestehende oder in der ersten Schwangerschaftshälfte ($< 20.$ SSW) diagnostizierte Hypertonie mit Blutdruckwerten ≥ 140 mmHg systolisch und ≥ 90 mmHg diastolisch. Eine chronische Hypertonie liegt auch dann vor, wenn eine erstmals in der Schwangerschaft manifestierende Hypertonie nach der Entbindung länger als 6 Wochen fortbesteht.
 - Eklampsie: Auf dem Boden einer Präeklampsie auftretende tonisch-klonische Krampfereignisse, die auf keine andere Ursache zurückzuführen sind. Das Vorbestehen von Hypertonie und Proteinurie ist hierbei nicht obligat.
 - HELLP-Syndrom: Eine Komplikation der Präeklampsie, bei der die Patientinnen die laborchemischen Trias Hämolyse (H \rightarrow *hemolysis*), erhöhte Leberwerte (EL \rightarrow *elevated liver enzymes*) und Thrombozytopenie < 100 Gpt/l (LP \rightarrow *low platelets*) zeigen. Auch in diesem Fall können Hypertonie und Proteinurie als Symptome fehlen.

2.1.3 Risikofaktoren und Wiederholungsrisiko

Präeklampsie tritt bei 25% der Schwangerschaften bei Frauen mit chronischem Hypertonus auf. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer Niereninsuffizienz, Bestehen der Hypertonie seit mindestens vier Jahren oder Zustand nach chronischem Hypertonus in einer früheren Schwangerschaft, ist die prozentuale Rate noch höher (Gifford et al., 2000).

Das Wiederholungsrisiko und die Prognose sind in erster Linie abhängig vom Gestationsalter bei der Entbindung sowie vom BMI in der Schwangerschaft (Mostello et al., 2008). Präeklampsie in einer früheren Schwangerschaft fungiert hierbei als der größte Risikofaktor für die Entwicklung einer Präeklampsie in der Folgeschwangerschaft, wobei das Risiko bei ungefähr 15% liegt. Bei zwei stattgehabten Präeklampsien verdoppelt sich in etwa das Risiko auf 32% (Hernández-Díaz et al., 2009).

Bei Frühgeburten vor der 34. SSW und schwerer PE liegt das Risiko einer erneuten Präeklampsie sogar bei 25%, bei Geburten vor der 28. SSW bei 55% (National Guideline Alliance, 2011). Bei Nullipara mit PE besteht ein bis zu 40%iges Risiko in späteren Schwangerschaften wieder an einem Hypertonus zu erkranken; Multipara und Frauen mit *early-onset* PE zeigen sogar noch höhere prozentuale Raten (Gifford et al., 2000). Eine mögliche Erklärung für das Wiederholungsrisiko könnte auf die unzureichende Regeneration des mütterlichen Herz-Kreislauf-Systems nach vorangegangener Präeklampsie zurückzuführen sein, da das kardiovaskuläre Profil bei Frauen mit rezidivierenden Präeklampsien schlechter zu sein scheint. Im Falle einer Unterversorgung der uteroplazentaren Einheit durch das mütterliche Herz-Kreislauf-System kann eine Hypoperfusion der Plazenta zu fetalen Wachstumsstörungen und/oder mütterlicher Hypertonie führen, was wiederum das Entstehen einer Präeklampsie begünstigt (Thilaganathan und Kalafat, 2019). Eine Eklampsie kann sich zu 38-53% pränatal, zu 18-36% unter der Geburt und zu 11-44% postnatal entwickeln. Bei vorangegangener Eklampsie beträgt das Wiederholungsrisiko in der Folgeschwangerschaft 2-16%, das Risiko eine Präeklampsie zu entwickeln liegt sogar bei 22-35% (Sibai, 2005).

Nach den AWMF-Leitlinien von 2019 stellen folgende, in Tabelle 1 aufgeführte, anamnestische und schwangerschaftsspezifische Risikofaktoren (RF) eine prognostische Gefahr für die Entstehung einer Präeklampsie dar (Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019):

Tabelle 1. Anamnestische und schwangerschaftsspezifische Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie

Risikofaktoren (RF)	Relatives Risiko
Antiphospholipid-Syndrom	9
Z.n. Präeklampsie	7
BMI > 30 kg/m ²	3-5
Vorbestehender Diabetes mellitus	3,5
Familiäre Belastung	3
Vorbestehende Nierenerkrankung	3
Erstparität	2,5-3
Alter > 40 Jahre	2
Mehrlingsschwangerschaft	3
Chronische Hypertonie	
• Mit 1 zusätzlichem RF	1,55
• Mit 2 zusätzlichen RF	3
• RR diastolisch > 110 mmHg (< 20 Wochen)	3,2
Autoimmunerkrankungen	7-9,7
Ethnizität (afroamerikanisch)	2

Quelle: AWMF-Leitlinien (Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019)

2.1.4 Pathogenese

Trotz vieler bereits durchgeführter Studien, die die Pathogenese der Präeklampsie zu erklären versuchen, bleibt die genaue Ursache der Erkrankung weiterhin unklar. Da die Präeklampsie eine schwangerschaftsspezifische Erkrankung ist und die Symptome in der Regel nach der Entbindung rückläufig sind, wird ein plazentarer Zusammenhang angenommen (Uzan et al., 2011). Ferner tritt die Erkrankung auch bei Blasenmolen unter Abwesenheit des Fetus auf, was die pathogenetische Annahme stützt (Chun et al., 1964). Die placentare Dysfunktion scheint dabei den klinischen Manifestationen voranzugehen (Pennington et al., 2012).

Während der Schwangerschaft bedarf es einer hämodynamischen und endothelialen Anpassung der Plazenta an die notwendige steigende Blutzufuhr zum Embryo. Dieser Vorgang wird als Plazentation bezeichnet. Histologisch betrachtet setzt sich die Plazenta aus Trophoblasten als Primärzelltypen zusammen. Im ersten Trimester (1. bis 13. SSW) kolonisieren die extravillösen, embryonalen Trophoblasten das innere Myometriumsdrittel, was man als interstitielle Invasion bezeichnet. Nahezu zeitgleich kommt es zum Einfall von endovaskulären Trophoblasten in die Wand der uterinen Spiralarterien, wodurch die elastischen, muskulären und neuralen Gewebsanteile der Gefäßmedia zunehmend zerstört werden. Die endovaskulären Trophoblasten werden im Sinne einer Endothelrekonstruktion in die Gefäßwand eingebaut. Am Ende des zweiten Trimenons (14. bis 27. SSW) ist die Konversion der Spiralarterien in uteroplazentare Arterien abgeschlossen. Durch diesen als *Remodelling* bezeichneten Vorgang werden die Arterien zu Niedrigwiderstandsgefäßen und sind weniger sensitiv für vasokonstriktive Einflüsse. Die für die Versorgung des Embryos notwendige Erhöhung der Blutzufuhr kann somit durch Vasodilatation gewährleistet werden (Robertson et al., 1975; Pijnenborg et al., 1991; Gilbert et al., 2008). Die Invasion extravillöser Trophoblast-Zelltypen in das maternale Uterusgewebe scheint somit für die erfolgreiche Entwicklung der menschlichen Plazenta und das Fortschreiten der Schwangerschaft von wesentlicher Bedeutung zu sein (Knöfler und Pollheimer, 2012).

In Abbildung 1 ist die Entwicklung der verschiedenen Untergruppen der extravillösen Trophoblasten und deren Funktion schematisch dargestellt.

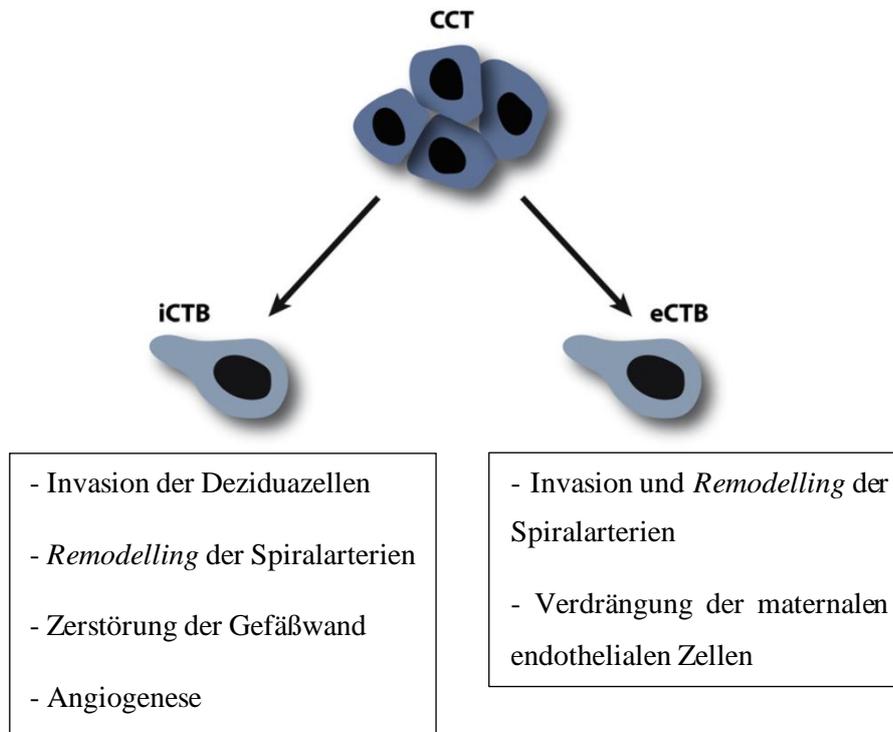


Abbildung 1. Entwicklung der verschiedenen extravillösen Trophoblasten-Subtypen und deren Funktion

Die Vorläuferzellen befinden sich an der Basalmembran in Form von Zellhaufen (*cell column trophoblast*, CCT). Aus diesen entwickeln sich die interstitiellen Zytotrophoblasten (iCTB), die in die Uterusdezidua eindringen, und die endovaskulären Zytotrophoblasten (eCTB), die in die maternalen Spiralarterien einwandern. Quelle: In Anlehnung an Knöfler und Pollheimer, 2012

Bei der Präeklampsie gehen bisherige Studien von einer plazentaren Dysregulation als Ursache der Erkrankung aus (Tallarek et al., 2012). Obwohl die dafür histologischen Korrelate bereits im 1. Trimenon entstehen, treten die daraus resultierenden klinischen Symptome und pathologischen Laborwerte erst nach einer gewissen zeitlichen Latenz in Erscheinung, was die Frühdiagnostik einer PE erschwert (Pennington et al., 2012).

Eine limitierte oder sogar ausbleibende Invasion der Spiralarterien führt zu einem verringerten *Remodelling* um 30-50%. Die Trophoblasten erreichen zwar die Dezidua, dringen jedoch nicht bis in das Myometrium vor. Durch die pathologisch verlaufende Transformation der Spiralarterien bleibt der Widerstand in den Gefäßen hoch. Sie sind sensitiver für vasokonstriktive Einflüsse mit geringerer Möglichkeit zur Dilatation. Dies führt einerseits zu einem reduzierten Blutfluss zum Kind und andererseits zu einer eingeschränkten uteroplazentaren Perfusion mit der Folge einer Plazentaischämie. Schwerwiegende maternale und fetale Komplikationen können die Folge sein (Robertson, 1976; Gilbert et al., 2008).

Dekker und Sibai (1998) gehen von einer multifaktoriellen Genese der gestörten Plazentation aus. Die Autoren ziehen diesbezüglich vier Hypothesen in Betracht, die nicht für sich alleine stehen, sondern vielmehr miteinander interagieren. Neben der Plazentaischämie verweisen sie auf die schädigenden toxischen Effekte durch ansteigendes VLDL (*very-low-density-lipoprotein*), eine Maladaptation des Immunsystems sowie eine mögliche genetische Prägung. Andere Arbeiten hingegen postulieren, dass der Endothelschaden die Crux der Multisystemerkrankung darstellt und ein Missverhältnis zwischen vasokonstriktorisches (Thromboxan) und vasodilatatorischen (Prostacyclin) Faktoren bewirkt. Die Folgen sind eine verminderte uteroplazentare Perfusion sowie Vasospasmen (Duley, 2003; Bujold et al., 2009). Es bleibt ungewiss, ob die Ursache der Präeklampsie eine ischämische und minderperfundierte Plazenta oder eine unangemessene maternale Inflammationsreaktion ist (Sibai et al., 2005). In jüngeren Studien wird auch der Zusammenhang zwischen Präeklampsie und dem Wnt-Signalweg als möglicher Grund der Erkrankung diskutiert, was Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

2.1.4.1 Histopathologische Veränderungen in der Plazenta

Bereits viele Studien beschäftigten sich mit der Frage, ob pathognomonische histologische Veränderungen in der Plazenta bei einer schwangerschaftsinduzierten Hypertonie (SIH), wozu auch die Präeklampsie zählt, existieren. Grundsätzlich sind bei plazentaren Untersuchungen von durch Präeklampsie-komplizierten Schwangerschaften histopathologische Befunde nachweisbar, allerdings sind diese nicht obligat. Falls Plazentabefunde vorhanden sind, können diese die Diagnose einer Präeklampsie bestätigen; eine Abwesenheit von histopathologischen Ereignissen schließt hingegen die Diagnose nicht aus (Roberts und Post, 2008).

Nach Beargen et al. (2005) bestehen prinzipiell fünf plazentare histopathologische Veränderungen bei einer SIH. Am häufigsten traten in der o.g. Studie Plazentainfarkte auf. Mikroskopisch fallen diese durch einen Kollaps der Gefäße und den Verlust des intervillösen Raumes auf. Der prozentuale Anteil der Infarkte an der Masse des involvierten Plazentagewebes soll von großer Bedeutung für das fetale Outcome sein. Daneben imponierten deziduale Gefäßveränderungen im Sinne einer (akuten) Atherosis, deziduale Gefäßthrombosen und eine deziduale Vaskulitis. Diese sind Folge der unzureichenden physiologischen Umwandlung der Spiralarterien durch nur oberflächliche Trophoblasteninvasion. Darüber hinaus ergaben sich histopathologische Korrelate der vorzeitigen Plazentalösung, die als häufigste prädisponierende Ursache der Präeklampsie angesehen wird. Gefäßläsionen und Nekrosen führen zu arteriellen und venösen Blutungen, die letztendlich über ein retroplazentares Hämatom in einem Plazentainfarkt münden. Ebenso dient das gehäufte Vorkommen von Kernknospung als Indikator für eine plazentare Ischämie und ist hinweisend auf eine villöse Fehlentwicklung. Wenn mehr als 30% der Endzotten Kernknospung aufzeigen, vor allem in der frühreifen Plazenta, gilt dies als ein diagnostisches Kriterium für eine Durchblutungsgefährdung. Ferner ist die Plazenta bei einer schwangerschaftsinduzierten Hypertonie bezogen auf das Gestationsalter kleiner und trockener.

Die Autoren der Studie betonen jedoch deutlich, dass diese o.g. pathologischen Gewebsveränderungen nicht pathognomonisch für Präeklampsie sind, sondern nur ein Indiz für eine abnormale uteroplazentare Perfusion sein können. Darüber hinaus korrelieren die pathologischen Untersuchungen von präeklampsischen Plazentagewebe nicht verlässlich mit den klinischen Manifestationen. Somit scheint die plazentare Untersuchung nur bei einem Teil der Biopsien zur Untermauerung der klinischen Symptome hilfreich zu sein.

Zhang et al. (2006) fanden heraus, dass die schwangerschaftsinduzierte Hypertonie eher eine funktionelle Erkrankung des mütterlichen Gefäßsystems als eine organische (plazentare) Veränderung ist, die durch die Schwangerschaft induziert wird. Die schwangerschaftsinduzierte Hypertonie beruht auf einer Schwächung des mütterlichen Zirkulationssystems, die aber nicht als histologisches Korrelat in der Plazenta nachzuweisen ist. Die Autoren folgerten, dass einerseits die SIH nicht allein durch eine histologische Begutachtung der Plazenta diagnostiziert werden kann. Andererseits können histologische Untersuchungen der Plazenten von Patientinnen mit SIH zumindest einen Hinweis auf die klinische Erkrankung ergeben.

2.1.5 Diagnostik und Screening

Die frühzeitige Identifizierung von schwangeren Frauen mit einem erhöhten Präeklampsie-Risiko ist äußerst wichtig, stellt aber eine große Herausforderung dar. Trotz zunehmender Bemühungen und intensiver Forschung wurden nur geringe Verbesserungen in den Vorhersagemethoden der Erkrankung geschaffen (Sibai et al., 2005). Bisher existiert noch kein alleiniger Test zur Früherkennung einer Präeklampsie, sodass auf eine Kombination mehrerer Methoden zurückgegriffen wird. Die unspezifische Grunddiagnostik bei Schwangeren impliziert eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung mit Eruiierung potenzieller Risikofaktoren, Blutdruckmessung (MAD = Mittlerer arterieller Druck), Messung der 24h-Eiweißausscheidung im Urin und Laborparameter (Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019). Als Screeningmethoden haben sich biophysikalische und biochemische Verfahren etabliert.

Die Dopplersonographie der Aa. uterinae zählt zu den biophysikalischen Verfahren, die bei Risikoschwangerschaften Anwendung findet. Bestehen eines bilateralen *Notches* (postsystolische Inzisur) ≥ 24 SSW und/oder ein erhöhter Pulsatilitätsindex (PI) können Ausdruck einer Minderperfusion der Plazenta und somit hinweisend auf eine drohende Präeklampsie sein (Cnossen et al., 2008). Darüber hinaus bietet die Ultraschalluntersuchung eine pränatale Überwachungsmöglichkeit des Fetus (Fetometrie) und unterstützt bei pathologischen Ergebnissen die postnatale Planung (Sibai et al., 2003). Regelmäßig werden hierbei sonographisch der biparietale Durchmesser, der Kopfumfang, der Abdomenumfang und die Femurlänge des Fetus bestimmt, welche zur Abschätzung des fetalen Gewichtes dienen. Liegt das sonographisch geschätzte Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile, besteht definitionsgemäß eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR). Die

Dopplersonographie der Aa. uterinae scheint sogar aussagekräftiger zur Identifizierung einer schweren *early-onset* Präeklampsie zu sein, wenn gleichzeitig eine IUGR vorliegt (Yu et al., 2008). Zu beachten ist jedoch, dass die Ultraschalldiagnostik aufgrund der subjektiven Beurteilbarkeit des Untersuchers mit einer hohen Fehlerquote behaftet ist (Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019).

Zu den biochemischen Screeningmethoden, die v.a. im ersten Trimenon herangezogen werden, zählen u.a. die Bestimmung der sFlt-1/PlGF-Ratio sowie PAPP-A im mütterlichen Serum. sFlt-1 (*soluble fms-like tyrosinkinase-1*) und PlGF (*placental growth factor*) sind zwei auf die Angiogenese einwirkende Gegenspieler, die bei pathologischen Dopplerwerten laborchemisch bestimmt werden können und eine prognostische Wertigkeit besitzen (Rana et al., 2012). Steigende sFlt-1-Level bei gleichzeitig sinkenden PlGF-Level können die anschließende Entwicklung einer Präeklampsie voraussagen (Levine et al., 2004). So zeigen Präeklampsie-Patientinnen eine erhöhte sFlt-1/PlGF-Ratio im Vergleich zu gesunden Schwangeren und Patientinnen mit chronischer Hypertonie oder Gestationshypertonie (Verlohren et al., 2012). In der multizentrisch angelegten PROGNOSIS-Studie (*Prediction of Short-Term Outcome in Pregnant Women with Suspected Preeclampsia Study*), in der 1270 Schwangere zwischen der 24. und 36. SSW eingeschlossen wurden, konnte eine sFlt-1/PlGF-Ratio ≤ 38 mit einem negativen Vorhersagewert von 99,3% die Entwicklung einer Präeklampsie in den kommenden Wochen sicher ausschließen. Ein Quotient > 38 hingegen konnte das Auftreten einer Präeklampsie in den kommenden vier Wochen mit einem positiven Vorhersagewert von 36,7% voraussagen. Durch die Bestimmung der sFlt-1/PlGF-Ratio als zusätzliche Screeningmethode neben der Messung des Blutdrucks und der Proteinurie konnten unnötige Krankenhausaufenthalte um 50% verringert werden (Zeisler et al., 2016). PAPP-A (*pregnancy-associated plasma protein A*) ist ein weiterer mütterlicher Serumparameter, der eine frühe Prädiktion einer Präeklampsie und einer IUGR ermöglicht (Smith et al., 2002; Ranta et al., 2011). PAPP-A wird von den Trophoblasten produziert und fungiert als *Insulin-like growth factor* (IGF)-bindende Protein 4-Protease (Lawrence et al., 1999). Physiologisch steigt der PAPP-A-Wert in der Schwangerschaft an und sinkt nach der Entbindung wieder ab. Ein niedriger Serumspiegel von PAPP-A im ersten Trimenon scheint negative Auswirkungen auf Mutter und Kind zu haben (Spencer et al., 2008).

Auf der Basis einer Kombination aus anamnestischen, biophysikalischen und biochemischen Parametern wurde ein Algorithmus zur Risikobestimmung einer frühen Präeklampsie (12. bis 14. SSW) entwickelt. Die durch das Screening ermittelte Detektionsrate für eine *early-onset* Präeklampsie lag bei 91%; die für eine *late-onset* PE lag mit 60,9% deutlich geringer (Akolekar et al., 2011). Auch Eldeen Y Elkholi et al. (2016) berichteten mit einer Treffsicherheit von $\geq 87\%$ über eine reliable Vorhersagemöglichkeit der Erkrankung durch eine Kombination aus biophysikalischen Screeningverfahren und der Bestimmung von PlGF. Birdir et al. (2015) ermittelten sogar eine 96%ige Detektionsrate für eine PE vor der 34. SSW mittels einer Kombination aus Anamnese, A. uterina-PI,

MAD, PAPP-A und PIGF. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von O’Gorman et al. (2016), in der die Kombination von A.uterina-PI, MAD, PAPP-A und PIGF eine Vorhersagerate von 75% bzw. 88% im Falle einer Präeklampsie mit Notwendigkeit der Entbindung vor der 37. bzw. 34. SSW ergab.

Weitere biochemische Prädiktionsparameter sind Gegenstand aktueller Studien. Die AWMF-Leitlinien empfehlen jedoch bis dato eine Kombination mehrerer diagnostischer Methoden, da der prädiktive Wert der einzelnen biophysikalischen und biochemischen Verfahren gering ist (Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019).

2.1.6 Prävention

Als einzige wirksame Prävention gilt die Einnahme von 150 mg Acetylsalicylsäure (ASS) täglich bei Frauen mit einem hohen Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie. Niedrigdosiertes Aspirin führt zu einer Hemmung der Thromboxan A₂-Biosynthese in der Plazenta und bewirkt somit ein verändertes Thromboxan A₂/Prostacyclin-Verhältnis zugunsten des vasodilatativ-fungierenden Prostacyclins (Clarke et al., 1991). Die Einnahme sollte bis zur 16. SSW begonnen und bis zur 36. SSW fortgeführt werden (Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019). Zu den Hochrisikoschwangerschaften zählen folgende anamnestische und schwangerschaftsspezifische Angaben: Hypertension in der Vorschwangerschaft, chronische Nierenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Diabetes mellitus Typ 1 und 2 und chronischer Hypertonus (Bujold, 2010). Die ASPRE-Studie von 2017 (*Aspirin for Evidence-Based Preeclampsia Prevention*) bekräftigte diese Präventionsmaßnahme. Die Studie zielte darauf ab, den Effekt von Aspirin auf die Inzidenz von Präeklampsie zu überprüfen. Die Screening-Methode zur Risikobewertung und somit Indikationsstellung einer prophylaktischen ASS-Therapie beinhaltete neben mütterlichen Risikofaktoren biophysikalische Parameter (MAD und Pulsatilitätsindex der A. uterina) sowie Biomarker (PIGF und PAPP-A). Frauen mit Hochrisikoschwangerschaften erhielten ab der 11. bzw. 14. SSW bis hin zur 36. SSW 150 mg ASS pro Tag. Die Untersucher fanden heraus, dass hierdurch die Inzidenz der Präeklampsie < 37. SSW im Vergleich zur Kontrollgruppe um 63% gesenkt werden konnte. Es wurde allerdings kein signifikanter Effekt bezüglich des Auftretens einer *term* PE (Gestationsalter \geq 37. SSW) berichtet (Rolnik et al., 2017).

2.1.7 Therapie

Die Behandlungsindikation der Präeklampsie richtet sich nach dem fetalen Gestationsalter, dem mütterlichen und fetalen Status und den Laborbefunden (Sibai et al., 2005). Eine antihypertensive Therapie bei Schwangeren ist bei persistierenden Blutdruckwerten von \geq 150/95 mmHg indiziert. Bei Vorliegen eines Gestationshypertonus oder erhöhten Blutdruckwerten mit subklinischen Symptomen sollte eine Blutdrucksenkung bereits ab Blutdruckwerten von $>$ 140/90 mmHg angestrebt werden

(Regitz-Zagrosek et al., 2018). Die Zielblutdruckwerte sollten im gering hypertensiven Bereich zwischen 130 bis 150 mmHg systolisch und 80 bis 100 mmHg diastolisch liegen; dabei sollte die Blutdrucksenkung stufenweise vorgenommen werden (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013). Medikamentöses Mittel der ersten Wahl ist hierfür Alpha-Methyldopa (Dröge und Verlohren, 2017). Eine neu aufgetretene PE sollte zunächst im Krankenhaus behandelt werden, in anderen Fällen kann die Therapie auch ambulant erfolgen. Bei einer Exazerbation der Erkrankung wird jedoch eine erneute beziehungsweise erstmalige stationäre Einweisung nötig (Gifford et al., 2000). Die antihypertensive Therapie kann bei Frauen mit PE und schweren Blutdruckanstiegen das Risiko von zerebrovaskulären und kardiovaskulären Ereignissen mindern; bei Frauen mit milder PE jedoch hat diese keinen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. Dies bekräftigt eine von Abalos et al. (2018) durchgeführte Studie mit 2815 Frauen mit milder PE. Dort zeigte sich, dass sich zwar durch die antihypertensive Therapie das Risiko für die Entwicklung eines schweren Hypertonus halbiert hat, es aber nicht zu einer signifikanten Reduktion des PE-Risikos kam. Darüber hinaus konnte durch die medikamentöse Blutdruckreduktion bisher kein positiver fetaler Outcome beobachtet werden. Daher ist bisher strittig, ob Frauen mit milder bis moderater Hypertonie antihypertensiv behandelt werden sollten (Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019). In Tabelle 2 und 3 sind die geeigneten bzw. ungeeigneten Antihypertensiva zur Behandlung in der Schwangerschaft aufgeführt.

Tabelle 2. Geeignete orale Antihypertensiva

	Medikament	Dosierung	Anmerkung
Geeignet	Alpha-Methyldopa	250-500 mg (2-4x/d), max. 2 g/d	Mittel der 1. Wahl
	Nifedipin retard	20-60 mg, max. 120 mg/d	
Eingeschränkt geeignet	Selektive β -1-Rezeptorblocker (z.B. Metoprolol)	25-100 mg (2x/d)	Erhöhtes Risiko fetaler Wachstumsrestriktion

Quelle: Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019

Tabelle 3. Ungeeignete orale Antihypertensiva

Medikamente	Anmerkung
Diuretika	Potenzielle Beeinträchtigung der uteroplazentaren Perfusion durch zusätzliche Plasmavolumenreduktion
ACE-Hemmer	Keine teratogenen Effekte. Kontraindiziert im II./III. Trimenon: Akutes Nierenversagen bei Neugeborenen, Oligohydramnion
Angiotensin AT1-Antagonisten	Oligohydramnion, Schädelknochenhypoplasie, potenziell teratogen und nephrotoxisch für das Neugeborene
Alle anderen Antihypertensiva	Ungenügende Informationen über Anwendung in der Schwangerschaft

Quelle: Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019

Zur Prophylaxe einer Eklampsie stehen Antikonvulsiva zur Verfügung. Die AWMF-Leitlinien empfehlen als Goldstandard Magnesiumsulfat, was eine deutliche Reduktion der Auftretenswahrscheinlichkeit bewirkt und auch zur akuten Behandlung von Eklampsien geeignet ist (Pryde und Mittendorf, 2009; Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019). Nach einer Aufsättigungsdosis von 4 g intravenös über 5-15 Minuten sollte der Magnesiumspiegel durch eine Infusion von 1 g/Stunde über 24 Stunden aufrechterhalten werden. Wiederkehrende Anfälle sollten mit einer weiteren intravenös verabreichten Dosis von 2-4 g über 5-15 Minuten behandelt werden. Diazepam, Phenytoin oder andere Antikonvulsiva werden als Alternative zu Magnesiumsulfat nicht empfohlen (National Guideline Alliance UK, 2019). Das Medikament sollte nur während der Wehen und unmittelbar postnatal bei Schwangeren mit schwerer Präeklampsie verordnet werden. Magnesiumsulfat zeigte im Vergleich zu anderen Antikonvulsiva oder Placebo eine signifikante Verringerung der Müttersterblichkeit bei schwerer PE. Jedoch bewirkt der Einsatz von Magnesiumsulfat keinen klaren Vorteil bei Frauen mit milder PE (Sibai et al., 2005).

Die Entbindung stellt die einzige kausale Behandlungsmöglichkeit der Präeklampsie dar und gilt als ultima ratio. In der Regel sollte diese nach der vollendeten 37. SSW angestrebt werden (Gifford et al., 2000; National Institute for Health and Clinical Excellence, 2011). Eine Prolongation der Schwangerschaft über die 37. SSW hinaus ist nicht empfohlen (Koopmanns et al., 2009).

In einer Studie mit 1819 Schwangeren mit diagnostizierter hypertensiver Schwangerschaftserkrankung konnte herausgefunden werden, dass eine geplante elektive Entbindung nach der 34. SSW mit einer geringeren maternalen Mortalität und Morbidität verbunden ist und das Risiko für die Entwicklung eines HELLP-Syndroms oder Nierenfunktionsstörungen senkt (Cluver et al., 2017). Bei milden Verlaufsformen zwischen der 34. und 37. SSW erhöht eine dringliche Entbindung hingegen das Risiko eines neonatalen Atemnotsyndroms erheblich, sodass in diesem Fall eine abwartende Strategie und eine engmaschige klinische Überwachung erfolgen sollte (Broekhuijsen et al., 2015).

Ebenso wird zu einem konservativen Prozedere bei Präeklampsien zwischen der 24. und 33. SSW geraten, da eine vorzeitige Entbindung bei relativ geringer maternaler Komplikationsrate schwerwiegende fetale Auswirkungen zur Folge haben könnte (Haddad et al., 2004; Khoshnood et al., 2015). Die Entbindung sollte in diesem Fall je nach maternaler Klinik möglichst lange hinausgezögert werden, um die fetale Reifung zu gewährleisten. Ab der 33. bis 34. SSW kann der Fetus zwecks Lungenreifung von einer zusätzlichen maternalen Glukokortikoids substitution profitieren (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013). Die TRUFFLE-Studie von 2015 (*Trial of Umbilical and Fetal Flow in Europe*) ergab zudem, dass bei Präeklampsien vor der 32. SSW ein klinisches Monitoring mittels Kombination aus sonographischer Doppleruntersuchung des Ductus venosus und CTG zur Bestimmung des Entbindungszeitpunkts am geeignetsten ist (Lee et al., 2013; Lee et al., 2015).

Wird eine Entbindung vor der 24. SSW aus maternaler und/oder fetaler Sicht nötig, sollte die Entscheidung im Rahmen eines "shared decision making" mit allen Beteiligten getroffen werden (Charles et al., 1997; Vlemmix et al., 2013).

2.2 Der Wnt-Signalweg

Der Begriff Wnt leitet sich von den Wörtern *Wingless* und *Int-1* ab. Bereits 1980 wurde in der Gattung *Drosophila melanogaster* ein Segmentpolaritätsgen entdeckt, das bei den Fruchtfliegen zu einer Flügellosigkeit führte. Daher erhielt das Gen die Bezeichnung *Wingless* (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Im Jahre 1982 identifizierten Nusse und Varmus das Maus-Protoonkogen *Int-1*, welches eine Integrationsstelle für das Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV) darstellte (Nusse und Varmus, 1982). Es zeigte sich in folgenden Studien, dass die beiden Gene identisch sind; das in der Maus nachgewiesene *int-1*-Gen ist homolog zu dem *Wingless*-Gen bei *Drosophila* (Rijsewijk et al., 1987). Daraus ergab sich der zusammengesetzte Begriff Wnt für eine Reihe von Genen in Wirbeltieren. Mittlerweile existieren 19 verschiedene humane Wnt-Gene, von denen wiederum einige zusätzliche Isoformen aufweisen.

Die Zugehörigkeit zur Wnt-Familie ist definiert durch die Aminosäuresequenz und nicht durch die Funktion. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Wnts mit verschiedenen Aufgaben assoziiert sind (Gordon und Nusse, 2006). Die Wnt-Gene kodieren für sezernierte, cysteinreiche Glykoproteine, die Zell-zu-Zell-Interaktionen während des Zellwachstums in Embryonen und Erwachsenen vermitteln. Sie dirigieren einerseits die Proliferation und Differenzierung in der Embryogenese, wie die Trophoblastendifferenzierung, Plazentaentwicklung und Organogenese. Andererseits wird den Wnts auch ein Einfluss auf die Homöostase der adulten Gewebszellen nachgesagt. Eine Fehlregulierung des Wnt-Signalwegs wiederum kann Entwicklungsdefekte und Tumorerkrankungen des Menschen bedingen (Miller et al., 1999; Logan und Nusse, 2004; Clevers, 2006).

Der Wnt-Signalweg lässt sich in drei Hauptwege unterteilen: Der kanonische, β -Catenin-abhängige Signalweg, der planare Zellpolaritäts-Signalweg (PCP) und der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg (Huelsenken und Behrens, 2002). Der am meisten und besten erforschte unter ihnen ist der β -Catenin-abhängige Signalweg, auf den auch in dieser Arbeit näher eingegangen wird.

2.2.1 β -Catenin

β -Catenin ist ein zytoplasmatisches Protein, welches homolog zu dem Segmentpolaritätsgen *armadillo* (*arm*) bei *Drosophila* ist (McCrea et al., 1991). Das humane Pendant des CTNNB1-Gens ist auf Chromosom 3 lokalisiert (Kraus et al., 1994). β -Catenin gehört zur Familie der Ca^{2+} -abhängigen Zell-zu-Zell-Adhäsionsmoleküle und zeigt eine starke Verbindung zum zytoplasmatischen Anteil von E-

Cadherin (McCrea et al., 1991; Peifer et al., 1992). Neben der Funktion als membranständiges Adhäsionsmolekül kann β -Catenin auch in den Nukleus übergehen und dort durch Rekrutierung von Chromatin-*Remodelling*-Komplexen eine tragende Rolle in Transkriptionsprozessen, z.B. im Wnt-Signalweg, übernehmen (Huelsen und Behrens, 2002; Willert und Jones, 2006). Das Molekül wird vorwiegend in Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert. Die Ausschüttung korreliert mit morphologischen Entwicklungen und scheint auch einen Einfluss auf Differenzierung und *Remodelling* in der menschlichen Plazenta zu haben (Li et al., 2003).

2.2.2 Dickkopf-1 (DKK1)

Die Dickkopf-Familie setzt sich aus vier Mitgliedern zusammen (DKK1-4). DKKs sind sezernierte Glykoproteine und weisen jeweils zwei cysteinreiche Domänen auf, die untereinander durch einen Verknüpfungsbereich variabler Länge verbunden sind (Kawano und Kypta, 2003). DKKs spielen u.a. eine entscheidende Rolle in der embryonischen Entwicklung, sollen an der Entstehung von Krebs beteiligt sein und scheinen ebenfalls einen Einfluss auf neurodegenerative Erkrankungen zu haben (Niehrs, 2006). DKK1, das Gründungsmitglied der Familie, wurde erstmals bei Krallenfröschen der Gattung *Xenopus embryogenesis* als Antagonist des kanonischen Wnt-Signalwegs identifiziert. Dort beeinträchtigte DKK1 durch hemmende Einwirkung auf den Signalweg die Kopfentwicklung der Krallenfrösche (Glinka et al., 1998). Das humane DKK1-Gen ist auf Chromosom 10 lokalisiert (Roessler et al., 2000). DKK1 wird während der gesamten Embryogenese exprimiert und fungiert als Antagonist während der Entwicklung von Extremitäten und Knochen. Die Balance zwischen dem Wnt-Signalweg und der DKK1-Inhibition ist entscheidend für die Knochenbildung und -homöostase. Eine unzureichende bzw. übermäßige DKK1-Aktivität im Knochen führt zu einer erhöhten bzw. geringeren Knochendichte (Adamska et al., 2004; Li et al., 2006). Ferner scheint DKK1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Neuronen zu spielen und reguliert außerdem die Hautpigmentierung und -dicke durch Kontrolle des Wnt-Signalwegs in Melanozyten (Verani et al., 2007; Yamaguchi et al., 2007). Darüber hinaus gilt die menstruationszyklische Expression des DKK1-Gens in der menschlichen Plazenta als gesichert. Schwangerschaftsspezifische Auswirkungen durch DKK1-vermittelte Funktionen sind somit nicht auszuschließen (Tulac et al., 2003).

2.2.3 Der kanonische, β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg

Der kanonische, β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg wird durch verschiedene Mediatoren reguliert (siehe Abbildung 3). Der Kernaspekt liegt in der Akkumulation und Translokation des zytoplasmatischen Proteins β -Catenin in den Zellkern. Bei Abwesenheit eines stimulierenden Signals wird die intrazelluläre β -Catenin-Konzentration durch den sogenannten Zerstörungskomplex, bestehend aus Axin, GSK-3 β (Glykogensynthase-Kinase 3 β), CK1 (Caseinkinase 1) und APC (Adenomatöse

Polyposis Coli), niedrig gehalten. Axin nimmt hierbei eine zentrale Position ein, da es mit allen anderen Komponenten direkt interagieren kann. Auf diese Weise scheint Axin der limitierende Faktor zu sein, der entweder die Zusammenführung oder den Zerfall des Zerstörungskomplexes fördert (Moon et al., 2004). Die Aktivierung des Signalwegs erfolgt, sobald ein Wnt-Protein an FZD (*Frizzled*) bindet. FZD stellt eine Gruppe von G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren dar, von denen im menschlichen Genom bisher zehn verschiedene detektiert werden konnten. FZD weist eine cysteinreiche Domäne auf, an die sich die Wnt-Proteine binden können (Bhanot et al., 1996). LRP5/6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*) fungieren hierbei als Co-Rezeptoren (Tamai et al., 2000). Diese aus drei Komponenten bestehende Verbindung nimmt eine Schlüsselrolle im Initiierungsprozess des Signalweges ein. Der Membrankomplex aktiviert Dvl (*Dishevelled*), ein ubiquitär exprimiertes, zytoplasmatisches Protein, welches das Wnt-Signal durch die direkte Anlagerung an FZD in die Zelle transloziert (Chen et al., 2003). Durch das stimulierende Signal wird die Degradierung von β -Catenin gehemmt, sodass β -Catenin im Zytoplasma akkumuliert und schließlich in den Zellkern immigriert. Im Nukleus interagiert β -Catenin mit dem N-terminalen Ende der Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (*T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor*). Diese binden an der DNA und fördern in Zusammenarbeit mit dem Co-Aktivator β -Catenin die Transkription von verschiedenen Wnt-Zielgenen. Zu diesen Zielgenen gehören u.a. *Conductin*, *Cyclin D1*, *c-myc* und *TCF-1* (Huelsen und Behrens, 2002; Logan und Nusse, 2004).

Neben der Abwesenheit eines Wnt-Proteins können verschiedene extrazelluläre Mediatoren den Wnt-Signalweg hemmen. Einer der Mediatoren, der in dieser Studie genauer untersucht wird, ist das sezernierte Glykoprotein Dickkopf 1 (DKK1). DKK1 hemmt spezifisch den kanonischen Wnt-Signalweg, indem es extrazellulär an LRP5/6 des Wnt-Rezeptor-Komplexes bindet und diesen antagonisiert (Bafico et al., 2001). Während die Affinität von LRP5/6 für die Wnts gering ist, bindet DKK1 mit hoher Affinität an LRP 6 und fördert die Internalisierung des Rezeptors. LRP 5/6 agieren somit als Wnt-Co-Rezeptoren, deren Aktivität von DKK1 moduliert wird (Niehrs, 2006). Darüber hinaus konnten Mao et al. (2002) zeigen, dass Kremen 1 und 2 (Krm 1/2) eine wichtige Funktion in der Interaktion mit DKK1 und Modulierung des Wnt-Signalwegs einnehmen. Diese hochaffinen Rezeptoren für u.a. DKK1 vermitteln eine stärkere Hemmfähigkeit des Signalwegs im Vergleich zur alleinigen Interaktion zwischen DKK1 und LRP5/6. Die Autoren schlussfolgerten, dass DKK1 die Formation eines dreiteiligen Komplexes bestehend aus Kremen 1, Kremen 2 und LRP5/6 triggert, wobei DKK1 als direkte Brücke zwischen den Rezeptoren fungieren könnte. Durch die Komplexbildung wird LRP5/6 endozytiert, sodass der Rezeptor nicht mehr für die Anbindung von Wnt zugänglich ist. Auf diese Weise findet keine Wnt-LRP5/6-Interaktion mehr statt und die Signalweiterleitung in das Zytoplasma entfällt. Der Zerstörungskomplex bleibt bestehen, wodurch β -Catenin phosphoryliert und letztendlich mittels Ubiquitin-vermittelter Proteolyse degradiert wird. β -Catenin kann nicht in den Zellkern übergehen, die Transkriptionsförderung bleibt aus (Huelsen und Behrens, 2002).

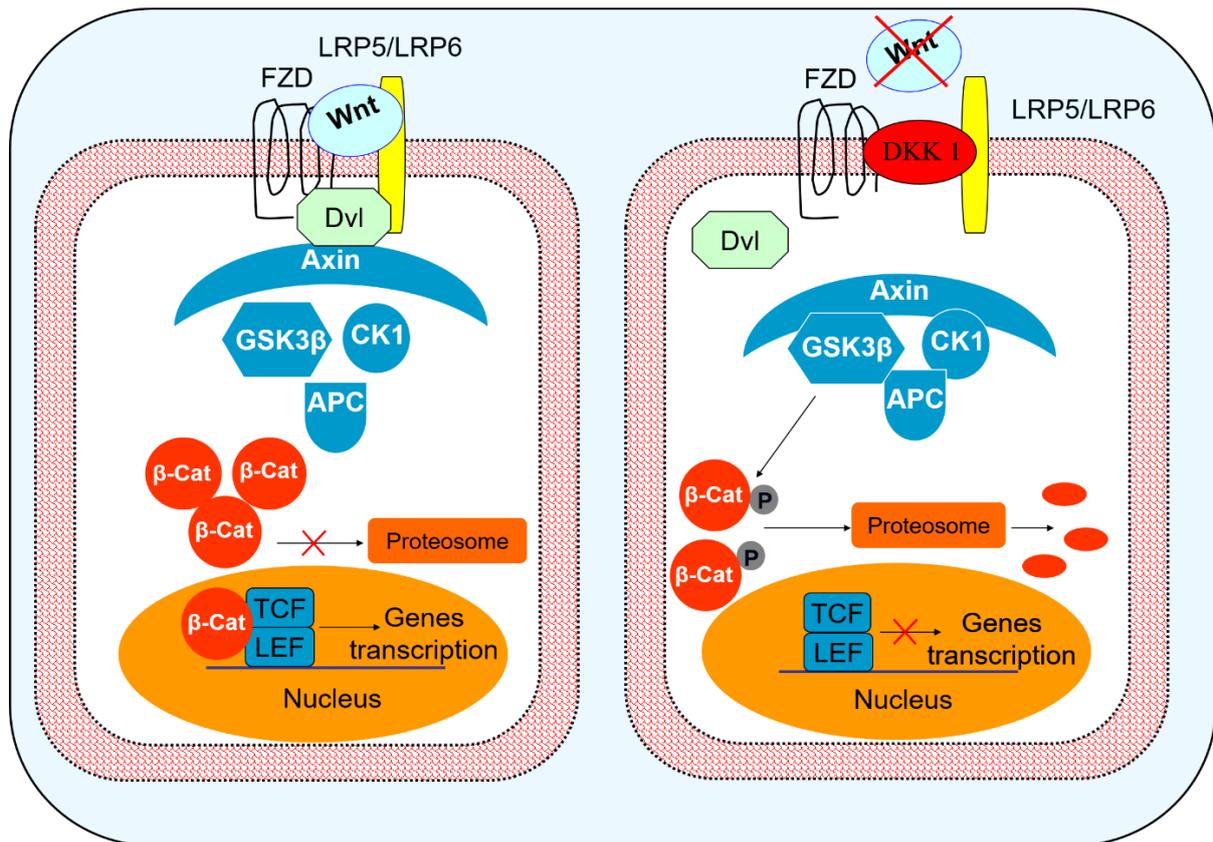


Abbildung 3. Darstellung des kanonischen, β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs

Linke Seite: aktiver Signalweg. Durch die Bildung des Membrankomplexes bestehend aus Wnt, FZD und LRP5/6 wird Dvl aktiviert. Axin bindet an Dvl und bedingt somit den Zerfall des Zerstörungskomplexes. β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma und kann in den Nucleus übergehen. Die Transkriptionsförderung findet statt. **Rechte Seite:** gehemmter Signalweg. Bei Abwesenheit eines Wnt-Moleküls bzw. bei Anlagerung von DKK1 an den Membrankomplex bleibt der Zerstörungskomplex bestehen. β -Catenin wird phosphoryliert und in Proteasomen abgebaut. Die Transkriptionsförderung bleibt aus. FZD (*Frizzled*), LRP5/6 (*low-density-lipoprotein receptor-related protein 5/6*), Dvl (*Dishevelled*), GSK3 β (Glykogensynthasekinase 3 β), CK1 (Caseinkinase 1), APC (Adenomatöse Polyposis Coli), β -Cat (β -Catenin), TCF/LEF (*T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor*), DKK1 (Dickkopf 1), P (Phosphorylierung).

Quelle: Eigene Darstellung

2.2.3.1 Der kanonische, β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg in Trophoblasten

Der maternale Uterus passt sich durch Adaptionsprozesse an die Schwangerschaft an. Diese beinhalten u. a. die Differenzierung der Stromazellen, Angiogenese und immunologische Veränderungen. Wie in Punkt 2.1.4 geschildert, verlaufen die Plazentationsvorgänge bei Präeklampsie jedoch unzureichend. Da die Pathogenese dieser Schwangerschaftserkrankung noch nicht eindeutig geklärt ist, existieren

diesbezüglich viele Hypothesen. Neben endothelialen, immunologischen oder genetischen Ursachen (Dekker und Sibai, 1998) könnte auch ein Mangel an Transkriptionsfaktoren und somit auch an bestimmten Zielgenen für die gestörte Plazentation verantwortlich sein.

Der Wnt-Signalweg hat sich als wesentlicher Faktor herauskristallisiert, der Zellproliferation und -migration dirigieren kann. Darüber hinaus übernimmt er eine tragende Rolle in der Endometriumsfunktion, Dezidualisierung, Trophoblastendifferenzierung und -invasion. Ein aktivierter Wnt-Signalweg könnte die Basis für eine regelrechte Implantation und Invasion von Trophoblastzellen sein (van der Horst et al., 2012). Eine Überaktivierung des kanonischen, β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs hingegen kann zu Funktionsstörungen der Trophoblasten führen, die unter anderem für die Entstehung eines Chorionkarzinoms verantwortlich sein kann. Die Herunterregulierung wiederum scheint mit der Entwicklung einer Präeklampsie assoziiert zu sein (Li et al., 2003).

Es wurde gezeigt, dass die Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung an der endometrialen Hämostase und der normalen Uterusfunktion beteiligt ist (Wang et al., 2010; Atli et al., 2011; Dunlap et al., 2011; Fan et al., 2012). Auch in der Pathogenese und Progression multipler Krebsarten scheint dieser eine entscheidende Rolle einzunehmen (Zhan et al., 2017). Darüber hinaus detektieren viele Studien den Wnt-Signalweg, Regulator für die Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren, im Zusammenhang mit Schwangerschaft und Schwangerschaftskomplikationen (Pollheimer et al., 2006; Sonderegger et al., 2007; Fitzgerald et al., 2010; Sonderegger et al., 2010; Knöfler und Pollheimer, 2013). Daher scheint dieser auch bei der Entwicklung und Differenzierung von Trophoblasten als Hauptbestandteile der Plazenta von tragender Bedeutung zu sein (Zhang et al., 2017).

In Tierversuchen mit Mäusen verursachten homozygote Mutationen von *Wnt2* und *Wnt7b* verschiedene Plazentapathologien (Monkley et al., 1996; Parr et al., 2001). Sonderegger und Kollegen identifizierten die Expression von 75% (14/19) der Wnt-Liganden und 80% (8/10) der *Frizzled*-Rezeptoren im menschlichen Plazentagewebe (Sonderegger et al., 2007). Die Expressionsspiegel von *Wnt1*, *Wnt7A*, *Wnt10A* und *Wnt10B* sind in Trophoblasten des ersten Trimesters höher als in ausgereiften Trophoblasten, wohingegen *Wnt1* und *Wnt2B* stärker in extravillösen Trophoblasten exprimiert werden, was darauf hindeutet, dass der Wnt-Signalweg die Trophoblasten-Invasivität regulieren kann und eine entscheidende Rolle in der Trophoblastenfunktion und -differenzierung spielen könnte (Sonderegger et al., 2007). Darüber hinaus wurden auch β -Catenin und *DKK1* im menschlichen Endometrium nachgewiesen, wobei β -Catenin sowohl in der proliferativen als auch in der sekretorischen Phase auffindbar war; *DKK1* hingegen nur in der sekretorischen Phase (Tulac et al., 2003). Ferner wurde herausgefunden, dass Wnt-Liganden und *DKK1* abhängig vom Menstruationszyklus in Endometriumzellen exprimiert werden (Tulac et al., 2006). Pollheimer et al. (2006) zeigten, dass *DKK1* außerdem die basale Migration, Invasion und Proliferation von Zytotrophoblasten reduziert. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit *Wnt3a* sank bei Zugabe von *DKK1* die β -Catenin-Konzentration in den Zytotrophoblastenkernen auf 41% im Vergleich zur Kontrollgruppe (100%) ab. Unter der Annahme,

dass der Wnt-Signalweg in den Plazentationsprozess involviert ist, zeigte sich eine deutliche Elimination der Wnt3a-bedingten Auswirkungen bei Anwesenheit von DKK1. Die Autoren folgerten, dass Wnt3a die Trophoblasteninvasion und -proliferation verstärkt. Des Weiteren scheinen auch die Transkriptionsfaktoren TCF (*T-cell factor*) einen Einfluss auf die Plazentation auszuüben, da sich die Expression von TCF 3/4 in invasiven Trophoblasten erhöht zeigte. Trotz umfassender Studien bleiben jedoch die Schlüsselregulatoren der Transkriptionsfaktoren für Initiierung und Differenzierung der invasiven Trophoblasten weitestgehend unbekannt (Knöfler, 2010).

2.3 Zielsetzung und Fragestellungen

Bereits mehrere Studien belegen das Vorkommen von DKK1 im Serum bei schwangeren Frauen und die Expression von DKK1 und β -Catenin in der Plazenta, was auf einen Zusammenhang zwischen dem kanonischen Wnt-Signalweg und das Vorliegen einer Schwangerschaft hindeutet. In der folgenden Studie soll untersucht werden, inwieweit der kanonische, β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg und dessen Mediatoren DKK1 und β -Catenin in der Pathogenese der Präeklampsie involviert sind. Einerseits soll das Vorkommen von DKK1 im Serum bei Schwangeren und nicht schwangeren Frauen bestätigt und das Verhältnis der DKK1-Serumkonzentrationen bei präeklampsischen Schwangeren im Vergleich zu gesunden Schwangeren und gesunden, nicht schwangeren Frauen dargestellt werden. Außerdem soll herausgearbeitet werden, ob Serum-DKK1 als Biomarker zur Vorhersage einer Präeklampsie geeignet sein könnte. Andererseits soll der Fokus auf die Bestimmung der DKK1- und β -Catenin-Genexpression in der Plazenta bei präeklampsischen und normalen Schwangerschaften gelegt werden um zu überprüfen, ob die plazentare Genexpression von DKK1 und β -Catenin sich im Sinne der antagonistischen Wirkung innerhalb des Wnt-Signalwegs gegenläufig zeigen.

Hierbei werden drei Gruppen in die Studie eingeschlossen, darunter 30 Schwangere mit Präeklampsie, 30 gesunde schwangere Frauen und 30 gesunde, nicht schwangere Frauen. Die DKK1-Serumspiegel sollen mittels ELISA gemessen werden. Die plazentare Transkription von DKK1- und β -Catenin-Genen bei den präeklampsischen Schwangeren und den gesunden Schwangeren soll mittels Real-Time-PCR nachgewiesen werden. Ferner werden Hämotoxylin-Eosin-Färbungen von plazentaren Gewebeproben angefertigt, um potenziell pathologische Veränderungen bei präeklampsischen Schwangerschaften darzustellen.

1. *Fragestellung: Inwieweit unterscheidet sich die Höhe der DKK1-Serumkonzentration bei gesunden, nicht schwangeren Frauen, gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie?*

Wir nehmen an, dass ein erhöhter DKK1-Serumspiegel bei präeklampsischen Schwangeren zu einer Hemmung des kanonischen, β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs führt und die Pathogenese der Erkrankung fördert. Unseres Wissens nach existierte zu Beginn unseres Projekts keine Studie, die die DKK1-Serumkonzentration bei Präeklampsie untersucht hat. In einer jüngsten Studie von 2019 ergab sich bei Frauen mit Präeklampsie eine erhöhte DKK1-Serumkonzentration im Vergleich zu gesunden Schwangeren (Tayyar et al., 2019). Aus obiger Fragestellung lässt sich folgende Hypothese ableiten:

- 1.1 *Die DKK1-Serumkonzentration ist bei Schwangeren mit Präeklampsie höher als bei gesunden Schwangeren und gesunden, nicht schwangeren Frauen.*

2. *Fragestellung: Inwieweit unterscheidet sich die Höhe der DKK1- und β -Catenin-Genexpression in der Plazenta bei gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie?*

DKK1 und β -Catenin werden ubiquitär im Gewebe exprimiert und lassen sich auch im hohen Maße in der Plazenta nachweisen (Li et al., 2003; Tulac et al., 2003). Neben der Bestimmung von DKK1 im Serum ist somit auch die plazentare Genexpression von DKK1 und β -Catenin von Bedeutung, um den Einfluss der beiden Mediatoren auf die Pathogenese der Präeklampsie zu werten. Im Rahmen von mehreren Arbeiten ergaben sich eine erhöhte DKK1-Genexpression bei gleichzeitig erniedrigter β -Catenin-Genexpression in der Plazenta bei präeklampsischen Schwangerschaften im Vergleich zu gesunden Schwangerschaften (Zhang et al., 2013; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2019). Zur Überprüfung der Fragestellung werden zwei Hypothesen abgeleitet:

- 2.1 *Die plazentare DKK1-Genexpression ist bei Schwangeren mit Präeklampsie höher als bei gesunden Schwangeren.*
- 2.2 *Die plazentare β -Catenin-Genexpression ist bei Schwangeren mit Präeklampsie niedriger als bei gesunden Schwangeren.*

3 METHODIK

3.1 Studiendesign und Untersuchungskollektiv

Die vorliegende prospektive Kohortenstudie erfolgte monozentrisch in der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin der Universität des Saarlandes (UKS) in Homburg/Saar. In dem Zeitraum von 2014 bis 2016 wurden insgesamt 90 Probandinnen rekrutiert, wovon allerdings zwei Patientinnen der Präeklampsie-Gruppe nachträglich aus der Studie ausgeschlossen wurden, da Ausschlusskriterien vorlagen. Insgesamt setzte sich die Studienpopulation demnach aus 28 Schwangeren zwischen der 26+4 und 40+2 SSW mit diagnostizierter Präeklampsie und 30 Schwangeren zwischen der 37+1 und 39+4 SSW ohne gesundheitliche Einschränkungen zusammen. Darüber hinaus dienten 30 weitere alterskorrelierte gesunde, nicht schwangere Frauen als zusätzliche Kontrollgruppe zur Detektion des humanen DKK1-Proteins im Serum.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Referenznummer: 249/13). Die Probandinnen wurden vor der Teilnahme von verschiedenen Ärzten und Ärztinnen über den Verlauf und die Risiken der Studie mündlich sowie schriftlich aufgeklärt. Die unterschriebene Einverständniserklärung jeder Probandin liegt vor. Es wurde explizit darauf hingewiesen, dass die Teilnehmerinnen ihre Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen können. Soziodemografische, geburtshilfliche und klinische Merkmale wurden aus den Krankenakten entnommen. Die im Rahmen der Studie erhobenen persönlichen Daten wurden verschlüsselt und pseudonymisiert gespeichert. Das Pseudonym setzte sich aus dem ersten Buchstaben des Vornamens, dem ersten Buchstaben des Nachnamens und der Teilnehmernummer zusammen. Die Daten werden insgesamt über einen Zeitraum von 30 Jahren aufbewahrt und nach Ablauf dieser Frist restlos gelöscht. Eine vorzeitige Löschung der Daten ist auch auf Wunsch der Studienteilnehmerinnen ohne Angabe von Gründen jederzeit möglich.

Für das Untersuchungsmaterial wurden pro Probandin einerseits direkt pränatal venöses maternales Blut (Serum und EDTA) und andererseits direkt postnatal jeweils fünf Plazentaprobe entnommen. Im Hinblick auf die bessere Planbarkeit der Probengewinnung wurden speziell diejenigen Schwangeren in die Kontrollgruppe aufgenommen, für die als Entbindungsmethode die primäre Sectio caesarea vorgesehen war. Hierbei erfolgte die Indikationsstellung ausschließlich nach klinischen Gesichtspunkten unabhängig von der Studie. Nach der Rekrutierung der Teilnehmerinnen sowie der Probengewinnung erfolgte die Messung und Auswertung des Materials im Zentrallabor, im Labor der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin sowie im Institut der Biochemie in Homburg/Saar.

3.1.1 Diagnosestellung einer Präeklampsie

Die Kriterien zur Diagnosestellung einer Präeklampsie basierten auf den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften 2014 (AWMF). Der Großteil der Patientinnen wurde im Rahmen der regulären Vorsorgeuntersuchungen erstmalig auffällig, indem sich erhöhte Blutdruckwerte zeigten. Zur weiteren Abklärung wurde ein Blutdrucktagesprofil angelegt und die 24h-Eiweißausscheidung im Sammelurin bestimmt. Die Diagnose einer Präeklampsie wurde bei Vorliegen von wiederholten Blutdruckmessungen mit Werten $> 140/90$ mmHg und bestehender Proteinurie ≥ 300 mg/24h gestellt.

3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Präeklampsie-Patientinnen

Einschlusskriterien

- Gestationsalter: 23+5 bis 41+6 SSW
- Alter der Studienteilnehmerinnen: 20 bis 42 Jahre
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung zur Studienteilnahme
- Als milde PE gilt:
 - Gestationshypertonie und Proteinurie ≥ 300 mg/24h, die nach der abgeschlossenen 20. SSW aufgetreten sind
- Als schwere PE gilt, wenn zusätzlich mindestens eines der folgenden Kriterien vorliegt:
 - Nierenfunktionseinschränkung (Kreatinin $\geq 0,9$ g/l oder Oligurie < 500 ml/24h)
 - Leberbeteiligung (Transaminasenanstieg, schwere Oberbauchschmerzen)
 - Lungenödem oder Zyanose
 - Hämatologische Störungen (Thrombozytopenie, Hämolyse)
 - Neurologische Symptome (schwere Kopfschmerzen, Sehstörungen)
 - Fetale Wachstumsretardierung
 - Blutdruck $\geq 170/110$ mmHg

Ausschlusskriterien

- Gestationsalter: $< 23+5$ bzw. $> 41+6$ SSW
- Alter der Studienteilnehmerinnen: < 20 bzw. > 42 Jahre
- Kein Vorliegen einer PE
- Chromosomale oder fetale Anomalien
- Chronische Vorerkrankungen
 - Chronische Hypertonie
 - Gestationsdiabetes oder Diabetes mellitus Typ 2

- Herz- oder Nierenerkrankungen
- Deutliche Einschränkung der geistig-psychischen Leistungsfähigkeit oder eine ausgeprägte Sprachbarriere, die eine Aufklärung und Einverständniserklärung zur Studienteilnahme nicht ermöglichen
- Fehlendes Vorliegen einer Einverständniserklärung

Kontrollprobandinnen

- **Gesunde Schwangere**

Einschlusskriterien

- Gestationsalter: 23+5 bis 41+6 SSW
- Alter der Studienteilnehmerinnen: 20 bis 42 Jahre
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung zur Studienteilnahme
- Unauffälliges 1. und 2. Trimesterscreening
- Komplikationsloser Schwangerschaftsverlauf

Ausschlusskriterien

- Gestationsalter: < 23+5 bzw. > 41+6 SSW
- Alter der Studienteilnehmerinnen: < 20 bzw. > 42 Jahre
- Chromosomale oder fetale Anomalien
- Chronische Vorerkrankungen
 - Chronische Hypertonie
 - Gestationsdiabetes oder Diabetes mellitus Typ 2
 - Herz- oder Nierenerkrankungen
- Deutliche Einschränkung der geistig-psychischen Leistungsfähigkeit oder eine ausgeprägte Sprachbarriere, die eine Aufklärung und Einverständniserklärung zur Studienteilnahme nicht ermöglichen
- Fehlendes Vorliegen einer Einverständniserklärung

- **Gesunde, nicht schwangere Frauen**

Einschlusskriterien

- Alter der Studienteilnehmerinnen: 20 bis 42 Jahre
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Ausschlusskriterien

- Alter der Studienteilnehmerinnen: < 20 bzw. > 42 Jahre
- Chronische Vorerkrankungen
 - Chronische Hypertonie
 - Gestationsdiabetes oder Diabetes mellitus Typ 2

- Herz- oder Nierenerkrankungen
 - Deutliche Einschränkung der geistig-psychischen Leistungsfähigkeit oder eine ausgeprägte Sprachbarriere, die eine Aufklärung und Einverständniserklärung zur Studienteilnahme nicht ermöglichen
 - Fehlendes Vorliegen einer Einverständniserklärung

3.2 Material und Geräte

3.2.1 Reagenzien

Tabelle 4. Reagenzien

Name	Firma	Katalognummer
2-Mercaptophenol	Merck, Deutschland	805740
Alkoholisches Hautantiseptikum	Schülke & Mayr, Deutschland	118211
Aquatex®	Merck, Deutschland	180562
Destilliertes Wasser	B. Braun, Deutschland	3451364
Entellan® Neu	Merck, Deutschland	107961
Eosin G-Lösung 0,5%, wässrig	Merck, Deutschland	115935
Ethanol absolut (≥ 99,8%)	Sigma-Aldrich, USA	S2BF0910V
Mayers Hämalunlösung	Merck, Deutschland	109249
RNase-Free DNase Set (50)	Qia gen, Deutschland	79254
RNase-ZAP	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), USA	AM9780
RT-PCR Grade Water Ready for RT-PCR	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), USA	AM9935
TaqMan® β-Actin Detection Reagents	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), USA	401846
TaqMan® Fast Advanced Mastemix	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), USA	4444557
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura, Niederlande	4583
XyloI	Otto Fischar, Deutschland	1330-20-7
Zamboni-Lösung	Morphisto, Deutschland	12773

3.2.2 Kits

Tabelle 5. Kits

Name	Firma	Katalognummer
7500 Fast Real-Time PCR System Spectral Calibration Kit II	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), USA	4362201
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, USA	5067-1511
AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (50)	Qia gen, Deutschland	80004

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), USA	4368814
Human DKK1 Quantikine® ELISA Kit	R & D Systems, USA	DKK100B
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen, Deutschland	79254
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), USA	6462115
TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), USA	4331182
TURBO DNA-free™ Kit	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), USA	AM1907

3.2.3 Lösungen

Tabelle 6. Lösungen

Name	Menge (pro Probe)	Verwendung
Master Mix	7,5 µl	Prüfung auf DNA-Anteile in den RNA-Proben
Primer	0,75 µl	
RNase-freies H ₂ O	5,75 µl	
RNA-Probe	1 µl	
RT-Buffer	2 µl	Master Mix für die Reverse Transkription der RNA
dNTP Mix	0,8 µl	
RT-Primers	2 µl	
Reverse Transcriptase	1 µl	
RNase-freies H ₂ O	4,2 µl	
Master Mix	10 µl	Reaktionsgemisch für die Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
Primers	1 µl	
RNase-freies H ₂ O	7 µl	
cDNA	2 µl	

3.2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7. Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Katalognummer
Deckgläser 100, Stärke 1	R. Langenbrinck, Deutschland	01-2460/1
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml)	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), USA	4346906
Mikrotomklingen A35	Feather, Japan	FEAA35
Objektträger Plus	Thermo Fisher Scientific, USA	03-0060
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), USA	4311971
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland	
• 2,5 µl		70.1130.212
• 10 µl		70.1130.210
• 20 µl		70.1116.210
• 100 µl		70.760.213

• 200 µl		70.760.211
• 1000 µl		70.762.211
Pipettenspitzen professional	Biozym Scientific, Deutschland	770200
Reagiergefäße	Sarstedt, Deutschland	
• 0,5 ml		72.704
• 1,5 ml		72.706
• 2,0 ml		72.695.500
Stainless Steel Beads (5mm)	Qia gen, Deutschland	69989
Sterile Skalpellklingen	B. Braun, Deutschland	BB518

3.2.5 Geräte

Tabelle 8. Geräte

Name	Firma
-20°C-Kühlschrank	Liebherr, Deutschland
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, USA
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), USA
Axioskop 40+ AxioCam MRC	Carl Zeiss, Deutschland
C1000™ Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, USA
Forma™-86°C-Ultratiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific, USA
Leica CM 1900 Cryostat	Leica Biosystems, Deutschland
NanoDrop™20000/2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
PCR Workstation Pro	VWR Peqlab, USA
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
ThermoMixer® C	Eppendorf, Deutschland
TissueLyser LT	Qia gen, Deutschland
Vortex-Genie®2	Scientific Industries, USA
Zentrifugen	
• 5417R	Eppendorf, Deutschland
• CM-6MT	ELMI, Lettland
• Kinetic Energy 26 Joules Galaxy Mini	VWR, USA

3.2.6 Software

Tabelle 9. Software

Name	Firma
Acrobat Reader	Adobe Systems, USA
Excel 2016 für Windows	Microsoft, USA
Magellan 7.2	Tecan Life Science, Schweiz
SAP (Kliniksoftware)	SAP, Deutschland
SPSS Software Version 21	IBM, USA
Word 2016 für Windows	Microsoft, USA

3.3 Probensammlung

Nach gewissenhafter Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien sowie des Vorliegens der schriftlichen Einverständniserklärung erfolgte die Probensammlung.

Unmittelbar pränatal wurden venöse Blutproben (Serum und EDTA) von 30 gesunden Schwangeren und 30 Frauen mit Präeklampsie abgenommen. Darüber hinaus wurden weitere 30 venöse Blutproben von alterskorrelierten gesunden, nicht schwangeren Frauen während deren Routinebesuchen in unserer Klinik gesammelt. Jeweils eine Serum- und eine EDTA-Monovette dienten zur Auswertung laborchemischer Parameter (Blutbild, klinische Chemie) im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes. Die Bestimmung der Serumkonzentrationen von DKK1 erfolgte im Labor der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes. Die Lagerung des hierfür benötigten Blutes bis zur Abholung durch einen Verantwortlichen der Studiengruppe erfolgte im Kühlschrank bei 4°C für maximal 2 Stunden. Eine Menge von 5 ml venösen Blutes wurde daraufhin jeweils in ein S-Monovette-Serum-Gel-Röhrchen überführt. Die Blutproben wurden bei 10000 g und einer Temperatur von 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugierung trennten sich die zellulären Blutbestandteile vom Blutplasma. Vom überstehenden Blutplasma wurde 3x 1 ml abpipettiert und in ein jeweils 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Bis zur Testung lagerten die Blutproben in einem Gefrierschrank bei -80°C.

Direkt postnatal wurden durch einen Verantwortlichen der Studiengruppe Plazentagewebeproben von allen schwangeren Frauen gewonnen. Hierbei wurden jeweils fünf Gewebeproben von einer Größe um die 1 cm x 1 cm x 1 cm aus verschiedenen Kotyledonen der maternalen Seite der Plazenta entnommen und in fünf beschriftete Kryoröhrchen gegeben. Um eventuelle Unterschiede in den verschiedenen Plazentaabschnitten auszuschließen, erfolgten die Biopsien sowohl im Zentrum der Plazenta (M) als auch in den einzelnen Quadranten (bei 3, 6, 9 und 12 Uhr). Die Proben waren makroskopisch frei von jeglichen Pathologien wie z.B. Infarkten. Das möglichst aseptische Arbeiten wurde durch die Verwendung von Einmalhandschuhen, sterilen Pinzetten sowie sterilen Scheren ermöglicht. Die Asservierung der Gewebebiopsien bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte ebenfalls in einem Gefrierschrank bei -80°C. In Abbildung 4 wird das Vorgehen einer Plazentagewebeentnahme veranschaulicht.

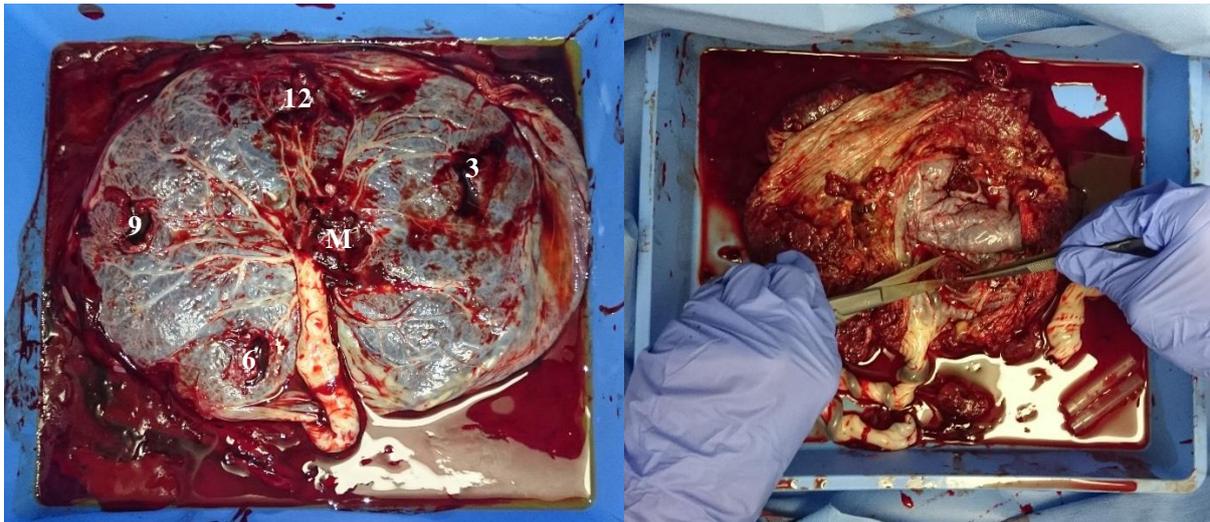


Abbildung 4. Beispielbilder einer Plazentagebeentnahme

Linke Seite: Die Entnahmestellen aller Quadranten (3, 6, 9, 12) und der Mitte (M) der Plazenta sind sichtbar.

Rechte Seite: Durchführung einer Probenentnahme mithilfe von Einmalhandschuhen, steriler Schere und steriler Pinzette.

Quelle: Eigene Darstellung

3.4 Laborbestimmungen

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, die DKK1-Serumkonzentration bei gesunden, nicht schwangeren Frauen, gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie sowie die DKK1- und β -Catenin-Gewebeexpression bei normalen und präeklampsischen Schwangerschaften zu bestimmen. Zur Serumanalyse fand das etablierte ELISA-Verfahren durch Gebrauch des *Human Dkk-1 Quantikine ELISA Kits* (DKK100B) von R&D Systems® (Deutschland) Anwendung. Zur Genexpressionsbestimmung waren mehrere vorbereitende Schritte nötig, um letztlich die Durchführung der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) zu ermöglichen. Zunächst musste die benötigte RNA aus den gesammelten Plazentagebewebeproben extrahiert werden. Um eine hohe Qualität und Integrität der gewonnene RNA sicherzustellen, wurde diese daraufhin mithilfe des *Bioanalyzers Agilent 2100* getestet. Nach anschließender Reinheitsüberprüfung der RNA unter Verwendung des *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* von Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) und der zugehörigen 7500 Software wurde eine reverse Transkription der RNA in die cDNA durchgeführt. Nach der Transkription konnte die rt-PCR angewandt werden. Ferner erfolgte bei einem Teil der Plazentagebewebeproben die Anfertigung von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen mit nachfolgender histologischer Begutachtung. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte und die rt-PCR näher beschrieben.

3.4.1 Serumanalyse

ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) impliziert ein antikörpervermitteltes Nachweisverfahren für spezifische Proteine (Engvall und Perlmann, 1971). Ein Ziel dieser Studie lag in der Detektion des humanen DKK1-Proteins im Serum der Probandinnen. Insgesamt wurden Serumproben von 30 gesunden, nicht schwangeren Frauen, 30 gesunden Schwangeren und 30 Frauen mit Präeklampsie zur Testung herangezogen. Die ELISA-Ergebnisse zweier Präeklampsie-Patientinnen wurden nachträglich aus der Studie exkludiert, nachdem Ausschlusskriterien vorlagen.

Das verwendete *Human Dkk-1 Quantikine ELISA Kit* (DKK100B) von R&D Systems® (Deutschland) impliziert ein rekombinantes humanes DKK1, um die relativen Mengen des natürlich auftretenden humanen DKK1 zu bestimmen. In dieser Studie fand das sogenannte „*Sandwich-ELISA*“-Verfahren Anwendung (s. Abbildung 5). Bei dem „*Sandwich-ELISA*“-Verfahren ist eine 96-well-Mikrotiterplatte mit einem spezifischen Antikörper (AK) für das humane DKK1 beschichtet. Dieser Antikörper wird auch als *coating-AK* bezeichnet. Für jede Testung wurden die benötigten Reagenzien und Proben gemäß den Anweisungen des Herstellers vorbereitet. Jede Serumprobe der einzelnen Probandinnen wurde doppelt getestet (Duplikat), sodass insgesamt 180 Testungen durchgeführt wurden. Die bei -80°C gelagerten Serumproben wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Sobald der Aggregatzustand der Serumproben in flüssig übergegangen war, wurden diese in die vorgesehenen 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, wodurch sich im Serum vorhandenes DKK1 an den gebundenen AK haftete. Nach einer Inkubationsphase von 2 Stunden bei Raumtemperatur und 350 rpm wurden durch einen Waschprozess (4x 200 µl Waschpuffer) ungebundene Substanzen entfernt. Im nächsten Schritt wurden 200 µl eines enzymmarkierten, polyklonalen AK spezifisch für DKK1 hinzugefügt. Dieser zweite AK wird auch als *detection-AK* bezeichnet. In einer erneuten Inkubationsphase von 2 Stunden bei Raumtemperatur und 350 rpm formierte sich ein *Sandwich-Komplex* bestehend aus *coating-AK*, DKK1 und *detection-AK*. Im folgenden Schritt wurden nach einem erneuten Waschprozess 200 µl einer Substratlösung (Tetramethylbenzidin) in jede Vertiefung hinzugegeben, welche mit dem enzymmarkierten AK interagiert. Während der sich anschließenden lichtgeschützten Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur machte sich dies makroskopisch durch einen Farbumschlag bemerkbar. Nach der Zugabe von 50 µl einer Stopp-Lösung (Schwefelsäure) pro Vertiefung konnte die Farbintensität photometrisch bei 450 nm gemessen werden, welche proportional zur Menge an zuvor gebundenem DKK1 ist. Den DKK1-Proteingehalt erhielt man mithilfe einer Vier-Parameter-Logistikkurve, die gegen eine Standardkurve angepasst und unter Verwendung von *Magellan 7.2 Ink Data Analysis* von Tecan Life Science (Schweiz) ausgewertet wurde.

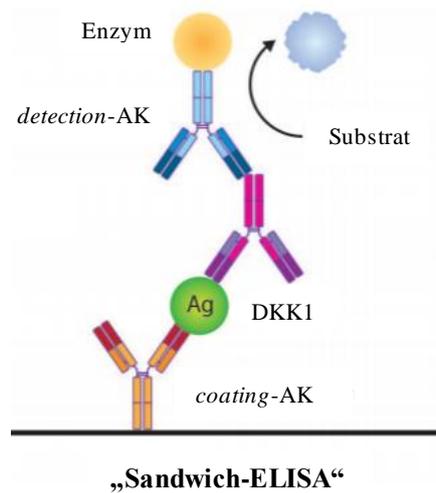


Abbildung 5. Graphische Darstellung des „Sandwich-ELISA“-Verfahrens mit DKK1 als Antigen

Nach Formierung des *Sandwich*-Komplexes bestehend aus *coating*-AK, DKK1 und enzymmarkierter *detection*-AK wird ein Substrat hinzugefügt, welches mit dem enzymmarkierten AK interagiert und dieses als Farbumschlag anzeigt. Ag = Antigen; AK = Antikörper; DKK1 = Dickkopf-1.

Quelle: In Anlehnung an Salazar et al., 2017

3.4.2 Histologische Untersuchung der Plazentagewebebeben

Unter der Hypothese, dass sich histologische Unterschiede zwischen den Plazenten von PE-Patientinnen und der Kontrollgruppe zeigen, wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Plazentabiospien von jeweils fünf PE-Patientinnen und fünf Kontrollprobandinnen angefertigt, wodurch einzelne zelluläre Strukturen sichtbar gemacht werden können. Durch die Färbemethode sollte darüber hinaus die Gleichheit der fünf untersuchten Plazentaprobe einer Studienteilnehmerin bewiesen werden. Da von jeder Studienteilnehmerin fünf Plazentaprobe vorlagen, erhielt man insgesamt 50 Schnitte zur histologischen Begutachtung. Für alle Färbungen wurden Gewebeschnitte mit 5 µm Dicke verwendet.

Hämatoxylin/Hämalaun (Zubereitung als Aluminiumlack) ist ein bei saurem pH-Wert positiv geladener Farbstoff, der negativ geladene bzw. basophile Strukturen, wie z.B. Zellkerne, blau färbt. Eosin wiederum ist ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Dieser führt zur rötlichen Färbung aller übrigen Strukturen, v.a. des Zytoplasmas (Fischer et al., 2008). Die Färbungsergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10. Ergebnisse der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von zellulären Strukturen

Strukturen	Farbe
Zellkerne	Blau
Zytoplasma	Blassrot
Bindegewebsfasern	
• Kollagene	Rot
• Retikuläre	-
• Elastische	Blassrot-rot
Muskelgewebe	Rot
Erythrozyten	Rotorange
Knorpel	Bläulich

Quelle: In Anlehnung an Vollmar-Hesse, 2007

Für die Anfertigung der für die Färbung notwendigen Gewebeschnitte wurde sich dem Verfahren der Gefriermikrotome bedient. Gefriermikrotome sind Kryoschnitte, die durch eine stickstoffinduzierte Härte der Proben eine optimale Schneidfähigkeit gewährleisten. Die Herstellung der Mikrotome erfolgte mittels eines Kryostats. Die sich auf Trockeneis befindlichen Plazentagewebeproben wurden mittels eines Skalpell zugeschnitten. Das restliche Gewebe wurde für die weitere Verwendung auf Trockeneis zurückgestellt. Die jeweils zugeschnittene Plazentaprobe wurde mittels eines Tropfens *Tissue-Tec* auf einer zuvor gekühlten Trägerplatte fixiert und mit Hilfe einer Kühlhaube der Kühlkammer des Kryostaten für eine Minute tiefgefroren. Daraufhin wurde die Platte an der vorgesehenen Öffnung des Kryostaten befestigt. Die Plazentaprobe wurde auf die gewünschte Gewebedicke von 5 µm zugeschnitten und konnte daraufhin auf einen Objektträger aufgezoogen werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Abklatsch. Der Objektträger wurde im Objektträgerständer des Kryostaten bei -20°C gelagert, bis alle Schnitte zum Färben präpariert waren.

Zur Anfertigung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte zunächst die zehnminütige Fixierung der präparierten Gewebeschnitte in Zamboni-Lösung. Anschließend wurden die Objektträger dreimalig mit *Aqua dest.* gespült, um die überschüssige Farbe abzuwaschen. Nach dem Trocknen wurden die Proben für drei Minuten in Hämalaun-Mayer gefärbt und daraufhin mit heißem Leitungswasser dreimalig gespült. Die einminütige Gegenfärbung erfolgte mit der Eosin-Lösung, worauf wiederum die Proben mit *Aqua dest.* gespült wurden. Zur Fixierung der Färbung wurden die Objektträger in Schalen mit ansteigenden Isopropanol-Konzentrationen getaucht. Mittels Schwenken der Objektträger und zunehmender Verweildauer mit Fortschreiten der Alkoholreihe wurden die Proben dehydriert und die Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf diesem Wege gebunden. Abschließend erfolgte das Eindecken der Schnitte mit Aquatex® und Deckgläsern.

Nach Vollendung des Färbeprozesses wurden mittels eines Lichtmikroskops Fotografien der Gewebeprouben in 5- und 10-facher Vergrößerung aufgenommen, welche von einer Pathologin des Universitätsklinikums des Saarlandes interpretiert und ausgewertet wurden. Da in der histologischen Untersuchung der Plazentabiopsien einer Studienteilnehmerin Unterschiede hinsichtlich Struktur und Aufbau ausgeschlossen werden konnten, wurde die unter Punkt 3.4.3 beschriebene Gewebeextraktion nur an drei von den zuvor fünf gesammelten Plazentaprouben pro Schwangere durchgeführt.

3.4.3 Gewebeextraktion

Die Gewebeextraktion wurde entsprechend der Leitlinien des *AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit* von Qiagen (Deutschland) durchgeführt. Dieses Kit erlaubt die gleichzeitige Reinigung und Gewinnung von DNA, RNA und Protein aus dem zu untersuchenden Gewebe. Für die vorliegende Studie war die RNA-Extraktion von Bedeutung, sodass auf diese im Folgenden näher eingegangen wird. Die DNA- und Proteinextraktion wurde für zukünftige Projekte aufbewahrt. Insgesamt wurden 180 Plazentagewebeprouben getestet, um die Expressionsniveaus der Gene Dickkopf 1 (DKK1) und Catenin beta 1 (CTNNB1) zu bestimmen. Um einen möglichst umfassenden Überblick zu gewinnen, wurden primär die Prouben der Plazentastellen 3, 9 und M impliziert. Im Falle einer nicht verwertbaren Messung wurde auf die Prouben der anderen Quadranten 6 bzw. 12 zurückgegriffen. Das Expressionsniveau jeder Proubandin wurde durch Berechnen des Durchschnitts der drei erhaltenen Werte definiert.

Zu Beginn wurden die gefrorenen Plazentaprouben mittels eines Skalpell auf Stücke ≤ 30 mg geschnitten, da kleinere Prouben eine effizientere Trennung von DNA und RNA sowie einen höheren Ertrag dieser ermöglichen. Das restliche Proubenmaterial wurde unmittelbar zurück auf Trockeneis gestellt. Die zugeschnittenen Plazentastücke wurden in ein vorgekühltes 2 ml Röhrrchen gegeben, welches eine *Stainless Steel* Kugel enthielt. Zur Proubenzerkleinerung und -homogenisierung wurde in jedes Röhrrchen 600 μ l *Lysis Buffer* gegeben. Dieser wurde im Vorhinein angesetzt und bestand aus 10 μ l beta-Mercaptoethanol pro 1 ml Buffer RLT. Er diente neben der Homogenisierung zur direkten Inaktivierung von DNasen, RNasen und Proteasen. Das Gemisch aus Plazentaproube und Buffer wurde für zwei Minuten bei 20 Hz mit Hilfe des *TissueLyser* homogenisiert. Gegebenenfalls wurde bei Bestehen von makroskopisch sichtbarem Restgewebe dieser Vorgang wiederholt. Das Homogenat wurde anschließend für drei Minuten bei *full speed* (14.000 R/min) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Pipettieren in ein *AllPrep® DNA spin column* überführt, welches sich in einem 2 ml Sammelröhrrchen befand. Durch erneutes Zentrifugieren für 30 Sekunden bei 8000 g konnte die DNA an der Membran gebunden werden, wohingegen die RNA und die Proteine im Durchfluss verblieben. Bis zur weiteren Reinigung der DNA wurde das *AllPrep® DNA spin column* in ein neues 2 ml Sammelröhrrchen gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur aufbewahrt (nicht Teil dieser Arbeit). Der Durchfluss wurde für die RNA-Extraktion genutzt.

Durch Hinzufügen von 96-100%igen Ethanol und Mischen mittels mehrmaligen Auf- und Abpipettierens wurden die Nukleinsäuren präzipitiert. Dieses Gemisch wurde daraufhin mit 430 µl RLT Buffer zur Reinigung versetzt. Bis zu 700 µl wurden in ein *RNeasy spin colum* überführt, welches sich in einem 2 ml Sammelröhrchen befand. Durch die darauffolgende Zentrifugierung für 15 Sekunden bei 8000 g wurde die RNA an der Membran gebunden; der Proteinanteil verblieb im Durchfluss. Zur weiteren Proteintestung wurde der Durchfluss in ein neues 2 ml Sammelröhrchen gegeben und bei -80°C aufbewahrt (nicht Teil dieser Arbeit). Um die RNA-Qualität zu optimieren bedurfte es mehrerer Waschschriffe, sodass an dieser Stelle ein optionaler Zwischenschritt eingefügt wurde. Es handelte sich um die Anwendung des *RNase-free DNase-Sets* von Qiagen (Deutschland), welches eine effiziente DNA-Digestion während der RNA-Aufreinigung fördert. Zunächst wurden 350 µl RW1 Buffer hinzugegeben und die Lösung für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Daraufhin wurden 80 µl DNase Inkubationsmix (bestehend aus 10 µl DNase und 70 µl RDD Buffer) direkt auf die Membran des *RNeasy spin columns* gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur wirken gelassen. Danach wurde die Waschung mit 350 µl RW1 Buffer wiederholt. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach Vollendung des Zwischenschritts wurden zweimalig hintereinander jeweils 500 µl RPE Buffer beigemischt und die Säule durch erneute Zentrifugierung für 15 Sekunden bzw. 2 Minuten bei 8000 g gewaschen und getrocknet. Der Durchfluss wurde verworfen. Abschließend wurde das *RNeasy spin column* in ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen überführt und 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben. Durch die darauffolgende Zentrifugierung für eine Minute bei 8000 g wurde die RNA ausgewaschen.

Für einige Proben, die nicht mit dem Zwischenschritt der RNA-Aufreinigung behandelt worden sind, wurde nachträglich das *TURBO DNA-free™ Kit* von Qiagen (Deutschland) herangezogen. Entsprechend der Leitlinien wurden 5 µl TURBO DNase Buffer und 1 µl TURBO DNase zu einer bestimmten Menge an RNA gegeben und vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Gemisch wurde im Folgenden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Hinzugabe von 5 µl DNase Inaktivierungsreagenz erfolgte eine erneute Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Mischung bei 10000 g für 1,5 Minuten zentrifugiert und die gereinigte RNA durch Pipettieren des Überstandes in ein neues Röhrchen überführt.

Letztlich wurden die RNA-Konzentrationen der jeweiligen Plazentaprobe unter Verwendung des *Scientific™ NanoDrop 2000 Spectrophotometers* gemessen. Neben der RNA-Konzentration wurde besonderes Augenmerk auf die 280/260 Absorptions-Ratio gelegt, welche die Reinheit der RNA anzeigt. Die optimale 280/260 Absorptions-Ratio für RNA liegt bei 2,0. Im Falle einer zu großen Abweichung von dieser Ratio erfolgte eine erneute Testung der Plazentaprobe. Bei wiederholter nicht verwertbarer Messung wurde auf die Gewebeprobe der Quadranten 6 bzw. 12 zurückgegriffen.

3.4.4 Bioanalyzer

Um die Integrität der RNA im Hinblick auf die Verwendung für die rt-PCR zu überprüfen, wurde das Verfahren der Kapillargelelektrophorese angewandt. Diese Testung erfolgte unter Verwendung des *Agilent RNA 6000 Nano Kit* und des *Bioanalyzer Agilent 2100* von Agilent Technologies (USA) im Labor der Biochemie des UKS. Bevor die eigentliche Testung erfolgen konnte, waren vorbereitende Schritte notwendig. Zunächst musste der *RNA Ladder* für 2 Minuten bei 70°C denaturiert werden mit anschließender Abkühlung auf Eis und bedarfsgerechter Überführung in ein 0,5 ml RNase-freies Aliquot. Als zweiter Schritt erfolgte die Herstellung des benötigten Gels: 550 µl der *RNA gel matrix* wurden bei 1500 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, sodass Aliquots mit 65 µl gefiltertem Gel zur Verfügung standen und diese in 0,5 ml RNase-freie Röhrchen überführt werden konnten. Als letzten Vorbereitungsschritt wurde der *Gel-Dye Mix* vorbereitet: Nach einer 30-minütigen Erwärmung bei Raumtemperatur wurde dieser für 10 Sekunden mit einem Vortexer gemischt. 1 µl des *Gel-Dye Mix* wurde daraufhin in das 65 µl Aliquot mit dem gefilterten Gel pipettiert. Nach erneutem Durchmischen mithilfe des Vortexers wurde die Mischung bei 13000 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und musste innerhalb eines Tages verwendet werden. Nachdem alle nötigen Vorbereitungsschritte beendet waren, konnte die eigentliche Testung der RNA-Proben auf deren Integrität erfolgen. Zu Beginn jedes Durchlaufs wurde ein neuer RNA-Chip in die *priming station* eingelegt. Daraufhin wurden 9 µl des *Gel-Dye Mixes* in die Vertiefungen des Chips pipettiert, die mit einem **G** markiert waren. Die *priming station* wurde geschlossen und der Stempel wurde nach unten gedrückt, bis dieser von einem Clip gehalten wurde. Nach 30 Sekunden wurde der Clip gelöst und nach weiteren 5 Sekunden der Stempel langsam zurückgeführt. Nun wurden 9 µl des *Gel-Dye Mixes* in die Vertiefungen des Chips pipettiert, die mit einem **G** markiert waren. Daraufhin wurden jeweils 5 µl des RNA-Markers in alle 12 Vertiefungen und in die Vertiefung mit dem Leiter-Symbol gegeben. Nachdem 1 µl des vorbereiteten *Ladders* in die Vertiefung mit dem Leiter-Symbol und jeweils 1 µl von jeder RNA-Probe in die übrigen 12 Vertiefungen pipettiert wurden, wurde der Chip für 1 Minute und 2400 rpm mit dem Vortexer gemischt. Die Auswertung erfolgte letztlich in dem *Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument*.

Das entsprechende Programm liefert eine sogenannte RIN (*RNA Integrity Number*). Die RIN ist ein standardisiertes Qualitätslabel, welches die Reinheit/Unversehrtheit der RNA angibt. Diese kann Zahlen von 1 bis 10 annehmen, wobei 1 einer völlig degradierten RNA und 10 einer völlig intakten RNA entspricht. Bei RIN-Ergebnissen ≥ 5 kann mit aussagekräftigen Werten für die PCR gerechnet werden, welchen wir daher als *Cut-off*-Wert für unsere Studie festlegten (Becker et al., 2009). Abbildungen 6 und 7 zeigen Beispiele der Bioanalyzer-Messung von jeweils drei RNA-Proben einer Kontrollprobandin bzw. einer PE-Patientin.

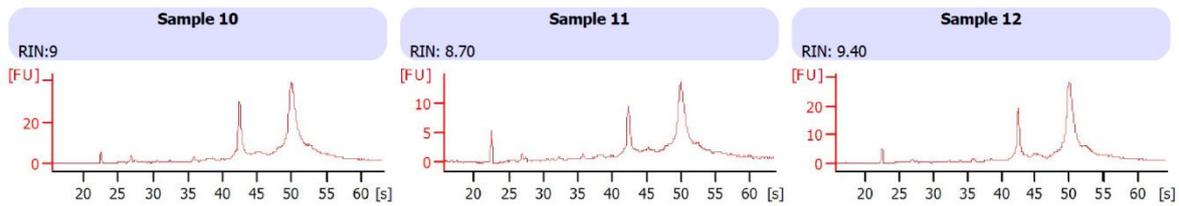


Abbildung 6. Beispiel einer Bioanalyser-Messung von drei RNA-Proben einer gesunden Schwangeren

Die drei Diagramme zeigen das Ergebnis der Kapillargelelektrophorese von drei RNA-Proben einer gesunden Schwangeren. Bei Vorliegen einer unversehrten RNA sollten sich folgende „Peaks“ zeigen: Ein Marker-Peak bei ca. 25 s und zwei ribosomale Peaks bei ca. 40-45 s bzw. 50 s; dabei sollte der erste ribosomale Peak (18S) kleiner als der zweite ribosomale Peak (28S) sein. RIN (*RNA Integrity Number*), FU (*Fluorescence Units*), s (Zeit in Sekunden).

Quelle: Eigene Darstellung

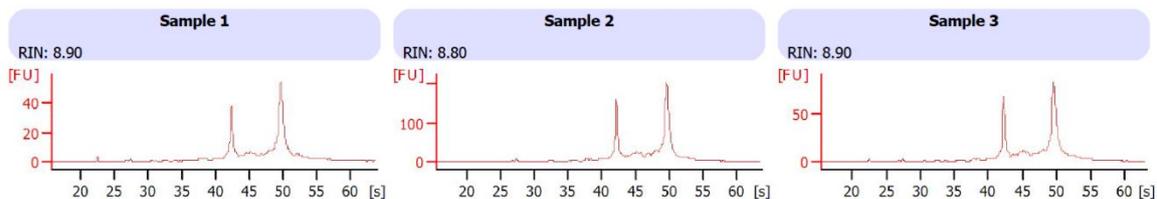


Abbildung 7. Beispiel einer Bioanalyser-Messung von drei RNA-Proben einer PE-Patientin

Die drei Diagramme zeigen das Ergebnis der Kapillargelelektrophorese von drei RNA-Proben einer PE-Patientin. Bei Vorliegen einer unversehrten RNA sollten sich folgende „Peaks“ zeigen: Ein Marker-Peak bei ca. 25 s und zwei ribosomale Peaks bei ca. 40-45 s bzw. 50 s; dabei sollte der erste ribosomale Peak (18S) kleiner als der zweite ribosomale Peak (28S) sein. RIN (*RNA Integrity Number*), FU (*Fluorescence Units*), s (Zeit in Sekunden).

Quelle: Eigene Darstellung

3.4.5 Ausschluss von DNA-Anteilen in den RNA-Proben

Um potenzielle DNA-Anteile in der gewonnenen RNA auszuschließen, wurde die Prüfung auf DNA nach den Leitlinien des *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* von Applied Biosystems (USA) und der zugehörigen 7500 Software durchgeführt. Dieser Vorgang ist nötig, da bereits minimale DNA-Sequenzen die PCR stören und die Ergebnisse verfälschen könnten. Für jede RNA-Probe wurde ein totales Volumen von 15 µl verwendet. Pro Probe setzte sich das Reaktionsgemisch aus folgenden Reagenzien zusammen:

- 7,5 µl Master Mix
- 5,75 µl RNase-freies Wasser
- 0,75 µl Primer
- 1 µl RNA-Probe

Das Reaktionsgemisch pro RNA-Probe wurde jeweils in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben und durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Röhrchen wurden sicher verschlossen und kurz zentrifugiert, um Überreste von der Wand zu lösen und Luftblasen zu eliminieren. Nach Überführung in eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde diese in den *ThermoCycler* gegeben, um die Analyse zu starten. Alle getesteten Proben erwiesen sich als DNA-frei.

3.4.6 Reverse Transkription der RNA

Die Voraussetzung zur Anwendung der rt-PCR ist die vorherige Umschreibung der extrahierten RNA in die komplementäre DNA (*complementary DNA* = cDNA). Dieser als „Reverse Transkription“ bezeichnete Vorgang wurde unter Verwendung des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems (USA) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Zunächst wurde der Master Mix auf Eis hergestellt. Dieser setzte sich pro RNA-Probe aus folgenden Reagenzien zusammen:

- 2 µl RT Buffer
- 0,8 µl eines 100 mmol dNTP Mix
- 2 µl RT Random Primers
- 1 µl MultiScript™ Reverse Transcriptase
- 4,2 µl Nuclease-freies Wasser

Der Master Mix mit einem totalen Volumen von 10 µl pro Reaktion wurde gemischt und zentrifugiert. Nun wurden pro RNA-Probe 10 µl Master Mix sowie 10 µl der RNA-Probe (10% mol pro Lösung) in ein 0,2 ml PCR-Röhrchen gegeben und durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Röhrchen wurden sicher verschlossen und kurz zentrifugiert, um Überreste von der Wand zu lösen und Luftblasen zu eliminieren. Daraufhin wurden die Röhrchen in den *ThermoCycler* gegeben, um die reverse Transkription zu starten. Die Konditionen des *ThermoCyclers* sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11. Konditionen des *ThermoCyclers* bei der reversen Transkription der RNA

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

Quelle: Modifiziert entsprechend des Protokolls des *High Capacity cDNA Reverse Transcription-Kit* von Applied Biosystems™ (USA)

Nach Beendigung des Vorgangs wurden die cDNA-Proben bis zur Durchführung der PCR in einem Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

3.4.7 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)

Die Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren und dient unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Substraten der Vervielfältigung und Quantifizierung von cDNA in Echtzeit. Zur Quantifizierung wird die Menge der fluoreszierenden Signale in einen numerischen Wert umgewandelt. Der PCR-Vorgang an sich setzt sich aus meist 20 bis 50 Zyklen zusammen, wobei jeder Zyklus wiederum aus drei Schritten besteht. Im ersten Schritt erfolgt zunächst die Denaturierung der Ausgangs-DNA bei einer Temperatur von 95°C, bei der die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge getrennt wird. Nach Abkühlung der Temperatur auf 50-70°C lagern sich die Primer im Rahmen der Primerhybridisierung/*Annealing* an das komplementäre 3' Ende jedes DNA-Einzelstranges an. Für die anschließende Amplifikation/*Extension* wird die Temperatur auf 72°C erhöht, sodass optimale Bedingungen für die thermostabile DNA-Polymerase bestehen. Diese ermöglicht abschließend die Synthese des komplementären DNA-Stranges (Müller und Prange, 2016). Ein Zyklus einer PCR ist in Abbildung 8 dargestellt.

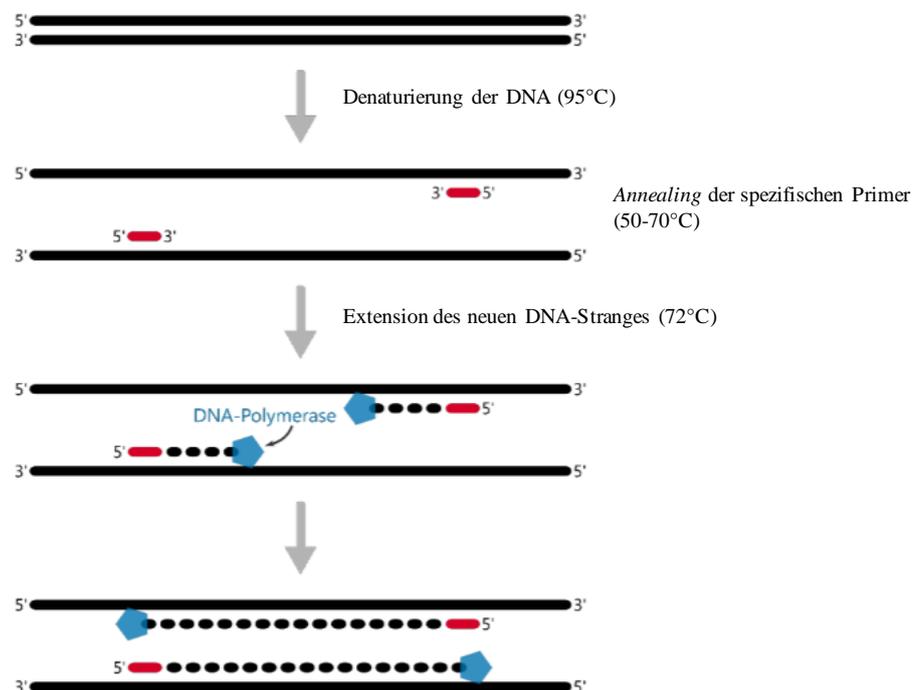


Abbildung 8. Zyklus einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die Ausgangs-DNA bei 95°C denaturiert und so in ihre Einzelstränge zerlegt. Im zweiten Schritt (*Annealing*) erfolgt bei 50-70°C die Anlagerung der spezifischen Primer an die Einzelstränge der Ausgangs-DNA. Im letzten Schritt (*Extension*) wird die Temperatur bei 72°C stabil gehalten, um die DNA mit Hilfe der DNA-Polymerase zu vermehren. Die exponentielle Amplifikation der Ziel-DNA erfolgt durch wiederholte Zyklen.

Quelle: in Anlehnung an Gürtler et al., 2019

Bei der in dieser Studie angewandten rt-PCR liegt die Besonderheit in der Verwendung eines fluoreszierenden Farbstoffes, welcher es erlaubt, in Echtzeit die Menge der polymerisierten DNA zu messen. Die rt-PCR wurde entsprechend des Protokolls des *TaqMan® Gene Expressions Assays* und mithilfe des *7500 Fast Real-Time PCR System* von Applied Biosystems (USA) sowie des *ThermoCyclers* durchgeführt. Die in dieser Arbeit untersuchten Gene waren DKK1 und CTNNB1. Für die relative Quantifizierung wurde das Referenz-Gen Actin beta (ACTB) herangezogen, auch *Housekeeping*-Gen genannt. Referenz-Gene weisen ein konstantes Expressionsniveau auf und werden durch experimentelle Behandlung nicht beeinflusst (de Jonge et al., 2007). Jede Probe wurde auf alle drei Gene geprüft (Tabelle 12).

Tabelle 12. *TaqMan Gene Expression Assays* für die quantitative rt-PCR

Gen-Name	Gen-Symbol	<i>TaqMan® assay ID</i>
Dickkopf 1	<i>DKK1</i>	Hs00183740_m1
Catenin beta 1	<i>CTNNB1</i>	Hs00355045_m1
^a Actin beta	<i>ACTB</i>	Hs03929097_m1

^a Körpereigenes Gen/*Housekeeping*-Gen

Quelle: Eigene Darstellung

Pro Durchgang konnten neun Proben plus Negativkontrolle getestet werden. Alle Proben wurden dreifach getestet. Die Negativkontrolle diente dem Ausschluss von potenziellen Verunreinigungen und enthielt statt cDNA destilliertes Wasser. Alle Proben wurden verdünnt, um eine cDNA-Konzentration von 10 ng zu erhalten. Pro Probe setzte sich das PCR-Reaktionsgemisch aus folgenden Reagenzien zusammen:

- 10 µl *TaqMan® Gene Expression Master Mix*
- 1 µl *TaqMan® Gene Expression Assay* (Actin beta, DKK1 bzw. Catenin beta 1)
- 7 µl RNase-freies Wasser
- 2 µl cDNA

Die jeweils resultierenden 20 µl wurden in ein Nuklease-freies 0,2 ml PCR-Röhrchen pipettiert und nach Verschließen der Kappe sanft gemischt. Nach Überführen in die *96-well*-Mikrotiterplatte, vorsichtigem Versiegeln und einer 2-minütigen Zentrifugation wurde die Platte in den *ThermoCycler* gegeben. Die Auswertung der Messung erfolgte mit der *7500 Software v.2.0.5* der Life Technologies GmbH (Deutschland). Diese Software entwirft nach vollständiger Testung ein Amplifikationsdiagramm (s. Abbildung 9), welches die vier verschiedenen Phasen der Amplifikation darstellt. Die erste Phase bildet die Hintergrundfluoreszenz ab, die der Basislinie der rt-PCR-Reaktion während der anfänglichen PCR-Zyklen entspricht. Das Fluoreszenzsignal ändert sich in dieser Phase kaum. In den folgenden zwei

Phasen kommt es zur zunächst exponentiellen und daraufhin linearen Verstärkung des Fluoreszenzsignals. In der letzten Phase bildet dieses ein Plateau. Die Schwellenlinie (*threshold*) ist der Signalpegel, der einen statistisch signifikanten Anstieg gegenüber dem berechneten Basissignal widerspiegelt (Life Technologies, 2015).

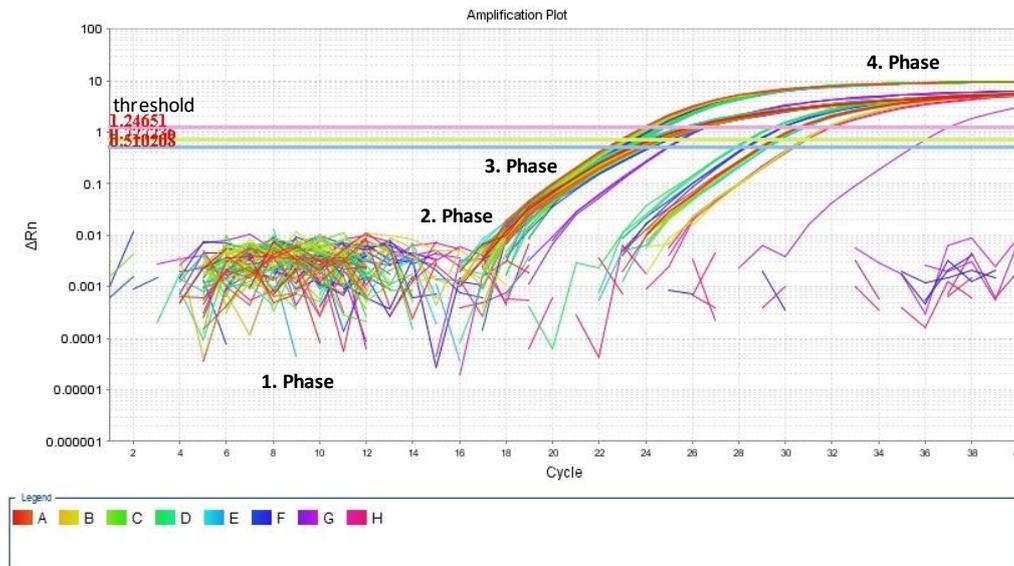


Abbildung 9. Ergebnisse einer rt-PCR zur Genanalyse

Das Diagramm zeigt das logarithmische Verhältnis zwischen dem Ausmaß an fluoreszierenden Signalen (ΔRn ; y-Achse) und der Anzahl an Durchläufen (*Cycle*; x-Achse). Ein rt-PCR-Durchgang gliedert sich grob in vier Phasen (1. Phase: Hintergrundfluoreszenz, 2. Phase: exponentielle Verstärkung, 3. Phase: lineare Verstärkung, 4. Phase: Plateauphase). Zur Quantifizierung dient der C_t -Wert, der den Schnittpunkt zwischen einem fluoreszierenden Signal und der Schwellenlinie (*threshold*) darstellt.

Quelle: Eigene Darstellung

Der Schwellenwertzyklus (C_t) gibt die Zyklusnummer an, bei der die in der Reaktion erzeugte Fluoreszenzkurve die Schwellenwertlinie überschritten hat. C_t -Wert und cDNA-Konzentration verhalten sich reziprok zueinander. Der C_t -Wert ist umso niedriger, je mehr cDNA-Konzentration in der Ausgangsprobe vorhanden war. Alle Proben mit einem Variationskoeffizienten des Schwellenwertzyklus (C_t) $> 5\%$ wurden erneut getestet. Der vergleichende ΔC_t -Wert wurde angewandt, um mit Hilfe des Referenz-Gens Actin beta die relative RNA-Menge in den untersuchten Proben zu erhalten. Der ΔC_t -Wert wurde berechnet, indem die C_t -Werte von ACTB von den C_t -Werten der interessierenden RNA subtrahiert wurden, wobei $\Delta C_t = ([C_t\text{-RNA von Interesse}] - [C_t\text{-RNA von ACTB}])$ gilt. Der $\Delta\Delta C_t$ -Wert wiederum wurde berechnet, indem der mittlere ΔC_t -Wert der Kontrollgruppe von dem ΔC_t -Wert der Fallgruppe subtrahiert wurde, wobei $\Delta\Delta C_t = ([\Delta C_t\text{-Fälle}] - [\Delta C_t\text{-Kontrollen}])$ gilt. Die

relative Menge oder der *Fold Change Cut-Off* für die mRNAs wurden mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Gleichung berechnet (Livak und Schmittgen, 2001).

3.5 Statistische Methoden

Die klinischen Daten der Probandinnen wurden mittels des in dem Universitätsklinikum des Saarlandes etablierten Softwaresystems SAP ermittelt, indem u. a. auf dort hinterlegte Arztbriefe, Geburtsprotokolle und Laborwerte zurückgegriffen wurde. Alle klinischen Parameter der Probandinnen sowie alle laborchemischen Ergebnisse wurden daraufhin pseudonymisiert und anonymisiert in einer Microsoft Excel-Tabelle zusammengetragen und mithilfe der SPSS Software Version 21 (IBM, Armonk, NY; USA) analysiert und ausgewertet.

Im Falle einer Gemini-Geburt wurden die erhobenen Parameter für Geburtsgewicht, APGAR-Score, IUGR und Nabelschnur-pH gemittelt.

Mittelwert, Standardabweichung, Median und Spannweite wurden für die deskriptive Statistik der parametrischen und nicht-parametrischen stetigen Variablen herangezogen. Die kategorischen Variablen (Gravidität, Parität, An- bzw. Abwesenheit von auf PE-hinweisende Symptome, APGAR-Wert und An- bzw. Abwesenheit einer IUGR) wurden wiederum mittels absoluter und relativer Häufigkeit beschrieben. Zur Überprüfung der Anwendungsvoraussetzung des parametrischen Student's t-Tests wurden die abhängigen Variablen zunächst mittels eines Histogramms und des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Die Annahme der Varianzhomogenität für den t-Test für unabhängige Stichproben erfolgte anhand des Levene-Tests. Die Nullhypothese wurde im Anschluss gegen die Alternativhypothese getestet, indem bei den stetigen Variablen der parametrische Student's t-Test bei Vorliegen einer Normalverteilung oder der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten Daten angewandt wurde. Der Chi-Quadrat-Test diente zur Auswertung der kategorischen Variablen wie Gravidität, Parität, An- bzw. Abwesenheit von auf PE-hinweisende Symptomen, APGAR-Wert und An- bzw. Abwesenheit von IUGR. Zum Vergleich aller drei eingeschlossenen Gruppen hinsichtlich Alter der Studienteilnehmerinnen und DKK1-Serumkonzentration fand der Kruskal-Wallis-Test Anwendung. Die Korrelationen zwischen zwei stetigen Variablen wurden unter Verwendung des parametrischen Pearson-Korrelationskoeffizienten bei Normalverteilung bzw. des nicht-parametrischen Spearman-Korrelationskoeffizienten im Falle nicht normalverteilter Daten und des entsprechenden Tests der Nullhypothese, bei der der Korrelationskoeffizient gleich Null ist, bewertet. Bei allen statistischen Tests wurde das beidseitige Signifikanzniveau auf 5% festgelegt, sodass die Nullhypothese bei $p < 0.05$ abgelehnt wurde. Entsprechend für explorative Studien wurden keine Anpassungen für Mehrfachtestungen vorgenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakteristika der Studienpopulation

In die vorliegende Studie wurden nach erfolgter Aufklärung und Einwilligung entsprechend der Ein- und Ausschlusskriterien insgesamt $N = 90$ Probandinnen zwischen 28 und 42 Jahren eingeschlossen. Dabei handelte es sich um 30 gesunde, nicht schwangere Frauen, 30 schwangere Frauen ohne gesundheitliche Einschränkungen und 30 Patientinnen mit diagnostizierter Präeklampsie. Zwei Patientinnen aus der Präeklampsie-Gruppe wurden nachträglich aus der Studie ausgeschlossen, nachdem Ausschlusskriterien vorlagen. Es zeigte sich unter allen Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Alters der Studienteilnehmerinnen, sodass von Altersgleichheit ausgegangen werden konnte. Die Altersverteilung ist in Abbildung 10 veranschaulicht.

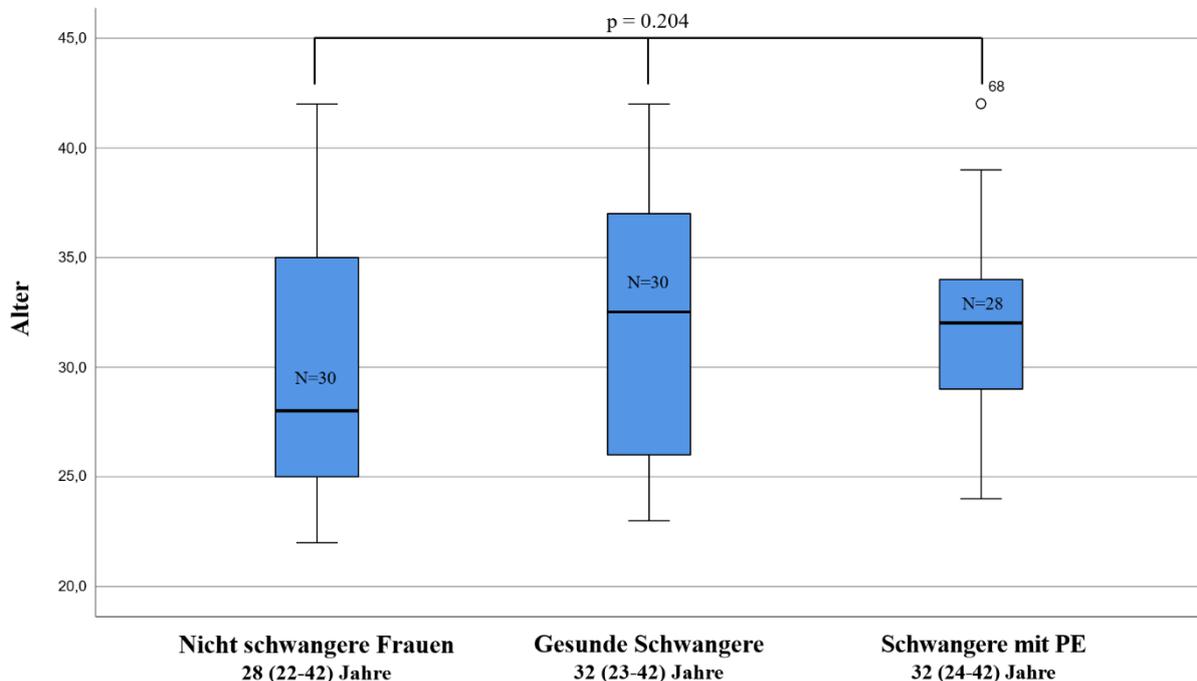


Abbildung 10. Altersverteilung

Darstellung als Median (Spannweite). Der p-Wert wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Statistisch signifikant ($p < 0.05^*$), hoch signifikant ($p < 0.01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0.001^{***}$). N = Stichprobenumfang.

Quelle: Eigene Darstellung

Da bei den gesunden, nicht schwangeren Frauen lediglich das Alter als klinischer Parameter erhoben wurde, beziehen sich die folgenden Daten auf die Gruppen der Schwangeren, wozu die gesunden Schwangeren und die Schwangere mit PE zählen.

4.1.1 Gesunde Schwangere vs. Präeklampsie

Um die klinischen Charakteristika und Laborwerte der gesunden Schwangeren mit denen der präeklampsischen Schwangeren zu vergleichen, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben bei Vorliegen einer Normalverteilung, der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben im Falle nicht normalverteilter Daten und der Chi-Quadrat-Test für kategoriale Variablen durchgeführt und auf Signifikanz geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0.05$ festgelegt.

4.1.1.1 Klinische Charakteristika

Die 30 gesunden Schwangeren der Kontrollgruppe und die 28 Patientinnen mit Präeklampsie unterschieden sich in vielen klinischen und schwangerschaftsspezifischen Parametern voneinander. Auch das neonatale Outcome war zwischen den beiden Gruppen verschieden. Eine Übersicht der klinischen Charakteristika der gesunden Schwangeren und der Präeklampsie-Patientinnen sowie deren Neugeborenen zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13. Gesunde Schwangere vs. Präeklampsie - Klinische Charakteristika

Charakteristika	Gesunde Schwangere	Präeklampsie	p-Wert
Alter (Jahre)	32 ± 5,7 N=30	32 ± 4,4 N=28	NS
BMI (kg/m ²)	31,8 (20,2-47,9) N=30	33,6 (24,8-58,1) N=28	0.033*
Gravidität			< 0.001***
• Primigravida	N=5 (16,7%)	N=19 (67,9%)	
• Secundigravida	N=13 (43,3%)	N=6 (21,4%)	
• Multigravida	N=12 (40%)	N=3 (10,7%)	
Parität			< 0.001***
• Nullipara	N=6 (20%)	N=22 (78,6%)	
• Primipara	N=21 (70%)	N=4 (14,3%)	
• Multipara	N=3 (10%)	N=2 (7,1%)	
RR systolisch (mmHg)	114 ± 15 N=30	149 ± 14 N=28	< 0.001***
RR diastolisch (mmHg)	68 ± 11 N=30	90 ± 11 N=28	< 0.001***
Puls (S/min)	52 (40-112) N=30	80 (52-105) N=28	< 0.001***
Symptome			NS
• Ja	N=15 (50%)	N=19 (67,9%)	
• Nein	N=15 (50%)	N=9 (32,1%)	
Gestationsalter (Wochen)	38+4 (37+1-39+4) N=30	35+4 (26+4-40+2) N=28	< 0.001***
Geburtsgewicht (g)	3343 ± 530 N=30	2072 ± 1012 N=27	< 0.001***
Nabelschnur-pH	7,3 (7,2-7,4) N=30	7,3 (7,2-7,4) N=27	NS
APGAR-Wert ≥ 7			
• 1 Minute	N=28 (93,3%)	N=19 (70,4%)	0.035*
• 5 Minuten	N=30 (100%)	N=26 (96,3%)	NS
• 10 Minuten	N=30 (100%)	N=26 (96,3%)	NS
IUGR			0.001**
• Ja	N=0 (0%)	N=9 (32,1%)	
• Nein	N=30 (100%)	N=19 (67,9%)	

Statistisch signifikant ($p < 0.5^*$), hoch signifikant ($p < 0.01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0.001^{***}$); Darstellung als Mittelwert ± Standardabweichung oder als Median und Spannweite für parametrische und nicht-parametrische kontinuierliche Variablen. Darstellung als absolute und relative Häufigkeit für kategorische Variablen; Symptome = Anwesenheit von einem oder mehreren auf Präeklampsie hinweisende, klinische Merkmale: Kopfschmerzen, schwere Ödeme, vaginale Blutungen, rechtsseitige Oberbauchschmerzen und Augenflimmern. N = Stichprobenumfang; NS = nicht signifikant ($p > 0.05$); BMI = *Body-Mass-Index*; RR = Blutdruck; APGAR-Wert = Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen, Reflexe; IUGR = *intrauterine growth restriction*.

In Anlehnung an die bereits unter Punkt 4.1 herausgestellte Altersgleichheit in allen drei untersuchten Gruppen, konnte auch zwischen den gesunden Schwangeren und den präeklampsischen Schwangeren kein signifikanter Altersunterschied gezeigt werden, sodass eine Vergleichbarkeit möglich war. In der Kontrollgruppe zeigte sich zum Entbindungszeitpunkt ein signifikant niedrigerer BMI von durchschnittlich 31,8 kg/m² verglichen mit den Präeklampsie-Patientinnen, die im Durchschnitt einen BMI von 33,6 kg/m² zum Entbindungszeitpunkt aufwiesen ($p = 0.033$). Somit lagen nach WHO-Klassifikation beide Gruppen im adipösen Bereich (Adipositas Grad 1). Der BMI wies innerhalb der gesamten Studienpopulation mit einem Minimum von 20,2 kg/m² und einem Maximum von 58,1 kg/m² eine große Streuung auf. Unter den Präeklampsie-Müttern waren 19 Frauen zum ersten Mal schwanger. In der Kontrollgruppe erwarteten die meisten Schwangeren bereits ihr mindestens zweites Kind ($p < 0.001$). Daraus folgernd waren die Präeklampsie-Patientinnen zu ca. 78% Nullipara. Dieser Wert war signifikant höher als in der Kontrollgruppe, wo sich nur zu 20% Nullipara fanden ($p < 0.001$). Die Gegenüberstellungen von Gravität und Parität zwischen den beiden Gruppen sind in den Abbildung 11 und 12 dargestellt.

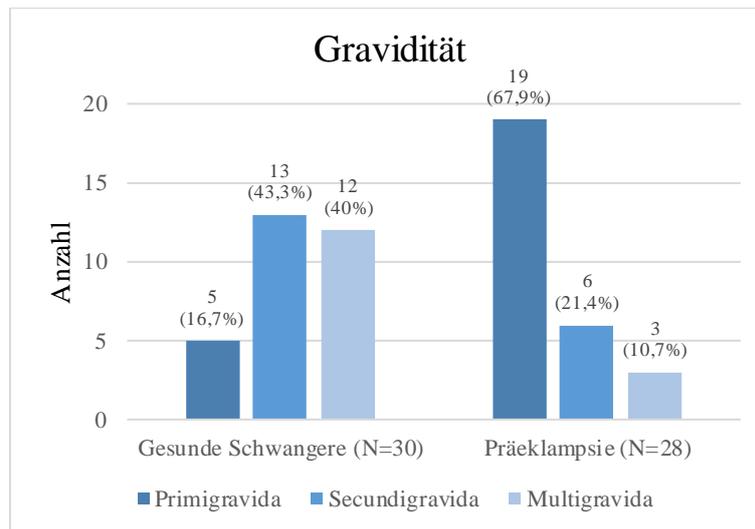


Abbildung 11. Vergleich der Gravidität zwischen den gesunden Schwangeren und den Schwangeren mit Präeklampsie

Linke Seite: Graphische Darstellung der Gravidität bei den gesunden Schwangeren. **Rechte Seite:** Graphische Darstellung der Gravidität bei den Schwangeren mit Präeklampsie.

Quelle: Eigene Darstellung

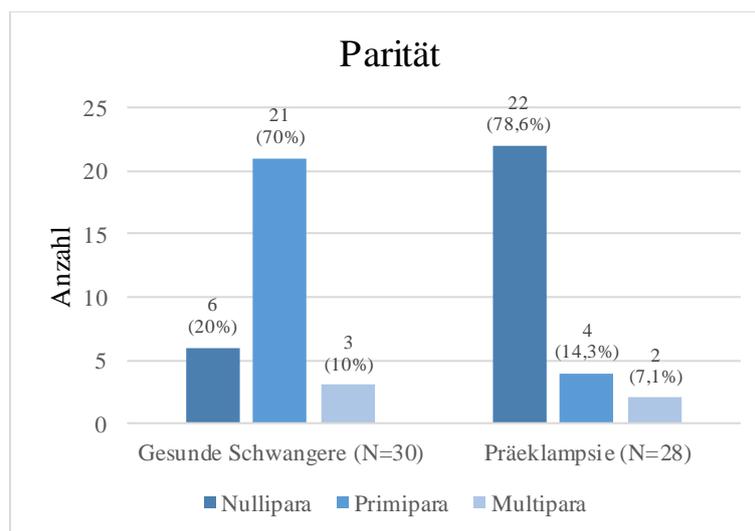


Abbildung 12. Vergleich der Parität zwischen den gesunden Schwangeren und den Schwangeren mit Präeklampsie

Linke Seite: Graphische Darstellung der Parität bei den gesunden Schwangeren. **Rechte Seite:** Graphische Darstellung der Parität bei den Schwangeren mit Präeklampsie.

Quelle: Eigene Darstellung

Darüber hinaus ergaben sich höchst signifikante Unterschiede in den erhobenen Vitalparametern Blutdruck (systolisch und diastolisch) und Puls zum Zeitpunkt der Geburt. Entsprechend der Diagnose „Präeklampsie“ war der durchschnittliche Blutdruck der Frauen mit Präeklampsie statistisch signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Das galt sowohl für den systolischen als auch für den diastolischen Wert ($p < 0.001$). Während der systolische und diastolische Blutdruckwert der gesunden Schwangeren im Normbereich lag (114/68 mmHg), zeigten die Schwangeren mit Präeklampsie im Schnitt hypertensive Blutdruckwerte (149/90 mmHg). Auch der Puls war im Durchschnitt in dieser Gruppe statistisch signifikant höher ($p < 0.001$). Ferner wurden auf Präeklampsie hinweisende, klinisch-pathologische Symptome erfragt, zu denen Kopfschmerzen, schwere Ödeme, vaginale Blutungen, rechtsseitige Oberbauchschmerzen und Augenflimmern zählten. Bei Anwesenheit von einem der klinischen Merkmale wurden die Symptome als positiv gewertet. Unter den gesunden Schwangeren hatten 50% der Probandinnen mindestens ein auf Präeklampsie-hinweisendes Symptom. Bei den Präeklampsie-Patientinnen litten sogar ca. zwei Drittel unter den o.g. Symptomen, wobei der Unterschied nicht signifikant war ($p = 0.192$). Unter den 30 Frauen mit Präeklampsie entwickelten sechs Frauen ein HELLP-Syndrom. Der Geburtsmodus war bei allen gesunden Schwangeren die primäre Sectio caesarea. Die präeklampsischen Schwangeren brachten ihre Kinder sowohl als Spontangeburt als auch mittels eines Kaiserschnitts auf die Welt. In der Präeklampsie-Gruppe fanden sich drei Zwillingschwangerschaften. Die klinischen Parameter (Geburtsgewicht, Nabelschnur-pH, APGAR-Wert und IUGR) der neugeborenen Zwillingspaare wurden gemittelt. Sowohl das Gestationsalter bei Geburt als auch das Geburtsgewicht des Kindes lagen in der Präeklampsie-Gruppe höchst signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe ($p < 0.001$). Während die Frauen mit Präeklampsie im Schnitt bereits nach ca. 248 Tagen (35+4 SSW) entbunden, bekamen die gesunden Mütter ihre Kinder durchschnittlich erst nach ca. 269 Tagen (38+4 SSW). Somit waren die Kinder der Präeklampsie-Patientinnen häufiger Frühgeborene (definitionsgemäß Geburt vor der vollendeten 37. SSW). Darüber hinaus wogen die Kinder der Präeklampsie-Mütter bei Geburt im Schnitt ca. 1271 Gramm weniger als die Kinder der gesunden Mütter. Der Nabelschnur-pH-Wert war bei den Neugeborenen beider Gruppen annähernd gleich. Zur Beurteilung des klinischen Zustands des Neugeborenen erfolgte die Erhebung des APGAR-Wertes, welcher auf Dr. Virginia Apgar zurückgeht (Apgar, 1953). Nach einer Minute, fünf Minuten und zehn Minuten wurden jeweils fünf Kriterien des klinischen Zustands des Neugeborenen erhoben, zu denen Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen und Reflexe zählen. Pro Zeitpunkt können Werte von 0 bis 10 erreicht werden. Einen Wert von ≥ 7 nach einer Minute erreichten nur ca. 70% der Neugeborenen der PE-Patientinnen, aber über 93% der Neugeborenen der Kontrollgruppe ($p = 0.035$). Nach 5 und 10 Minuten ergaben sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede im APGAR-Wert, was auf eine initial langsamere postnatale Adaptation in der Präeklampsie-Gruppe hindeutet. Bei neun Neugeborenen der Präeklampsie-Mütter wurde eine Intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) diagnostiziert. In der Kontrollgruppe war kein Neugeborenes

entwicklungsverzögert, sodass ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen verzeichnet werden konnte ($p = 0.001$).

4.1.1.2 Laborparameter

Laborchemisch wiesen die gesunden Schwangeren im Schnitt einen signifikant niedrigeren Hämoglobin-Wert als die PE-Patientinnen auf ($p = 0.011$), wobei der Hämoglobin-Median der Kontrollgruppe im anämischen Bereich lag. Unter den Elektrolyten zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied in den Kalium-Werten zwischen beiden Gruppen ($p = 0.002$). Die Natrium-Werte waren hingegen in beiden Gruppen annähernd gleich. Zudem zeigten sich bei den Präeklampsie-Patientinnen höchst signifikant höhere Kreatinin- und Harnsäure-Werte ($p < 0.001$). Der DeRitis-Quotient als Ausdruck des Leberstatus lag in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Präeklampsie-Gruppe ($p = 0.046$), wobei beide Mediane deutlich oberhalb des Normbereichs lagen. Ergab sich bezüglich der ALT-Werte kein signifikanter Unterschied, stiegen die AST-Werte bei den Präeklampsie-Patientinnen gegenüber der Kontrollgruppe deutlich an ($p < 0.001$). Da die Leberwerte jedoch in der Kontrollgruppe nicht regelmäßig erhoben wurden, ist die Aussagekraft der Ergebnisse eingeschränkt. Weder im Bilirubin-Wert noch in der Thrombozytenzahl ergaben sich zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede. Die Laborparameter der gesunden Schwangeren und der Schwangeren mit Präeklampsie zeigt Tabelle 14.

Tabelle 14. Gesunde Schwangere vs. Präeklampsie - Laborparameter

Laborparameter (Referenzbereich)	Gesunde Schwangere	Präeklampsie	p-Wert
Hämoglobin (g/dl) (12,0 – 15,0)	11,6 (6,8-13,9) N=30	12,2 (11-13,5) N=28	0.011*
Natrium (mmol/l) (135 – 145)	137 (133-142) N=29	137 (128-141) N=25	NS
Kalium (mmol/l) (3,5 – 5,1)	4 (3,6-5,1) N=29	4,3 (3,8-5) N= 25	0.002**
Kreatinin (mg/dl) (0,50 – 0,90)	0,53 ± 0,13 N=16	0,75 ± 0,16 N=28	< 0.001***
Harnsäure (mg/dl) (2,4 – 5,7)	4 ± 0,9 N=15	5,9 ± 1,5 N=28	< 0.001***
ALT (U/l) (10 – 35)	19 (16-31) N=15	21 (8-392) N=28	NS
AST (U/l) (10 – 35)	12,5 (9-19) N=14	27,5 (7-242) N=28	< 0.001***
DeRitis-Quotient (0,6 – 0,8)	1,62 (0,84-2,21) N=14	1,3 (0,60-3,40) N=28	0.046*
Bilirubin (mg/dl) (< 1,1)	0,25 (0,2-0,4) N=10	0,2 (0,1-0,8) N=25	NS
Thrombozyten (/nl) (140 – 400)	228 ± 71 N = 30	209 ± 87 N = 28	NS

Statistisch signifikant ($p < 0.05^*$), hoch signifikant ($p < 0.01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0.001^{***}$); Darstellung als Mittelwert ± Standardabweichung oder als Median und Spannweite für parametrische und nicht-parametrische kontinuierliche Variablen; N = Stichprobenumfang; NS = nicht signifikant; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartat-Aminotransferase; U/l = Unit/Liter; DeRitis = AST/ALT.

4.2 DKK1 im Serum

Zur Ermittlung der DKK1-Serumwerte wurden Messungen von insgesamt 90 Studienteilnehmerinnen herangezogen. Zwei Serumproben unter den Präeklampsie-Patientinnen konnten nicht ausgewertet werden, da Ausschlusskriterien vorlagen.

4.2.1 Nicht schwangere Frauen vs. Alle Schwangere

Bei den Schwangeren (gesunde Schwangere und Schwangere mit PE) lag der durchschnittliche DKK1-Mittelwert im Serum signifikant höher als bei den gesunden, nicht schwangeren Frauen. Die Ergebnisse der DKK1-Serumwerte der gesunden, nicht schwangeren Frauen und der Schwangeren zeigt Abbildung 13.

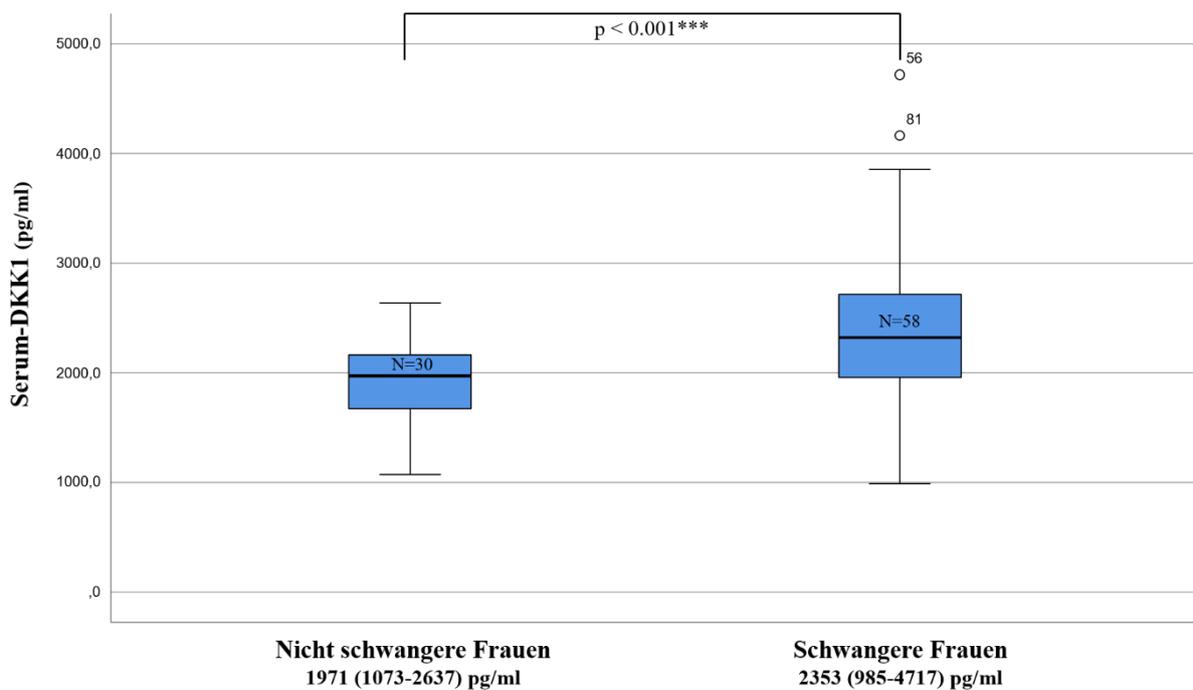


Abbildung 13. DKK1-Serumkonzentration bei gesunden, nicht schwangeren Frauen und allen Schwangeren

Darstellung als Median (Spannweite). Der p-Wert wurde mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Statistisch signifikant ($p < 0.05^*$), hoch signifikant ($p < 0.01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0.001^{***}$). N = Stichprobenumfang.

Quelle: Eigene Darstellung

4.2.2 Nicht schwangere Frauen vs. Gesunde Schwangere vs. Präeklampsie

Setzt man alle drei Gruppen (gesunde, nicht schwangere Frauen, gesunde Schwangere und Schwangere mit PE) bezüglich der DKK1-Serumkonzentrationen in Beziehung zueinander, ergeben sich sowohl signifikante als auch nicht signifikante Ergebnisse, welche in Abbildung 14 dargestellt sind.

Die DKK1-Serumkonzentrationen der 30 gesunden Schwangeren als auch die der 28 präeklampsischen Schwangeren waren signifikant höher als die DKK1-Serumkonzentrationen der 30 gesunden, nicht schwangeren Frauen ($p = 0.001$ beziehungsweise $p = 0.006$). Dabei zeigte sich die größte Differenz in den Ergebnissen zwischen den gesunden, nicht schwangeren Frauen und den gesunden Schwangeren. Zwischen den gesunden und den präeklampsischen Schwangeren zeigte sich hinsichtlich der DKK1-Serumkonzentrationen hingegen kein signifikanter Unterschied ($p = 0.442$). Der p-Wert zwischen allen drei Gruppen lag bei $p = 0.004$.

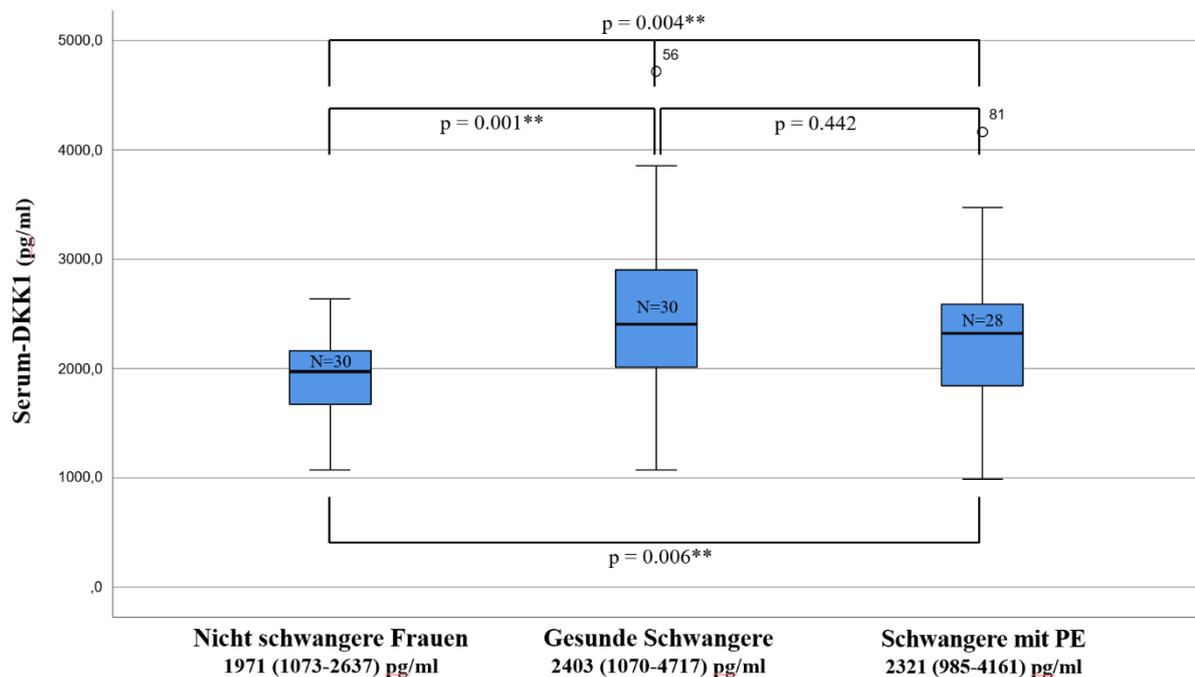


Abbildung 14. DKK1-Serumkonzentration bei gesunden, nicht schwangeren Frauen, gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie

Darstellung als Median (Spannweite). Der p-Wert zwischen allen drei Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Der p-Wert zwischen jeweils 2 Gruppen wurde mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Statistisch signifikant ($p < 0.05^*$), hoch signifikant ($p < 0.01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0.001^{***}$). N = Stichprobenumfang.

Quelle: Eigene Darstellung

4.2.3 Subgruppenanalyse

Um ein Bias bezüglich des Gestationsalters der Schwangeren im Hinblick auf die DKK1-Serumkonzentration auszuschließen, führten wir eine Subgruppenanalyse durch. Wir verglichen die DKK1-Serumproteinpiegel zwischen 18 Frauen mit PE und 18 gesunden Schwangeren, die sich hinsichtlich des Gestationsalters bei der Entbindung nicht signifikant unterschieden (Median [Spannweite]: 268 [266-271] Tage beziehungsweise 262 [235-282] Tage; $p = 0.13$). Allerdings konnte auch in diesem Fall kein signifikanter Unterschied in der DKK1-Serumkonzentration zwischen den gesunden Schwangeren und den Schwangeren mit Präeklampsie detektiert werden ($p = 0.855$). Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt.

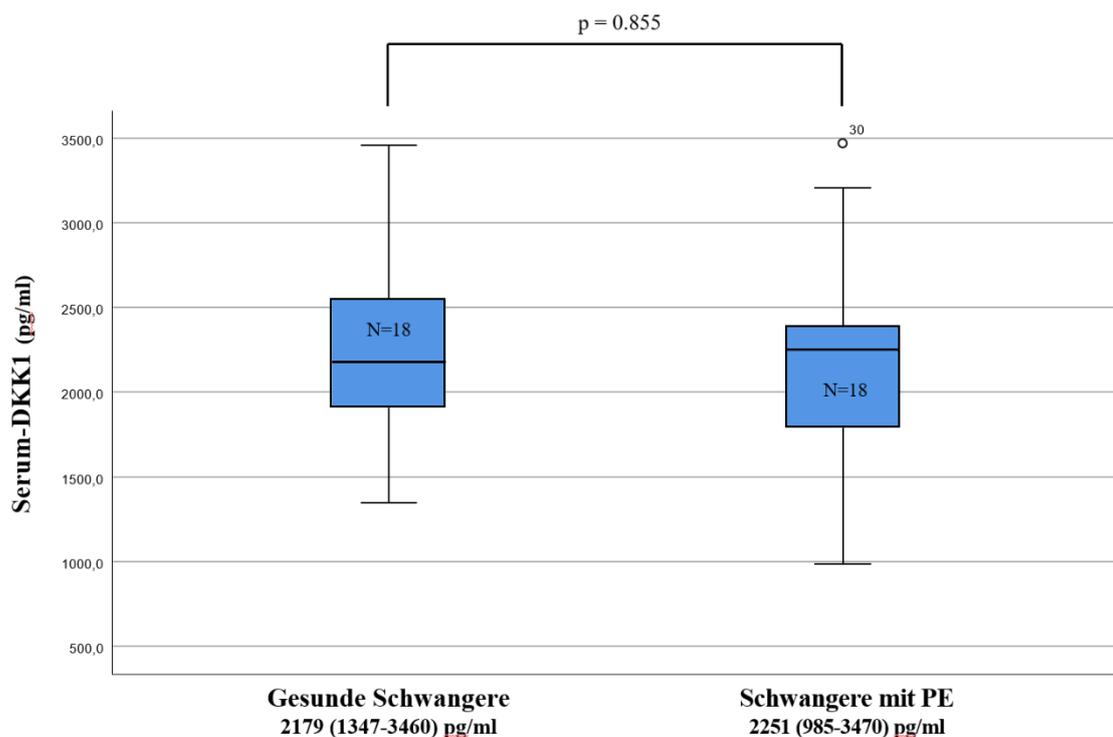


Abbildung 15. Subgruppenanalyse - DKK1-Serumkonzentration bei gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie

Darstellung als Median (Spannweite). Der p-Wert wurde mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Statistisch signifikant ($p < 0.05^*$), hoch signifikant ($p < 0.01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0.001^{***}$). N = Stichprobenumfang.

Quelle: Eigene Darstellung

4.2.4 Korrelationsanalyse

Die DKK1-Serumkonzentrationen korrelierten in allen drei getesteten Gruppen nicht mit dem Alter der Frauen ($p = 0.351$, $p = 0.882$ beziehungsweise $p = 0.739$ für gesunde, nicht schwangere Frauen, gesunde Schwangere und präeklampsische Schwangere). Darüber hinaus haben wir untersucht, ob die DKK1-Serumkonzentration bei den präeklampsischen Schwangerschaften mit anderen klinischen Charakteristika, einschließlich Gestationsalter, Geburtsgewicht, APGAR-Wert, IUGR und Vorhandensein eines oder mehrerer der oben genannten auf PE-hinweisenden Symptome, korreliert. Wir fanden heraus, dass die DKK1-Serumkonzentrationen bei präeklampsischen Frauen mit einem oder mehreren auf PE-hinweisenden Symptomen signifikant niedriger waren (Median [Spannweite]: 2020 [985-2872] pg/ml) verglichen mit den Frauen in der Gruppe ohne diese Symptome (Median [Spannweite]: 2430 [2267-4161] pg/ml). Der p-Wert lag bei $p = 0.012$. Darüber hinaus ergaben sich signifikant niedrigere DKK1-Serumkonzentrationen bei den präeklampsischen Frauen, deren Kinder mit IUGR entwickelt wurden (Median [Spannweite]: 1884 [985-2872] pg/ml) verglichen mit den Fällen mit normalem intrauterinem Wachstum (Median [Spannweite]: 2377 [1764-4161] pg/ml) bei einem p-Wert von $p = 0.048$. Die signifikanten Ergebnisse sind in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt.

Keine anderweitigen signifikanten Korrelationen wurden ermittelt.

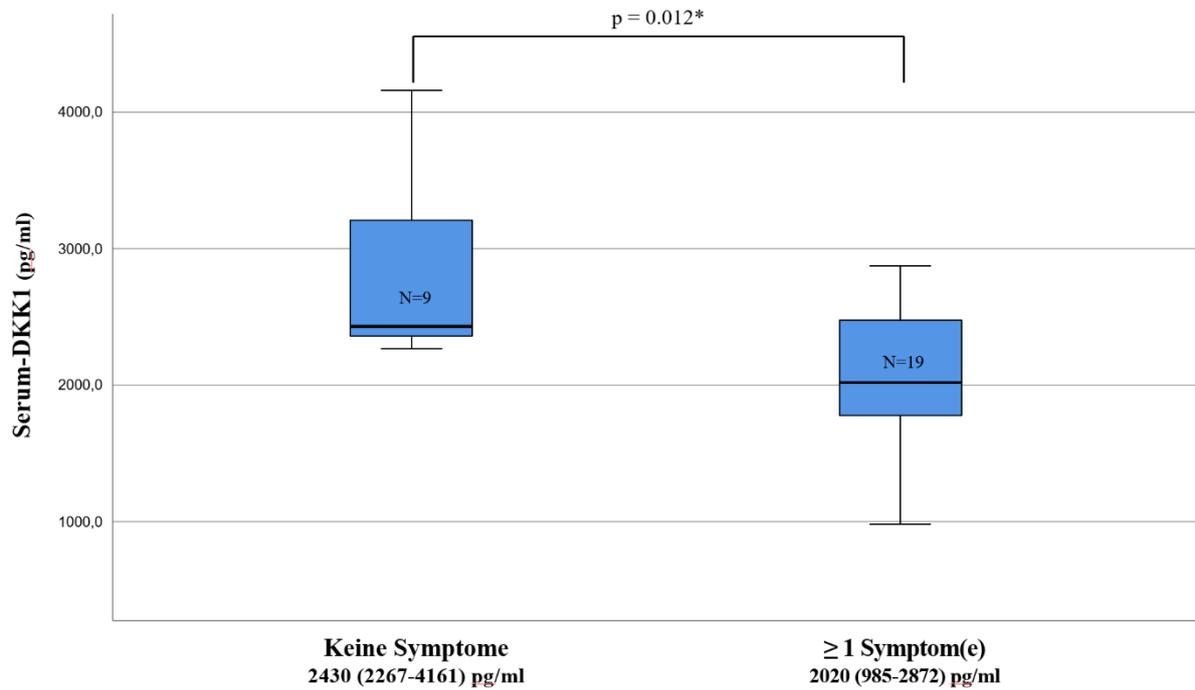


Abbildung 16. Korrelation zwischen DKK1-Serumkonzentration bei Schwangeren mit Präeklampsie und Vorhandensein von auf Präeklampsie-hinweisenden Symptomen

Darstellung der Ergebnisse als Median (Spannweite). Der p-Wert wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Statistisch signifikant ($p < 0.05^*$), hoch signifikant ($p < 0.01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0.001^{***}$). N = Stichprobenumfang.

Quelle: Eigene Darstellung

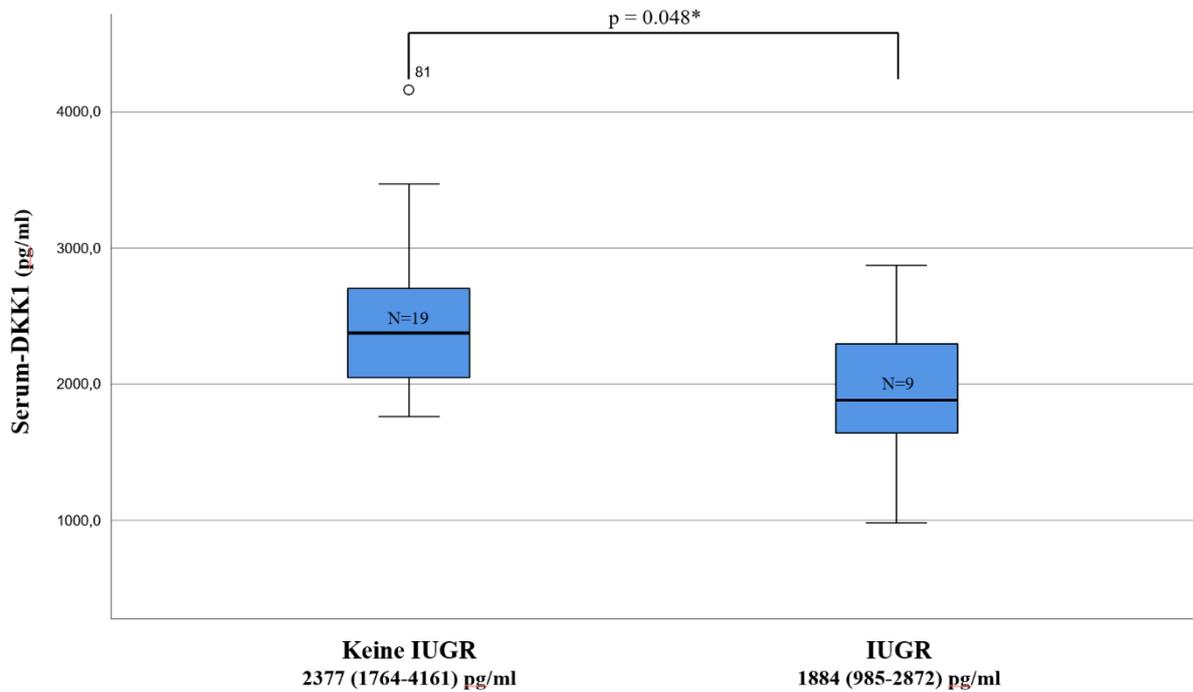


Abbildung 17. Korrelation zwischen DKK1-Serumkonzentration bei Schwangeren mit Präeklampsie und IUGR

Darstellung der Ergebnisse als Median (Spannweite). Der p-Wert wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Statistisch signifikant ($p < 0.05^*$), hoch signifikant ($p < 0.01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0.001^{***}$). IUGR = *Intrauterine Growth Restriction* (Intrauterine Wachstumsretardierung); N = Stichprobenumfang.

Quelle: Eigene Darstellung

4.3 Plazentamorphologie

Die Anfertigung der histologischen Plazentaschnitte erfolgte mit zweierlei Intentionen. Einerseits sollte die An- bzw. Abwesenheit von Präeklampsie-typischen histologischen Merkmalen geprüft werden. Andererseits sollte hinsichtlich der Genexpressionsanalyse die mikroskopische Gleichheit aller entnommenen Gewebeproben einer Patientin bewiesen werden. Es wurden kryostatisch Plazentaschnitte von fünf Kontroll- und fünf PE-Patientinnen hergestellt. Da von jeder Studienteilnehmerin fünf Plazentaprobe vorlagen, erhielt man insgesamt 50 Schnitte. Nach der Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin wurden mit Hilfe einer Mikroskop-Kamera Bilder der Plazentaschnitte in 5- und 10-facher Vergrößerung angefertigt und diese zur histologischen Begutachtung einer Pathologin aus dem Institut für allgemeine und spezielle Pathologie des UKS vorgelegt.

In Abbildung 18 ist exemplarisch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung verschiedener Entnahmestellen der Plazenta einer gesunden Schwangeren dargestellt. Wie erwartet ergaben alle Biopsien entsprechend der Schwangerschaftswoche ein physiologisches Bild ohne Hinweis auf pathologische Ereignisse wie eine Entzündung, eine Dilatation oder eine Obliteration. Es zeigte sich an den entnommenen Stellen eine ausgereifte Plazentastruktur mit guter Vaskularisation, sodass man von einer auch insgesamt gesunden Plazenta ausgehen konnte.

In Abbildung 19 ist zum Vergleich exemplarisch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung verschiedener Entnahmestellen der Plazenta einer Präeklampsie-Patientin dargestellt. Im Großen und Ganzen ähnelten die Biopsien denen der gesunden Schwangeren. Lediglich eine höhere Anzahl an Kernknospen, welche bei Vorliegen von $> 30\%$ auf eine Hypoxie hinweisen können (Beargen et al., 2005), spiegelte sich in zwei von fünf Biopsien der Präeklampsie-Patientin wider. Nichtsdestotrotz fanden sich keine pathognomonischen Hinweise auf eine pathologische Plazentaentwicklung im Sinne einer Präeklampsie, sodass sich in unserem Beispiel keine eindeutige Korrelation zwischen der klinischen Symptomatik und der Plazentamorphologie ergab.

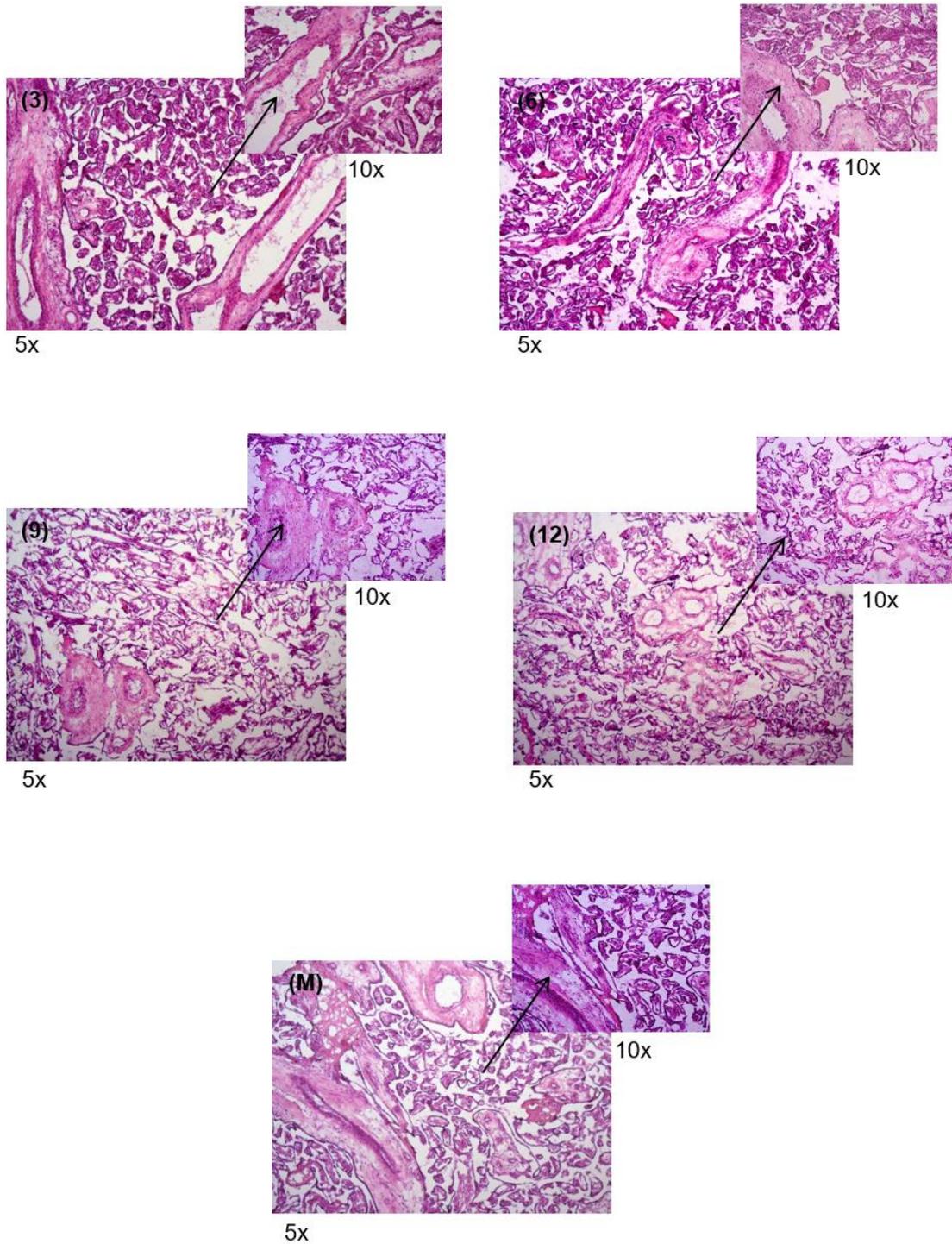


Abbildung 18. Hämotoxylin-Eosin Plazentaschnitte verschiedener Stellen einer gesunden Schwangeren (SSW: 38+1)

HE-Plazentaschnitte einer gesunden Schwangeren, angefertigt aus den entnommenen Plazentabiopsien von 3 Uhr (3), 6 Uhr (6), 9 Uhr (9), 12 Uhr (12) und aus der Mitte (M). Darstellung in 5- und 10-facher Vergrößerung.

3 Uhr: Abbildung von Stammzotten, kleinen Zotten und Kernknospen. Keine Hinweise auf eine Obliteration, Entzündung oder Dilatation. **6 Uhr:** Abbildung von Stammzotten, kleinen Zotten und Kernknospen. Keine Hinweise auf eine Obliteration, Entzündung oder Dilatation. **9 Uhr:** Abbildung von Stammzotten, kleinen Zotten und Kernknospen. Viele synzytiokapilläre Membranen. Keine Hinweise auf eine Obliteration, Entzündung oder Dilatation. **12 Uhr:** Abbildung von Stammzotten, kleinen Zotten und Kernknospen. Keine Hinweise auf eine Obliteration, Entzündung oder Dilatation. **Mitte:** Zwischenzotten (mesenchymales Stroma), zweireihige Trophoblasten. Keine Hinweise auf eine Obliteration, Entzündung oder Dilatation.

Quelle: Eigene Darstellung

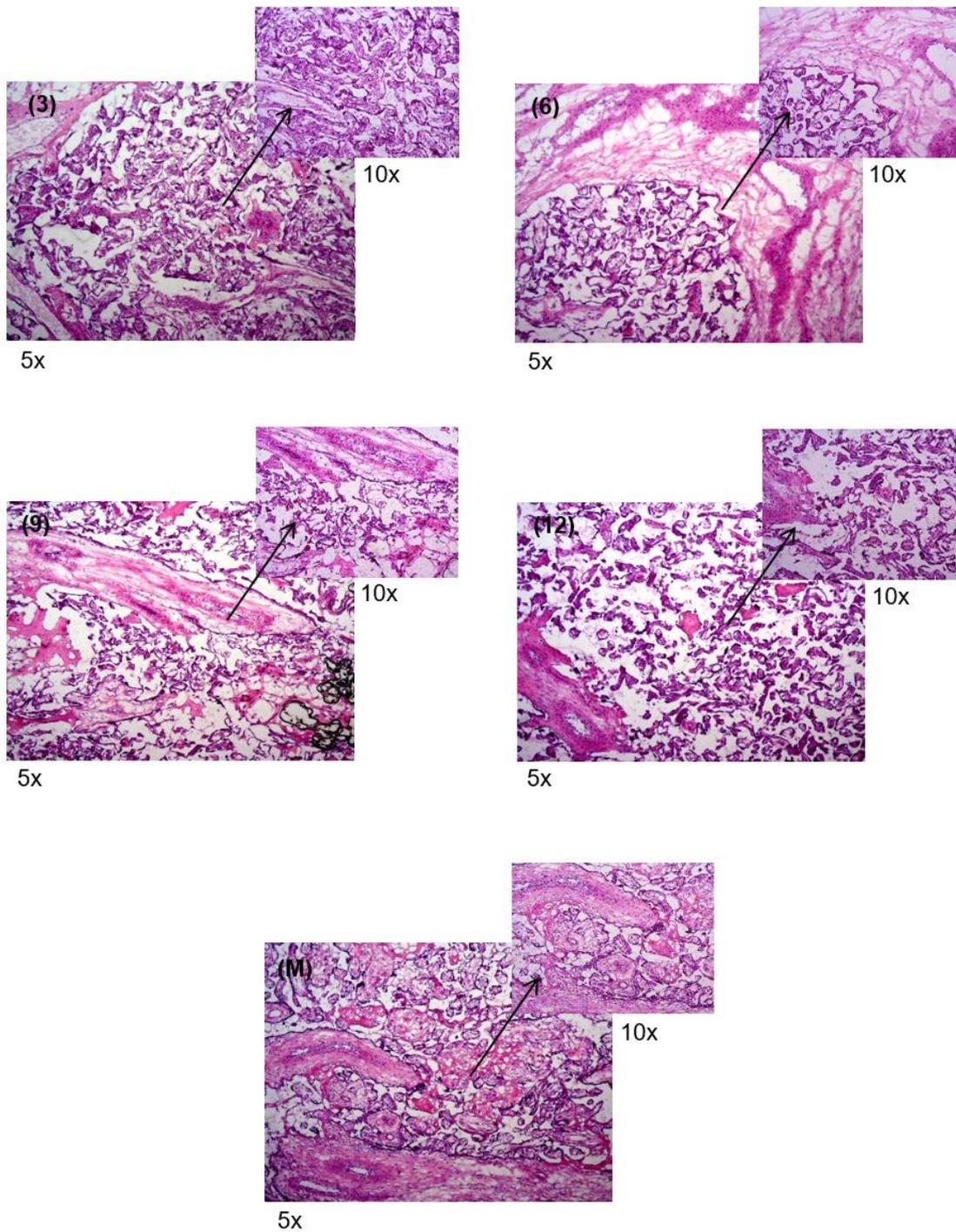


Abbildung 19. Hämatoxylin-Eosin Plazentaschnitte verschiedener Stellen einer Schwangeren mit Präeklampsie (SSW: 36+1)

HE-Plazentaschnitte einer Schwangeren mit Präeklampsie, angefertigt aus den entnommenen Plazentabiopsien von 3 Uhr (3), 6 Uhr (6), 9 Uhr (9), 12 Uhr (12) und aus der Mitte (M). Darstellung in 5- und 10-facher Vergrößerung.

3 Uhr: Abbildung von Trophoblasten in der Basalplatte mit vielen Blutgefäßen und Kernknospen. **6 Uhr:** Abbildung von eng aneinander liegenden Zotten mit vielen Kernknospen. Wenig Fibrinoid. **9 Uhr:** Abbildung von vorwiegend Endzotten, die gut vaskularisiert sind. Vermehrtes Vorkommen von Zellkernen. **12 Uhr:** Abbildung von vorwiegend Endzotten, die überwiegend von Epithel ausgekleidet sind mit einigen Kernknospen und z.T. synzytiokapillären Membranen. **Mitte:** Abbildung von vorwiegend Endzotten, die gut vaskularisiert sind.

Quelle: Eigene Darstellung

4.4 Genexpression von DKK1 und β -Catenin im Plazentagewebe

Zur Erhebung der Genexpression von DKK1 und β -Catenin im Plazentagewebe wurden Plazentaprobe von insgesamt 60 Studienteilnehmerinnen untersucht. Da von jeder Studienteilnehmerin jeweils fünf Gewebeprobe entnommen wurden, konnten insgesamt 150 Gewebeprobe von Präeklampsie-Patientinnen und 150 Gewebeprobe von gesunden Schwangeren gewonnen werden. Von jeder Probandin wurden drei von den jeweils fünf entnommenen Plazentaprobe unterschiedlicher Lokalisation zur Messung verwendet, sodass insgesamt 180 Testungen durchgeführt wurden. Zwei Messungen aus der Präeklampsie-Gruppe wurden nachträglich aus der Studie ausgeschlossen, da Ausschlusskriterien vorlagen. Das Expressionsniveau eines Gens wurde bestimmt, indem der Durchschnitt der drei erhaltenen Werte berechnet wurde.

Die rt-PCR-Ergebnisse zeigten, dass die Expressionsniveaus von DKK1 in Plazenten von Frauen mit präeklampsischer Schwangerschaft signifikant niedriger waren als die Expressionsniveaus in Plazenten von Frauen mit normaler Schwangerschaft (Median [Spannweite]: ΔC_t : 6,3 [3,5-7,7] beziehungsweise 5,4 [2,7-7,5]; $p = 0.029$). Die ΔC_t -Werte der DKK1-Genexpression sind in Abbildung 20 veranschaulicht. Unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Gleichung zeigte sich, dass die Genexpression von DKK1 in Plazenten von Frauen mit präeklampsischer Schwangerschaft um 38% reduziert war, verglichen mit der Expression in Plazenten von Frauen mit normaler Schwangerschaft. Darüber hinaus fanden wir heraus, dass die Expressionsniveaus von CTNNB1 in Plazenten von Frauen mit präeklampsischer Schwangerschaft ebenfalls niedriger waren als in Plazenten von Frauen mit normaler Schwangerschaft (Median [Spannweite] ΔC_t : 0,9 [-2,36-1,83] beziehungsweise 0,6 [0-1,89]). Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p = 0.054$). Die ΔC_t -Werte der CTNNB1-Genexpression sind in Abbildung 21 dargestellt. Unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Gleichung ergab sich eine um 10% geringere Genexpression von CTNNB1 in Plazenten von Frauen mit präeklampsischer Schwangerschaft, verglichen mit der Expression in Plazenten von Frauen mit normaler Schwangerschaft.

Unsere Daten ergaben keine signifikanten Korrelationen zwischen DKK1- und/oder CTNNB1-Expressionsniveaus mit den erhobenen klinischen Merkmalen einschließlich Gestationsalter, Geburtsgewicht, APGAR-Wert, IUGR und Vorliegen eines oder mehrerer der oben genannten auf PE-hinweisenden Symptome bei Frauen mit normaler Schwangerschaft als auch bei Frauen mit präeklampsischer Schwangerschaft.

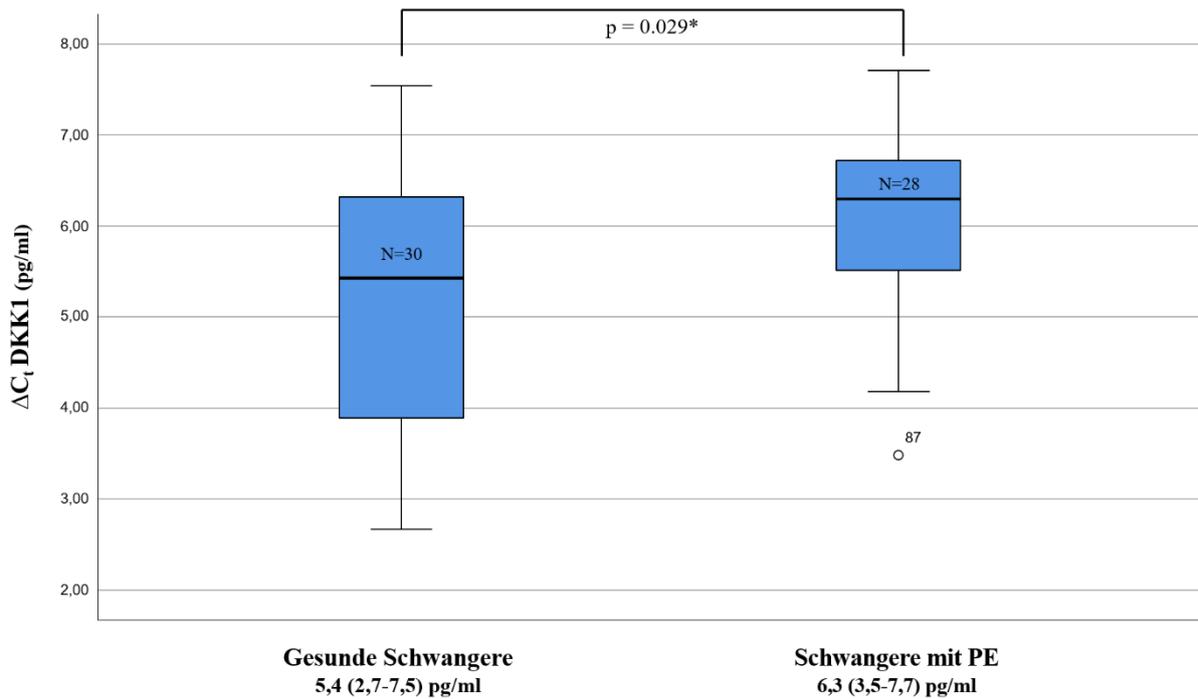


Abbildung 20. Genexpressionsniveaus von DKK1 in Plazentagewebeproben

Darstellung der Ergebnisse als ΔC_t -Werte und als Median (Spannweite). Der p-Wert wurde mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Statistisch signifikant ($p < 0,05^*$), hoch signifikant ($p < 0,01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0,001^{***}$). N = Stichprobenumfang.

Quelle: Eigene Darstellung

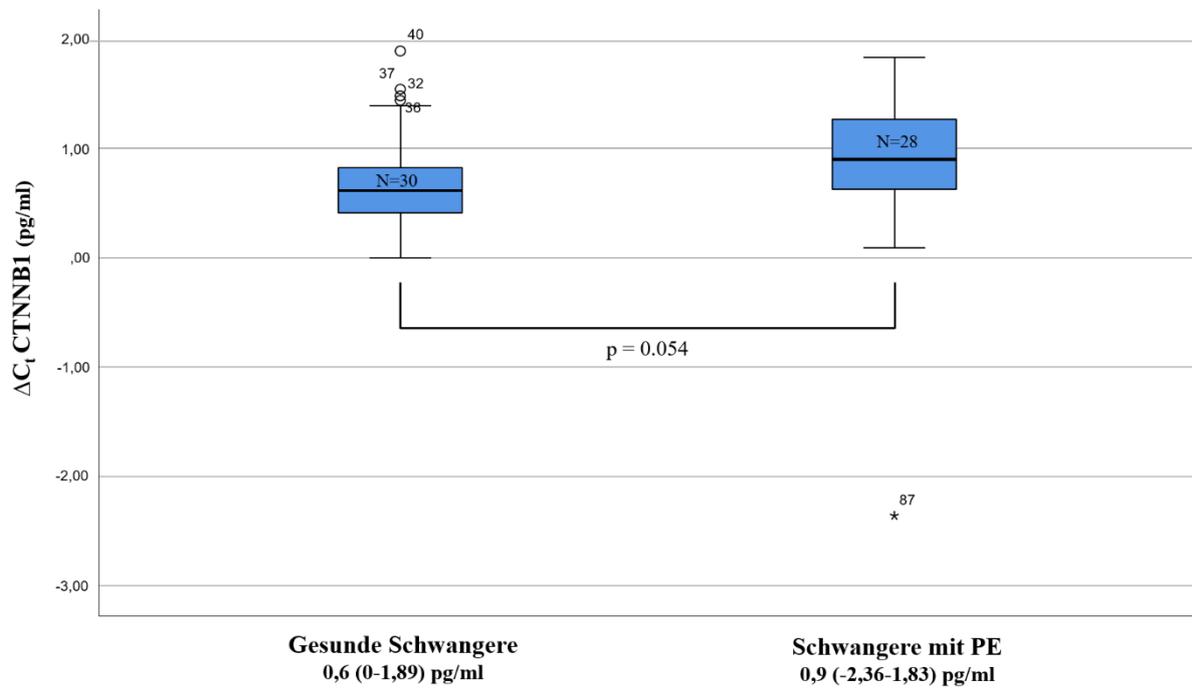


Abbildung 21. Genexpressionsniveaus von CTNNB1 in Plazentagewebeproben

Darstellung der Ergebnisse als ΔC_t -Werte und als Median (Spannweite). Der p-Wert wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Statistisch signifikant ($p < 0.05^*$), hoch signifikant ($p < 0.01^{**}$), höchst signifikant ($p < 0.001^{***}$). CTNNB1 = Catenin, beta-1; N = Stichprobenumfang.

Quelle: Eigene Darstellung

5 DISKUSSION

Die Präeklampsie ist eine schwangerschaftsinduzierte, zum Teil schwerwiegend verlaufende Multisystemerkrankung, über deren Pathogenese bislang noch spekuliert wird. Trotz vieler Studien, die sich mit der Erforschung der Erkrankungsursache beschäftigen, bleibt die Genese der Präeklampsie unklar. Da die Erkrankung bisher nur durch die Entbindung beendet werden kann, ging man lange Zeit davon aus, dass die Präeklampsie eine Plazenta-assoziierte Ursache haben muss (Stegers et al., 2010). Da nicht nur die Risikofaktoren und die klinischen Symptome der Erkrankung kardiovaskulärer Natur sind, sondern die kardiovaskuläre Morbidität auch Jahre nach der Präeklampsie bestehen bleibt, postulieren neuere Studien hingegen die Involvierung des maternalen Herz-Kreislauf-Systems an der Pathogenese der Präeklampsie (Thilaganathan und Kalafat, 2019). Nichtsdestotrotz scheint die Plazenta eine zentrale Rolle im Erkrankungsprozess einzunehmen.

Multiple Signalwege vermitteln die Trophoblastenfunktion während der Plazentation. Der exakte Mechanismus des Prozesses ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Einige Studien haben die Beziehung zwischen dem Wnt-Signalweg und verschiedenen schwangerschaftsspezifischen Komplikationen untersucht. Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, ob und inwiefern bei Schwangeren mit Präeklampsie ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und der Plasmakonzentration und Gewebsexpression von Dickkopf-1 (DKK1) bzw. der Gewebsexpression von β -Catenin (CTNNB1), zwei Antagonisten innerhalb des Wnt-Signalwegs, besteht. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie sind:

- Alle schwangeren Frauen (gesunde Schwangere und Schwangere mit Präeklampsie) wiesen durchschnittlich im Vergleich zu gesunden, nicht schwangeren Frauen signifikant höhere DKK1-Serumkonzentrationen auf.
 - Die DKK1-Serumkonzentrationen waren signifikant niedriger bei präeklampsischen Frauen mit Vorhandensein von einem oder mehreren auf PE-hinweisenden Symptomen (Kopfschmerzen, schwere Ödeme, vaginale Blutungen, rechtsseitige Oberbauchschmerzen und Augenflimmern) verglichen mit den Frauen dieser Gruppe ohne o.g. Symptome.
 - Die DKK1-Serumkonzentrationen waren signifikant niedriger bei präeklampsischen Frauen, deren Kinder mit IUGR entwickelt wurden, verglichen mit den Fällen dieser Gruppe mit normalem intrauterinem Wachstum.

- Im Plazentagewebe von Frauen mit normaler Schwangerschaft ergaben sich durchschnittlich signifikant höhere DKK1-Expressionsniveaus als im Plazentagewebe von Frauen mit präeklampsischer Schwangerschaft.
- Im Plazentagewebe von Frauen mit normaler Schwangerschaft fanden sich durchschnittlich höhere CTNNB1-Expressionsniveaus als im Plazentagewebe von Frauen mit präeklampsischer Schwangerschaft. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant.

5.1 DKK1-Serumkonzentration bei gesunden, nicht schwangeren Frauen, gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie

5.1.1 Die DKK1-Serumkonzentration ist bei Schwangeren mit Präeklampsie höher als bei gesunden Schwangeren und bei gesunden, nicht schwangeren Frauen

DKK1, das Gründungsmitglied der Dickkopf-Familie, ist ein sezerniertes Glykoprotein, welches als inhibitorisch wirkender Mediator auf den β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg Einfluss nimmt (Niehrs, 2006). Zirkulierendes DKK1 wurde im Rahmen von verschiedenen menschlichen Krankheiten einschließlich Karzinomen detektiert und stellte sich als potenzieller Biomarker zur Diagnostik und Progression (Kasoha et al., 2018; Feng et al., 2019; Igbini et al., 2019; Zhu et al., 2019) sowie als ein vielversprechendes Zielgen für Krebstherapien heraus (Kagey und He, 2017). Serumbiomarker gelten allgemein als von großem Vorteil aufgrund ihrer nicht-invasiven, im Vergleich kostengünstigen und einfachen Bestimmbarkeit. Bisher existieren nur wenige Studien, die zirkulierendes DKK1 in gynäkologischen Erkrankungen untersucht haben. Bao und Kollegen fanden heraus, dass bei 29 Patientinnen mit unerklärlich wiederkehrenden spontanen Fehlgeburten die Serumkonzentrationen von DKK1 signifikant höher waren, verglichen mit den Serumkonzentrationen von 30 Frauen mit normaler Schwangerschaft (Bao et al., 2013). Darüber hinaus hat eine frühere Arbeit unserer Laborgruppe gezeigt, dass Patientinnen mit Endometriose höhere DKK1-Serumkonzentrationen aufwiesen als gleichaltrige gesunde Frauen (Kasoha et al., 2019). Eine weitere Studie unserer Klinik untersuchte Serumproben von 89 Brustkrebspatientinnen und 89 gesunden Frauen auf die DKK1-Serumkonzentration. Es zeigte sich, dass die Serumspiegel von DKK1 bei Brustkrebspatientinnen ohne Metastasen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht waren; bei Patientinnen mit Knochenmetastasen lag die Konzentration sogar noch höher (Kasoha et al., 2018).

Unseres Wissens nach existierte zu Beginn unseres Projekts keine Studie, die die DKK1-Serumkonzentration bei Präeklampsie untersucht hat. Jüngst veröffentlichte Tayyar et al. (2019) eine

Studie, in der sich signifikant höhere DKK1-Serumkonzentrationen in der Gruppe mit *early-onset* Präeklampsie (27 Fälle) verglichen mit einer Kontrollgruppe (27 Fälle) ergaben. Zwischen der Gruppe mit *early-onset* Präeklampsie und *late-onset* Präeklampsie (26 Fälle) fand sich hingegen kein Unterschied in den DKK1-Serumkonzentrationen. In einer kürzlich publizierten Studie ergab sich in einer Kohorte von 61 Frauen mit normaler Schwangerschaft und 34 Frauen mit PE kein signifikanter Unterschied in den sekretierten DKK1-Spiegeln (Ueland et al., 2020).

Die Synchronisation der Blastozysten-Aktivierung mit der Uterusrezeptivität ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Implantation. Die Uterusrezeptivität wiederum wird durch verschiedene Faktoren einschließlich Steroidhormone reguliert, unter denen Östrogen und Progesteron die wichtigsten Mediatoren darstellen (Marquardt et al., 2019). Östrogen und Progesteron agieren über eine synergetische Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren und zellulären Signalen wie dem Wnt-Signalweg auf das Endometrium. Rider und ihre Mitarbeiter zeigten, dass die Verabreichung von Progesteron im Uterus von geschlechtsreifen, ovariectomierten Ratten die Zellen auf den Eintritt in den Zellzyklus vorbereitet, indem die Wnt-Signalkaskade aktiviert wird, was wiederum zur Akkumulation von β -Catenin führt. Die Kernlokalisierung von β -Catenin und eine ausreichende Komplexbildung mit TCF/LEF erforderten Estradiol für den Eintritt in den Zellzyklus, was darauf hindeutet, dass endokrin-abhängige Wnt-Signale die Zelldifferenzierung und -proliferation steuern (Rider et al., 2006). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wnt-Signalaktivität im Falle einer Schwangerschaft im Vergleich zur Abwesenheit einer Schwangerschaft unterschiedlich sein könnte.

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass DKK1-Serumspiegel sowohl bei Schwangeren als auch bei gleichaltrigen nicht schwangeren Frauen nachweisbar waren. Es ergab sich bei allen schwangeren Frauen, sowohl bei denen mit Präeklampsie als auch bei den gesunden Schwangeren, ein signifikant höherer DKK1-Median im Serum im Vergleich zu den gesunden, nicht schwangeren Frauen. Darüber hinaus zeigten sich bei den PE-Fällen mit IUGR 20% niedrigere DKK1-Serumkonzentrationen verglichen mit den Fällen, in denen sich die Feten der Schwangerschaftswoche entsprechend entwickelten. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bezüglich der auf PE-hinweisenden Symptome, zu denen Kopfschmerzen, schwere Ödeme, vaginale Blutungen, rechtsseitige Oberbauchschmerzen und Augenflimmern zählten. Bei den präeklampsischen Frauen, die ein oder mehrere dieser Symptome aufwiesen, wurden 15% niedrigere DKK1-Serumkonzentrationen im Vergleich zu den präeklampsischen, symptomlosen Frauen detektiert. Allerdings konnte in unserer Studie kein signifikanter Unterschied in der DKK1-Serumkonzentration zwischen präeklampsischen Frauen und gesunden Schwangeren eruiert werden. Um ein Bias bezüglich des Gestationsalters der Schwangeren auszuschließen, wurde diese Untersuchung um eine Subgruppenanalyse ergänzt. Wir verglichen die DKK1-Serumproteinspiegel zwischen 18 Frauen mit PE und 18 gesunden Schwangeren, die sich hinsichtlich des Gestationsalters bei der Entbindung nicht signifikant unterschieden (Median [Spannweite]: 268 [266-271] Tage beziehungsweise 262 [235-282] Tage; $p = 0.13$) und konnten trotz

allem keinen signifikanten Unterschied in der DKK1-Serumkonzentration detektieren ($p = 0.855$). Dieses Ergebnis deckt sich mit den berichteten Studiendaten von Ueland et al. (2020). Bei ebenfalls direkt pränataler Blutprobenentnahme konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied in der DKK1-Serumkonzentration zwischen PE und gesunden Schwangeren detektiert werden. Obwohl unsere eingangs formulierte Hypothese nicht gänzlich bestätigt werden konnte, zeigt sich eine klare Tendenz hinsichtlich einer höheren DKK1-Serumkonzentration bei schwangeren Frauen im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen.

Die Diskrepanzen zwischen Tayyars und unseren Resultaten könnten auf die unterschiedliche Anzahl von eingeschlossenen Fällen und/oder auf den Zeitpunkt der Stichprobenentnahme zurückzuführen sein. Während unsere Blutprobenabnahme direkt pränatal erfolgte, befand sich in der Studie von Tayyar und Kollegen keiner der Patientinnen zum Zeitpunkt der Entnahme der Blutproben im Entbindungsstadium. Obwohl in Tayyars Studie ebenfalls von IUGR-Fällen bei den Feten präeklampsischer Mütter berichtet wurden, erfolgte keine Korrelationsanalyse zwischen IUGR und der DKK1-Serumkonzentration, sodass unsere vorliegenden Ergebnisse nicht in Vergleich gesetzt werden konnten. Ähnlich verhält es sich mit der von uns durchgeführten Korrelationsanalyse zwischen auf PE-hinweisenden Symptomen und der DKK1-Serumkonzentration. Aufgrund fehlender Daten anderer Arbeiten ist die Aussagekraft eingeschränkt. Ferner ergibt sich eine erschwerte Vergleichbarkeit zwischen unserer, Tayyars und Uelands Studie aufgrund der eingeschränkten Übertragbarkeit von Messwerten, da unterschiedliche Gruppen getestet wurden. Während in unserer Studie auch gesunde, nicht schwangere Frauen inkludiert wurden, differenzierten Tayyar und Kollegen zwischen *early-onset* und *late-onset* PE. In dem Projekt von Ueland hingegen wurde nur zwischen gesunden und präeklampsischen Schwangeren unterschieden. Ferner zeigte sich in unseren Messungen eine große Variabilität der DKK1-Serumwerte auch innerhalb der einzelnen Gruppen. Die Bestimmung eines eindeutigen Grenzwerts, der als Diagnose-Biomarker fungieren könnte, ist somit erschwert. Daher sind weitere Untersuchungen erforderlich, einschließlich einer größeren Anzahl getesteter Fälle, einheitlicher Gruppenanalysen und einer Entnahme von Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten (z.B. bei Feststellung der Schwangerschaft, zum Zeitpunkt der PE-Diagnose bei betroffenen Frauen und direkt pränatal), um das Potenzial von DKK1 im Serum als Screening-Parameter einer Präeklampsie nachzuweisen.

5.2 DKK1-Expressionsniveaus im Plazentagewebe bei gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie

5.2.1 Die plazentare DKK1-Genexpression ist bei Schwangeren mit Präeklampsie höher als bei gesunden Schwangeren

Neben der Bestimmung der DKK1-Serumspiegel wurde in der vorliegenden Studie auf die Genexpressionsniveaus von DKK1 im Plazentagewebe getestet. Das Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, ob sich DKK1 auch im Plazentagewebe nachweisen lässt und ob in diesem Falle die Serum-DKK1-Niveaus mit den Gen-Niveaus in der Plazenta übereinstimmen. Zusätzlich wurde auch auf den Nachweis von β -Catenin-Genexpressionsniveaus getestet (s. Punkt 5.3). Nur wenige Studien haben bisher die Gen- und/oder Proteinexpression verschiedener Wnt-Signalmoleküle unter Verwendung von Plazentagewebe von präeklampsischen Schwangeren untersucht. Zhang et al. (2013) untersuchten Plazentagewebe von insgesamt 60 Probandinnen auf mRNA- und Proteinexpressionsspiegel von DKK1, darunter 30 Frauen mit schwerer Präeklampsie und 30 gesunde Schwangere. Die Ergebnisse legen dar, dass DKK1 vorwiegend in den Synzytiotrophoblasten und den extravillösen Trophoblasten exprimiert wird. In 30 Plazentageweben von Frauen mit schwerer PE waren die mRNA- und Proteinexpressionsspiegel von DKK1 erhöht, verglichen mit 30 Plazentageweben von Frauen mit normaler Schwangerschaft. Ähnliche Ergebnisse wurden später von Wang und Kollegen berichtet. In deren Studie ergaben sich signifikant höhere DKK1-Expressionsspiegel in Plazentageweben von 30 präeklampsischen Frauen mit schwerer PE im Vergleich zu denen von 32 gesunden schwangeren Frauen (Wang et al., 2018). Ferner wurde in einer kürzlich durchgeführten Studie gezeigt, dass die mRNA-Spiegel von DKK1 im Plazentagewebe bei einer *early-onset* Präeklampsie höher waren als bei Frühgeborenen-Plazenten. Allerdings ergab sich kein signifikanter Unterschied in den DKK1-mRNA-Spiegeln zwischen *early-onset* und *late-onset* PE (Zhang et al., 2019).

Gegensätzliche Ergebnisse zeigten sich in jüngeren Studien von Huang et al. (2019) und Li et al. (2020). Huang und Kollegen untersuchten 20 Plazenten von Frauen, deren Kinder mit IUGR entwickelt wurden, und 20 Plazenten von gesunden schwangeren Frauen u.a. auf die DKK1- und β -Catenin-Genexpression in den entnommenen Plazentaprobe. Es ergab sich eine signifikante Abnahme der DKK1-Genexpressionsspiegel im Gewebe der IUGR-Gruppe im Vergleich zur Gruppe der gesunden Schwangeren. In der Studie von Li und Kollegen wurden 20 gesunde Schwangere, 20 Frauen mit einer *early-onset* PE und 20 Frauen mit einer *late-onset* PE eingeschlossen um u.a. das Expressionsniveau von DKK1 und β -Catenin in den Plazentageweben der Schwangeren unter Verwendung der Western Blot-Methode nachzuweisen. Es fanden sich signifikant verringerte Expressionsspiegel von DKK1-

Protein bei den Frauen mit einer *early-onset* PE im Vergleich zur Expression bei gesunden Schwangeren.

In unserer Arbeit haben wir herausgefunden, dass die Expressionsniveaus von DKK1-Genen im Plazentagewebe der PE-Gruppe im Vergleich zu denen in der Gruppe der gesunden Schwangeren um 35% signifikant verringert waren. Unsere eingangs formulierte Hypothese, dass die DKK1-Genexpression bei den Schwangeren mit Präeklampsie höher ist als bei den gesunden Schwangeren, konnte somit nicht bestätigt werden. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Studien von Huang et al. (2019) und Li et al. (2020). Allerdings untersuchten Huang und Kollegen Plazenten von IUGR-Fällen und nicht von Präeklampsie, was die Übertragbarkeit auf unsere Studie einschränkt. Eine begrenzte Vergleichbarkeit ergibt sich auch daraus, dass Li und Kollegen die Western Blot-Methode anwandten, wohingegen in unserer Studie die Testung der DKK1- und β -Catenin-Genexpressionsspiegel mittels rt-PCR erfolgte. Unsere Ergebnisse stehen hingegen in Widerspruch zu den Studien von Zhang et al. (2013), Wang et al. (2018) und Zhang et al. (2019). Diese unterschiedliche Beobachtung unserer Studie könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass DKK1 ein Antagonist der Wnt/ β -Catenin-Kaskade ist und über eine negative Rückkopplungsschleife einen regulatorischen Effekt ausübt (Niida et al., 2004). Andererseits könnte die Heterogenität der getesteten Fälle und der Subgruppen zu Diskrepanzen innerhalb der Studienbeobachtungen geführt haben. Allerdings ist anzumerken, dass unsere Studie vor allem aufgrund der geringen Probandenzahl Einschränkungen aufweist, was gegensätzliche Ergebnisse erklären vermag.

Darüber hinaus wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die die dysregulierte Expression mehrerer Mitglieder des Wnt-Signalwegs induzieren, was die aberranten Ergebnisse zu erklären vermag. Zum einen scheint eine veränderte Promotormethylierung eine veränderte Genexpression von DKK1 und Wnt2 in präeklampsischen Plazenten im Vergleich zu Kontroll-Plazenten zu verursachen, was wiederum zu einer verringerten Aktivität der Wnt-Signalkaskade führt (Liu et al., 2017; Zhang et al., 2019). Zum anderen wird oxidativer Stress (Zhang et al., 2015) oder eine veränderte Expression von nachgeschalteten Genen als Ursache genannt, die wiederum die Proliferation von Trophoblasten beeinflussen (Kumar et al., 2013). Zusammenfassend zeigen unsere Beobachtungen und die der früheren Studien aber deutlich die abnormale Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signals bei Präeklampsie, was auf die Beteiligung des kanonischen, β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs an der Pathogenität der Erkrankung hinweist.

5.3 CTNNB1-Expressionsniveaus im Plazentagewebe bei gesunden Schwangeren und Schwangeren mit Präeklampsie

5.3.1 Die plazentare β -Catenin-Genexpression ist bei Schwangeren mit Präeklampsie niedriger als bei gesunden Schwangeren

β -Catenin ist ein zytoplasmatisches Protein, welches zur Familie der Ca^{2+} -abhängigen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle gehört. Neben der Funktion als membranständiges Adhäsionsmolekül kann β -Catenin eine tragende Rolle in Transkriptionsprozessen, z.B. im Wnt-Signalweg, übernehmen, indem es in den Zellkern übergeht (Huelsen und Behrens, 2002). Zytoplasmatisches β -Catenin scheint eine wichtige Rolle in der Entstehung von menschlichen Krankheiten wie Krebs zu spielen (Takayama et al., 1996; Maruyama et al., 2000; Bowley et al., 2007). Allerdings existieren bisher nur wenige Studien, die zytoplasmatisches β -Catenin in gynäkologischen Erkrankungen untersucht haben. Han und Kollegen erforschten die β -Catenin-Expression bei 10 Frauen mit *Placenta accreta*, bei 20 Frauen mit *Placenta previa* und im Plazentagewebe von 30 gesunden Schwangeren. Es ergaben sich statistisch signifikant niedrigere Gen- und Proteinexpressionsspiegel von β -Catenin in den Plazentageweben von Frauen mit *Placenta accreta* verglichen mit denen der Kontrollgruppe bzw. in den Plazentageweben von Frauen mit *Placenta previa* verglichen mit denen der Kontrollgruppe (Han et al., 2019.) Ebenso ließen sich verminderte β -Catenin-Expressionsspiegel im Plazentagewebe bei IUGR nachweisen (Huang et al., 2019).

Analog zur bisher raren Bestimmung von DKK1-Expressionsniveaus in Plazentagewebe existieren bisher nur wenige Studien, die sich mit der β -Catenin-Expression in Plazentagewebe bei Präeklampsie beschäftigt haben. In einer kürzlich durchgeführten Studie von Wang et al. (2018) wurde Plazentagewebe von 30 Frauen mit schwerer Präeklampsie und Plazentagewebe von 32 gesunden schwangeren Frauen u.a. auf die Genexpression von β -Catenin untersucht. Die mRNA-Spiegel von Wnt1, β -Catenin, c-myc und CyclinD1 waren in den Plazenten der schweren präeklampptischen Schwangeren signifikant verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe. In einer anderen Arbeit waren die mRNA- und Proteinexpressionsspiegel von β -Catenin in 30 Plazentageweben von Frauen mit schwerer PE vermindert, verglichen mit 30 Plazentageweben von Frauen mit normaler Schwangerschaft (Zhang et al., 2013). Darüber hinaus hat eine kürzlich durchgeführte Studie die Rolle von oxidativem Stress und CCAAT/Enhancer-Bindungsprotein Beta (C/EBP β), einem Schlüsselregulator der Uterusrezeptivität und der embryonalen Implantation, im Zusammenhang mit PE und seiner Beteiligung an der Regulation der invasiven Kapazitäten von Trophoblasten untersucht. In dieser Studie wurde über eine erhöhte Expression von C/EBP β und eine verringerte Expression von β -Catenin in menschlichen Plazentageweben von präeklampptischen Frauen im Vergleich zu nicht pathologischen Plazenten und in

mit Hypoxie/Reoxygenierung (H/R) behandelten extravillösen Trophoblastenzelllinien des ersten Trimesters berichtet (HTR8/SVneo). Darüber hinaus erhöhte der *C/EBP β -Knockdown* die β -Catenin-Expression signifikant und erhöhte die Zellinvasionskapazitäten, möglicherweise durch Verringerung der übermäßigen Erzeugung von intrazellulärem ROS (reaktive Sauerstoffspezies) durch erhöhte Aktivität der Metalloproteinasen MMP-2/9 und verminderte Expression von TIMP-1/2 (Zhuang et al., 2015). Eine dysregulierte Expression von β -Catenin hingegen könnte indirekt zur PE-Pathogenität über eine veränderte Expression von Wnt/ β -Catenin-Zielgenen beitragen, die wiederum die Trophoblastenproliferation beeinflussen (Kumar et al., 2013; Wang et al., 2018).

Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen unserer Studie überein. In unserer Arbeit ergaben sich verringerte Expressionsniveaus von β -Catenin-Genen in den Plazentageweben der PE-Gruppe im Vergleich zu denen in der normalen Schwangerschaftsgruppe. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Unsere Eingangshypothese konnte somit nicht gänzlich bestätigt werden, aber es lässt sich eine deutliche Tendenz erkennen, dass die plazentare β -Catenin-Genexpression bei Frauen mit Präeklampsie im Vergleich zu den gesunden Schwangeren verringert ist. Eventuell hätte eine höhere Probandenanzahl zu einem deutlicheren Ergebnis führen können. Es braucht allerdings noch weitere Forschung, um den Einfluss der β -Catenin-Expression im Plazentagewebe bei Präeklampsie zu untersuchen.

5.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

5.4.1 DKK1 als potenzieller Prädiktor einer Präeklampsie

In den aktuellsten AWMF-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen von 2019 wird deutlich herausgestellt, dass bis dato keine alleinige Screening-Methode zur sicheren Vorhersage einer Präeklampsie zur Verfügung steht. Vielmehr wird im ersten und zweiten Trimenon auf eine Kombination von anamnestischen, biophysikalischen und biochemischen Parametern zurückgegriffen, um eine aussagekräftige Risikoeinschätzung zu gewährleisten (Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2019).

Die frühzeitige Erkennung einer Präeklampsie ist von außerordentlicher Bedeutung, um eine engmaschige und intensive Betreuung der Schwangeren und ihres Fetus bereits im 1. Trimenon zu garantieren. Die betroffenen Schwangeren sollten frühzeitig von der bisher einzigen effektiven Präventionsmöglichkeit mittels 150 mg Acetylsalicylsäure (ASS) pro Tag profitieren können (Rolnik et al., 2017). Darüber hinaus ermöglicht nur eine frühzeitige Diagnosestellung die rechtzeitige Anbindung der Betroffenen an erfahrene Perinatalzentren zur weitergehenden Diagnostik und Therapie.

So könnte auf erhöhte Blutdruckwerte früh reagiert und mit Antihypertensiva therapiert werden, um die mütterliche und fetale Komplikationsrate möglichst klein zu halten.

In einer Arbeit von 2016 wurde die Kombination aus Pulsatilitätsindex der A. uterina (UTPI) und mütterlichem Serum-PIGF als ideale Marker für das erste Trimester zur Vorhersage von PE und IUGR bei schwangeren Frauen mit geringem Risiko herausgestellt, was einem Zusammenspiel von biophysikalischen und biochemischen Methoden entspricht. Die Hinzunahme von PAPP-A verbesserte die Genauigkeit nicht (Eldeen Y Elkholi et al., 2016). Die internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe „FIGO“ (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) gab in 2019 eine Empfehlung heraus, die die Aussagekraft von kombinierten Screening-Methoden betont. Allen schwangeren Frauen sollte im ersten Trimester ein Screening bestehend aus der Kombination von mütterlichen Risikofaktoren, mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), PIGF und Pulsatilitätsindex der A. uterina (UTPI) angeboten werden (Poon et al., 2019). Eine jüngste Studie von Serra und Kollegen untermauert diese Empfehlung. Die Kombination aus mütterlichen Risikofaktoren, biophysikalischen Parametern (mittlere arterielle Blutdruck und mittlere Pulsatilitätsindex der A. uterina) und PIGF als biochemischer Marker zeigte die beste Erkennungsrate. Vor allem die Hinzunahme des Plazentawachstumsfaktors zu den biophysikalischen Parametern verbesserte die Nachweisrate signifikant von 59% auf 94% (Serra et al., 2020).

Nach Eldeen Y Elkholi et al. (2016) sollte der ideale Biomarker für PE und IUGR leicht messbar, einfach, schnell, nicht invasiv und kostengünstig sein. Das Risiko für den Patienten sollte möglichst geringgehalten werden. Die Technologie sollte allgemein verfügbar und die Ergebnisse reproduzierbar und zuverlässig mit einer guten Empfindlichkeit und Spezifität sein. Idealerweise sollte der Biomarker neben der diagnostischen Komponente eine Interventionsmöglichkeit bieten, um die Entwicklung der Krankheit zu verhindern oder zumindest bessere Outcomes für Mutter und Fetus zu erreichen. Eine Bestimmbarkeit bereits im ersten Trimenon würde darüber hinaus die Einleitung von diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen in der Frühschwangerschaft gewährleisten.

Zu den biochemischen Markern als potenzielle Prädiktoren einer Präeklampsie zählt Dickkopf-1 im Serum bisher nicht. Nichtsdestotrotz findet zirkulierendes DKK1 bereits Anwendung in Diagnostik und Progression anderer klinischer Erkrankungen. Zhu und Kollegen untersuchten die Bedeutsamkeit von Serum-DKK1 als Biomarker für die Vorhersagbarkeit des klinischen Outcomes bei Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall. Es ergab sich ein Dosis-Wirkungs-Zusammenhang zwischen höherem DKK1 zu Studienbeginn und einer schlechteren Prognose ein Jahr nach einem akuten ischämischen Schlaganfall (Zhu et al., 2019). Auch in Zusammenhang mit duktalem Pankreaskarzinomen fand sich eine Überexpression von DKK1 im Serum, was mit einer niedrigeren Gesamtüberlebensrate korreliert war (Igbini et al., 2019). Sowohl vorherige Arbeiten unserer Forschungsgruppe als auch die vorliegende Studie verdeutlichen die Vorteilhaftigkeit von DKK1 als Biomarker aufgrund seiner ökonomischen Effizienz, Einfachheit und Nicht-Invasivität (Kasoha et al.,

2018; Kasoha et al., 2019). Die Ergebnisse unserer Studie lassen einen Zusammenhang zwischen erhöhten DKK1-Serumkonzentrationen und das Vorliegen einer Schwangerschaft vermuten. Da es sich bei DKK1 allerdings um ein sekretorisches Glykoprotein handelt, könnte dessen Aktivität durch sekundäre Modifizierungen seiner selbst oder dessen Liganden beeinflusst werden, was die Anwendung als Biomarker limitiert. Ferner zeigte sich in unseren Messungen eine große Variabilität der Werte, was die Festlegung eines eindeutigen Grenzwertes erschwert. Darüber hinaus erfolgten die Blutabnahmen direkt pränatal, was keine Aussagekraft über DKK1 als Biomarker in der Frühschwangerschaft erlaubt. Diesbezüglich werden weitere Studien nötig sein, in denen eine größere Studienpopulation bereits im ersten Trimester untersucht wird, um eine fundierte Aussage über den Zusammenhang von DKK1 im Serum und das Auftreten von Präeklampsie treffen zu können.

5.5 Methodenkritik

5.5.1 Probandinnenkollektiv

Die vorliegende Studie zielte darauf ab, die Serumkonzentration von Dickkopf-1 (DKK1) bei gesunden, nicht schwangeren Frauen, gesunden schwangeren Frauen und präeklampsischen Schwangeren bzw. die Gewebsexpression von Dickkopf-1 (DKK1) sowie die Gewebsexpression von β -Catenin (CTNNB1) bei gesunden schwangeren Frauen im Vergleich zu präeklampsischen Schwangeren zu evaluieren. Es wurden 90 Probandinnen eingeschlossen, die zwischen 2014 bis 2016 in der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes (UKS) in Homburg/Saar behandelt wurden. Da es sich bei der Klinik um ein Haus der Maximalversorgung handelt, ist in der Regel von einer höheren Rate an schwereren Fällen auszugehen, als dies in kleineren Krankenhäusern der Fall ist. Unter diesem Gesichtspunkt und da dies keine multizentrisch angelegte Studie ist, ist die Zuverlässigkeit der Übertragung auf andere klinische Zentren und auf die Gesamtbevölkerung kritisch zu betrachten. Zudem ist die Studienpopulation im Vergleich zu Studien mit ähnlicher Thematik eher klein, sodass eine Verallgemeinerung der Ergebnisse folglich schwierig ist. Unter den 90 Probandinnen fanden sich 60 Mütter und 30 nicht schwangere Frauen, die sich hinsichtlich des Alters nicht unterschieden und sich somit für einen Vergleich eigneten. Da jedoch hinsichtlich der 30 nicht schwangeren Frauen nur das Alter und die DKK1-Serumkonzentration erhoben wurden, war die Vergleichbarkeit bezüglich anderer klinischer, nicht schwangerschaftsspezifischer Parameter limitiert. Darüber hinaus erfolgte keine Unterteilung der Präeklampsie-Studiengruppe in *early-onset* und *late-onset* Präeklampsie, was Inhalt vieler anderer Forschungen war (Lisonkova und Joseph, 2013; Tayyar et al., 2019; Zhang et al., 2019). Unsere Studienergebnisse erlauben somit keine Rückschlüsse auf einen möglichen Zusammenhang zwischen DKK1-Serumkonzentration bzw. DKK1- und β -Catenin-Genexpression und Auftretungszeitpunkt der Erkrankung und dessen Auswirkung auf mögliche

Morbidität und Mortalität. Unter den 30 Frauen mit Präeklampsie entwickelten sechs Frauen ein HELLP-Syndrom. Diese Subgruppe ist allerdings zu klein um aussagekräftige Resultate unter dem Gesichtspunkt des Schweregrades einer Präeklampsie zu liefern.

5.5.2 Datengewinnung

Die erhobenen klinischen und schwangerschaftsspezifischen Daten der Probandinnen (Alter, BMI, Blutdruck etc.) wurden aus den elektronischen Akten gewonnen, die in das klinikinterne Computersystem SAP eingelesen worden sind. Jedoch wiesen einige Akten Lücken auf, sodass nicht alle Parameter erhoben werden konnten und es somit zu quantitativen und qualitativen Einbußen in der Ergebnisauswertung kam. Die Anwendung eines systematischen Fragebogens zur Datengewinnung hätte erwogen werden können. Ebenso wurde vor allem bei den gesunden schwangeren Frauen nicht regelhaft spezifische Laborwerte wie Leber- und Hämolyseparameter oder die Proteinurie bestimmt, wodurch die Vergleichbarkeit eingeschränkt wurde.

5.5.3 Probengewinnung

Unmittelbar pränatal wurden für die Bestimmung der DKK1-Serumkonzentration venöse Blutproben von 30 gesunden schwangeren Frauen und 29 Frauen mit Präeklampsie entnommen. Darüber hinaus wurden weitere 30 venöse Blutproben von alterskorrelierten gesunden, nicht schwangeren Frauen während deren Routinebesuchen in unserer Klinik gesammelt. Die maximale Lagerungszeit des Blutes bei 4°C bis zur Abholung durch einen Verantwortlichen der Studiengruppe lag bei maximal 2 Stunden. Nach der Zentrifugation wurden die Blutproben in einem Gefrierschrank bei -80°C bis zur Testung aufbewahrt.

Die Gewebeproben aus der Plazenta wurden direkt nach der Plazentageburt gewonnen, was eine Unterbrechung der mütterlichen Blutzufuhr nötig machte. Dies könnte einen negativen Einfluss auf die Qualität und Unversehrtheit des Gewebes gehabt haben. Makroskopisch waren alle entnommenen Proben frei von jeglichen Pathologien wie Infarkten. Um eventuelle Unterschiede in verschiedenen Plazentaabschnitten auszuschließen und die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, erfolgten die Biopsien sowohl im Zentrum der Plazenta (M) als auch in den einzelnen Quadranten (bei 3, 6, 9 und 12 Uhr). Die Asservierung der Gewebebiopsien bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte in einem Gefrierschrank bei -80°C. Zur Real-Time PCR gingen nur Proben mit hoher RNA-Integrität ein.

Obwohl die laborchemischen Experimente der Serum- und Gewebeproben größtenteils von einer Person durchgeführt worden sind, erfolgte die Sammlung der Proben durch verschiedene Teilnehmer der Forschungsgruppe, sodass Qualitätsunterschiede nicht sicher ausgeschlossen werden konnten. Besonders die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Zentrifugation bzw. Plazentageburt und

Gewebeprobengewinnung durch einen Teilnehmer der Forschungsgruppe variierte stark, da sich vor allem bei schweren PEs zum Teil nächtliche spontane Plazentalösungen ereigneten, sodass die Akquise der Proben auch außerdienstlich erfolgen musste. Der ursprünglich kalkulierte Zeitrahmen zur Probensammlung konnte daher nicht immer garantiert werden.

6 ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG

Die vorliegende Arbeit ist eine der wenigen bisher vorhandenen Studien, die sich mit der Erforschung des kanonischen, β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs in der Pathogenese der Präeklampsie beschäftigte. Besonders die DKK1- und CTNNB1-Genexpression im Plazentagewebe ist bisher wenig untersucht. Es konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die DKK1-Serumkonzentration bei schwangeren Frauen im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen erhöht ist. Ferner zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der DKK1-Serumkonzentration bei den PE-Fällen mit IUGR beziehungsweise mit auf PE-hinweisenden Symptomen. Darüber hinaus war eine tendenzielle Abnahme der CTNNB1-Genexpression im Plazentagewebe von präeklampsischen Frauen im Gegensatz zu gesunden Schwangeren zu verzeichnen. Entgegen unserer Hypothese fand sich eine signifikant geringere DKK1-Expression im Plazentagewebe der präeklampsischen Schwangeren als im Plazentagewebe der gesunden Schwangeren.

Trotz der aufgezeigten Limitationen in unserer Studie berichten die dargelegten Ergebnisse über eine aberrante DKK1-Serumkonzentration bei präeklampsischen Schwangeren sowie eine aberrante Genexpression von DKK1 und β -Catenin in präeklampsischen Plazenten. Auch frühere Forschungen indizieren die mögliche Bedeutsamkeit von DKK1 und β -Catenin bei Präeklampsie. Daher könnte eine aberrante Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung einen plausiblen Mechanismus für die Pathogenität der dieser Erkrankung darstellen. Eine dysregulierte Expression von DKK1 auf Genebene in der Plazenta, jedoch nicht auf Proteinebene im maternalen Serum könnte die Annahme bestätigen, dass die Präeklampsie einen plazentaren Ursprung hat. Bei sowohl dysregulierter Expression von DKK1 auf Gen- und Proteinebene könnte über die Verwendung von DKK1 im Serum als Screening-Parameter diskutiert werden, um die Erkrankung frühzeitig detektieren und behandeln zu können.

Die Befunde dieser Studie leisten einen wichtigen Beitrag in der Erforschung der Pathogenese der Präeklampsie und sollten als Ausgangspunkt zukünftiger prospektiver Vergleichsstudien angesehen werden, um einen besseren Einblick in die molekularen Grundlagen von Wnt/ β -Catenin bezüglich der Wechselwirkungen zwischen Mutter und Fetus während einer normalen und einer präeklampsischen Schwangerschaft zu erhalten. Sollten diese die Involvierung des kanonischen, β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs in der Pathogenese der Präeklampsie bestätigen, könnte die Ursachenforschung um einen weiteren vielversprechenden Schritt ergänzt werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

A.

1. Abalos E, Duley L, Steyn D, Gialdini C (2018) Antihypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, Issue 10. Art.No.: CD002252.
2. Adamska M, MacDonald BT, Sarmast ZH, Oliver ER, Meisler MH (2004) En1 and Wnt7a interact with Dkk1 during limb development in the mouse. *Dev Biol.* 272(1):134-144.
3. Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zcanca M, Nicolaides KH (2011) Prediction of early, intermediate and late-pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Published correction appears in Prenat Diagn* 31(1):66-74.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy (2013) Hypertension in Pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology* 122(5):1122-1131.
5. Apgar V (1953) A Proposal for a New Method of Evaluation of the Newborn Infant. Originally published in July 1953, volume 32, pages 250-259. *Anesth Analg.* 120(5):1056-1059.
6. Atli MO, Guzeloglu A, Dinc DA (2011) Expression of wingless type (WNT) genes and their antagonists at mRNA levels in equine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 20 125:94-102.

B.

7. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nature Cell Biology* 3(7): 683–686.
8. Bao SH, Shuai W, Tong J, Wang L, Chen P, Duan T (2013) Increased Dickkopf-1 expression in patients with unexplained recurrent spontaneous miscarriage. *Clin Exp Immunol* 172(3):437–443.
9. Becker C, Riedmaier I, Pfafel MW (2009) RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BioSpektrum* 15(5):512-515.
10. Bernardes TP, Zwertbroek EF, Broekhuijsen K, Koopmans C, Boers K, Owens M, Thornton J, van Pampus MG, Scherjon SA, Wallace K, Langenveld J, van den Berg PP, Franssen M, Mol B, Groen H (2019) Delivery or expectant management for prevention of adverse maternal and

- neonatal outcomes in hypertensive disorders of pregnancy: an individual participant data meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 53(4):443–453.
11. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382(6588):225–230.
 12. Birdir C, Aktas B, Kimming R, Köninger A (2015) Präeklampsiescreening im ersten Trimenon. *Gynäkologe* 48(5):394–398.
 13. Bowley E, O’Gorman DB, Gan BS (2007) β -Catenin Signaling in Fibroproliferative Disease. *Journal of Surgical Research* 138(1):141–150.
 14. Broekhuijsen K, van Baaren GJ, van Pampus MG, Ganzevoort, W, Sikkema JM, Woiski MD, Oudijk MA, Bloemenkamp KW, Scheepers HC, Bremer HA, Rijnders RJ, van Loon AJ, Perquin DA, Sporcken JM, Papatsonis DN, van Huizen ME, Vredevoogd CB, Brons JT, Kaplan M, van Kaam AH, HYPITAT-II study group (2015) Immediate delivery versus expectant monitoring for hypertensive disorders of pregnancy between 34 and 37 weeks of gestation (HYPITAT-II): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 385(9986):2492–2501.
 15. Bujold E, Morency AM, Roberge S, Lacasse Y, Forest JC, Giguère Y (2009) Acetylsalicylic acid for the prevention of preeclampsia and intra-uterine growth restriction in women with abnormal uterine artery Doppler: a systematic review and meta-analysis. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada* 31(9):818–826.
 16. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, Forest JC, Giguère Y (2010) Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology* 116(2): 402–414.
- C.**
17. Carr DB, Newton KM, Utzschneider KM, Tong J, Gerchman F, Kahn SE, Easterling TR, Heckbert SR (2009) Preeclampsia and risk of developing subsequent diabetes. *Hypertension in pregnancy* 28(4):435–447.
 18. Charles C, Gafni A, Whelan T (1997) Shared decision-making in the medical encounter: what does it mean? (or it takes at least two to tango). *Soc Sci Med.* 44(5):681-692.
 19. Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nusse R, Lefkowitz RJ (2003) Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science (New York, N.Y.)* 301(5638):1391–1394.
 20. Chun D, Braga C, Chow C, Lok L (1964) Clinical Observations on Some Aspects of Hydatidiform

- Moles *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth* 71(2):180–184.
21. Clarke RJ, Mayo G, Price P, FitzGerald GA (1991) Suppression of thromboxane A2 but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N Engl J Med.* 325(16):1137-1141.
 22. Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127(3):469–480.
 23. Cluver C, Novikova N, Koopmans CM, West HM (2017) Planned early delivery versus expectant management for hypertensive disorders from 34 weeks gestation to term. *Cochrane Database Syst Rev.* 1(1):CD009273.
 24. Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, Zwinderman AH, Robson SC, Bindels PJ, Kleijnen J, Khan KS (2008) Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: A systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ: Canadian Medical Association journal* 178(6):701–711.
 25. Crispi F, Miranda J, Gratacós E (2018) Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction: biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease. *Am J Obstet Gynecol* 218(2S):S869-S879.
- D.**
26. de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ, ter Elst A (2007) Evidence based selection of housekeeping genes. *PloS one* 2(9):e898.
 27. Dekker GA, Sibai BM (1998) Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *American journal of obstetrics and gynecology* 179(5):1359–1375.
 28. Dröge LA, Verlohren S (2017) Präeklampsie: Aktuelle diagnostische und therapeutische Aspekte. *Gynakologe* 50(3):213–221.
 29. Duley L (2003) Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy. *British Medical Bulletin* 67:161–176.
 30. Duley L (2009) The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in Perinatology* 33(3):130–137.
 31. Dunlap KA, Filant J, Hayashi K, Rucker EB, 3rd, Song G, Deng JM, Behringer RR, DeMayo FJ, Lydon J, Jeong JW, Spencer TE (2011) Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biology of reproduction* 85(2):386–396.

E.

32. Eldeen Y Elkholi DG, Hefeda MAE, Nagy HM (2016) First Trimester Screening for Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction Using Uterine Artery Doppler and Maternal Serum Placental Growth Factor and Pregnancy Associated Plasma Protein-A. *Reproductive Immunol Open Acc* 1:15.
33. Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9):871-874.
34. ESC Guidelines for the management of cardiovascular diseases during pregnancy (2019) *Revista espanola de cardiologia (English ed.)* 72(2):161.

F.

35. Fan X, Krieg S, Hwang JY, Dhal S, Kuo C, Lasley BL, Brenner RM, Nayak NR (2012) Dynamic regulation of Wnt7a expression in the primate endometrium: implications for postmenstrual regeneration and secretory transformation. *Endocrinology* 153:1063-9.
36. Feng Y, Zhang Y, Wei X, Zhang Q (2019) Correlations of DKK1 with pathogenesis and prognosis of human multiple myeloma. *Cancer Biomarkers* 24(2):195–201.
37. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2008) Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protocols* pdb.prot4986.
38. Fitzgerald JS, Germeyer A, Huppertz B, Jeschke U, Knöfler M, Moser G, Scholz C, Sonderegger S, Toth B, Markert UR (2010) Governing the invasive trophoblast: current aspects on intra- and extracellular regulation. *American Journal of reproductive immunology (New York, N.Y.)* 63(6):492–505.

G.

39. Gifford RW, August PA, Cunningham G, Green LA, Lindheimer MD, McNellis D, Roberts JM, Sibao BM, Taler SJ (2000) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 183(1):1–22.
40. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP (2008) Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294(2):H541-H550.
41. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391(6665):357–362.

42. Gordon MD, Nusse R (2006) Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 281(32):22429-22433.
43. Gürtler P, Baillie CK, Goerlich O, Estendorfer-Rinner S, Baiker A (2019) Genome Editing Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL).
44. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (2019) Hypertensive Pregnancy Disorders: Diagnosis and Therapy. S2k -Level, AWMF-Registry No. 015/018.

H.

45. Haddad B, Deis S, Goffinet F, Paniel BJ, Cabrol D, Siba BM (2004) Maternal and perinatal outcomes during expectant management of 239 severe preeclamptic women between 24 and 33 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 190(6):1590-1597.
46. Han Q, Zheng L, Liu Z, Luo J, Chen R, Yan J (2019) Expression of β -catenin in human trophoblast and its role in placenta accreta and placenta previa. *The Journal of international medical research* 47(1):206-214.
47. Hernández-Díaz S, Toh S, Cnattingius S (2009) Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)* 338:b2255.
48. Huang L, Ying H, Chen Z, Zhu YL, Gu Y, Hu L, Chen D, Zhong N (2019) Down-regulation of DKK1 and Wnt1/ β -catenin pathway by increased homeobox B7 resulted in cell differentiation suppression of intrauterine fetal growth retardation in human placenta. *Placenta* 80:27–35.
49. Huelsken J, Behrens J (2002) The Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science* 115(21):3977-3978.
50. Hypertensive Pregnancy Disorders: Diagnosis and Therapy. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (S2k-Level, AWMF-Registry No. 015/018, March 2019).

I.

51. Igbini E, Guo F, Jiang SW, Kelley C, Li J (2019) Dkk1 involvement and its potential as a biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinica Chimica Acta* 488:226–234.

K.

52. Kagey MH, He X (2017) Rationale for targeting the Wnt signalling modulator Dickkopf-1 for oncology. *British Journal of Pharmacology* 174(24):4637–4650.
53. Kasoha M, Bohle RM, Seibold A, Gerlinger C, Juhasz-Böss I, Solomayer EF (2018) Dickkopf-1 (Dkk1) protein expression in breast cancer with special reference to bone metastases. *Clinical and Experimental Metastasis* 35(8):763–775.

54. Kasoha M, Goldbach L, Klavounos P, Findelklee S, Juhasz-Böss I, Eichler H, Solomayer EF (2019) Expression of the Wnt antagonist Dickkopf-1 in endometriosis. *Integr Mol Med* 6.
55. Kawano Y, Kypta R (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* 116(Pt 13):2627–2634.
56. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF (2006) WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 367(9516):1066-1074.
57. Khashan AS, Evans M, Kublickas M, McCarthy FP, Kenny LC, Stenvinkel P, Fitzgerald T, Kublickiene K (2019) Preeclampsia and risk of end stage kidney disease: A Swedish nationwide cohort study. *PLoS medicine* 16(7):e1002875.
58. Khoshnood Shariati M, Karimi Z, Rezaiejad M, Basiri A, Torkestani F, Saleh Gargari S (2015) Perinatal complications associated with preterm deliveries at 24 to 33 weeks and 6 days gestation (2011-2012): A hospital-based retrospective study. *Iran J Reprod Med.* 13(11):697-702.
59. Knöfler M (2010) Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *The International journal of developmental biology* 54(2-3):269–280.
60. Knöfler M, Pollheimer J (2012) IFPA Award in Placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion. *Placenta* 33 Suppl(2):S55-S62.
61. Knöfler M, Pollheimer J (2013) Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Frontiers in genetics* 4:190.
62. Koopmans CM, Bijlenga D, Groen H, Vijgen SM, Aarnoudse JG, Bekedam DJ, van den Berg PP, de Boer K, Burggraaff JM, Bloemenkamp KW, Drogtróp AP, Franx A, de Groot CJ, Huisjes AJ, Kwee A, van Loon AJ, Lub A, Papatsonis DN, van der Post JA, Roumen FJ, HYPITAT study group (2009) Induction of labour versus expectant monitoring for gestational hypertension or mild pre-eclampsia after 36 weeks' gestation (HYPITAT): a multicentre, open-label randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 374(9694):979–988.
63. Kraus C, Liehr T, Hülsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG (1994) Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 23(1):272–274.
64. Kumar P, Luo Y, Tudela C, Alexander JM, Mendelson CR (2013) The c-Myc-regulated microRNA-17~92 (miR-17~92) and miR-106a~363 clusters target hCYP19A1 and hGCM1 to inhibit human trophoblast differentiation. *Mol Cell Biol.* 33(9):1782-1796.

L.

65. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, Yates JR 3rd, Conover CA (1999) The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(6):3149–3153.
66. Lees C, Marlow N, Arabin B, Bilardo C, Brezinka C, Derks JB, Duvekot J, Frusca T, Diemert A, Ferrazzi E, Ganzevoort W, Hecher K, Martinelli P, Ostermayer E, Papageorghiou AT, Schlembach D, Schneider KT, Thilaganathan B, Todros T, van Wassenaer-Leemhuis A, TRUFFLE Group (2013) Perinatal morbidity and mortality in early-onset fetal growth restriction: cohort outcomes of the trial of randomized umbilical and fetal flow in Europe (TRUFFLE). *Ultrasound in obstetrics & gynecology: the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 42(4):400–408.
67. Lees CC, Marlow N, van Wassenaer-Leemhuis A, Arabin B, Bilardo CM, Brezinka C, Calvert S, Derks JB, Diemert A, Duvekot JJ, Ferrazzi E, Frusca T, Ganzevoort W, Hecher K, Martinelli P, Ostermayer E, Papageorghiou AT, Schlembach D, Schneider KT, Thilaganathan B (2015) TRUFFLE study group (2015). 2 year neurodevelopmental and intermediate perinatal outcomes in infants with very preterm fetal growth restriction (TRUFFLE): a randomised trial. *Lancet (London, England)* 385(9983):2162–2172.
68. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu K, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA (2004) Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *New England Journal of Medicine* 350(7):672–683.
69. Li HW, Cheung AN, Tsao SW, Cheung AL, O WS (2003) Expression of e-cadherin and beta-catenin in trophoblastic tissue in normal and pathological pregnancies. *International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 22(1):63–70.
70. Li J, Sarosi I, Cattle RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, Morony S, Adamu S, Geng Z, Qiu W, Kostenuik P, Lacey DL, Simonet WS, Bolon B, Qian X, Shalhoub V, Ominsky MS, Zhu Ke H, Li X, Richards WG (2006) Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 39(4):754–766.
71. Li N, Huang L, Li Y, Chen X, Yang Y, Hou Y, Qiao C (2020) Lin28B/miR-92b Promote the Proliferation, Migration, and Invasion in the Pathogenesis of Preeclampsia via the DKK1/Wnt/ β -Catenin Pathway. *Reprod Sci.* 27:815-822.
72. Life Technologies (2015) Realtime PCR handbook. *Realtime PCR handbook*:1–68.

73. Lisonkova S, Joseph KS (2013) Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early-versus late-onset diseases. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 209(6):544.e1-544.e12.
74. Liu Y, Ma Y (2017) Promoter Methylation Status of WNT2 in Placenta from Patients with Preeclampsia. *Med Sci Monit.* 23:5294-5301.
75. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4):402–408.
76. Lo JO, Mission JF, Caughey AB (2013) Hypertensive disease of pregnancy and maternal mortality. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 25(2):124–132.
77. Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20(1):781–810.
- M.**
78. MacKay AP, Berg CJ, Atrash HK (2001) Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstetrics and Gynecology* 97(4):533–538.
79. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417(6889):664–667.
80. Marquardt RM, Kim TH, Shin JH, Jeong JW (2019) Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis?. *International Journal of Molecular Sciences* 20(15):3822.
81. Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S (2000) Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 59(4):302–309.
82. McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B (1991) A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science (New York, N.Y.)* 254(5036):1359–1361.
83. Meads CA, Cnossen JS, Meher S, Juarez-Garcia A, ter Ried G, Duley L, Roberts TE, Mol BW, van der Post JA, Leeflang MM, Barton PM, Hyde CJ, Gupta JK, Khan KS (2008) Methods of prediction and prevention of pre-eclampsia. *Health Technol Assess* 12(6):iii–270.
84. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT (1999) Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18(55):7860–7872.
85. Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ (1996) Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development (Cambridge, England)*

122(11):3343–3353.

86. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kayas A (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nature reviews. Genetics* 5(9):691–701.
87. Mostello D, Kallogjeri D, Tungsiripat R, Leet T (2008) Recurrence of preeclampsia: effects of gestational age at delivery of the first pregnancy, body mass index, paternity, and interval between births. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 199(1):55.e1-55.e557.
88. Müller HJ, Prange DB (2016) PCR-Polymerase Kettenreaktion. *Springer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage.*

N.

89. Nassar AH, Adra AM, Chakhtoura N, Gómez-Martín O, Beydoun S (1998) Severe preeclampsia remote from term: labor induction or elective cesarean delivery?. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 179(5):1210–1213.
90. National Guideline Alliance (UK) (2011) Hypertension in pregnancy: diagnosis and management. *London: National Institute for Health and Care Excellence (UK).*
91. National Guideline Alliance (UK) (2019) Hypertension in pregnancy: diagnosis and management. *London: National Institute for Health and Care Excellence (UK).*
92. Niehrs C (2006) Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25(57):7469–7481.
93. Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T (2004) DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the β -catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23(52):8520–8526.
94. Nusse R, Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31(1):99–109.
95. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287(5785):795–801.

O.

96. O’Gorman N, Nicolaidis KH, Poon LC (2016) The use of ultrasound and other markers for early detection of preeclampsia. *Women’s Health* 12(2):199–207.

P.

97. Parr BA, Cornish VA, Cybulsky MI, McMahon AP (2001) Wnt7b regulates placental development in mice. *Developmental Biology* 237(2):324–332.

98. Peifer M, McCrea PD, Green KJ, Wieschaus E, Gumbiner BM (1992) The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *The Journal of cell biology* 118(3):681-691.
99. Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ (2012) Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Disease Models & Mechanisms* 5(1):9–18.
100. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruyse L, van Assche A (1991) Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 98(7):648–655.
101. Pollheimer J, Loregger T, Sonderegger S, Saleh L, Bauer S, Bilban M, Czerwenka K, Husslein P, Knöfler M (2006) Activation of the canonical wingless/T-Cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast. *The American Journal of Pathology* 168(4):1134–1147.
102. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, McAuliffe F, da Silva Costa F, von Dadelszen P, Mclntyre HD, Kihara A, Kihara AB, Di Renzo GC, Romero R, D'Alton M, Berghella V, Nicolaides KH, Hod M (2019) The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 145(S1):1–33.
103. Pryde PG, Mittendorf R (2009) Contemporary usage of obstetric magnesium sulfate: indication, contraindication, and relevance of dose. *Obstet Gynecol* 114(3):669–673.

R.

104. Rana S, Hacker MR, Modest AM, Salahuddin S, Lim KH, Verlohren S, Perschel FH, Karumanchi SA (2012) Circulating angiogenic factors and risk of adverse maternal and perinatal outcomes in twin pregnancies with suspected preeclampsia. *Hypertension* 60(2):451–458.
105. Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, Pulkki K, Heinonen S (2011) Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 157(1):48–52.
106. Regitz-Zagrosek V, Roos-Hesselink JW, Bauersachs J, Blomstrom-Lundqvist C, Cifkova R, De Bonis M, Iung B, Johnson MR, Kintscher U, Kranke P, Lang IM, Morais J, Pieper PG, Presbitero P, Price S, Rosano G, Seeland U, Simoncini T, Swan L, Warnes CA,... ESC Scientific Document Group (2018) 2018 ESC Guidelines for the management of cardiovascular diseases during pregnancy. *European heart journal* 39(34):3165–3241.

107. Rider V, Isuzugawa K, Twarog M, Jones S, Cameron B, Imakawa K, Fang J (2006) Progesterone initiates Wnt- β -catenin signaling but estradiol is required for nuclear activation and synchronous proliferation of rat uterine stromal cells. *Journal of Endocrinology* 191(3):537–548.
108. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987) The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50(4):649–657.
109. Roberge S, Bujold E, Nicolaides KH (2018) Aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 218(3):287–293.
110. Roberts DJ, Post MD (2008) The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *J Clin Pathol.* 61(12):1254–1260.
111. Robertson WB (1976) Uteroplacental vasculature. *Journal of Clinical Pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)* 10:9–17.
112. Robertson WB, Brosens I, Dixon G (1975) Uteroplacental vascular pathology. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 5(1–2):47–65.
113. Roessler E, Du Y, Glinka A, Dutra A, Niehrs C, Muenke M (2000) The genomic structure, chromosome location, and analysis of the human DKK1 head inducer gene as a candidate for holoprosencephaly. *Cytogenetics and cell genetics* 89(3–4):220–224.
114. Rolnik DL, Wright D, Poon LC, O’Gorman N, Syngelaki A, de Paco Matallana C, Akolekar R, Cicero S, Janga S, Singh M, Molina FS, Persico N, Jani JC, Plasencia W, Papaiouannou G, Tenenbaum-Gavish K, Meiri H, Gizurason S, Maclagan K, Nicolaides KH (2017) Aspirin versus placebo in pregnancies at high risk for preterm preeclampsia. *New England Journal of Medicine* 377(7):613–622.

S.

115. Salazar A, Velázquez-Soto H, Ayala-Balboa J, Jiménez-Martínez MC (2017) Allergen-Based Diagnostic: Novel and Old Methodologies with New Approaches. *IntechOpen* 77–99.
116. Serra B, Mendoza M, Scazzocchio E, Meler E, Nolla M, Sabrià E, Rodríguez I, Carreras E (2020) A new model for screening for early-onset preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 222(6):608.e1–608.e18.
117. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005) Pre-eclampsia. *Lancet (London, England)* 365(9461):785–799.
118. Sibai BM (2005) Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. *Obstetrics & Gynecology* 105(2):402–410.

119. Sibai BM, Caritis S, Hauth J; National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network (2003) What we have learned about preeclampsia. *Seminars in Perinatology* 27(3):239–246.
120. Smith GC, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, Connor JM (2002) Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87(4):1762–1767.
121. Sonderegger S, Husslein H, Leisser C, Knöfler M (2007) Complex expression pattern of Wnt ligands and frizzled receptors in human placenta and its trophoblast subtypes. *Placenta* 28(Suppl A):S97-S102.
122. Sonderegger S, Pollheimer J, Knöfler M (2010) Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation - review. *Placenta* 31(10):839–847.
123. Spencer K, Cowans NJ, Nicolaides KH (2008) Low levels of maternal serum PAPP-A in the first trimester and the risk of pre-eclampsia. *Prenatal diagnosis* 28(1):7-10.
124. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R (2010) Pre-eclampsia. *The Lancet* 376(9741):631–644.
125. Stepan H, Kuse-Föhl S, Klockenbusch W, Rath W, Schauf B, Walther T, Schlembach D (2015) Diagnosis and Treatment of Hypertensive Pregnancy Disorders. Guideline of DGGG (S1-Level, AWMF Registry No. 015/018, December 2013). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 75(9):900–914.
- T.**
126. Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S, Oka H, Kimura Y, Tamura S, Inoue M, Monden T, Ito F, Monden M (1996) Beta-catenin expression in human cancers. *American Journal of Pathology* 148(1):39–46.
127. Tallarek AC, Huppertz B, Stepan H (2012) Preeclampsia - Aetiology, Current Diagnostics and Clinical Management, New Therapy Options and Future Perspectives. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 72(12):1107–1116.
128. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407(6803):530–535.
129. Tayyar AT, Karakus R, Eraslan Sahin M, Topbas NF, Sahin E, Karakus S, Yalcin ET, Tayyar A (2019) Wnt signaling pathway in early- and late-onset preeclampsia: evaluation with Dickkopf-1 and R-Spondin-3 glycoproteins. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 299(6):1551–1556.

130. Thilaganathan B, Kalafat E. Cardiovascular System in Preeclampsia and Beyond (2019) *Hypertension* 73(3):522-531.

131. Tulac S, Nayak NR, Kao LC, Van Waes M, Huang J, Lobo S, Germeyer A, Lessey BA, Taylor RN, Suchanek E, Giudice LC (2003) Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88(8):3860–3866.

132. Tulac S, Overgaard MT, Hamilton AE, Jumbe NL, Suchanek E, Giudice LC (2006) Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1453–1461.

U.

133. Ueland T, Estensen ME, Grindheim G, Bollerslev J, Henriksen T, Aukrust P, Aakhus S, Gullestad L, Lekva T (2020) Elevated levels of the secreted wingless agonist R-spondin 3 in preeclamptic pregnancies. *Journal of Hypertension* 38:1347-1354.

134. Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM (2011) Pre-eclampsia: Pathophysiology, diagnosis, and management. *Vascular Health and Risk Management* 7:467–474.

V.

135. van der Horst PH, Wang Y, van der Zee M, Burger CW, Blok LJ (2012) Interaction between sex hormones and WNT/ β -catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology* 358(2):176–184.

136. Verani R, Cappuccio I, Spinsanti P, Gradini R, Caruso A, Magnotti MC, Motolese M, Nicoletti F, Melchiorri D (2007) Expression of the Wnt inhibitor Dickkopf-1 is required for the induction of neural markers in mouse embryonic stem cells differentiating in response to retinoic acid. *Journal of neurochemistry* 100(1):242–250.

137. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, Calda P, Holzgreve W, Galindo A, Engels T, Denk B, Stepan H (2012) The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 206(1):58.e1-58.e588.

138. Vlemmix F, Warendorf JK, Rosman AN, Kok M, Mol BW, Morris JM, Nassar N (2013) Decision aids to improve informed decision-making in pregnancy care: a systematic review. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 120(3):257–266.

W.

139. Wang X, Zhang Z, Zeng X, Wang J, Zhang L, Song W, Shi Y (2018) Wnt/ β -catenin signaling

pathway in severe preeclampsia. *Journal of Molecular Histology* 49(3):317–327.

140. Wang Y, van der Zee M, Fodde R, Blok LJ (2010) Wnt/B-catenin and sex hormone signaling in endometrial homeostasis and cancer. *Oncotarget* 1:674–84.
141. Willert K, Jones KA (2006) Wnt signaling: is the party in the nucleus?. *Genes Dev.* 20(11):1394–1404.
142. Wu P, Haththotuwa R, Kwok CS, Babu A, Kotronias RA, Rushton C, Zaman A, Fryer AA, Kadam U, Chew-Graham CA, Mamas MA (2017) Preeclampsia and Future Cardiovascular Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes* 10(2):e003497

Y.

143. Yamaguchi Y, Passeron T, Watabe H, Yasumoto K, Rouzaud F, Hoashi T, Hearing VJ (2007) The effects of dickkopf 1 on gene expression and Wnt signaling by melanocytes: mechanisms underlying its suppression of melanocyte function and proliferation. *The Journal of investigative dermatology* 127(5):1217–1225.
144. Vollmar-Hesse I (2007) HistoNet 2000. *HistoNet*. <http://www.histonet2000.de/text.php?k=F001>.
145. Yu CK, Khouri O, Onwudiwe N, Spiliopoulos Y, Nicolaidis KH (2008) Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler imaging: Relationship to gestational age at delivery and small-for-gestational age. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 31(3):310–313.

Z.

146. Zeisler H, Llorba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Allegranza D, Dilba P, Schoedl M, Hund M, Verlohren S (2016) Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *New England Journal of Medicine* 374(1):13–22.
147. Zhan T, Rindtroff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36(11):1461–1473.
148. Zhang L, Leng M, Li Y, Yuan Y, Yang B, Li Y, Yuan E, Shi W, Yan S, Cui S (2019) Altered DNA methylation and transcription of WNT2 and DKK1 genes in placentas associated with early-onset preeclampsia. *Clinica Chimica Acta* 490:154–160.
149. Zhang Z, Li H, Zhang L, Jia L, Wang P (2013) Differential expression of β -catenin and Dickkopf-1 in the third trimester placentas from normal and preeclamptic pregnancies: a comparative study. *Reproductive biology and endocrinology:RB&E* 11:17.
150. Zhang Z, Wang X, Zhang L, Shi Y, Wang J, Yan H (2017) Wnt/ β -catenin signaling pathway in trophoblasts and abnormal activation in preeclampsia (Review. *Molecular Medicine Reports*

16(2):1007–1013.

151. Zhu Z, Guo D, Zhong C, Wang A, Xie X, Xu T, Chen CS, Peng Y, Peng H, Li Q, Ju Z, Geng D, Chen J, Liu L, Wang Y, Zhang Y, He J (2019) Serum Dkk-1 (Dickkopf-1) Is a Potential Biomarker in the Prediction of Clinical Outcomes among Patients with Acute Ischemic Stroke. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39(2):285–293.
152. Zhuang B, Luo X, Rao H, Li Q, Shan N, Liu X, Qi H (2015) Oxidative stress-induced c/EBP β inhibits β -catenin signaling molecule involving in the pathology of preeclampsia. *Placenta* 36:839–846.

8 ANHANG

8.1 Aufklärung und Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Anlage I

Patienteninformation zur Studie

„Maternale und fetale Serumspiegel von DKK-1 und die Expression von β -Catenin in der Plazenta bei präeklampsischen und normalen Schwangerschaften, sowie die Untersuchung von postpartalen Verläufen von s-Fit-1/PIGF bei präeklampsischen Patientinnen und deren Korrelation mit den üblichen postpartalen laborchemischen und klinischen Parametern“

Liebe Patientin, liebe Probandin!

Die Schwangerschaftsvergiftung (Präeklampsie) ist eine Bluthochdruckerkrankung in der Schwangerschaft, mit schweren mütterlichen und kindlichen Komplikationen. Die einzig mögliche Therapie besteht in der vorzeitigen Entbindung durch einen Kaiserschnitt. Die Ursachen der Schwangerschaftsvergiftung (Präeklampsie) sind bisher nicht eindeutig geklärt. Sicher ist allein, dass es zu einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren kommt, die den Blutdruck erhöhen.

Um besser beurteilen zu können, was hier genau im Gefäß geschieht, möchten wir Blut und insbesondere Zellteilungsfaktoren, gefäßbildende und -hemmende Faktoren in deren Auswirkungen auf Ihren Körper unmittelbar vor und nach der Geburt, im Labor untersuchen. Wir vergleichen Ergebnisse von Blutproben von Patientinnen, die an einer Schwangerschaftsvergiftung leiden, mit gesunden, schwangeren Frauen und Frauen, die nicht schwanger sind.

Mit diesem Schreiben laden wir Sie ein, an dieser Studie teilzunehmen. Sie können durch eine einfache Blutentnahme zu diesem wissenschaftlichen Projekt beitragen.

Wenn Sie an der Studie teilnehmen, wird bei Ihnen im Rahmen der routinemäßigen Maßnahmen, eine Blutabnahme von maximal 20 mL erfolgen, mit der eine spezielle Analyse Ihrer Präeklampsieparameter durchgeführt wird. Eine Gewinnung, Lagerung, oder Analyse von Erbgut tragenden Nukleinsäuren (DNA) aus Blutzellen wird nicht vorgenommen. Die Ergebnisse dieser speziellen Untersuchung werden Ihnen auf Wunsch selbstverständlich mitgeteilt. Wir werden sowohl klinische Parameter (z.B. Blutdruck, Körperschwellungen, subjektives Befinden), als auch die o.g. Laborparameter unmittelbar vor der Geburt, 2 Stunden nach der Geburt, täglich vom 1. bis 4. Tag nach der Geburt und 6 Wochen nach der Geburt (d.h. nach der Wochenbettperiode) erheben.

Bei der Studie werden Blutabnahmen außerhalb der Routine durchgeführt. Selten wird versehentlich ein arterielles Gefäß, statt eines venösen punktiert, das Blutungen und Blutergüsse zur Folge haben könnte, die jedoch in der Regel keiner weiteren Behandlung bedürfen. Nur gelegentlich kann eine Verletzung oder Perforation der Gefäßwand stattfinden. Nervenverletzungen im Einstichgebiet können ab und zu vorübergehende oder ggf. bleibende Gefühls- und Bewegungsstörungen, schlimmstenfalls auch Lähmungen verursachen. Infektionen des Katheters und der Einstichstelle können mit Antibiotika behandelt werden. Sehr selten wurde die Bildung von Blutgerinnsel (Thromben) berichtet. Sollte sich ein solches Blutgerinnsel vom Gefäß ablösen und in die Lunge gelangen (Lungenembolie), kann der Patient in einen akut bedrohlichen Zustand geraten, der intensivmedizinische Behandlung erfordert.

Alle personenbezogenen Daten unterliegen den geltenden Datenschutzbestimmungen und werden pseudonymisiert. Unter Pseudonymisierung oder auch das Pseudonymisieren, engl. Pseudonymization versteht man „das Ersetzen des Namens und anderer Identifikationsmerkmale durch ein Kennzeichen“ aus dem Zweck, die Bestimmung des Betroffenen auszuschließen, oder wesentlich zu erschweren. Sie können jederzeit, ohne Angabe von Gründen, Ihre Einwilligung zur Teilnahme an diesem Vorhaben, zurücknehmen. Dies wird keine Folgen oder Nachteile auf Ihre weitere Behandlung haben.

Für weiterführende Fragen zu unserer Studie, stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Wir bedanken uns herzlich für Ihre Unterstützung,

Prof. Dr. med. E.-F. Solomayer

Amr Hamza

Maternale und fetale Serumspiegel von DKK-1 und die Expression von β -Catenin in der Plazenta bei präeklampsischen und normalen Schwangerschaften, sowie die Untersuchung von postpartalen Verläufen von s-Flt-1/PlGF bei präeklampsischen Patientinnen und deren Korrelation mit den üblichen postpartalen laborchemischen und klinischen Parametern

Einwilligungserklärung

.....
Name der Patientin/Probandin in Druckbuchstaben

geb. am

Teilnehmer-Nr.

Ich bin in einem persönlichen Gespräch durch die Ärztin

.....
Name des Arztes/der Ärztin in Druckbuchstaben

ausführlich und verständlich über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite dieser Studie aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text der Patienteninformation, sowie die hier nachfolgend abgedruckte Datenschutzerklärung gelesen und verstanden. Ich hatte die Gelegenheit, mit dem Prüfarzt über die Durchführung der Studie zu sprechen. Alle meine Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet.

Möglichkeit zur Dokumentation zusätzlicher Fragen seitens des Patienten oder sonstiger Aspekte des Aufklärungsgesprächs:

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden.

Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass dadurch Nachteile für meine medizinische Behandlung entstehen.

Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Prüfung personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der klinischen Prüfung folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, das heißt ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der klinischen Prüfung teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Prüfung personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, über mich erhoben und in Papierform, sowie auf elektronischen Datenträgern bei/in der Klinischen Chemie und dem behandelnden Arzt aufgezeichnet und ausgewertet werden.
2. Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte des Sponsors sowie die zuständigen Überwachungsbehörden in meine beim Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten, insbesondere meine Gesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von der ärztlichen Schweigepflicht.
3. Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist unwiderruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme am Therapieversuch beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden.
4. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Prüfung mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden, wie es die Vorschriften über die klinische Prüfung von Arzneimitteln bestimmen. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.
5. Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, am Heilversuch teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten, gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die in Nr. 3 a) bis c) genannten Zwecke noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

Ich erkläre mich bereit, freiwillig an der Studie
„Maternale und fetale Serumspiegel von DKK-1 und die Expression von β -Catenin in der Plazenta bei
präeklampsischen und normalen Schwangerschaften, sowie die Untersuchung von postpartalen Verläufen
von s-Flt-1/PlGF bei präeklampsischen Patientinnen und deren Korrelation mit den üblichen postpartalen
laborchemischen und klinischen Parametern“
teilzunehmen.

Ein Exemplar der Patienten-Information und -Einwilligung habe ich erhalten.
Ein Exemplar verbleibt im Prüfzentrum.

.....
Name der Patientin/Probandin in Druckbuchstaben



.....
Datum

.....
Unterschrift der Patientin/Probandin

Ich,,
(Name des Arztes/der Ärztin in Druckbuchstaben)

habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung der Probandin eingeholt.

.....
Datum

.....
Unterschrift des Arztes/der Ärztin

8.2 Posterpräsentation

- 17. Deutscher Gestose-Kongress, Leipzig, April 2017: „Die Rolle des Wnt-Signalwegs bei Präeklampsie“ (Referentin: L. Fackiner; Autoren: L. Fackiner, M. Kasoha, E.-F. Solomayer, A. Hamza).
- Erhalt des Posterpreises durch die Arbeitsgemeinschaft Schwangerschaft und Gestose (AGSG).



Die Rolle des Wnt-Signalwegs bei Präeklampsie

Lena Fackiner*, Mariz Kasoha*, Erich-Franz Solomayer, Amr Hamza
 Klinik für Gynäkologie, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Einleitung

Der Wnt-Signalweg ist einer von vielen Signaltransduktionswegen, der für die normale Embryonalentwicklung, Zellproliferation und -migration essentiell ist. β -Catenin ist der primäre Wnt-Effektor, indem er als Coaktivator zur Förderung der Gentranskription dient. Dickkopf-1 (DKK1) als sezerniertes Glykoprotein kann den kanonischen Wnt-Signalweg antagonisieren und übt u.a. einen negativen Effekt auf die Dezidualisierung, Trophoblastdifferenzierung und embryonische Entwicklung aus (Abbildung 1).

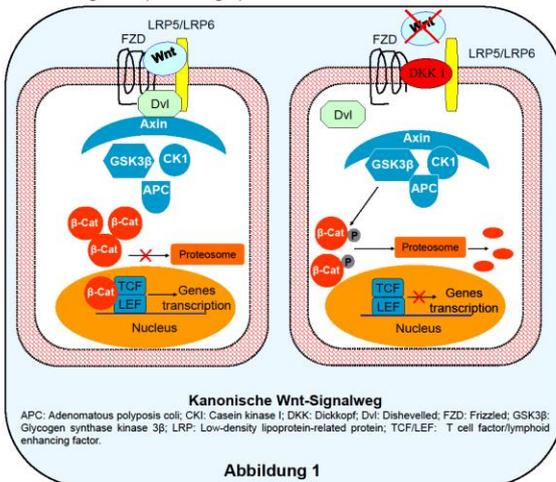


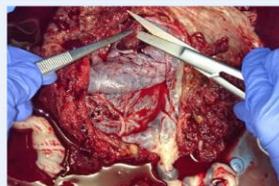
Abbildung 1

Präeklampsie (PE) ist eine verbreitete, schwangerschaftsspezifische Erkrankung, die zur Familie der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen zählt. Präeklampsie tritt bei 2-8% aller Schwangeren auf und geht mit einer deutlich erhöhten maternalen und fetalen Morbidität und Mortalität einher. In vielen verschiedenen Studien wurde die Assoziation zwischen einem dysregulierten Wnt-Signalweg und Präeklampsie dokumentiert; die genaue Pathogenese dieser Erkrankung ist jedoch ungeklärt. Diese Arbeit zielt darauf ab, die Bedeutung von DKK1 und β -Catenin in der Plazenta als auch von DKK1 im Serum bei Präeklampsie-Patientinnen zu untersuchen.

Materialien und Methoden

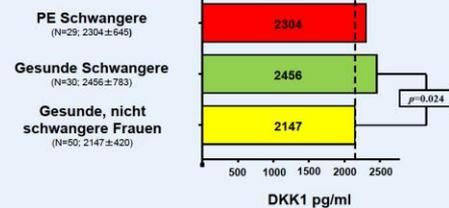
Diese Studie inkludiert 110 Probanden, 30 mit Präeklampsie [32 (22-42) Jahre], 30 gesunde schwangere Frauen [33 (23-43) Jahre] und 50 gesunde, nicht schwangere Frauen [29 (22-43) Jahre]. Wir entnehmen jeweils zeitnah nach der Plazentageburt 3 Plazentaprobe von 3 verschiedenen Stellen und lagerten diese bis zur Testung bei -80°C (Abbildung 2). 30 Plazenta Kryoschnitte von 10 Plazenten (5 PE und 5 Gesunde) wurden mit HE gefärbt. Die DKK1-Proteinlevel wurden mittels Human DKK-1 Quantikine ELISA Kit von R&D gemäß der Herstellerinstruktionen gemessen. Die Genexpression von DKK1 und β -Catenin wurde mittels TaqMan Assays ermittelt.

Abbildung 2



Ergebnisse

DKK1 Protein Expression im Serum



Genexpression von DKK1 und β -Catenin in der Plazenta

HE-Plazenta Kryoschnitte

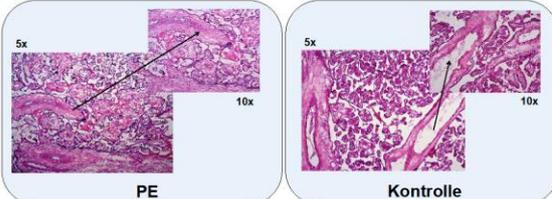
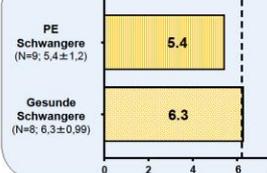


Abbildung 3: Zeichen gestörter intervillöser Durchblutung; zunächst proliferative, dann regressive Veränderungen des Chorionepithels; Obstruktion/Dilatation von Gefäßen; Kernknospen > 30%; Verkalkungen; vermehrte Mikrofibrinablagerungen → Zottenstromafibrose

Mittelwert Δ CT DKK1



Mittelwert Δ CT β -Catenin

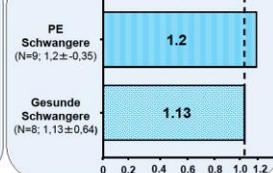


Abbildung 4: DKK1- und β -Catenin Genexpression in der Plazenta. Ergebnisse sind als Mittelwert \pm STD gezeigt.

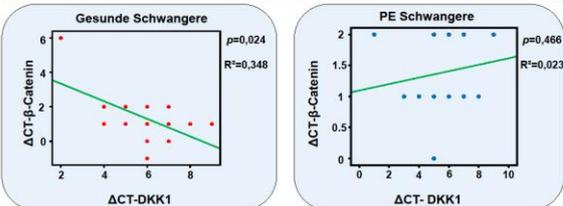


Abbildung 5: Korrelation zwischen DKK1- und β -Catenin Genexpression

Zusammenfassung

DKK1 scheint einen Einfluss auf die Schwangerschaft zu haben. Die DKK1-Proteinlevel im Serum waren bei PE-Schwangeren im Vergleich zu gesunden Schwangeren nicht signifikant unterschiedlich; die DKK1-Genexpression hingegen war 2-fach höher. Dies könnte auf einen gestörten Wnt-Signalweg bei Präeklampsie auf Genebene, nicht aber auf Proteinebene hindeuten. Die verbliebenen Proben werden untersucht, um die exakte Beteiligung von DKK1 und β -Catenin bei Präeklampsie zu eruieren.

Urkunde

Die Arbeitsgemeinschaft

Schwangerschaftshochdruck und Gestose (AGSG)

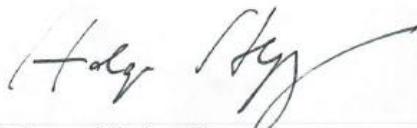
verleiht an

Lena Fackiner

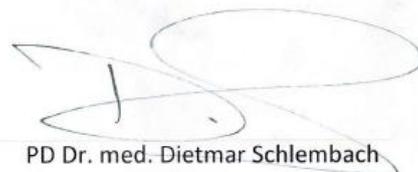
den Posterpreis im Wert von 500 EUR

anlässlich des 17. Deutschen Gestose-Kongress in Leipzig.

Leipzig, 29.04.2017



Prof. Dr. med. Holger Stepan



PD Dr. med. Dietmar Schlembach

9 DANKSAGUNG

Diese Danksagung gebührt allen Menschen, die mir auf unterschiedlichstem Wege bei der Erstellung dieser Promotion geholfen haben.

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Solomayer bedanken, der das Konzept für die Studie entwickelt und mir die Möglichkeit gegeben hat, in der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin zu promovieren und diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Ein besonderer Dank gebührt auch meinem Betreuer Herrn Dr. med. Hamza, der mich an das Thema herangeführt und mir wichtige Denkanstöße und Hilfestellungen gegeben hat. Darüber hinaus hat er einen erheblichen Anteil zur (teils auch nächtlichen) Rekrutierung der Proben beigetragen. Auch für das zeitintensive Korrekturlesen und für die konstruktive Kritik möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Kasoha danke ich für die ganzheitliche Mitbetreuung. Ohne ihre umfassende Hilfe und ihre schier unendliche Geduld wäre mir die Arbeit im Labor nur halb so leichtgefallen. Außerdem möchte ich mich für die konstruktive Kritik bezüglich der Ausarbeitung des Methodenteils und die kompetente und zuverlässige Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, die mir nicht nur im gesamten Studium, sondern auch bei der Fertigstellung meiner Promotion beistand. Ohne ihre emotionale und tatkräftige Unterstützung wäre weder das Studium noch die Doktorarbeit möglich gewesen. Besonders danken möchte ich meiner Schwester Christina, dir mir in allen Lebenslagen beisteht und mir auch in dieser Hinsicht eine große Stütze gewesen ist.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Opa Adolf und bei Steffen bedanken, denen ich diese Arbeit auch widmen möchte. Opa, vielen Dank, dass Du immer an mich geglaubt hast. Nachdem Du mich bei jedem Staatsexamen gefragt hast, ob ich nun „Doktor“ bin, hätte ich Dir diese Frage nun endlich mit „Ja“ beantworten können. Steffen, Dir danke ich für Deine bedingungslose Liebe und Unterstützung. Du warst sowohl beruflich als auch privat immer für mich da und hast mich in schwierigen Zeiten auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt.

Ich werde Euch immer in meinem Herzen tragen.

Zum Schluss noch ein großes Dankeschön an alle Teilnehmerinnen dieser Studie. Vielen Dank für Ihr Vertrauen in dieses Projekt.

10 LEBENSLAUF

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

