

Aus der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Bernd Gerber

Untersuchungen zur Expression und Funktion des Glykoproteins  
Progranulin an der Humanplazenta sowie Evaluation neuer Marker in der  
Prädiktion und Diagnostik der Präeklampsie

Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae habilitatus (Dr. med. habil.)

der Universität Rostock

Vorgelegt von:

Dr. med. Johannes Stubert

aus Rostock

geboren am 04.04.1979 in Leipzig

**Gutachter:**

Prof. Dr. med. habil. Bernd Gerber, Universitätsfrauenklinik Rostock

Prof. Dr. med. habil. Ekkehard Schleußner, Universitätsfrauenklinik Jena

Prof. Dr. rer. nat. habil. Udo Jeschke, Universitätsfrauenklinik LMU München

Datum der Einreichung: 31. Januar 2015

Datum der Verteidigung: 28. September 2015

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG</b> .....  | <b>4</b>  |
| VORKOMMEN UND BEDEUTUNG VON PROGRANULIN .....   | 4         |
| PHYSIOLOGISCHE UND PATHOPHYSIOLOGISCHE ASPEKTE DER PLAZENTAENTWICKLUNG .....  | 5         |
| KLINISCHE MANIFESTATION DER PRÄEKLAMPSIE .....  | 8         |
| <b>2. FRAGESTELLUNG</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>3. ORIGINALARBEITEN</b> .....  | <b>12</b> |
| 1. EXPRESSIONSMUSTER VON PROGRANULIN IN DER HUMANPLAZENTA UND SEINE BEDEUTUNG FÜR DIE ZELLPROLIFERATION AN DER CHORIONKARZINOMZELLINIE BeWo. STUBERT J, RICHTER DU, GERBER B, BRIESE V. J REPROD DEV 2011;57(2):229-235 .....   | 12        |
| 2. PROGRANULIN ZEIGT ZYTOPROTEKTIVE EFFEKTE AN TROPHOBLASTZELLEN IN VITRO, ANTAGONISIERT JEDOCH NICHT EINE DURCH TNF- $\alpha$ INDUZIERTE APOPTOSE. STUBERT J, WALDMANN K, DIETERICH M, RICHTER DU, BRIESE V. ARCH GYNECOL OBSTET 2014;290:867-873 .....  | 15        |
| 3. DIE TROPHOBLASTÄRE EXPRESSION VON PROGRANULIN IST HOCHREGULIERT IN FÄLLEN VON FETALER WACHSTUMSRESTRIKTION UND PRÄEKLAMPSIE. STUBERT J, SCHATTENBERG F, RICHTER DU, DIETERICH M, BRIESE V. J PERINAT MED 2012;40(5):475-481 .....  | 17        |
| 4. KLINISCHE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN SCHWERER EARLY- UND LATE-ONSET PRÄEKLAMPSIE UND ANALYSE VON PRÄDIKTOREN DES PERINATALEN OUTCOMES. STUBERT J, ULLMANN S, DIETERICH M, DIEDRICH D, REIMER T. J PERINAT MED. 2014;42(5):617-627 .....   | 20        |
| 5. PRÄDIKTION DER PRÄEKLAMPSIE UND EINER INDIZIERTEN ENTBINDUNG < 34 SCHWANGERSCHAFTSWOCHEN DURCH SFLT-1 UND PLGF BEI PATIENTINNEN MIT PATHOLOGISCHEM DOPPLERFLUSSMUSTER DER AA. UTERINAE IM ZWEITEN TRIMENON: EINE PROSPEKTIVE KOHORTENANALYSE. STUBERT J, ULLMANN S, BOLZ M, KÜLZ T, DIETERICH M, RICHTER DU, REIMER T. BMC PREGNANCY AND CHILDBIRTH 2014;14(1):292 ..... | 24        |
| 6. BESTIMMUNG VON MIRNA-EXPRESSIONSPROFILEN AUS MÜTTERLICHEM SERUM VON PATIENTINNEN MIT HELLP-SYNDROM. STUBERT J, KOCZAN D, RICHTER DU, DIETERICH M, ZIEMS B, THIESEN HJ, GERBER B, REIMER T. HYPERTENS PREGNANCY 2014;33(2):215-235 .....  | 28        |
| <b>7. DISKUSSION</b> .....  | <b>32</b> |
| <b>8. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....   | <b>39</b> |
| <b>9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>10. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b> .....  | <b>42</b> |
| <b>11. DANKSAGUNG</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>12. LEBENS LAUF</b> .....  | <b>44</b> |
| <b>10. PUBLIKATIONS LISTE</b> .....   | <b>46</b> |
| <b>11. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....   | <b>51</b> |

# 1. Einleitung

## Vorkommen und Bedeutung von Progranulin

Progranulin (syn. PC-cell derived growth factor [PCDGF], Granulin-Epithelin Precursor [GEP], Acrogranin bzw. Proepithelin), ein 1990 erstmals beschriebenes, hoch konserviertes Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 68-88 kDa, besitzt als ubiquitär exprimiertes Zytokin proliferationsstimulierende, antiapoptotische, angiogenetische sowie antiinflammatorische Eigenschaften (1-7). Progranulin-mRNA wird in zahlreichen Geweben exprimiert, unter anderem auch in relativ hoher Konzentration in humanem Plazentagewebe (8-11). Ergebnisse bisheriger Untersuchungen legen nahe, dass Progranulin für entwicklungsbiologische, aber auch regenerative und neoplastische Prozesse funktionell bedeutsam ist (12-14). Plazentagewebe weist unter physiologischen Bedingungen eine hohe Expression von Progranulin auf (9, 15). Sowohl Progranulin mRNA als auch das Protein lassen sich bereits in trophoectodermalen Zellen präimplantatorischer muriner Blastozysten nachweisen (16). Untersuchungen an graviden Mäusen wiesen nach, dass Progranulin sowohl in der maternalen Dezidua, als auch in Teilen des embryonalen Gewebes und den Trophoblastzellen exprimiert wird, wobei die Expression im unmittelbaren Bereich der fetomaternalen Grenzfläche besonders hoch ausfiel (17). In vitro wurde durch Progranulin die Degradation der Zona pellucida („hatching“) an murinen Blastozysten beschleunigt sowie das Wachstums und die Differenzierung der Blastozyste stimuliert (16, 18).

Wenig ist bekannt, über welche Mechanismen die Progranulinwirkung vermittelt wird. Zwischenzeitlich wurde nachgewiesen, dass es spezifisch an die Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR) 1 und 2 bindet und hierüber (v.a. über TNFR2) durch funktionelle Antagonisierung von TNF- $\alpha$  an humanen T<sub>reg</sub>-Zellen antiinflammatorisch wirkt (19, 20). Mit der Identifizierung des Death receptor 3 (DR3, ein Mitglied der TNFR-Superfamilie) als einem weiteren Bindungspartner des Progranulins sowie dem Nachweis TNF- $\alpha$ -unabhängiger Wirkungsmechanismen wird ersichtlich, dass die Komplexität der durch Progranulin aktivierten Signalwege über eine alleinige Interaktion mit TNF- $\alpha$  hinaus reicht (21, 22).

Bisher ungeklärt sind die Regulationsmechanismen der trophoblastären Progranulinexpression. Im Zusammenhang mit der Bedeutung wechselnder Sauerstoffkonzentrationen im Rahmen der Plazentaentwicklung und deren Störungen, ist es jedoch interessant, dass Hypoxie sowohl bei Wundheilungsvorgängen als auch an neuronalem Gewebe einen die Progranulinexpression steigernden Faktor darstellt (2, 23).

Dies wiederum hat antiapoptotische beziehungsweise zytoprotektive Effekte zur Folge (2, 24).

### **Physiologische und pathophysiologische Aspekte der Plazentaentwicklung**

In seiner Rolle als anatomische Barriere zwischen maternaler und fetaler Zirkulation kontrolliert der multinukleäre Syncytiotrophoblast die Autonomie des Feten. Seine funktionelle Bedeutung ist vielfältig und umfasst nicht nur den fetomaternalen Stoffaustausch, sondern auch die immunologische Abgrenzung des Feten gegenüber der Mutter sowie eine bedeutsame Stoffwechseleigenleistung, beispielsweise in Form der Synthese zahlreicher Hormone (z.B. humanes Choriongonadotropin) und Wachstumsfaktoren (25). Dieser hohen funktionellen Spezialisierung liegt eine zelluläre Differenzierung zugrunde. So besitzen die mit der Basalmembran in Kontakt stehenden villösen Zytotrophoblastzellen die Fähigkeit zur Proliferation, während der stoffwechselaktive Syncytiotrophoblast hierzu nicht befähigt ist. Dieser regeneriert sich, indem villöse Zytotrophoblastzellen fortlaufend in das Syncytium integriert werden. Zugleich werden gealterte Zellbestandteile des Syncytiotrophoblasten in Form räumlich begrenzter, apoptotischer Abschnürungen in die maternale Zirkulation freigesetzt (sog. syncytial knots). Es resultiert eine Homöostase aus Proliferation, Differenzierung und Apoptose (26, 27).

Im ersten Trimenon entwickelt sich die Plazenta unter den Bedingungen eines niedrigen Sauerstoffangebots (Sauerstoffpartialdruck ca. 20mmHg) (28, 29). Ursächlich hierfür ist die fehlende Durchblutung des intervillösen Raums, welche nach Eröffnung der maternalen Spiralarterien erst um die 12. Schwangerschaftswoche (SSW) post menstruationem einsetzt. In dieser Phase stellt der geringe Sauerstoffpartialdruck einen wichtigen regulierenden Faktor für das Wachstum und die Entwicklung der Plazenta dar (30). In dieser Zeit kommt es zu ausgeprägter Zytotrophoblastproliferation. Es dominieren mesenchymale Zotten und unreife Zwischenzotten, welche sich durch ein breites Trophoblastepithel und ein retikuläres Zottenstroma auszeichnen. Die während dieser Phase dominierende Form der Angiogenese ist charakterisiert durch das Aussprossen von Gefäßknospen mit Ausbildung von Gefäßverzweigungen (31).

Mit Einsetzen der Durchblutung des intervillösen Raums durch Eröffnung der Spiralarterien (ca. 12. SSW p.m.) kommt es zu einem raschen Anstieg der Sauerstoffkonzentration auf ein Maximum des  $pO_2$  von ca. 60mmHg um die 16. SSW (29). Zeitgleich kommt es zu einer zunehmenden Ausbildung von reifen Zwischenzotten und schließlich Endzotten. Das Innere dieser Zotten wird zu mehr als 50% von Kapillaren ausgefüllt die in den Endzotten keine

Mediastruktur mehr aufweisen. Die Entstehung der Endzotten basiert auf einer passiven Protrusion durch starkes Längenwachstum der sinusoidalen Gefäße (sog. non-branching angiogenesis). Das Zottenstroma ist deutlich reduziert, der Syncytiotrophoblast maximal ausgedünnt (31). Durch die Invasion extravillöser Trophoblastzellen bis in den Bereich des inneren Drittels des Myometriums mit nachfolgender Transformation der Spiralarterien wird eine ausreichende Durchblutung der Plazenta im zweiten und dritten Trimenon gewährleistet (32).

Entwicklungsstörungen mit vorzeitiger Eröffnung der Spiralarterien und nachfolgender Hyperoxie führen durch Bildung von Sauerstoffradikalen und Wegfall des physiologischen Sauerstoffgradienten zu tiefgreifenden Störungen der Plazentaentwicklung. Sie können ursächlich für eine zu geringe Invasion extravillöser Trophoblastzellen mit nachfolgend unzureichender Transformation der Spiralarterien sein (33-35), als auch Störungen der villösen Trophoblasthomöostase bedingen, die sich durch syncytiotrophoblastäre Reifungsstörungen mit konsekutiv gesteigerter Apoptoserate und vermehrter Freisetzung nekrotischer Zellpartikel (sog. syncytiotrophoblastäre Mikrovesikel, STBM) äußert (36, 37). Je nach Schweregrad dieser Störungen kann es zu einem abortiven Verlust der Schwangerschaft kommen oder aber der Grundstein für die spätere Entwicklung einer Präeklampsie beziehungsweise einer fetalen Wachstumsrestriktion (fetal growth restriction, FGR) gelegt werden (28, 30, 38). Bei Dominanz eines insuffizienten fetomaternalen Stoffaustauschs kommt es zur Ausbildung einer FGR. Stehen hingegen funktionelle Störungen des Syncytiotrophoblasten im Vordergrund, kann es durch die gesteigerte Freisetzung antiangiogener und proinflammatorischer Faktoren zu einer maternalen Endotheldysfunktion mit nachfolgender Präeklampsie kommen (39). Sowohl FGR als auch Präeklampsie lassen sich verallgemeinernd als syndromale Erkrankungen einer gestörten Plazentaentwicklung betrachten, die sich sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht unterscheiden (Tabelle 1) (40-44).

**Tabelle 1: Differenzierung zwischen Präeklampsie und FGR anhand trophoblastärer Veränderungen.**

|  | isolierte FGR | isolierte Präeklampsie |
|--|---------------|------------------------|
| <b>Zytotrophoblast</b>                 |               |                        |
| - <b>Volumen</b>                       | - reduziert   | - unverändert          |
| - <b>Zahl</b>                          | - reduziert   | - unverändert          |
| - <b>Proliferationsrate</b>            | - reduziert   | - unverändert          |
| <b>Syncytiotrophoblast</b>             |               |                        |
| - <b>Volumen</b>                       | - reduziert   | - unverändert          |
| - <b>Zahl</b>                          | - reduziert   | - unverändert          |
| - <b>Apoptoserate</b>                  | - gesteigert  | - gesteigert           |
| - <b>nekrotische „syncytial knots“</b> | - unverändert | - gesteigert           |

Die lange Zeit als entscheidender Faktor der Präeklampsieentwicklung angenommene Störung der extravillösen Trophoblastzellinvasion lässt sich zwar bei 90% aller Präeklampsien nachweisen, allerdings findet sie sich auch bei rund 60% der normotensiven FGR und dürfte somit nicht der unmittelbare Auslöser einer Präeklampsie sein (45). Die aufgrund ihrer nekrotischen Genese proinflammatorisch wirkenden STBMs gelangen in Form des „trophoblast shedding“ in großem Umfang in die maternale Zirkulation und sind vermutlich der entscheidende Trigger für die Auslösung der symptomgenerierenden Dysfunktion des maternalen Endothels bei der Präeklampsie (37, 46). Hierin besteht ein entscheidender Unterschied zwischen Präeklampsie und isoliert auftretender FGR (47). Ungeachtet dessen ist eine schwere Präeklampsie fast immer mit einer FGR assoziiert, so dass beide ätiopathogenetische Parallelen aufweisen müssen. Sowohl die FGR als auch die Präeklampsie weisen histologisch keine pathognomonische Zottenstruktur auf, jedoch gibt es Veränderungen, die hier überdurchschnittlich häufig zu finden sind (Tabelle 2) (48). Interessanterweise sind diese Strukturstörungen zum Teil gegensätzlich, was darauf zurückzuführen sein dürfte, dass nicht, wie lange Zeit angenommen wurde, eine intervillöse Perfusionsstörung mit konsekutiver chronischer Hypoxie alleinige Ursache der gestörten Plazentaentwicklung ist, sondern vielmehr subtile Durchblutungsstörungen mit temporärer Ischämie und Reperfusion über Reoxygenierungsschäden in einer Reifungsstörung der Plazenta resultieren (49). Damit ließe sich erklären, warum bei beiden Krankheitsbildern sowohl Zeichen der plazentaren Hypoxie als auch der Hyperoxie auftreten können (50).

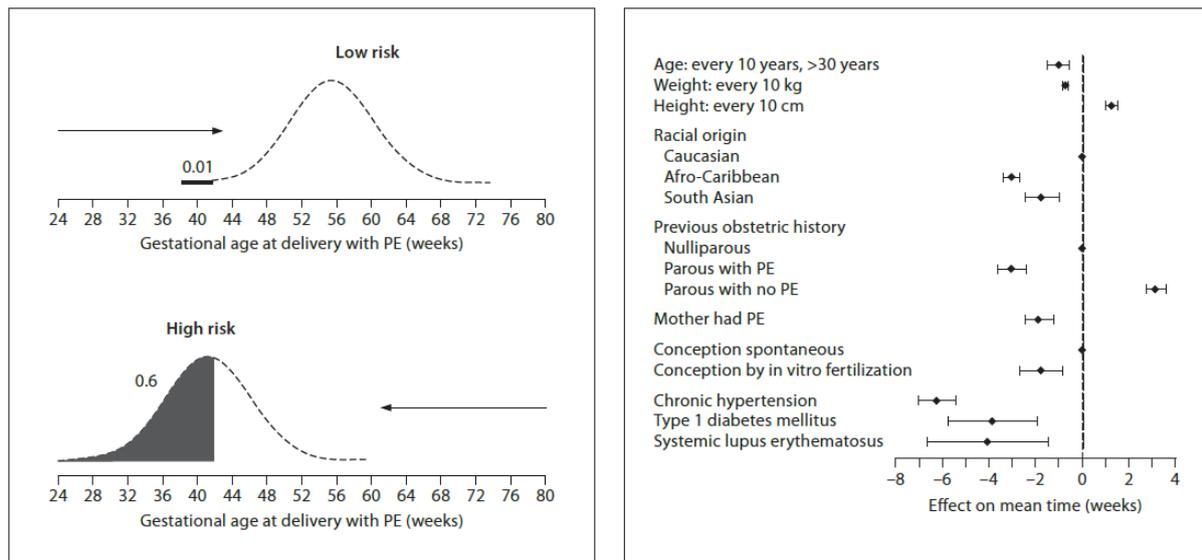
**Tabelle 2: Typische pathologische Veränderungen der Plazenta bei Präeklampsie und FGR.** Auflistung der Veränderungen entsprechend der vermutlich vorherrschenden intraplazentaren Sauerstoffsituation (nach 48,50)

| Zeichen der plazentaren Hypoxie  | Zeichen der plazentaren Hyperoxie   |
|--|---|
| - dissoziierte Reifungsstörung mit Prävalenz der Unreife bzw. Reifungsretardierung                   | - Akzeleration der Zottenreife mit verfrühtem Auftreten reifer Zwischenzotten und Endzotten |
| - persistierende verzweigende Angiogenese mit Ausbildung dichter traubenartiger Zotten (Chorangiose) | - ausgeprägte nicht-verzweigende Angiogenese mit langen zarten Gefäßen (Endzottenmangel)    |
| - Vermehrtes Auftreten von syncytial knots (Tenney-Parker-Phänomen)                                  |   |

## Klinische Manifestation der Präeklampsie

Die Präeklampsie wird definiert als ein kombiniertes Auftreten einer sich nach der 20. SSW manifestierenden Hypertonie gemeinsam mit einer Proteinurie ( $\geq 300\text{mg/d}$ ) (51). Die Bandbreite klinischer Manifestationen ist bei der Präeklampsie ausgesprochen groß und es mangelt nicht an Versuchen, dieser Heterogenität durch zumeist klinisch orientierte Subklassifikationen gerecht zu werden. Diese unterteilen die Präeklampsie gemäß dem Zeitpunkt der klinischen Manifestation (52), dem Schweregrad (53) oder betreffen das Auftreten besonderer Verlaufsformen wie beispielsweise des HELLP-Syndroms (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets) (54), der Pfortpräeklampsie und der Eklampsie. Diese Heterogenität ist dem Umstand geschuldet, dass dem Syndrom Präeklampsie eine maternale Endothelzell dysfunktion zugrunde liegt, die ihrerseits der pathophysiologischen Endstrecke einer multifaktoriell bedingten Störung entspricht (39). Auch wenn das Vorhandensein von Plazentagewebe für die Manifestation der Erkrankung obligat ist (trotz der Möglichkeit eines postpartalen Auftretens), so sind auch prädisponierende mütterliche Faktoren wie beispielsweise eine chronische Hypertonie, ein Diabetes mellitus, vorbestehende Nierenerkrankungen, Störungen der Gerinnung, Übergewicht oder auch ein höheres maternales Alter für Schweregrad und Verlauf der Präeklampsie von Bedeutung (55, 56). Besondere Beachtung findet die Differenzierung zwischen früh manifester (early-onset,  $<34+0$  SSW) und sich spät manifestierender (late-onset,  $\geq 34+0$  SSW) Präeklampsie (57). Klinisch ist die early-onset Form - obwohl sie nur ca. 10-20% aller Präeklampsien ausmacht - besonders relevant, da sie neben einer hohen maternalen Morbidität aufgrund des häufig schweren Verlaufs auch mit einer hohen Rate an iatrogenen Frühgeburtlichkeit und damit fetaler Morbidität und Mortalität assoziiert ist (58). Hinzu kommt, dass in dieser Subgruppe gehäuft Zeichen einer Plazentainsuffizienz auftreten, die sich in Form einer FGR (chronisch) oder auch einer akuten fetalen Gefährdung äußern können. Diesen unterschiedlichen Verläufen scheint auch eine unterschiedliche Pathogenese zugrunde zu liegen (36). Es wird vermutet, dass die endotheliale Dysfunktion der Mutter bei der early-onset Präeklampsie vornehmlich plazentar ausgelöst wird und hierbei eine sich sehr früh manifestierende Störung des Trophoblasten zu einer tiefgreifenden funktionellen Schädigung sowohl des villösen, als auch des extravillösen Trophoblasten führt, wie es im vorausgehenden Abschnitt bereits erläutert wurde. Hingegen treten bei der late-onset Präeklampsie prädisponierende maternale Risikofaktoren, die eine endotheliale Dysfunktion begünstigen stärker in den Vordergrund (57). Anhand mathematischer Modelle lässt sich für die Manifestation der Präeklampsie eine fiktive Verteilungskurve errechnen, dessen

Maximum bei einem theoretischem Schwangerschaftsalter von 55 SSW liegen würde (59). Entsprechend dieser Hypothese würde letztlich in jeder Schwangerschaft eine endotheliale Dysfunktion mit nachfolgender Präeklampsie infolge einer materno-plazentaren Dysbalance auftreten (60). Das Modell verdeutlicht, dass zum einen jede Plazenta das Potential einer Präeklampsiegenerierung aufweist und zum anderen der Manifestationszeitpunkt durch prädisponierende Risikofaktoren (maternal als auch plazentar) nach vorne verlagert werden kann (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Hypothetische Verteilungskurve der zeitlichen Präeklampsie-manifestation in Abhängigkeit der Risikogruppierung (links). Einfluss maternalen Risikofaktoren auf den Manifestationszeitpunkt der Präeklampsie (rechts).** Abbildung aus Referenz 59 entnommen.

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass angiogene Faktoren für die funktionale Integrität des mütterlichen Endothels von essentieller Bedeutung sind. Ein Ungleichgewicht zugunsten antiangiogener Faktoren resultiert in einer Ausbildung präeklampsischer Symptome (61). Damit konnte das vermutlich wichtigste pathophysiologische Verbindungsglied zwischen fetaler und maternaler Dysfunktion aufgeklärt werden. Nichtsdestotrotz bleiben weiterhin wesentliche Aspekte der Pathophysiologie sowohl vorausgehende, plazentare als auch nachfolgende, endotheliale Mechanismen der Präeklampsie ungeklärt. Dies betrifft beispielsweise die Bedeutung trophoblastär freigesetzter Substanzen, die ihrerseits auslösend für die angiogene Dysbalance sein dürften. Aber auch die Einordnung proinflammatorischer Mediatoren in das pathophysiologische Konzept der Präeklampsie und seiner Subtypen (HELLP-Syndrom) ist bis dato unbefriedigend.

## 2. Fragestellung

Proteinurie und Hypertonie stehen ebenso wie die charakteristischen Laborveränderungen des HELLP-Syndroms am Ende einer komplexen Krankheitsentwicklung. Hieraus resultieren im Wesentlichen drei prinzipielle, praxisrelevante Probleme, die in Teilen durch die hier vorgestellten Arbeiten untersucht wurden:

- 1.) Trotz der Erkenntnisse bezüglich der formalen Pathogenese der maternalen Endotheldysfunktion werden die Mechanismen der plazentaren Dysfunktion bei Präeklampsie und auch anderer plazentaassoziierten Erkrankungen nicht oder nur unzureichend verstanden. Neuere Hypothesen der Krankheitsentstehung sehen in einer Dysfunktion des villösen Trophoblasten eine zentrale Bedeutung. Progranulin ist ein Zytokin, welches bei der Regulation der Trophoblastzellfunktion von Bedeutung sein könnte. Ziel der hier vorliegenden Arbeiten war es, die plazentaren Expressionsmuster dieses Glykoproteins unter physiologischen und pathologischen Voraussetzungen zu beschreiben und dessen funktionelle Bedeutung im Rahmen der Plazentaentwicklung näher zu untersuchen.
- 2.) Die Präeklampsie ist ein pathogenetisch heterogenes Krankheitsbild, welches sich durch Unterschiede in Schweregrad, begleitender maternaler und fetaler Morbidität oder auch Zeitpunkt der Manifestation äußert. Um klinisch anwendbare Erkenntnisse über Prädiktion, Diagnostik und Therapie der Erkrankung entwickeln zu können, ist es unabdingbar, eine Charakterisierung dieser einzelnen Subgruppen hinsichtlich ihrer klinischen Verläufe vorzunehmen. In einer retrospektiven Analyse wurden Fälle mit einer schweren Präeklampsie nach verschiedenen klinischen Gesichtspunkten und in Abhängigkeit ihres Manifestationszeitpunkts analysiert. In Hinblick auf die hier ebenfalls vorgestellte prospektive Studie sollte evaluiert werden, wie häufig in den einzelnen Subgruppen pathologische Dopplerflusskurven der uterinen Arterien auftreten und inwieweit Differenzen hinsichtlich prognostischer Parameter (mütterliches und kindliches Outcome) vorliegen.
- 3.) Die klinischen Diagnoseparameter der Präeklampsie - Hypertonie und Proteinurie - sind, da sie einerseits das Krankheitsbild erst zu einem sehr späten Zeitpunkt erfassen und andererseits Schwierigkeiten in der differentialdiagnostischen Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen bereiten können, unbefriedigend. Das trifft besonders dann zu, wenn die Präeklampsie durch Symptome vorbestehender Erkrankungen überlagert wird (z.B. chronische Hypertonie, chronische Nierenschäden). Dieser Umstand wiegt besonders schwer, da diese Krankheitsbilder mit einer deutlichen Risikoerhöhung für die Entwicklung einer Präeklampsie assoziiert sind. In der Frühphase

der Erkrankungen können die diagnostisch wegweisenden Kriterien noch nicht oder nur leichtgradig ausgeprägt sein, wie z.B. eine isolierte Thrombozytopenie oder ein diskreter Transaminasenanstieg bei beginnendem HELLP-Syndrom. Das Abwarten des klinischen Vollbildes kann sowohl die maternale als auch die fetale Morbidität erhöhen. Dem steht die Gefahr einer Übertherapie durch unnötige Interventionen entgegen. Eine Prädiktion bzw. eine Früherkennung insbesondere der mit hoher maternaler und fetaler Morbidität und Mortalität assoziierten early-onset Präeklampsien könnte neue therapeutische und sogar prophylaktische Interventionen ermöglichen. Mithilfe der Dopplersonographie lässt sich der Großteil von Patientinnen, die eine early-onset Präeklampsie entwickeln bereits im zweiten Trimenon identifizieren (62). Die geringe Spezifität dieser Methode schränkt die Aussagekraft jedoch erheblich ein. Neue molekulare Marker könnten die Spezifität der Diagnostik weiter verbessern. Das bei der Präeklampsie auftretende Ungleichgewicht von Angiogenesefaktoren geht der klinischen Manifestation der Erkrankung voraus. Durch eine zusätzliche Bestimmung von Angiogenesefaktoren könnte die Spezifität der Dopplersonographie verbessert und damit die Testgenauigkeit erhöht werden. Im Rahmen einer prospektiven Studie wurde diese Fragestellung untersucht. Während Angiogenesefaktoren in der Diagnostik der Präeklampsie bereits in klinischen Situationen Anwendung finden (63-65), stellt die Möglichkeit einer diagnostischen miRNA-Analyse derzeit einen vorwiegend experimentellen Ansatz dar. Neben einer Anwendung im Rahmen der Diagnostik, kann die Identifizierung different exprimierter miRNAs helfen, neue pathophysiologische Ansätze aufzudecken. Mithilfe der hier vorgestellten Studie sollte vorrangig die Umsetzbarkeit dieser neuen diagnostischen Methode überprüft werden (proof of principle), wobei die Untersuchungen an Serumproben von Patientinnen mit manifestem HELLP-Syndrom durchgeführt wurden.

### 3. Originalarbeiten

#### 1. Expressionsmuster von Progranulin in der Humanplazenta und seine Bedeutung für die Zellproliferation an der Chorionkarzinomzelllinie BeWo.

Stubert J, Richter DU, Gerber B, Briese V. Expression pattern of progranulin in the human placenta and its effect on cell proliferation in the choriocarcinoma cell line BeWo. J Reprod Dev 2011;57(2):229-235

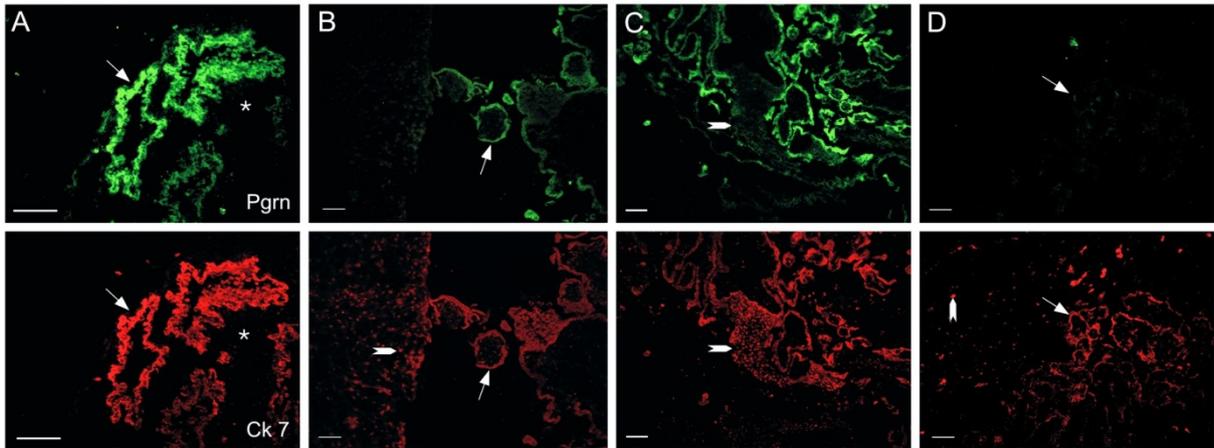
**Fragestellung:** In welchen Zellen der Humanplazenta wird das Glykoprotein Progranulin exprimiert und wie verändern sich Muster und Intensität der Expression im Schwangerschaftsverlauf? Ist Progranulin im Fruchtwasser nachweisbar? Welche funktionale Bedeutung hat Progranulin auf das Migrations- und Invasionsverhalten isolierter humaner Trophoblastzellen sowie auf das Zellwachstum der Chorionkarzinomzelllinien BeWo und Jeg-3?

**Material und Methoden:** Die Expression von Progranulin wurde mittels immunhistochemischer Untersuchungen an Gefrierschnitten gesunden Plazentagewebes des ersten und des dritten Trimenons qualitativ und semiquantitativ untersucht. In gleicher Weise erfolgte eine Analyse der Expression an den Chorionkarzinomzellen. Für die Darstellung wurden monoklonale murine anti-humane Progranulin-Antikörper (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) verwendet. Untersuchungen zur Differentialexpression wurden durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen in Kombination mit Kaninchen anti-human Zytokeratin-7-Antikörpern (Epitomics, Biomol, Hamburg) durchgeführt. Die Ergebnisse der semiquantitativen immunhistochemischen Expressionsanalyse wurden durch Western Blot-Untersuchungen kontrolliert (Angabe der Intensität als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Eine Bestimmung der Progranulinkonzentrationen an gepoolten Fruchtwasserproben (gewonnen durch Amniocentese zwischen 14 und 18 SSW) erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen ELISA (Quantikine human progranulin immunoassay, R&D Systems). Funktionelle Untersuchungen wurden an isolierten humanen villösen Trophoblastzellen des ersten Trimenons und kultivierten BeWo- sowie Jeg-3-Zellen durchgeführt. Die Isolation der Trophoblastzellen basierte auf einer immunomagnetischen Separation durch Entfernung MHC-Klasse-1 positiver und zusätzlich CD45 positiver Zellen. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen inkubiert (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5%CO<sub>2</sub>). Migrations- und Invasionassays basierten auf Verfahren unter Verwendung von Polycarbonat-Membran

Inserts (CytoSelect, Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). Die Proliferationsuntersuchungen erfolgten an den Chorionkarzinomzelllinien mittels quantitativer photometrischer Messung der BrdU-Inkorporation. Die Zellen wurden hierbei mit verschiedenen Konzentrationen von humanem rekombinantem Progranulin (Enzo Life Sciences, Lörrach) behandelt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels exaktem U-Test nach Mann-Whitney, Student T-Test oder ANOVA mit anschließender post hoc Analyse nach Scheffé. P-Werte <0,05 wurden als signifikant gewertet.

**Ergebnisse:** Villöse Trophoblastzellen zeigten eine deutliche Progranulinexpression, die während des ersten Trimenons stärker als im dritten Trimenon ausgeprägt war (Abbildung 2). Die Western Blot-Analyse bestätigte diese Ergebnisse (Intensität  $61,5 \pm 17,4$  vs.  $15,5 \pm 4,8$ ;  $P < 0,05$ ). Extravillöse Trophoblastzellen und die Zellen des Zottenstromas (incl. Endothelzellen) zeigten im Vergleich nur eine schwache Progranulinexpression. Im Fruchtwasser fanden wir Progranulin in einer Konzentration von  $133,1 \pm 11,6$  ng/ml. Eine Expression von Progranulin konnte auch an isolierten, kultivierten villösen Trophoblastzellen nachgewiesen werden. Eine im zeitlichen Verlauf ansteigende Konzentration des Proteins in den Kulturüberständen lässt eine sekretorische Freisetzung annehmen. In BeWo- und Jeg-3-Zellen konnte ebenfalls Progranulin mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Durch Hinzugabe von rekombinantem Progranulin ( $1,0$  und  $0,2 \mu\text{g/ml}$ ) konnten wir an villösen Trophoblastzellen weder einen Einfluss auf das Invasions- noch das Migrationsverhalten der Zellen feststellen. Hingegen stimulierte das Glykoprotein die DNS-Synthese von BeWo-Zellen, zeigte jedoch keinen wachstumsfördernden Effekt auf Jeg-3-Zellen.

**Schlussfolgerung:** Progranulin weist ein komplexes Expressionsmuster in humanem Plazentagewebe auf. Eine maximale Expression findet sich während des ersten Schwangerschaftsdrittels. BeWo-Zellen werden aufgrund ihrer Eigenschaften (z.B. pseudosyncytiäre Aggregation) häufig als Modell villöser Trophoblastzellen verwendet. Im Gegensatz zu den mitotisch inaktiven primären Trophoblastzellkulturen lassen sich an den Chorionkarzinomzellen auch Proliferationsuntersuchungen durchführen. Die Stimulation des Trophoblastzellwachstums in diesen Zellen und die auffällige Dominanz der Expression in den villösen Trophoblastzellen lassen eine funktionelle Bedeutung im Rahmen der villösen Trophoblastzellregeneration vermuten. Darüber hinaus ist aufgrund der sekretorischen Freisetzung eine parakrine Aktivität möglich. Die physiologische Bedeutung dieses Glykoproteins scheint im Zusammenhang mit der Plazentaentwicklung während des ersten Schwangerschaftsdrittels zu liegen.



**Abbildung 2: Differentialexpression von Progranulin (grün) und Zytokeratin 7 (rot), Doppelimmunfluoreszenzfärbung, korrespondierende Schnitte. A-C 12. SSW, D 39. SSW. A** Starke Progranulinexpression der endometrialen Drüsen (Pfeil) und sehr schwache Färbung der stromalen Dezidua (Stern) **B** Fetomaternale Grenzregion. Plazentazotten mit starker Progranulinexpression des villösen Trophoblasten (VT, Pfeil). Die CK7+ Zellen innerhalb der Dezidua (dicker Pfeil) entsprechen extravillösen Trophoblastzellen (EVT) und weisen nur eine schwache Positivität für Progranulin auf. **C** Zotte mit EVT in Form einer Zellinsel (dicker Pfeil). Ebenfalls nur schwache Progranulinexpression. **D** Fetomaternale Grenzregion (38. SSW). VT (Pfeil) und EVT (dicker Pfeil). Im Vergleich zum ersten Trimenon deutlich schwächere Progranulinexpression trophoblastärer Zellen. Balken = 100µm.

## 2. Progranulin zeigt zytoprotektive Effekte an Trophoblastzellen in vitro, antagonisiert jedoch nicht eine durch TNF- $\alpha$ induzierte Apoptose.

Stubert J, Waldmann K, Dieterich M, Richter DU, Briesse V. Progranulin shows cytoprotective effects on trophoblast cells in vitro but does not antagonize TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. Arch Gynecol Obstet 2014;290:867-873

**Fragestellung:** Mit dem Nachweis, dass Progranulin an TNF-Rezeptoren bindet und TNF- $\alpha$  funktionell antagonisieren kann, stellt sich die Frage ob dieser Effekt auch an humanen villösen Trophoblastzellen festzustellen ist. TNF- $\alpha$  ist durch proapoptotische Aktivität an der Trophoblastzellhomöostase beteiligt. Plazentaassoziierte Erkrankungen weisen charakteristische Störungen dieses Gleichgewichts auf. Im Rahmen dieser Arbeit galt es zu klären, inwieweit Progranulin die Prozesse der Trophoblastzellhomöostase singular und in Wechselwirkung mit TNF- $\alpha$  beeinflusst.

**Material und Methoden:** Die funktionellen Untersuchungen wurden an isolierten villösen Trophoblastzellen des ersten Trimenons und BeWo-Zellen durchgeführt. Isolation und Kultivierung erfolgten analog zu Publikation 1. Die Zellen wurden mit rekombinantem humanem Progranulin, rekombinantem humanem TNF- $\alpha$  (beide R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) allein und kombiniert inkubiert. Anschließend wurden die Viabilität der Zellen mittels MTT-Assay (Roche, Mannheim) und die Zytotoxizität mittels LDH-Assay (Roche, Mannheim) untersucht. Beide Assays basieren auf einer chromogenen Reaktion mit photometrischer Quantifizierung. Negativkontrollen blieben unbehandelt, im LDH-Assay erfolgte eine Positivkontrolle durch Zugabe des Detergens Triton X-100 (1%ig). Relative Zytotoxizität und Viabilität wurden miteinander verglichen. Zusätzlich erfolgte zur Differenzierung der gemessenen Effekte an den primären Trophoblastzellen eine Quantifizierung der Caspase-8-Aktivität, die im Rahmen der Apoptose ansteigt. Die Ergebnisse (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) wurden mittels Kruskal-Wallis-Test für multiple Vergleiche analysiert. Im Fall signifikanter Unterschiede erfolgte eine Post-hoc-Analyse durch paarweisen Vergleich basierend auf der Methode nach Bonferroni mit entsprechender Adjustierung der P-Werte.

**Ergebnisse:** Im LDH-Assay zeigte TNF- $\alpha$  in-vitro eine dosisabhängige Zytotoxizität auf BeWo-Zellen (42,6%  $\pm$  28,0% bei 10ng/ml und 57,5%  $\pm$  29,2% bei 100ng/ml) und in deutlich geringerer Ausprägung auch auf primäre Trophoblastzellen (3,1%  $\pm$  0,9% bei 10ng/ml). Die relative Viabilität der BeWo-Zellen war entsprechend erniedrigt (0,61  $\pm$  0,36 bei 10ng/ml und

0,46 ± 0,34 bei 100ng/ml). Ebenfalls deutlich schwächer waren die Effekte bei den primären Trophoblastzellen (0,96 ± 0,02 bei 10ng/ml).

Progranulin hingegen hatte eine zytoprotektive Wirkung auf BeWo-Zellen (-20,2% ± 37,1% bei 0,5µg/ml) mit im Vergleich zu unbehandelten Zellen erniedrigter LDH-Freisetzung. Ähnliche Ergebnisse, wenngleich schwächer ausgeprägt, waren an den primären Trophoblastzellen zu beobachten (-8,4% ± 0,9% bei 0,5µg/ml). Die Viabilität bei den BeWo-Zellen wurde durch die Zugabe von Progranulin leicht gesteigert (1,11 ± 0,43 bei 0,5µg/ml), bei den primären Trophoblastzellen war dieser Anstieg ebenfalls, jedoch nur marginal nachweisbar (1,03 ± 0,02 bei 0,5µg/ml).

Durch die Kombination beider Substanzen (TNF- $\alpha$  10ng/ml + Progranulin 0,5µg/ml) konnten an den BeWo-Zellen weder eine antagonisierende Wirkung der TNF- $\alpha$  induzierten Zytotoxizität (28,3% ± 35,8%), noch der reduzierten Viabilität nachgewiesen werden (0,61 ± 0,42). Gleiches traf auf die primären Trophoblastzellen zu (-1,3% ± 8,4% und 0,95 ± 0,08). Auffällig war hier allerdings die große Heterogenität der Ergebnisse des LDH-Assays. Die Bestimmung der Caspase-8-Aktivität bestätigte diese Ergebnisse insofern, als dass durch TNF- $\alpha$  eine leichte Steigerung der Apoptose festzustellen war. Dieser Effekt wurde durch Progranulin nicht antagonisiert. Progranulin allein blieb ebenfalls ohne Einfluss auf die Aktivität der Caspase 8.

**Schlussfolgerung:** Progranulin wirkte weder an villösen Trophoblastzellen noch an BeWo-Zellen antagonisierend auf TNF- $\alpha$ . Allerdings zeigte es allein gegeben eine gewisse zytoprotektive Aktivität. Die ebenfalls festgestellte Steigerung der Viabilität dürfte in erster Linie Folge der induzierten Proliferation sein. Alle Effekte sind an primären Trophoblastzellen im Vergleich zu den BeWo-Zellen deutlich schwächer ausgeprägt. Es ist zu vermuten, dass die hier beobachteten Veränderungen von physiologisch untergeordneter Bedeutung sind. Parakrine Effekte scheinen somit von größerer Relevanz für die Funktion des trophoblastär synthetisierten Progranulins zu sein.

### 3. Die trophoblastäre Expression von Progranulin ist hochreguliert in Fällen von fetaler Wachstumsrestriktion und Präeklampsie.

Stubert J, Schattenberg F, Richter DU, Dieterich M, Briese V. Trophoblastic progranulin expression is upregulated in cases of fetal growth restriction and preeclampsia. J Perinat Med 2012;40(5):475-481

**Fragestellung:** Mit dem Nachweis der trophoblastären Progranulinexpression stellt sich die Frage, ob sich die Expressionsintensität unter pathologischen Bedingungen gegenüber der Norm unterscheidet. Störungen der Plazentaentwicklungen mit nachfolgender Ausprägung klinischer Krankheitsbilder wie Präeklampsie oder FGR gehen vermutlich infolge einer gestörten intervillösen Perfusion mit hypoxischen Phasen einher. Diese führen zu einer reaktiven Expressionssteigerung des Hypoxie induzierten Faktors HIF-1 $\alpha$ . Im Zusammenhang mit Wundheilungsprozessen, wurde eine durch Hypoxie vermittelte Expressionssteigerung von Progranulin beobachtet. Eine durch die Sauerstoffkonzentration regulierte plazentare Progranulinexpression würde nicht nur die physiologische Abnahme während des Schwangerschaftsverlaufs erklären, sondern müsste unter pathologischen Voraussetzungen zu einer gesteigerten Expression führen.

**Material und Methoden:** Für die Untersuchungen wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Plazentagewebe von Einlingsschwangerschaften verwendet. Es wurden Gewebsblöcke von Patientinnen mit Präeklampsie (n=13), FGR (n=9) und gesunden Kontrollen (n=11) selektiert. Die Proben wurden nach mütterlichem Alter, Gestationsalter und prägravidem mütterlichem BMI gematched. Eine Präeklampsie wurde angenommen, wenn die Mutter einen nach der 20. SSW aufgetretenen Hypertonus ( $\geq 140/90$  mmHg) in Kombination mit einer Proteinurie ( $\geq 300$  mg/d) aufwies. Eine FGR war definiert als Kombination von Geburtsgewicht  $< 10.$  Perzentile und mindestens einem Zeichen einer Plazentainsuffizienz (pathologisches fetales Herzfrequenzmuster, Fruchtwasserindex  $\leq 5$  cm oder Widerstandserhöhung der A. umbilicalis  $> 95.$  Perzentile) unter Ausschluss einer Präeklampsie, einer genetischen Störung und einer intrauterinen Infektion. Konventionelle Schnitte des Gewebes wurden deparaffiniert und rehydriert. Anschließend erfolgte eine hitzebasierte Epitopdemaskierung mit Tris/EDTA/Citrat Puffer (pH 8.0). Nach Blockade der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte unter Verwendung von monoklonalem Maus-anti-human-Progranulin Antikörpern (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) und monoklonalem Maus-anti-human-HIF-1 $\alpha$  Antikörpern (Linaris, Wertheim, Deutschland) immunhistochemisch gefärbt. Da die Expression von HIF-1 $\alpha$  sehr schwach ausgeprägt war, wurde eine Signalamplifikation (catalyzed signal amplification (CSA)

system, DAKO, Hamburg, Deutschland) zwischengeschaltet. Nach Diaminobenzidinfärbung erfolgte die semiquantitative Auswertung der Expression mittels Farbkanalzerlegung (CMYK-Model) und quantifizierender Gelbkanalanalyse an jeweils drei repräsentativen Aufnahmen pro Schnitt. Darüber hinaus kontrollierten wir die Expression der Progranulin-mRNA mittels quantifizierender RT-PCR. An Plazentafrischgewebe (3 Proben/Gruppe) wurde nach RNA-Isolation (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hildesheim, Deutschland) eine relative Quantifizierung mittels GAPDH als housekeeping Gen unter Verwendung von TaqMan-Sonden durchgeführt (Reverse Transkription und Amplifikation der cDNA unter Verwendung von Primern und Reagenzien der Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Alle Daten wurden mit Hilfe des U-Tests nach Mann-Whitney analysiert.

**Ergebnisse:** Im Mittel erfolgte bei den Patientinnen die Entbindung bei 36+2 SSW. In 20% der Fälle mit Präeklampsie lag begleitend eine FGR vor. In der Gruppe der normotensiven FGR lagen 78% der Neugeborenen unter der 5. Gewichtspersentile. Dominierender Entbindungsmodus bei Präeklampsie (100%) und FGR (88,9%) war die Sectio, alle Patientinnen der Kontrollgruppe wurden spontan entbunden. Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen ergab eine signifikant stärkere Expression von trophoblastärem Progranulin sowohl bei Präeklampsie (mittlere Färbeintensität I = 89,7;  $P < 0,05$ ) als auch bei FGR (I = 89,8;  $P < 0,05$ ) im Vergleich zu den Kontrollen (I = 83,9). Zwischen Präeklampsie und FGR bestanden keine signifikanten Expressionsunterschiede. Ähnlich waren die Ergebnisse für die HIF-1 $\alpha$ -Expression. Bei Präeklampsie (I = 186,0;  $P < 0,01$ ) und FGR (I = 174,3;  $P < 0,05$ ) war die Expression gegenüber den Kontrollen (I = 148,1) signifikant erhöht. Die Unterschiede zwischen FGR und Präeklampsie waren ebenfalls nicht signifikant ( $P = 0,27$ ). Trotz der immunhistochemischen Unterschiede konnten die an Frischgewebe durchgeführten PCR-Analysen keine Unterschiede der mRNA-Expression zwischen den drei Gruppen feststellen (relative Expression Präeklampsie 0,93 und FGR 0,86).

**Schlussfolgerung:** Die Proteinexpression von Progranulin war sowohl bei Präeklampsie als auch bei FGR gegenüber gesunden Kontrollen erhöht. Ebenso war eine verstärkte Expression von HIF-1 $\alpha$  festzustellen. Da die Expression von HIF-1 $\alpha$  eng mit akuten hypoxischen Phasen korreliert ist, wird unsere Hypothese einer sauerstoffregulierten Steuerung der trophoblastären Progranulinexpression unterstützt. Diskrepanz hierzu ist der fehlende mRNA-Anstieg, zumal mittels Microarray-Analysen bei Plazenten mit schwerer Präeklampsie ein 2-facher Anstieg der Expression beobachtet wurde (66). Wenngleich nicht durch qRT-PCR bestätigt, stimmen die Ergebnisse doch mit unseren immunhistochemischen Untersuchungen überein. Mögliche Ursachen für diese Differenzen könnten auf die Auswahl

des Untersuchungsmaterials zurückzuführen sein. Im Vergleich zu den immunhistochemisch analysierten Proben (frühe Manifestation mit schwerem klinischem Verlauf) lagen bei den Frischproben Fälle mit eher milden Verläufen und vergleichsweise später Manifestation zugrunde. Different pathophysiologische Mechanismen zwischen early- und late-onset Präeklampsie könnten ursächlich für die beobachteten Unterschiede sein.

#### 4. **Klinische Unterschiede zwischen schwerer early- und late-onset Präeklampsie und Analyse von Prädiktoren des perinatalen Outcomes.**

Stubert J, Ullmann S, Dieterich M, Diedrich D, Reimer T. Clinical differences between early- and late-onset severe preeclampsia and analysis of predictors for perinatal outcome. J Perinat Med. 2014;42(5):617-627

**Fragestellung:** Mit einer geschätzten Inzidenz von 0,4-2,8% aller Schwangerschaften ist die Präeklampsie eine seltene Erkrankung. Die überwiegende Mehrheit der Patientinnen zeigt zudem eine späte Manifestation (late-onset  $\geq 34+0$  SSW) mit zumeist mildem klinischem Verlauf. Schwere Verläufe sind selten und zumeist mit einer frühen Manifestation (early-onset,  $< 34+0$  SSW) assoziiert. Bei den early-onset Präeklampsien findet sich neben der maternalen Morbidität häufig eine beträchtliche kindliche Morbidität, die vor allem durch Frühgeburtlichkeit infolge vorzeitiger Schwangerschaftsbeendigung sowie einer Plazentainsuffizienz bedingt ist. Trotz geringer Häufigkeit ist diese Form der Präeklampsie somit von besonderer klinischer Bedeutung.

Den unterschiedlichen Entitäten liegen vermutlich differente pathophysiologische Verläufe zugrunde. Um klinische Unterschiede zwischen early- und late-onset Präeklampsien herausstellen zu können, ist es notwendig, dass der Schweregrad zwischen beiden Gruppen vergleichbar ist. Ziel dieser Studie war es, die klinischen Charakteristika von early- und late-onset Präeklampsien unter Einbeziehung lediglich schwerer Krankheitsverläufe zu analysieren. Darüber hinaus sollten Parameter identifiziert werden, welche bei der Abschätzung des perinatalen Outcomes hilfreich sein können.

**Material und Methoden:** In dieser retrospektiven Analyse wurden alle Einlingsschwangerschaften mit schwerer Präeklampsie, die an der Universitätsfrauenklinik Rostock zwischen 1. Januar 2006 und 31. Dezember 2011 entbunden wurden eingeschlossen. Schwere Präeklampsien waren definiert als Präeklampsie mit zumindest einem der folgenden Kriterien: arterielle Hypertonie mit systolisch  $\geq 160$  mmHg oder diastolisch  $\geq 110$  mmHg, Proteinurie  $\geq 5$  g/d, HELLP-Syndrom (Thrombozyten  $< 100 \times 10^9$  /l, Haptoglobin  $< 0,3$  g/l, ASAT  $> 70$  U/l). Kinder mit einem Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile waren als SGA (small for gestational age) definiert. Bei zusätzlichen Zeichen einer Plazentainsuffizienz (pathologischer Widerstand der Aa. uterinae oder der A. umbilicalis oder Oligohydramnion) wurde vom Vorliegen einer FGR ausgegangen. Ein pathologischer uteriner Blutfluss war definiert als bilaterale Widerstandserhöhung (resistance index, RI)  $> 95.$  Perzentile und/oder als Auftreten einer bilateralen postsystolischen Inzisur („notch“) in der Dopplersonographie. Ein pathologischer umbilikaler Blutfluss wurde definiert als Widerstandserhöhung (pulsatility index, PI)  $> 95.$  Perzentile. Eine Umverteilung („brain sparing effect“) des fetalen Blutflusses mit Vasodilatation im zerebralen Stromgebiet wurde

angenommen, wenn der Flusswiderstand (PI) in der A. cerebri media unter der 5. Perzentile lag.

Die statistischen Gruppenvergleiche wurden bei kontinuierlicher Merkmalsausprägung je nach Verteilung mittels Zwei-Stichproben T-Test oder Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Bei kategorialen Variablen wurden die Ergebnisse mittels  $\chi^2$ -Test oder exaktem Test nach Fisher analysiert. Parameter die für das perinatale Outcome von Bedeutung sein könnten, wurden primär durch univariate Regressionsanalyse und bei Signifikanz anschließend mittels logistischer multivariater Regressionsanalyse zur Berechnung adjustierter Odds ratios (OR) analysiert.

**Ergebnisse:** In einem Zeitraum von 6 Jahren identifizierten wir 68 Patientinnen mit einer schweren Präeklampsie. In rund zwei Dritteln (64,7%) lag eine early-onset Präeklampsie vor. Eine vorbestehende chronische Hypertonie fand sich tendenziell häufiger bei früher Manifestation der Präeklampsie. Ansonsten fanden sich keine Unterschiede in Bezug auf Kriterien des Schweregrades sowie vorbestehender Risikofaktoren (Tabelle 3). Erwartungsgemäß war die Rate an Frühgeburten und SGA-Neugeborenen bei early-onset Präeklampsien höher. Bei den Frühgeburten <34+0 SSW wurde die Entscheidung zur Entbindung in 67,9% primär aufgrund maternaler Indikationen gestellt. Dopplersonographische Pathologien im Stromgebiet der Aa. uterinae fanden sich bei den early-onset-Präeklampsien in 71,8% bei den late-onset Präeklampsien hingegen nur bei 11,8% ( $P < 0,001$ ). Insgesamt wiesen nur 53,6% aller Patientinnen mit schwerer Präeklampsie pathologische Werte in den Dopplerflussmessungen der Aa. uterinae auf. Ein erhöhter Widerstand in der Nabelschnurarterie wurde bei early-onset Präeklampsien in 42,5%, bei den late-onset Formen in nur 11,8% ( $P = 0,032$ ) beobachtet. Eine Korrelation zwischen uterinen und umbilikalischen Widerständen bestand nicht ( $P = 0,337$ ), ein Drittel aller Patientinnen mit pathologischem Nabelschnurdoppler zeigte unauffällige Strömungsverhältnisse in den uterinen Gefäßen. Im Gegensatz hierzu lag eine signifikante Korrelation zwischen erhöhtem Widerstand in der Nabelschnur und Abnahme des Flusswiderstandes in der A. cerebri media vor ( $P = 0,017$ ). Im Rahmen der Multivarianzanalyse war der einzige signifikante Risikofaktor für einen 5-Minuten-Apgar  $\leq 7$  die Entbindung <34+0 SSW. Signifikante klinische Risikofaktoren für das Auftreten eines SGA-Neugeborenen waren sowohl eine Widerstandserhöhung der A. umbilicalis sowie ein Oligohydramnion. Dopplerpathologien der Aa. uterinae korrelierten nicht mit dem Auftreten eines SGA-Neugeborenen (OR = 2,4; 95% Konfidenzintervall (CI) 0,7-8,3;  $P = 0,155$ ). Gleiches galt für das Vorhandensein einer chronischen Hypertonie (OR = 0,8; 95%CI 0,2-2,5;  $P = 0,655$ ). Diese war jedoch mit einem signifikant höheren Risiko für das Auftreten einer neonatalen Azidose (Nabelarterien-pH-Wert  $< 7,20$ ) verbunden.

**Schlussfolgerung:** Auch wenn die Mehrheit der schweren Präeklampsien eine frühe Manifestation unter 34 SSW zeigten, so waren doch überraschend viele Fälle late-onset-Präeklampsien. Auch unter Berücksichtigung ausschließlich schwerer klinischer Verlaufsformen fielen signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf, was die Hypothese einer zumindest partiell differenten Pathogenese beider Subtypen bestätigt. Dopplerpathologien im maternalen und fetalen Stromgebiet traten signifikant häufiger in der early-onset Gruppe auf. Gleiches gilt für die Häufigkeit an SGA-Neugeborenen. Trotz dieses Unterschiedes ist die hohe Rate von mehr als 20% SGA-Neugeborenen in der Gruppe der late-onset Präeklampsien bemerkenswert. Die niedrigeren Apgar-Werte in der early-onset Gruppe müssen in erster Linie als Folge der hohen Frühgeburtlichkeit gesehen werden. Der Schweregrad der Präeklampsie selbst hatte keinen signifikanten Einfluss auf die neonatalen Outcome-Parameter.

Die fehlende Korrelation zwischen uterinem Blutfluss und Kindsgewicht sowie der Umstand, dass beinahe 21% der Kinder in der late-onset-Gruppe ein Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile aufwiesen, jedoch nur in 12% ein pathologischer bilateraler Doppler zu finden war, legt nahe, dass hier andere Faktoren ursächlich für die Restriktion des fetalen Wachstums sind. Als diagnostischer Parameter ist der uterine Doppler vor allem für die Detektion der early-onset Präeklampsien geeignet.

**Tabelle 3: Klinische Eigenschaften der Patientinnen mit schwerer Präeklampsie.**

| Merkmal  | Alle schweren Präeklampsien (n=68) | Early-onset (n=44) | Late-onset (n=24) | P-Wert |
|--|------------------------------------|--------------------|-------------------|--------|
| Chronische Hypertonie (n)  | 19 (27,9%)                         | 15 (34,1%)         | 4 (16,7%)         | 0,163  |
| Maximaler systolischer Blutdruck (mmHg)                                      | 172,5±19,3                         | 171,4±18,5         | 174,4±20,9        | 0,541  |
| Maximaler diastolischer Blutdruck (mmHg)                                     | 107,3±12,8                         | 107,5±14,2         | 106,9±9,7         | 0,853  |
| Proteinurie (mg/d)   | 4987±5819                          | 4936±5787          | 5085±602          | 0,804  |
| HELLP-Syndrom (n)  | 16 (23,5%)                         | 11 (25,0%)         | 5 (20,8%)         | 0,773  |
| Schwangerschaftsalter bei Entbindung (Wochen+Tage±Standardabweichung (Tage)) | 33+6±31                            | 31+5±28            | 37+5±14           | <0,001 |
| Geburtsgewicht (g)   | 1997±1032                          | 1460±685           | 2981±816          | <0,001 |
| SGA-Neugeborene (<10. Perzentile)  | 20 (29,4%)                         | 15 (34,1%)         | 5 (20,8%)         | 0,017  |
| 5-Minuten-Apgar-Wert   | 9                                  | 8                  | 9                 | <0,001 |
| Apgar ≤7 (n)   | 17 (25,0%)                         | 17 (38,6%)         | 0 (0,0%)          |        |
| Nabelschnurarterien-pH   | 7,29±0,079                         | 7,27±0,083         | 7,31±0,068        | 0,097  |
| Oligohydramnion (n, AFI ≤ 5)   | 12 (17,9%)                         | 7 (15,9%)          | 5 (21,7%)         | 0,333  |
| Bilateraler pathologischer Blutfluss der Aa. uterinae                        | 30 (53,6%)                         | 28 (71,8%)         | 2 (11,8%)         | <0,001 |
| Pathologischer Blutfluss der A. umbilicalis                                  | 19 (33,3%)                         | 17 (42,5%)         | 2 (11,8%)         | 0,032  |

**Tabelle 4: Signifikante Einflussfaktoren auf verschiedene kindliche Outcomeparameter bei schwerer Präeklampsie. Ergebnisse der Multivarianzanalyse.**

| Outcome Parameter                                | Variable                                    | adjustierte OR | 95% Konfidenzintervall | P-Wert |
|--|---|----------------|------------------------|--------|
| 5'-Minuten-Apgar-Wert ≤7                         | Entbindung <34+0 SSW                        | 15,0           | 3,3-71,4               | <0,001 |
| SGA-Neugeborenes                                 | Pathologischer Blutfluss der A. umbilicalis | 4,3            | 1,0-17,9               | 0,043  |
|  | Oligohydramnion                             | 11,4           | 1,8-71,4               | 0,010  |
| Neonatale Azidose (pH der A. umbilicalis < 7,20) | Chronische Hypertonie                       | 17,3           | 1,3-223,2              | 0,029  |

## 5. Prädiktion der Präeklampsie und einer indizierten Entbindung < 34

### **Schwangerschaftswochen durch sFlt-1 und PIGF bei Patientinnen mit pathologischem Dopplerflussmuster der Aa. uterinae im zweiten Trimenon: eine prospektive Kohortenanalyse.**

Stubert J, Ullmann S, Bolz M, Külz T, Dieterich M, Richter DU, Reimer T. Prediction of preeclampsia and induced delivery at <34 weeks gestation by sFLT-1 and PIGF in patients with abnormal midtrimester uterine Doppler velocimetry: a prospective cohort analysis. BMC Pregnancy and Childbirth 2014;14(1):292

**Fragestellung:** Early-onset Präeklampsien weisen in mehr als zwei Dritteln der Fälle einen pathologischen Dopplerbefund der uterinen Arterien auf. Neben der maternalen Morbidität ist bei diesen Patientinnen, hauptsächlich durch die vorzeitig indizierte Schwangerschaftsbeendigung, eine hohe perinatale Morbidität zu verzeichnen. Eine Detektion dieser Risikopatientinnen noch vor klinischer Manifestation der Erkrankung ermöglicht die intensive Betreuung der Schwangerschaft und kann dazu beitragen, das mütterliche und kindliche Outcome zu verbessern. Pathologien des uterinen Blutflusses lassen sich bereits im zweiten Trimenon sicher und nicht-invasiv mithilfe der Dopplersonographie feststellen. Folglich wird dieses Verfahren im Rahmen der Schwangerenvorsorge intensiv genutzt. Da die Spezifität der Untersuchung vergleichsweise gering ist, werden viele Patientinnen umsonst beunruhigt. Ziel dieser Studie war es, durch zusätzliche Bestimmung angiogener Faktoren die Spezifität der Dopplersonographie während des zweiten Trimenons für die Prädiktion der Präeklampsie zu verbessern.

**Material und Methoden:** Eingeschlossen wurden Patientinnen mit einem pathologischen Dopplerflussmuster der Aa. uterinae zwischen 19+0 und 26+6 SSW. Die Rekrutierungsphase erstreckte sich von Februar 2001 bis Juli 2013. Einschlusskriterien waren ein PI über der 95. Perzentile und/oder eine deutliche postsystolische Inzisur auf beiden Seiten. Die Präeklampsie war definiert als Auftreten einer maternalen Hypertonie (Blutdruck zweimalig innerhalb von mehr als 6h  $\geq 140/90$  mmHg) in Kombination mit einer signifikanten Proteinurie ( $\geq 300$  mg/d). Patientinnen mit chronischer Hypertonie (< 20+0 SSW) konnten eingeschlossen werden. Im Fall einer sich neu manifestierenden signifikanten Proteinurie wurde von einer Pfropfpräeklampsie ausgegangen. Bei Auftreten der Symptome einer Präeklampsie kleiner 34+0 SSW wurde diese als early-onset Präeklampsie definiert, andernfalls handelte es sich um eine late-onset Präeklampsie. ausgeschlossen waren

Patientinnen unter 18 Jahren, unter laufender Therapie mit Glucokortikoiden und nicht-steroidalen Analgetika (ausgenommen Acetylsalicylsäure 100 mg täglich) und das Vorhandensein eines Anti-Phospholipid-Syndroms. Das Vorliegen einer FGR wurde angenommen, wenn das Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile lag (SGA) und eines der folgenden Symptome einer Plazentainsuffizienz festzustellen war: (1) Oligohydramnion mit Amnion fluid index <5 cm, (2) persistierender bilateraler pathologischer Blutfluss in den Aa. uterinae, (3) pathologisches fetales Herzfrequenzmuster, (4) ein Zurückbleiben des Fetalwachstums bei wiederholter sonographischer Biometrie („kreuzende“ Perzentilen), (5) PI > 95. Perzentile der A. umbilicalis. Bei jeder Patientin erfolgte zum Zeitpunkt der Dopplersonographie eine venöse Blutentnahme mittels Serumröhrchen. Nach Abzentrifugation (2000 x g für 10 Minuten bei 15° C) der Festbestandteile wurde das Serum aliquotiert und bei -80° C asserviert. Die Bestimmung von solublem Flt-1 (sFlt-1) und Placental Growth Factor (PlGF) erfolgte mithilfe eines vollautomatisierten Sandwich-Immunoassays (Elecsys, Roche, Penzberg). Die Ergebnisse wurden in Abhängigkeit der schwangerschaftsspezifischen Normwerte klassifiziert. Werte über der 95. Perzentile für sFlt-1 und der Ratio aus sFlt-1 und PlGF, sowie unter der 5. Perzentile für PlGF wurden als pathologisch gewertet.

Die statistischen Gruppenvergleiche wurden bei kontinuierlicher Merkmalsausprägung je nach Verteilung mittels Zwei-Stichproben T-Test oder Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Bei kategorialen Variablen wurden die Ergebnisse mittels  $\chi^2$ -Test analysiert. Folgende Testcharakteristika wurden berechnet: Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktiver Vorhersagewert (PPV), negativ prädiktiver Vorhersagewert (NPV), positive likelihood-Ratio (LR+), negative likelihood-Ratio (LR-) und Testgenauigkeit. Darüber hinaus wurde eine Receiver operating characteristic (ROC) – Analyse durchgeführt mit Berechnung der Area under curve (AUC). Die cut-off-level entsprachen der maximalen Summe aus Sensitivität und Spezifität. Mittels logistischer Regressionsanalyse wurde der Zusammenhang zwischen einer pathologischen sFlt-1/PlGF-Ratio und dem Auftreten verschiedener Zielparameter untersucht. Nach univariater Analyse wurde mittels Multivarianzanalyse eine Adjustierung der Risiken unter Einschluss potentieller konfundierender Faktoren (mütterlicher BMI, Parität, Manifestationszeitpunkt der Präeklampsie, Vorhandensein einer chronischen Hypertonie, SSW während der Blutentnahme, Einnahme von Acetylsalicylsäure) durchgeführt. Für die Prädiktion einer Präeklampsie mithilfe der sFlt-1/PlGF-Ratio berechneten wir für das Studienkollektiv eine statistische Power von 95,5% bei einem  $\alpha$ -Fehler von 0,05.

**Ergebnisse:** Bei 24,0% (12/50) der Patientinnen trat im Schwangerschaftsverlauf eine Präeklampsie auf, 75,0% (9/12) zeigten eine early-onset Manifestation. Eine normotensive

FGR fand sich bei 12,0% (6/50), eine Hypertonie ohne signifikante Proteinurie bei 32,0% (16/50) und im weiteren unauffällige Schwangerschaftsverläufe in ebenfalls 32,0% (16/50). In der Präeklampsiegruppe lag das Geburtsgewicht bei 41,7% der Kinder unter der 10. Perzentile. Das mittlere Schwangerschaftsalter war in dieser Gruppe mit 34+4 SSW am niedrigsten ( $P=0,009$ ). Insgesamt erfolgte eine Entbindung unter 34 SSW bei 7 (14,0%) Patientinnen, 5 (71,4%) davon erkrankten an einer Präeklampsie (Tabelle 5). Der PPV der Dopplermessungen allein lag für die Präeklampsie bei lediglich 24,0% mit einer Falsch-Positiv-Rate von 76,0%. Durch die Hinzunahme der sFlt-1/PIGF-Ratio konnte die Diskriminierung der Patientinnen mit und ohne Entwicklung einer Präeklampsie deutlich verbessert werden (Tabelle 6). Der PPV erhöhte sich hierdurch auf 66,7%, der NPV lag noch höher bei 89,5% bei Vorhersagegenauigkeit von 84,0%. Entsprechend war das Risiko eine Präeklampsie zu entwickeln bei pathologisch erhöhter sFlt-1/PIGF-Ratio signifikant erhöht (OR 17,0; 95%CI 3,5-83,0;  $P < 0,001$ ). Nach Adjustierung blieben diese Ergebnisse signifikant (adjustierte OR 14,1; 95%CI 1,1-182,3;  $P = 0,043$ ). Die ROC-Analyse resultierte in einem AUC von 0,721 mit einem idealen cut-off für die sFlt-1/PIGF-Ratio von 13,0. Für die Prädiktion der normotensiven FGR und der Hypertonien ohne signifikante Proteinurie waren die Angiogenesefaktoren nicht geeignet. Patientinnen mit einer pathologischen sFlt-1/PIGF-Ratio wurden hingegen mit hoher Wahrscheinlichkeit bei einem Schwangerschaftsalter von unter 34+0 SSW entbunden. Die AUC betrug 0,877 mit einem idealen cut-off von ebenfalls 13,0. Der NPV lag bei 97,4% bei einer prädiktiven Genauigkeit von 86,0%. Das Risiko eine Frühgeburt zu erleiden war sowohl in der univariaten Analyse (OR 37,0; 95%CI 3,8-363,9;  $P < 0,001$ ) als auch nach Adjustierung signifikant erhöht (adjustierte OR 34,6; 95%CI 1,2-1026,2;  $P = 0,041$ ).

**Schlussfolgerung:** Neben einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie haben Patientinnen mit einer pathologischen uterinen Dopplersonographie auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer normotensiven FGR und einer Hypertonie ohne signifikante Proteinurie. Die hohe Rate an vorzeitigen Entbindungen unter 34+0 SSW sowie an fetaler Wachstumsrestriktion in der Präeklampsiegruppe grenzen diese, was den klinischen Schweregrad angeht, jedoch deutlich von den übrigen Gruppen ab. Trotzdem entwickelte nur eine von vier Patientinnen in dieser Studie eine Präeklampsie. Die Hinzunahme von angiogenen Faktoren konnte die prädiktive Genauigkeit des Tests deutlich verbessern (Reduktion der Falsch-Positiv-Rate von 76,0% auf 10,5%). Bemerkenswert ist der hohe NPV – bei den early-onset Präeklampsien 94,7% und bei Patientinnen mit Notwendigkeit einer Entbindung  $< 34+0$  SSW 97,4%. Damit können bei Frauen mit pathologischem uterinen Dopplerwerten und unauffälliger sFlt-1/PIGF-Ratio mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit diese

Ereignisse ausgeschlossen und die Betroffenen beruhigt werden. Im Fall eines pathologischen Ergebnisses ist die Schwangere besonders sorgfältig zu betreuen und eine Indikation für eine Lungenreifeinduktion sollte großzügig gestellt werden.

**Tabelle 5: Klinische Eigenschaften der Studienpatientinnen.**

| Merkmal   | Alle (n=50) | Präeklampsie (n=12) | FGR (n=6)  | Hypertonie (n=16) | Andere (n=16) | P-Wert |
|---|-------------|---------------------|------------|-------------------|---------------|--------|
| Alter, Jahre  | 29,7±4,9    | 29,8±3,9            | 33,3±4,8   | 28,3±3,6          | 29,6±6,3      | 0,206  |
| Body mass index, kg/m <sup>2</sup>  | 27,1±8,2    | 30,6±8,0            | 21,7±3,2   | 28,1±9,1          | 25,6±6,3      | 0,132  |
| Chronische Hypertonie (n)   | 8 (16,0%)   | 4 (33,3%)           | 0 (0,0%)   | 4 (25,0%)         | 0 (0,0%)      | 0,049  |
| Schwangerschaftsalter bei Entbindung (Wochen+Tage±Standardabweichung; Tage) | 37+2±24     | 34+4±26             | 37+5±5     | 37+4±25           | 38+6±17       | 0,009  |
| Neugeborene <34+0 SSW, n  | 7 (14,0%)   | 5 (41,7%)           | 0 (0,0%)   | 2 (12,5%)         | 0 (0,0%)      | 0,008  |
| Geburtsgewicht (g)  | 2588±809    | 1859±658            | 2270±303   | 2588±750          | 3175±626      | <0,001 |
| SGA-Neugeborene (<10. Perzentile)   | 16 (32,0%)  | 5 (41,7%)           | 6 (100,0%) | 6 (37,5%)         | 0 (0,0%)      |        |

**Tabelle 6: Testcharakteristika von sFit-1, PIGF und der sFit-1/PIGF-Ratio in Abhängigkeit verschiedener Zielkriterien.**

|                                    |                   | $\chi^2$ |              |            |       |       |                   |                  |                     |
|------------------------------------|-------------------|----------|--------------|------------|-------|-------|-------------------|------------------|---------------------|
|                                    |                   | P-Wert   | Sensitivität | Spezifität | PPV   | NPV   | LR+ (95%CI)       | LR- (95%CI)      | OR (95%CI)          |
| <b>Präeklampsie (n=12)</b>         | PIGF              | 0.027    | 58.3%        | 78.9%      | 46.7% | 85.7% | 2.77 (1.27-6.04)  | 0.53 (0.27-1.05) | 5.25 (1.31-21.03)   |
|                                    | sFit-1            | 0.240    | 16.7%        | 94.7%      | 50.0% | 78.3% | 3.17 (0.50-20.13) | 0.88 (0.68-1.15) | 3.60 (0.45-28.86)   |
|                                    | sFit-1/PIGF-Ratio | <0.001   | 66.7%        | 89.5%      | 66.7% | 89.5% | 6.33 (2.31-17.38) | 0.37 (0.17-0.84) | 17.0 (3.50-83.02)   |
| <b>Early-onset (n=9)</b>           | PIGF              | 0.220    | 50.0%        | 73.8%      | 26.7% | 88.6% | 1.91 (0.81-4.51)  | 0.68 (0.33-1.39) | 2.82 (0.60-13.24)   |
|                                    | sFit-1            | 0.115    | 25.0%        | 95.2%      | 50.0% | 87.0% | 5.25 (0.86-32.02) | 0.79 (0.53-1.18) | 6.67 (0.79-56.64)   |
|                                    | sFit-1/PIGF-Ratio | 0.001    | 75.0%        | 85.7%      | 50.0% | 94.7% | 5.25 (2.26-12.18) | 0.29 (0.09-0.98) | 18.00 (2.92-110.96) |
| <b>Late-onset (n=3)</b>            | PIGF              | 0.075    | 75.0%        | 73.9%      | 20.0% | 97.1% | 2.88 (1.36-6.06)  | 0.34 (0.06-1.86) | 8.50 (0.81-89.75)   |
|                                    | sFit-1            | 1.000    | 0.0%         | 91.3%      | 0.0%  | 91.3% | 0.00              | 1.10 (1.00-1.20) | 0.00                |
|                                    | sFit-1/PIGF-Ratio | 0.240    | 50.0%        | 78.3%      | 16.7% | 94.7% | 2.30 (0.75-7.07)  | 0.64 (0.24-1.72) | 3.60 (0.46-28.86)   |
| <b>Entbindung &lt;34 SSW (n=7)</b> | PIGF              | 0.176    | 57.1%        | 74.4%      | 26.7% | 91.4% | 2.23 (0.98-5.07)  | 0.58 (0.34-1.38) | 3.88 (0.75-20.12)   |
|                                    | sFit-1            | 0.089    | 28.6%        | 95.4%      | 50.3% | 89.1% | 6.14 (1.03-36.79) | 0.75 (0.47-1.20) | 8.20 (0.94-71.73)   |
|                                    | sFit-1/PIGF-Ratio | <0.001   | 85.7%        | 86.1%      | 50.1% | 97.4% | 6.14 (2.76-13.69) | 0.17 (0.03-1.02) | 37.00 (3.76-363.91) |

6. **Bestimmung von miRNA-Expressionsprofilen aus mütterlichem Serum von Patientinnen mit HELLP-Syndrom.**

Stubert J, Koczan D, Richter DU, Dieterich M, Ziems B, Thiesen HJ, Gerber B, Reimer T. miRNA expression profiles determined in maternal sera of patients with HELLP syndrome. Hypertens Pregnancy 2014;33(2):215-235

**Fragestellung:** Neben ihrer funktionellen Bedeutung sind microRNAs (miRNAs) potentielle diagnostische Biomarker, die aufgrund ihrer Stabilität auch aus Serumproben isoliert werden können. Das HELLP-Syndrom stellt eine besondere Subgruppe der Präeklampsie dar. Die Diagnose basiert auf einer Kombination von Laborveränderungen (Hämolyse, Thrombopenie und Transaminasenanstieg), deren vollständige Ausprägung jedoch einem bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadium entspricht. Die klinischen Symptome sind unspezifisch und typische Zeichen der Präeklampsie können fehlen. Eine differentialdiagnostische Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen kann somit schwierig sein. Mithilfe neuer sensitiver und spezifischer Marker könnte die Diagnose dieser häufig schwer und rasch progredient verlaufenden Erkrankung frühzeitig und sicher gestellt werden. Ziel der Arbeit war es, die Durchführbarkeit von miRNA-Analysen aus maternalen Serumproben zu überprüfen und hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen Patientinnen mit HELLP-Syndrom und gesunden Kontrollen zu untersuchen.

**Material und Methoden:** An der Universitätsfrauenklinik Rostock wurden Serumproben von 13 schwangeren Patientinnen mit manifestem HELLP-Syndrom und von weiteren 13 gesunden Kontrollen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asserviert. Ein HELLP-Syndrom wurde bei Vorliegen folgender Laborparameter angenommen: Thrombozyten  $<100 \times 10^9 /\text{l}$  (Normbereich  $150-450 \times 10^9 /\text{l}$ ), Haptoglobin  $<0,3 \text{ g/l}$  (Normbereich  $0,3-2,0 \text{ g/l}$ ) und Aspartataminotransferase (ASAT)  $>70 \text{ U/l}$  (Normbereich  $3-34 \text{ U/l}$ ). Die Serumproben der Kontrollen wurden Patientinnen entnommen, welche bezogen auf das maternale Alter, die Schwangerschaftswoche bei Blutentnahme und dem prägravidem Body mass index den HELLP-Patientinnen zugeordnet („gematched“) wurden. Das Vorliegen von manifesten Infektionserkrankungen und eines Diabetes mellitus waren Ausschlusskriterien. Mit Hilfe des QIAamp Circulating Nucleic Acid Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte unter Zwischenschaltung eines DNase-I-Verdau eine Isolation der RNA. Da die Proben nur sehr geringe Konzentrationen an RNA enthielten (ca.  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) erfolgte eine weitere Quantifizierung anhand von Serumäquivalenten. An jeweils sechs HELLP- und

Kontrollproben erfolgte schließlich eine miRNA-Expressionsanalyse unter Verwendung des TaqMan Array Human MicroRNA Card Set v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Dieses Array erlaubt eine Quantifizierung von 754 verschiedenen humanen miRNAs. Zuvor erfolgte eine reverse Transkription der RNA mittels TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit und Megaplex RT Primern (alle Applied Biosystems). Die cDNA wurde im Anschluss mittels TaqMan PreAmp Master Mix und Megaplex PreAmp Primer Pool präamplifiziert und schließlich unter Verwendung der Arrays mittels TaqMan Universal PCR Master Mix auf dem 7900 HAT Fast Real-Time PCR System (alles Applied Biosystems) amplifiziert. Die Datenanalyse erfolgte mit der zugehörigen Software SDS 2.3 und dem RQ Manager 1.2.

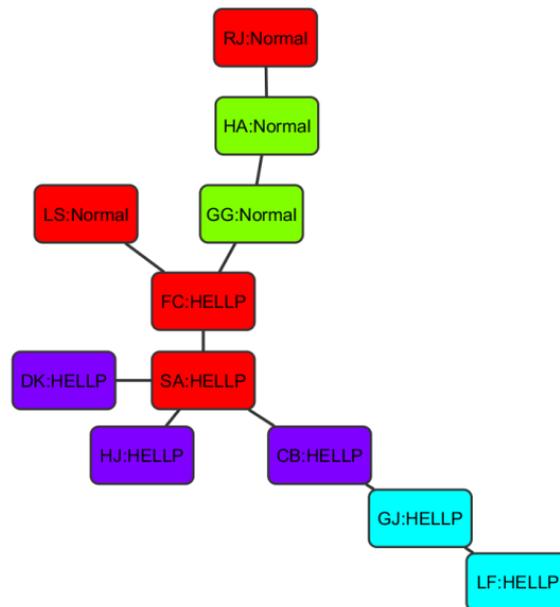
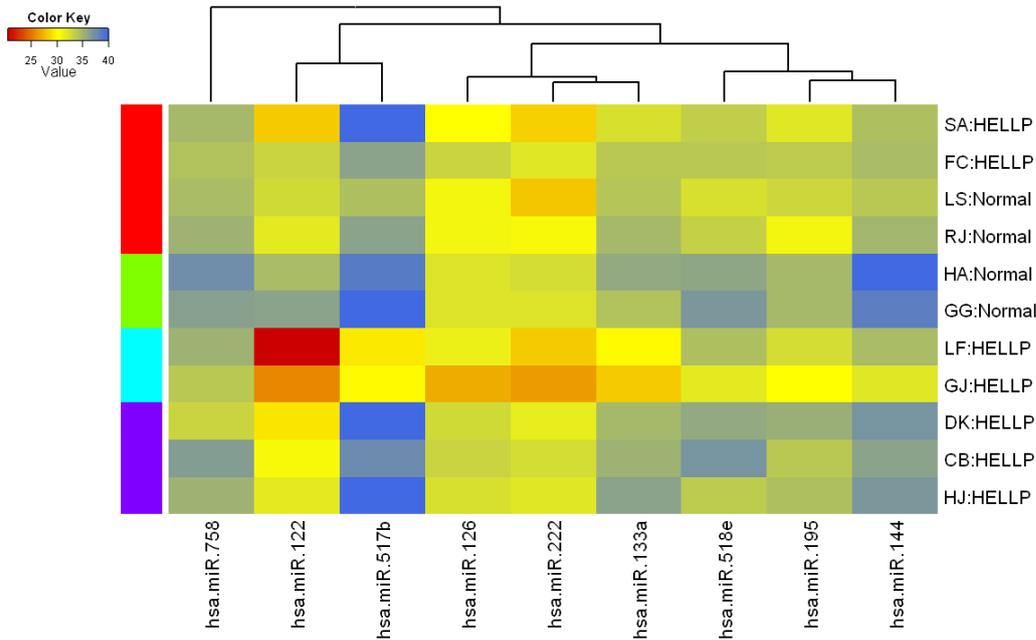
Für die Validierung der Ergebnisse wurden einzelne quantitative PCR Assays von sieben different exprimierten miRNAs und zwei plazentaspezifischen miRNAs durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten an weiteren sieben HELLP-Proben und den zugehörigen Kontrollen (Primer und die TaqMan-Sonden ebenfalls von Applied Biosystems). Für eine quantitative Auswertung der Ergebnisse wurden die Expressionen der Proben direkt zu den Serumäquivalenten normalisiert. Für die Kalkulation der Expressionsunterschiede zwischen beiden Gruppen wurden die Differenzen der jeweiligen  $C_T$ -Werte verwendet ( $2^{-\Delta G}$  mit  $\Delta G = C_{T \text{ HELLP}} - C_{T \text{ Kontrolle}}$ ).  $C_T$ -Werte  $\geq 40,0$  wurden als fehlende Expression gewertet. Expressionsunterschiede  $\geq 2,0$  und  $\leq 0,5$  wurden als signifikant betrachtet. Um Gruppenzugehörigkeiten aufzudecken wurde eine Auswertung der Ergebnisse mittels Cluster-Analyse durchgeführt.

**Ergebnisse:** Von 754 untersuchten miRNAs waren 343 miRNAs in den Serumproben vorhanden. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen ( $P < 0,05$ ) waren bei 10 miRNAs nachweisbar. Überwiegend war eine Zunahme der Expression in der HELLP-Gruppe festzustellen, am stärksten traf dies auf miR-122 und miR-758 zu. Nach Durchführung der validierenden Einzelassay-PCR-Analysen konnten wir die differente Expression dieser beiden miRNAs bestätigen. So war bei HELLP-Syndrom die mediane Expression der leberspezifischen miR-122 11,5-fach höher als in den Kontrollen ( $P=0,046$ ). In der ROC-Analyse resultierte eine AUC von 0.82 mit einer Spezifität von 86% bei einer Sensitivität von 57%. Die Expressionsergebnisse für miR-122 korrelierten signifikant mit den Serumkonzentrationen der ASAT ( $R=-0,581$ ;  $P=0,05$ ). MiR-758 war bei HELLP-Syndrom im Median 2,8-fach stärker exprimiert ( $AUC=0,74$ ). Generell traten jedoch große Expressionsunterschiede auch innerhalb der Gruppen auf. Obwohl in der Validierung keine signifikant unterschiedliche Expression für miR-133a nachgewiesen werden konnte, korrelierte diese miRNA signifikant mit dem maternalen Blutdruck ( $R=-0,639$ ;  $P=0,01$ ) und

dem Body mass index ( $R=0,663$ ;  $P=0,01$ ) der Patientinnen. Die auf dem plazentaspezifischem C19MC – Cluster (Chromosom 19q13) exprimierten miR-517b und miR-518e waren hingegen nur leichtgradig in ihrer Expression gesteigert und in der Validierung ebenfalls nicht mehr nachweisbar. Die Cluster-Analyse zeigte deutliche Heterogenität innerhalb der Patientinnen mit HELLP-Syndrom (Abbildung 3). Auffällig war die Abgrenzung der Patientinnen die zusätzlich die klassischen Zeichen einer Präeklampsie (Hypertonie, Proteinurie) aufwiesen (zwei von sechs Patientinnen). Hier fanden sich erhöhte Expressionen der mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziierten miR-133a als auch der Angiogenese regulierenden miR-126 und miR-222 (sog. AngioMiRs).

**Schlussfolgerung:** Der Nachweis von miRNAs aus dem Serum ist möglich und prinzipiell auch für diagnostische Zwecke einsetzbar. Trotzdem handelt es sich um eine methodisch sehr komplexe und durch zahlreiche Variablen beeinflusste Untersuchung. Im Sinne eines „proof of principle“ konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Differenzierung zwischen Patientinnen mit HELLP-Syndrom im Vergleich zu nicht Erkrankten möglich ist. Dies eröffnet nicht zuletzt neue pathophysiologische Ansätze in der Erforschung dieses Krankheitsbildes. Eine direkte Korrelation zur Expression trophoblastspezifischer miRNAs konnten wir jedoch nicht nachweisen. Die Expressionsunterschiede werden vor allem von miRNAs dominiert, die Folge der sekundären Leberschädigung (miR-122, miR-758) sowie der schwerwiegenden kardiovaskulären (endothelialen) Reaktion bei HELLP-Syndrom sind (miR-133a). Dies wurde vor allem durch die Cluster-Analyse deutlich.

Trotz methodischer Schwierigkeiten eröffnet diese Studie wegweisende Ansätze für weiterführende Analysen der miRNA-Expression bei Patientinnen mit plazentaassoziierten Erkrankungen. Zukünftig könnte diese Methode einen diagnostischen Stellenwert in der Prädiktion der Präeklampsie haben.



**Abbildung 3: Cluster-Analyse der HELLP Subgruppen.** Die Heat-map Darstellung zeigt die Ergebnisse einer k-means-Cluster-Analyse (oben). Eine graphische Visualisierung unter Verwendung einer „minimum spanning tree“ Analyse wurde durchgeführt, um die Beziehungen der miRNA-Expressionen zwischen der einzelnen Patientinnen darzustellen (Analyse mittels HAMSTER+ (siehe Originalpublikation)). Die farbliche Zuordnung zwischen beiden Darstellungen ist übereinstimmend. Drei verschiedene HELLP-Gruppen lassen sich zusammenfassen:

- HELLP-Patientinnen mit starkem Anstieg der leberspezifischen miR-122 sowie deutlichem Anstieg von miR-222, miR-126 und miR-133a. Diese Gruppe zeigt klinisch Zeichen einer zusätzlichen Präeklampsie mit Hypertonie und Proteinurie (hellblaue Farbe).
- HELLP-Patientinnen ohne zusätzliche Hypertonie und Proteinurie (dunkelblaue Farbe).
- Gruppe mit HELLP-Patientinnen ohne klare Abgrenzung gegenüber gesunden Kontrollen (rote Farbe).
- Kontrollen mit deutlicher Abgrenzung gegenüber HELLP-Patientinnen (grüne Farbe).

## 7. Diskussion

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten erfolgte erstmals eine systematische Analyse der Differentialexpression von Progranulin in humanem Plazentagewebe (67). Die Untersuchungen wurden sowohl an Normalgewebe als auch an Plazenten, die mit Schwangerschaftspathologien wie FGR und Präeklampsie assoziiert waren, durchgeführt (68). Nachdem in-vitro Untersuchungen an murinen Blastozysten eine funktionelle Bedeutung im Rahmen der frühen Schwangerschaftsentwicklung nachweisen konnten (16, 18), stellt sich die Frage, inwieweit Analogien zur humanen Schwangerschaftsentwicklung bestehen. Aus den hier präsentierten Untersuchungen lassen sich diesbezüglich verschiedene Rückschlüsse ziehen. Eine direkte Beeinflussung des Invasions- und Migrationsverhaltens trophoblastärer Zellen durch Progranulin, wie es an Mäusen nachgewiesen werden konnte, scheint nicht vorzuliegen. Wachstumsstimulierende Einflüsse konnten zumindest am Modell der choriokarzinomatösen BeWo-Zellen nachgewiesen werden, so dass ein wachstumsfördernder Einfluss auf teilungsfähige humane Trophoblastzellen in-vivo möglich erscheint. Da Untersuchungen zum Zellwachstum an den zur Proliferation unfähigen isolierten villösen Trophoblastzellen nicht durchführbar sind, soll dieser Aspekt im Rahmen eines durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projekts (STU 618/1-1) an dem hierfür besser geeigneten in-vitro Modell der Plazentaexplantkultur erneut untersucht werden.

Mit der Identifizierung der TNF-Rezeptoren als physiologische Bindungspartner des Progranulins (19, 20) erschien eine TNF- $\alpha$  antagonisierende Wirkung an den villösen Trophoblastzellen möglich. Es gelang jedoch nicht, diese Hypothese zu bestätigen (69). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Progranulin - wie bereits im Rahmen von Wundheilungsprozessen nachgewiesen - zytoprotektive Eigenschaften aufweist. Auch wenn der nachgewiesene Effekt in-vitro eher als gering einzustufen ist, so könnte dieser Wirkungsmechanismus durchaus physiologisch relevant sein.

Festzuhalten bleibt, dass sowohl das komplexe Expressionsmuster als auch die Ergebnisse der vergleichenden Expressionsanalysen bei Präeklampsie und chronischer Plazentainsuffizienz eine funktionelle Bedeutung im Rahmen der Plazentaentwicklung als sehr wahrscheinlich erachten lassen.

Betrachtet man allerdings die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeiten und berücksichtigt darüber hinaus die in den letzten Jahren wesentlich erweiterten Erkenntnisse zur Funktion des Progranulins, ist anzunehmen, dass der entscheidende Wirkungsmechanismus an der Plazenta eher in einer parakrinen Aktivität zu sehen ist. Insbesondere die anti-

inflammatorische Wirkung und die Bedeutung im Rahmen der Regulation von Endothelzellfunktion und Angiogenese sind in diesem Kontext hervorzuheben.

Endothelzellen exprimieren gewöhnlich kein oder nur sehr schwach Progranulin, eine Aktivierung der Angiogenese, wie sie im Rahmen der Wundheilung oder des Tumorwachstums auftritt, führt jedoch zu einer Expressionssteigerung (8, 13, 19). Progranulin gilt als pro-angiogenetisch, da es die Tubulusbildung endothelialer Zellen stimuliert (13). Eine Antagonisierung von Progranulin in hepatozellulären Karzinomen von Mäusen ging mit einer Reduktion der intratumoralen Gefäßdichte einher (70).

Vergleichbar mit dem angiogenetisch bedeutsamen PlGF führt ein Progranulin knock-down in Mäusen jedoch nicht zu einem letalen Schwangerschaftsverlauf (71). Die embryonale Entwicklung verläuft ungestört, allerdings kommt es postnatal zu einer beeinträchtigten Immunreaktion mit überschießenden Entzündungsreaktionen auf Infektionen. Umgekehrt führt jedoch eine endotheliale Überexpression von Progranulin zu deutlichen Anzeichen einer gestörten Angiogenese bei diesbezüglich genetisch manipulierten Mäusen (72). Aufgrund vaskulärer Fehlbildungen mit dilatierten und dünnwandigen Blutgefäßen kommt es hierbei gehäuft zu spontanen parenchymatösen Einblutungen bei den Neonaten mit nachfolgend erhöhter Mortalität. Die Plazenten dieser Mäuse wiesen zwar keine strukturellen vaskulären Auffälligkeiten auf, zeigten aber eine deutliche Häufung syncytialer Knoten des Trophoblasten. Die Assoziation dieser Veränderungen mit chronischen Zeichen einer placentaren Hypoxie ließen die Autoren schlussfolgern, dass auch diese Veränderungen Folge einer gestörten Vaskularisation sein könnten. Diese Ergebnisse korrelieren mit früheren Untersuchungen an den endotheliochorialen Plazenten des Amerikanischen Nerzes (*Neovison vison*), in denen nachgewiesen werden konnte, dass sowohl in den fetalen Kapillaren der Chorionzotten, als auch in den maternalen Endothelzellen, die den intervillösen Raum begrenzen, eine deutliche Expression von Progranulin vorlag (15). In den hier präsentierten Analysen an humanem Plazentagewebe konnten wir keine eindeutige Progranulinexpression in den Endothelzellen der Chorionzotten nachweisen (67), eine parakrine Modulation der Endothelzellfunktion durch trophoblastäres Progranulin wäre somit ein möglicher Mechanismus, um in die Prozesse der placentaren Angiogenese einzugreifen. Dieser Wirkungsmechanismus würde unter Berücksichtigung der zentralen Position des villösen Trophoblasten, welcher quasi als Vermittler zwischen Mutter und Kind fungiert, durchaus sinnvoll sein. Eine Überprüfung dieser Hypothese erfolgt derzeit im Rahmen des bereits weiter oben erwähnten DFG- Forschungsprojektes.

Im Sinne eines funktionellen Synergismus könnten auch die anti-inflammatorischen Eigenschaften des Progranulins auf placentarer Ebene zu einer Protektion von Endothelzellen vergleichbar den Ergebnissen von Hwang et al. beitragen (73). Diese zeigten

an humanen umbilikalischen Endothelzellen, HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), dass durch Progranulin die NO-Synthese stimuliert und inflammatorische Reaktionen mit nachfolgender Endothelzellaktivierung (Expression von ICAM-1) inhibiert wurden. Da bei Präeklampsie Endothelzellfunktionsstörung bzw. -aktivierung von zentraler Bedeutung sind, könnte somit einer gesteigerten Progranulinsekretion eine funktionelle Bedeutung im Sinne eines reaktiven protektiven Mechanismus zukommen. Selbstverständlich könnte über die anti-inflammatorischen Eigenschaften des Progranulins auch ein Teil der maternofetalen Immuntoleranz vermittelt werden. In diesem Zusammenhang ist der interessante Umstand zu erwähnen, dass die Epithelzellen des plazentalen Endometriums an den Gewebeschnitten des ersten Trimenons ebenfalls eine starke Progranulinexpression zeigten (67).

Ebenfalls ungeklärt bleibt die Frage, inwieweit die trophoblastäre Progranulinexpression reguliert wird. Die Korrelation mit der HIF-1 $\alpha$  Expression lässt eine durch Sauerstoff beziehungsweise durch hiermit in Verbindung stehende Stressoren gesteuerte Regulation wahrscheinlich erscheinen (68). Diese Beziehung konnte bereits in anderen Zusammenhängen nachgewiesen werden (2, 23).

Die hier zum Progranulin diskutierten Ergebnisse verdeutlichen, wie mühevoll es ist, diesen vergleichsweise neuartigen Mitspieler auf dem Gebiet der Plazentaentwicklung und insbesondere ihrer Störungen funktionell einzuordnen. Bei all diesen Betrachtungen ist jedoch nicht außer Acht zu lassen, dass neben primär plazentar lokalisierten Störungen auch maternale Faktoren an der Genese schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen, wie beispielsweise der Präeklampsie, beteiligt sind. Die Komplexität an Interaktionen wird deutlich, wenn man die late-onset Präeklampsie heranzieht. Diese klinisch zumeist mild verlaufende Erkrankung wird als typisches Beispiel einer dominierend maternal ausgelösten Variante gesehen (36). Late-onset Verlaufsformen zeigen typischerweise in geringerem Umfang als die early-onset Formen die charakteristischen Zeichen einer gestörten Plazentaentwicklung bzw. -funktion (74). Dies wird deutlich an dem selteneren Auftreten pathologischer Flusskurven des uterinen Stromgebietes (75) oder auch schwächerer Ausprägung des Ungleichgewichts angiogener Faktoren (76, 77). Unterschiede lassen sich auch hinsichtlich differenter Outcomeparameter nachweisen, wobei der early-onset Präeklampsie aufgrund des ungünstigen Verlaufs trotz ihrer Seltenheit eine besondere klinische Bedeutung zukommt (78, 79). Dieser Aspekt ist im Hinblick auf prädiagnostische Maßnahmen durchaus relevant.

Da late-onset Präeklampsien in der Mehrzahl der Fälle mild verlaufen und early-onset Präeklampsien zumeist schwer, untersuchten wir in einer retrospektiven Analyse nur schwere Verlaufsformen der Präeklampsie und verglichen diese hinsichtlich des Manifestationszeitpunktes (75). Ein überraschender, neuer Aspekt war, dass ein reichliches

Drittel (35,3%) der Patientinnen eine late-onset Manifestation aufwies – diese also einen nicht unwesentlichen Anteil an schwer verlaufenden Präeklampsien ausmachen. Prädisponierende maternale Faktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie verteilten sich ohne signifikante Unterschiede gleichmäßig auf beide Gruppen. Trotzdem zeigten sich auch in dieser speziellen Subgruppe deutliche Unterschiede zwischen early- und late-onset Präeklampsie. Early-onset Präeklampsien zeigten deutlich häufiger eine Dopplerpathologie der uterinen Arterien und höherer Raten an SGA-Neugeborenen, was die Dominanz plazentarer Störungen unterstreicht. Interessanter Weise bestand jedoch kein Zusammenhang zwischen uteriner Dopplerpathologie und Wachstumsrestriktion, was die hypothetische Beziehung zwischen FGR und fehlender Transformation der Spiralarterien infolge mangelnder extravillöser Trophoblastzellinvasion infrage stellt. Ein reduzierter Flusswiderstand der A. umbilicalis war hingegen mit einem reduziertem Geburtsgewicht assoziiert. Darüber hinaus war es der entscheidende Prognosefaktor für das Auftreten eines niedrigen 5-Minuten-Apgar-Scores. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der PORTO-Studie (80).

Für die Praxis bleibt der abnorme uterine Dopplerbefund jedoch bedeutsam, da er das erhöhte Risiko einer notwendigen Frühgeburtlichkeit anzeigt. Darüber hinaus war die Mehrzahl (71,8%) der early-onset Präeklampsien durch einen pathologischen Befund der uterinen Durchblutung gekennzeichnet. Es konnte bestätigt werden, dass die Dopplersonographie für die Detektion einer early-onset Präeklampsie eine hohe Sensitivität aufweist und als prädiktiver Parameter geeignet ist.

Inwieweit die diagnostische Aussagekraft der Dopplersonographie durch zusätzliche Bestimmung von maternalen Serummarkern verbessert werden kann, untersuchten wir in einer prospektiven Studie. Insbesondere das anti-angiogenetisch wirkende sFlt-1, ein löslicher VEGF-Rezeptor, sowie das pro-angiogenetische PlGF wurden für den diagnostischen Einsatz hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen ausgiebig untersucht (63, 65). Eine im Rahmen der Routinediagnostik durchführbare Labordiagnostik (Elecsys®, Fa. Roche) ist möglich. Da die Veränderungen angiogener Faktoren der klinischen Manifestation der Präeklampsie mehrere Wochen vorausgehen können, erscheint eine Verwendung als prädiktiver Test vielversprechend. Studienergebnisse an unselektionierten Niedrig-Risiko-Kollektiven waren jedoch aufgrund der hohen Rate an falsch positiven Resultaten infolge der niedrigen Präeklampsieprävalenz unbefriedigend (81, 82). Die Dopplersonographie im zweiten Trimenon stellt ein gutes Testverfahren für die Auswahl eines Hochrisikokollektivs dar (75). Durch die Bestimmung von sFlt-1 und PlGF ist es möglich, insbesondere die Spezifität bzw. den NPV zu verbessern (83). Durch die dopplersonographische Vortestung konnte in der hier präsentierten Studie die Rate falsch

positiver Ergebnisse sehr niedrig gehalten werden. Wesentlicher Kritikpunkt dieses Ansatzes ist die noch fehlende therapeutische bzw. präventive Interventionsmöglichkeit. Allerdings gibt es erste Studienergebnisse, die auf zukünftige Therapieoptionen hoffen lassen, um zumindest Schweregrad und Manifestationszeitpunkt der Präeklampsie günstig zu beeinflussen (84-86). Die Pathogenese der Präeklampsie verdeutlicht jedoch, dass eine effektive Prävention bereits frühzeitig, möglichst im ersten Trimenon beginnen sollte. Mit einer präventiven Einnahme von niedrig dosiertem ASS kann das Risiko einer early-onset Präeklampsie um bis zu 78-84% reduziert werden (87, 88). Die Ergebnisse eines kombinierten Erst-Trimester-Screenings sind vor allem aufgrund der Daten der Arbeitsgruppe um Nicolaides et al. sehr vielversprechend (89). Allerdings konnten bei weitem nicht alle Studien, trotz vergleichbarer Methoden, diese exzellenten Ergebnisse wiederholen (90, 91). Das Zweit-Trimester-Screening wird somit auch zukünftig seine Bedeutung im klinischen Alltag haben. Anzumerken ist, dass weitere von uns untersuchte potentielle Marker einer Präeklampsie wie Progranulin, Transthyretin (92-94) oder auch Serumamyloid A (95, 96) keine positiven Resultate in Bezug auf die Prädiktion dieser Erkrankung zeigten. Die mittleren Serumkonzentrationen unterschieden sich nicht zwischen den Patientinnen mit und ohne Entwicklung einer Präeklampsie (Daten noch nicht publiziert). Allerdings waren die Progranulin-Serumkonzentrationen bei Frauen, die ein hypotrophes Neugeborenes (Gewicht < 5. Perzentile) gebären signifikant erhöht. Die Bedeutung dieser Ergebnisse sind jedoch aufgrund der geringen Fallzahl (n=4) mit Zurückhaltung zu interpretieren.

Trotz der Weiterentwicklungen im Bereich der Präeklampsiediagnostik steht für die Prädiktion unverändert kein Test mit gewünscht hoher Sensitivität und vor allem Spezifität zur Verfügung. Insofern ist die Überprüfung neuartiger diagnostischer Ansätze wie beispielsweise die Analyse von miRNAs sinnvoll. In der hier vorgestellten Arbeit wurden die miRNA-Serum-Analysen bei Patientinnen mit HELLP-Syndrom durchgeführt (97). Die Entscheidung basierte auf den Überlegungen, dass einerseits das HELLP-Syndrom ein differentialdiagnostisch häufig schwer abgrenzbares Krankheitsbild darstellt, andererseits die Diagnosestellung mit Ausbildung des Vollbildes vergleichsweise spät erfolgt und somit wenig therapeutische Optionen offen lässt. Nicht zuletzt sind die klinischen Veränderungen bei einem HELLP-Syndrom sehr schwerwiegend, so dass diese Subgruppe einer Präeklampsie für den sehr experimentellen und methodisch neuartigen Ansatz als besonders geeignet eingeschätzt wurde. MicroRNAs sind kleine, ca. 22 Nukleotide umfassende, nicht-kodierende RNA-Moleküle, welche auf epigenetischer Ebene die Expression von vermutlich ca. 30% aller zellulär synthetisierten Proteine kontrollieren (98). Der Wirkmechanismus basiert auf einer postranskriptionalen Regulation der Proteinsynthese. Durch spezifische Bindung zwischen miRNA und mRNA wird mittels eines miRNA assoziierten Proteinkomplexes (RISC, RNA induced silencing complex) die Degradation der mRNA durch Ribonukleasen

beschleunigt und somit die Proteinbiosynthese inhibiert (99). Über diesen Wirkungsmechanismus sind die zahlreichen miRNAs an der Regulation sämtlicher biologischer Prozesse wie beispielsweise Wachstum und Regeneration beteiligt. Auch im Rahmen pathologischer Prozesse wie beispielsweise bei Störungen der Plazentaentwicklung und –funktion mit konsekutiver Manifestation plazentaassoziierter Erkrankungen sind miRNAs involviert (100, 101). Damit einhergehende Expressionsänderungen sind nicht nur von hohem pathophysiologischem Interesse, sondern können aufgrund charakteristischer Expressionsmuster auch für diagnostische Zwecke verwendet werden. Da miRNAs aufgrund einer RNase-Resistenz im Serum vergleichsweise stabil vorliegen, ist, trotz sehr niedriger Konzentrationen, eine gezielte Analyse möglich (102, 103). Die hier vorgestellten Untersuchungen an Serumproben von Patientinnen mit manifestem HELLP-Syndrom zeigen, dass nicht nur ein Nachweis der miRNAs aus diesem Material möglich ist, sondern mit Hilfe dessen auch diagnostische Aussagen getroffen werden können. Wenngleich die hier beschriebenen Gruppendifferenzen in erster Linie als Folge einer passiven miRNA-Freisetzung infolge direkter Einbeziehung erkrankter Organe (insbesondere der Leber beim HELLP-Syndrom) zu interpretieren sind, so könnten in Analogie zukünftig ebenso Veränderungen der Expressionsmuster identifiziert werden, die primär die plazentare Störung beispielsweise bei Präeklampsie widerspiegeln. Es ist kritisch anzumerken, dass die Ergebnisse der Arbeit sehr heterogen sind, was nicht zuletzt Folge methodischer Schwierigkeiten in der Aufarbeitung der Proben und der Auswertung der Ergebnisse war. So stellt die nur schwer umsetzbare Quantifizierung der miRNAs aus Körperflüssigkeiten ein Hauptproblem dar. „House keeping genes“, wie sie für eine Analyse aus soliden Geweben etabliert sind, fehlen oder sind ungenau (102). Die im Rahmen der Arbeit angewendete und zum damaligen Zeitpunkt aktuelle Methode der Quantifizierung wurde inzwischen durch andere Verfahren ersetzt (siehe ausführliche Diskussion im Originalbeitrag) (104). Aufgrund der aufwendigen, zeitintensiven Analyse dürfte dieses Verfahren vorerst keine Relevanz in der akuten Diagnostik erlangen. Im Rahmen prädiktiver Untersuchungen könnten miRNA-Analysen jedoch ein zukunftsweisendes Werkzeug in der Diagnostik sein, wenngleich durch die Ergebnisse einer aktuellen Arbeit diesbezügliche Hoffnungen gedämpft werden müssen (105). Nicht zuletzt verspricht dieses Verfahren jedoch die Aufdeckung neuer Forschungsansätze bezüglich pathogenetischer Aspekte.

Die Begrenztheit vor allem in Bezug auf die therapeutischen Möglichkeiten der Präeklampsie verdeutlicht, wie wichtig eine enge Verzahnung zwischen Grundlagenforschung und anwendungsorientierter klinischer Forschung ist. Im Rahmen dieser Habilitationsschrift wurde versucht, beide Konzepte im Sinne eines translationalen Forschungsansatzes zu realisieren. Mit Progranulin wurde ein plazentar exprimiertes Zytokin eingehend untersucht, wobei neben deskriptiven auch funktionelle Analysen durchgeführt wurden. Hierbei gelang

es erstmalig, pathophysiologische Bezüge zur Präeklampsie und FGR herzustellen, sowie einen proliferationsstimulierenden und zytoprotektiven Effekt an humanen Trophoblastzellen nachzuweisen. Allerdings erlaubt das verwendete Modell der Trophoblastzellkultur nur begrenzt Rückschlüsse auf physiologische Bedingungen. Parakrine Wirkungsmechanismen blieben vollständig unberücksichtigt, obwohl sie für die Plazentafunktion von wesentlicher Bedeutung sein könnten. In weiterführenden Untersuchungen werden daher die Ergebnisse am Modell des Plazentaexplantats unter durch virale Transduktion direkt regulierter Progranulinexpression überprüft. Darüber hinaus sollen mögliche parakrine Interaktionen mit Endothelzellen untersucht werden – ein Aspekt, der insbesondere unter pathologischen Bedingungen von Relevanz sein könnte. Ein weiterer Schwerpunkt wird es sein, die Regulationsmechanismen der Progranulinexpression zu untersuchen. Sowohl die Bedeutung der Sauerstoffkonzentration als auch die Möglichkeit einer posttranskriptionalen Regulation durch miR-195 stehen diesbezüglich im Fokus des durch die DFG geförderten Projekts.

## 8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Progranulin in humanem Plazentagewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen untersucht. Die stärkste Expression wurde an villösen Trophoblastzellen während des ersten Schwangerschaftsdrittels beobachtet. Sowohl bei Präeklampsie als auch bei fetaler Wachstumsrestriktion findet sich im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine erhöhte plazentare Progranulinexpression. An isolierten villösen Trophoblastzellkulturen und BeWo-Chorionkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass Progranulin einen proliferationsstimulierenden und zytoprotektiven Effekt auf diese Zellen ausübt. Das Invasions- und Migrationsverhalten wurde nicht beeinflusst. Ebenso konnte der proapoptotische Effekt von TNF- $\alpha$  durch Progranulin nicht antagonisiert werden. Es wird geschlussfolgert, dass die dominierende Funktion von trophoblastärem Progranulin in einer parakrinen Regulation plazentarer Entwicklungsprozesse wie beispielsweise der Angiogenese zu suchen ist.

In einer retrospektiven Analyse (n=68) wurden klinische Differenzen zwischen schweren Präeklampsien mit früher und später Manifestation (cut-off 34+0 SSW) analysiert. In rund 2/3 der Fälle handelte es sich um early-onset Erkrankungen. Diese waren in 71,8% mit einer pathologischen Dopplerflusskurve beider uterinen Arterien assoziiert. Bei den late-onset Präeklampsien wurde dies nur bei 11,8% der Fälle beobachtet. Early-onset Präeklampsien wiesen eine höhere Frühgeburtlichkeit und eine höhere Rate von Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht < 10. Perzentile auf. Eine Widerstandserhöhung der A. umbilicalis sowie das Auftreten eines Oligohydramnions waren mit einer Risikosteigerung für das Auftreten einer Wachstumsrestriktion assoziiert. Diese Beziehung galt nicht für die Widerstandserhöhung im uterinen Stromgebiet. Für die Definition einer Hochrisikogruppe ist das Auftreten einer uterinen Dopplerpathologie geeignet. In einer prospektiven Studie (n=50) entwickelten 24,0% der Patientinnen eine Präeklampsie, wenn sie im zweiten Trimenon einen pathologischen uterine Dopplerfluss aufwiesen. Durch eine zusätzliche automatisierte Bestimmung von sFlt-1 und PIGF ist es möglich, die Falsch-Positiv-Rate von 76,0% auf 10,5% zu reduzieren und somit die Testgenauigkeit zu verbessern. Bei Werten im Normbereich kann in 95% der Fälle die Entwicklung einer Präeklampsie ausgeschlossen werden.

MicroRNAs sind neue Biomarker durch deren Bestimmung aus maternalem Serum die Diagnostik plazentaassoziierter Erkrankungen zukünftig ermöglicht werden könnte. Mittels matched-pairs-Analyse wurde die miRNA-Expression von Patientinnen mit HELLP-Syndrom und gesunden Kontrollen verglichen. Im Sinne eines proof-of-principle konnte nachgewiesen

werden, dass sich einige miRNA-Expressionslevel zwischen diesen Gruppen signifikant unterschieden. Am auffälligsten war eine Expressionssteigerung der leberspezifischen miR-122, welche infolge der Leberbeteiligung beim HELLP-Syndrom freigesetzt wird. Damit eröffnet diese Methode die Möglichkeit eines diagnostischen Einsatzes in der Präeklampsiediagnostik. Aufgrund der aufwendigen Analyse erscheint vor allem ein prädiktiver Einsatz vielversprechend.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| ANOVA          | Analysis of variance  |
| ASAT           | Aspartat-Aminotransferase   |
| AUC            | Area under curve  |
| BMI            | Body mass index   |
| BrdU           | Bromdesoxyuridin  |
| CI             | Confidence interval   |
| ELISA          | Enzyme linked immunosorbent assay   |
| FGR            | Fetal growth restriction  |
| HELLP          | Hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets  |
| HIF-1 $\alpha$ | Hypoxie induzierter Faktor-1 $\alpha$   |
| HUVECs         | Human umbilical vein endothelial cells  |
| ICAM-1         | Intercellular adhesion molecule-1   |
| LDH            | Lactatdehydrogenase   |
| miRNA          | MicroRNA  |
| MTT            | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid  |
| NPV            | Negativer Prädiktiver Vorhersagewert  |
| OR             | Odds ratio  |
| PC-cells       | Tumorigene insulinunabhängige Variante der aus einem Teratom isolierten adipogenen Zelllinie 1246 |
| PI             | Pulsatility index   |
| PIGF           | Placental growth factor   |
| PPV            | Positiver Prädiktiver Vorhersagewert  |
| RI             | Resistance index  |
| ROC            | Receiver operating characteristic   |
| sFit-1         | soluble fms-like tyrosine kinase-1  |
| SGA            | Small for gestational age   |
| SSW            | Schwangerschaftswoche   |
| STMB           | syncytiotrophoblastäre Mikrovesikel   |
| TNF- $\alpha$  | Tumornekrosefaktor- $\alpha$  |
| TNFR           | TNF-Rezeptor  |

## 10. **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig angefertigt, alle verwendeten Ergebnisse und Daten anderer vollständig angegeben und korrekt zitiert sowie jedwede weitere Mitwirkung dritter offengelegt zu haben.

Rostock, den

Dr. med. Johannes Stubert

## 11. Danksagung

Eine Arbeit wie diese wäre ohne die Unterstützung durch Kollegen nicht realisierbar gewesen. Einigen dieser Personen möchte ich im Folgenden meinen Dank aussprechen:

- Herr Prof. Dr. med. habil. Bernd Gerber, Direktor der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik Rostock
- Herr Prof. Dr. med. habil. Toralf Reimer, Leitender Oberarzt der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik Rostock
- Frau Dr. rer. nat. Dagmar-Ulrike Richter, Leiterin des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik Rostock und Herr Prof. Dr. med. habil. Volker Briese, stellvertretender Direktor und Wissenschaftlicher Leiter des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik Rostock
- Frau Erika Greschkowitz, Herr Florian Schattenberg, Frau Stefanie Ullmann, Frau Kathrin Waldmann sowie Herr Torsten Kleber
- Herr Dr. med. Michael Bolz, Oberarzt der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik Rostock, Herr Dr. med. Thomas Külz, Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe und Herr Dr. rer. nat. Dirk Koczan, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Immunologie der Universität Rostock

## 12. Lebenslauf

### **Ausbildung:**

1985 – 1991 128. Polytechnische Oberschule, Leipzig

1991 – 1997 Gymnasium Thomasschule zu Leipzig (Abitur)

1997 – 1998 Zivildienst im Altenpflegeheim „Am Rosenthal“, Leipzig

1998 – 2005 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig (Approbation)

2005 – 2006 Assistenzarzt an der Frauenklinik des Helios Klinikums Berlin-Buch (Chefarzt: Prof. Dr. med. habil. Michael Untch)

2007 - 2011 Assistenzarzt an der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik Rostock am Klinikum Südstadt (Direktor: Prof. Dr. med. habil. Bernd Gerber)

seit 2011 Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik Rostock am Klinikum Südstadt

### **Wissenschaftlicher Werdegang:**

Promotion zum Dr. med. am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung für Neurophysiologie (Leiter: Prof. Dr. med. habil. Andreas Reichenbach), 2005

Thema: „Einfluss mechanischer Kräfte auf die DNA-Synthese von Müllerzellen“

Prädikat: magna cum laude

### **Hospitationen:**

02/2012 Prof. Dr. rer. nat. Huppertz, Berthold; Leiter des Instituts für Zellbiologie, Histologie und Embryologie der Universität Graz

05/2009 Prof. Dr. rer. nat. Jeschke, Udo; Leiter des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Campus Innenstadt Universitätsfrauenklinik München (Ludwig-Maximilians-Universität)

### **Begutachtung von wissenschaftlichen Manuskripten für folgende Fachzeitschriften:**

- BJOG
- Archives of Gynecology and Obstetrics
- PLOS ONE
- International Journal of Nanomedicine
- DNA and Cell Biology

### **Einwerbung von Drittmitteln:**

DFG Sachbeihilfe: Projektnummer STU 618/1-1, Beginn: 09/14; Laufzeit 3 Jahre

Titel: Untersuchungen zur Funktion und Regulation von Progranulin und miR-195 an humanen villösen Trophoblastzellen und deren Einfluss auf die Endothelzellfunktion

### **Auszeichnungen und Preise:**

1. 125. Tagung der NGGG, 2009 (Posterpreis in der Sitzung „Endokrinologie und Reproduktionsmedizin“)
2. 126. Tagung der NGGG, 2010 (Posterpreis in der Sitzung „Endokrinologie und Reproduktionsmedizin“)
3. 127. Tagung der NGGG, 2011 (Posterpreis in der Sitzung „Geburtshilfe 1“)
4. 21. Jahrestagung der AG Neonatologie MV und der AG Perinatalogie MV. Rostock, 2013 (1. Vortragspreis)
5. 15. Deutscher Gestosekongress. Berlin, 2013 (Wissenschaftspreis für den besten Vortrag)
6. 130. Tagung der NGGG, 2014 (2. Preis in der Sitzung „Leuchtfieber des Nordens“)

### **Mitgliedschaft in folgenden Fachgesellschaften:**

- Berufsverband der Frauenärzte, BVF
- Norddeutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, NGGG
- Arbeitsgemeinschaft Gestose der DGGG
- International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy, ISSHP
- Deutsche Gesellschaft für Senologie, DGS

## 10. Publikationsliste

Die in der kumulativen Habilitationsschrift integrierten Originalarbeiten sind mit einem \* markiert.

### Publikationsorgane mit wissenschaftlicher Qualitätssicherung

1. Stubert J, Gerber B. Isoflavones – Mechanism of action and impact on breast cancer risk. **Breast Care**. 4: 22-29, 2009
2. Stubert J, Gerber B. Fracture of maternal sternum during spontaneous delivery. **Arch Gynecol Obstet**. 280: 1007-1009, 2009
3. \* Stubert J, Richter DU, Gerber B, Briese V. Expression pattern of progranulin in the human placenta and its effect on cell proliferation in the choriocarcinoma cell line BeWo. **J Reprod Dev**. 57: 229-235, 2011
4. Stubert J, Hilgendorf I, Stengel B, Krammer-Steiner B, Freund M, Gerber B. Bilateral breast enlargement and reddish macules of skin as first signs of an acute lymphoblastic T-cell leukemia. **Onkologie**. 34: 384-387, 2011
5. Gerber B, Heintze K, Stubert J, Dieterich M, Hartmann S, Stachs A, Reimer T. Axillary lymph node dissection in early-stage invasive breast cancer: is it still standard today? **Breast Cancer Res Treat**. 128: 613-624, 2011
6. Dieterich M, Mann E, Wagner KF, Kramer-Steiner B, Reimer T, Gerber B, Stubert J. Desmopressin-induced Moschowitz-like syndrome after treatment of uterine atonic bleeding in a 28-year-old pregnant woman: case report and overview of the literature. **Blood Coagul Fibrinolysis**. 22(8):749-51, 2011.
7. Dieterich M, Müller-Jordan K, Stubert J, Kundt G, Wagner K, Gerber B. Pain management after caesarean: a randomized controlled trial of oxycodone versus intravenous piritramide. **Arch Gynecol Obstet**. 286(4):859-65, 2012.
8. Dieterich M, Dieterich H, Timme S, Reimer T, Gerber B, Stubert J. Using a titanium-coated polypropylene mesh (TiLOOP® Bra) for implant-based breast reconstruction: case report and histological analysis. **Arch Gynecol Obstet**. 286(1):273-76, 2012
9. \* Stubert J, Schattenberg F, Richter DU, Dieterich M, Briese V. Trophoblastic progranulin expression is upregulated in cases of fetal growth restriction and preeclampsia. **J Perinat Med**. 40(5): 475-81, 2012.
10. Dieterich M, Reimer T, Dieterich H, Stubert J, Gerber B. A short-term follow-up of implant based breast reconstruction using a titanium-coated polypropylene mesh (TiLoop® Bra). **Eur J Surg Oncol**. 38(12):1225-30, 2012.
11. Reimer T, Rohrmann H, Stubert J, Pecks U, Glocker MO, Richter DU, Gerber B. Angiogenic factors and acute-phase proteins in serum samples of preeclampsia and

- HELLP patients: a matched-pair analysis. **J Matern Fetal Neonatal Med.**26(3):263-9, 2013
12. Stachs A, Hartmann S, Stubert J, Dieterich M, Martin A, Kundt G, Reimer T, Gerber B. Differentiating Between Malignant and Benign Breast Masses: Factors Limiting Sonoelastographic Strain ratio. **Ultraschall Med.** 34(2):131-136; 2013
  13. Dieterich M, Stubert J, Stachs A, Radke A, Reimer T, Gerber B. Ruptured Poly-Implant Protheses Breast Implant After Aesthetic Breast Augmentation: Diagnosis, Case Management, and Histologic Evaluation. **Aesthetic Plast Surg.** 37(1):91-4; 2013
  14. Dieterich M, Reimer T, Kundt G, Stubert J, Gerber B. The Role of Hydroxyethyl Starch in Preventing Surgical-Site Infections and Nipple Necrosis in Patients Undergoing Reduction Mammoplasty: A Prospective Case-Control Study of 334 Patients. **Aesthetic Plast Surg.** 37(3):554-60; 2013
  15. \* Stubert J, Koczan D, Richter DU, Dieterich M, Ziems B, Thiesen HJ, Gerber B, Reimer T. miRNA expression profiles determined in maternal sera of patients with HELLP syndrome. **Hypertens Pregnancy.** 33(2):215-35, 2014
  16. Dieterich M, Hartwig F, Stubert J, Klöcking S, Kundt G, Stengel B, Reimer T, Gerber B. Accompanying DCIS in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma is predictive of improved local recurrence-free survival. **Breast.** 23(4):346-51; 2014
  17. \* Stubert J, Ullmann S, Dieterich M, Diederich, Reimer T. Clinical differences between early and late onset severe preeclampsia and analysis of predictors for perinatal outcome. **J Perinat Med.** 42(5):617-27; 2014
  18. \* Stubert J, Waldmann K, Dieterich M, Richter DU, Briese V. Progranulin shows cytoprotective effects on trophoblast cells in vitro but does not antagonize TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. **Arch Gynecol Obstet.** 290(5):867-73; 2014
  19. \* Stubert J, Ullmann S, Bolz M, Külz T, Dieterich M, Richter DU, Reimer T. Prediction of preeclampsia and induced delivery at <34 weeks gestation by sFLT-1 and PIGF in patients with abnormal midtrimester uterine Doppler velocimetry: a prospective cohort analysis. **BMC Pregnancy Childbirth.** 14(1):292; 2014
  20. Dieterich M, Stubert J, Gerber B, Reimer T, Richter DU. Biocompatibility, cell growth and clinical relevance of synthetic meshes and biological matrixes for internal support in implant-based breast reconstruction. **Arch Gynecol Obstet.** 2014 Dec 13
  21. Stubert J, Dieterich M, Gerber B. Medical prevention of breast cancer. **Breast Care.** 9(6):391-396; 2014
  22. Dieterich M, Stubert J, Reimer T, Erickson N, Berling A. Influence of Lifestyle Factors on Breast Cancer Risk. **Breast Care.** 9(6):407-414; 2014

## **Andere, nicht in PubMed gelistete Veröffentlichungen**

1. Stubert J, Gerber B. Stammzellen im Nabelschnurblut: derzeitige Anwendungsmöglichkeiten. **GynSpectrum**. 18(1): 13-15, 2010
2. Gerber B, Heintze K, Stubert J. Apparativ intensivierete Nachsorge beim Mammakarzinom: Pro und Kontra. **gyn**. 16(3): 186-93, 2011
3. Gerber B, Stubert J, Dieterich M, Stachs A, Hartmann S, Reimer T. Ist die Bestimmung des axillären Nodalstatus beim frühen Mammakarzinom noch zeitgemäß? **gyn**. 16(4): 254-261, 2011
4. Gerber B, Stubert J, Dieterich M, Wiessner R, Wagner K. Bedeutung der Fast-track-Chirurgie bei gynäkologischen Operationen. **gynäkol prax**. 36(1): 9-17; 2012
5. Stubert J, Dieterich M, Gerber B. Wie radikal soll eine Mastektomie sein? **gynäkol prax**. 37(2):281-96; 2013
6. Stubert J, Dieterich M, Gerber B. Konservative und operative Therapie der Gynäkomastie. **gyn**. 18(4): (accepted)
7. Stubert J, Gerber B. Neoadjuvante Therapie des Mammakarzinoms. **gynäkol prax**. 38(4):679-692; 2014

## **Poster und Vorträge:**

1. Stubert J, Richter DU, Gerber B, Briese V. Progranulinexpression in der Schwangerschaft. Poster P-71. 125. Tagung der NGGG, 2009 (Posterpreis in der Sitzung „Endokrinologie und Reproduktionsmedizin“)
2. Stubert J, Richter DU, Koczan D, Gerber B, Briese V. Untersuchungen zur Expression und Regulation von Progranulin in humanen Trophoblastzellen. Vortrag. 21. Akademischen Tagung Deutschsprechender Hochschullehrer, 2009. Abstract A110. **Geburtsh Frauenheilk**. 69: 733-771, 2009
3. Stubert J, Richter DU, Koczan D, Gerber B, Briese V. Spatio-temporal expression patterns of progranulin in the human placenta and control of its regulation by steroid hormones. Poster. A068. 9th World Congress of Perinatal Medicine, 2009. **J Perinat Med**. 37(1s): 373, 2009
4. Stubert J. Stammzellen im Nabelschnurblut: Stand und Zukunft. Vortrag. 12. Ostsee-Seminar f. Frauenheilkunde und Geburtshilfe im Dezember 2009
5. Stubert J, Richter DU, Gerber B, Briese V. Funktionelle Untersuchungen zur Wirkung von Progranulin auf Trophoblastzellen in-vitro. Poster P45. 126. Tagung der NGGG, 2010 (Posterpreis in der Sitzung „Endokrinologie und Reproduktionsmedizin“)

6. Stubert J, Koczan D, Richter DU, Gerber B, Reimer T. Analyse zirkulierender microRNAs bei HELLP-Syndrom. Poster. 14. Deutscher Gestosekongress, 2011
7. Stubert J, Koczan D, Richter DU, Gerber B, Reimer T. Analyse zirkulierender microRNAs bei HELLP-Syndrom. Poster P05. 127. Tagung der NGGG, 2011 (Posterpreis in der Sitzung „Geburtshilfe 1“)
8. Schattenberg F, Richter DU, Briese V, Stubert J. Plazentare Progranulin-Expression bei Präeklampsie und intrauteriner Wachstumsrestriktion. Poster 127. Tagung der NGGG, 2011
9. Stubert J, Koczan D, Richter DU, Gerber B, Reimer T. Analyse zirkulierender miRNAs bei HELLP-Syndrom. Vortrag. 22. Akademischen Tagung Deutschsprechender Hochschullehrer, 2011. Abstract V-22. **Geburtsh Frauenheilk.** 71: 697-734, 2011
10. Stubert J. Aktuelle operative Therapiestrategien des Mammakarzinoms. Vortrag. Nordlicht-Symposium der Universitätsklinik für Strahlentherapie, Rostock, November 2011.
11. Stubert J. Behandlung der Axilla. Wie viel Therapie ist noch notwendig? Vortrag 19. Mammasymposium der Universitätsfrauenklinik Rostock, 24.03.2012
12. Stubert J, Ullmann S, Briese V, Reimer T. Dopplersonographie der Aa. uterinae bei schwerer Präeklampsie. Poster. DGPGM Kongress Bonn, 2012
13. Stubert J. Systemtherapie beim Lokalrezidiv. Vortrag. 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Stuttgart, 06.07.2012
14. Stubert J, Ullmann S, Bolz M, Külz T, Gerber B, Reimer T. Measurement of sFlt-1 and PlGF for prediction of pregnancy associated diseases. Poster PP117. XVIII ISSHP World Congress 2012. **Pregnancy Hypertens.** 2(3):240-339, 2012.  
Doi:10.1016/j.preghy.2012.04.228
15. Stubert J. Neues in der operative Therapie des Mammakarzinoms. Vortrag. 7. Dierhagener gynäkologisch-onkologische Fortbildungstage. Dierhagen, 15.09.2012
16. Stubert J, Ullmann S, Bolz M, Külz T, Gerber B, Reimer T. Stellenwert von sFlt-1 und PlGF zur Prädiktion schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen. Poster PO-Geb 01.15. Abstract in **Arch Gynecol Obstet.** 286(Suppl1): S55, 2012 Kongress der DGGG, München, 09.10.2012
17. Stubert J. Stellenwert von sFlt-1 und PlGF zur Prädiktion der Präeklampsie im 2. Trimenon. Vortrag zur 21. Jahrestagung der AG Neonatologie MV und der AG Perinatalogie MV. Rostock, 26.01.2013 (ausgezeichnet mit dem 1. Vortragspreis)
18. Stubert J., Waldmann K., Schattenberg F., Richter D.-U., Briese V. Regulation der Trophoblastzellhomöostase durch Progranulin. Vortrag 15. Deutscher Gestosekongress. Berlin, 07.06.2013 (ausgezeichnet mit dem Wissenschaftspreis). Abstract in **Geburtsh Frauenheilk.** 73:1-21, 2013

19. Stubert J., Waldmann K., Schattenberg F., Richter D.-U., Briese V. Funktionelle Bedeutung von Progranulin für villöse Trophoblastzellen. Poster Nr. 49. 23. Akademischen Tagung Deutschsprechender Hochschullehrer, 2013.
20. Stubert J. Vorsitz der Sitzung „Gynäkomastie“ 33. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, München, 28.06.2013
21. Stubert J. Konservative und operative Therapie der Gynäkomastie. Vortrag. 33. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, München, 28.06.2013
22. Stubert J. Präeklampsie und HELLP. Vortrag 16. Ostseeseminar für Frauenheilkunde und Geburtshilfe im November 2013
23. Stubert J. Prädiktion von Präeklampsie und Frühgeburt mittels sFlt-1 und PIGF an einem Hochrisikokollektiv während des zweiten Trimenons. Vortrag. 130. Tagung der NGGG, Rostock 17.05.2014
24. Kleber T, Stubert J., Richter DU, Reimer T, Gerber B. Prädiktiver Stellenwert von Endoglin, Progranulin und Transthyretin im zweiten Trimenon in der Präeklampsiediagnostik. Poster in der Sitzung Geburtshilfe, 130. Tagung der NGGG, Rostock 17.05.2014
25. Stubert J. Vorsitz der Sitzung „Der mastopathische Formenkreis“ 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Berlin, 19.06.2014
26. Stubert J. Mastodynie – harmlose Erkrankung mit hohem Leidensdruck. Vortrag. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Berlin, 19.06.2014
27. Stubert J. Medikamentöse Therapie des männlichen Mammakarzinoms. Vortrag. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Berlin, 21.06.2014
28. Stubert J. State of the Art – Maligne Tumoren des Endometriums. Vortrag 17. Ostseeseminar für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Lübeck 06.12.2014
29. Stubert J. Osteoporose: Was muss der Gynäkologe vom Knochen wissen. Vortrag 17. Ostseeseminar für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Lübeck 06.12.2014
30. Stubert J. Mastodynie – ein relevantes Problem in der Praxis. Vortrag Klinikfortbildung des Martin-Luther-Krankenhauses, Berlin am 10.12.2014

## 11. Literaturverzeichnis

1. Tangkeangsirisin W, Serrero G. PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2004;25(9):1587-92.
2. Guerra RR, Kriazhev L, Hernandez-Blazquez FJ, Bateman A. Progranulin is a stress-response factor in fibroblasts subjected to hypoxia and acidosis. *Growth Factors*. 2007;25(4):280-5.
3. He Z, Ismail A, Kriazhev L, Sadvakassova G, Bateman A. Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. *Cancer Res*. 2002;62(19):5590-6.
4. Bateman A, Bennett HP. The granulin gene family: from cancer to dementia. *Bioessays*. 2009;31(11):1245-54.
5. Bateman A, Belcourt D, Bennett H, Lazure C, Solomon S. Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;173(3):1161-8.
6. Shoyab M, McDonald VL, Byles C, Todaro GJ, Plowman GD. Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(20):7912-6.
7. Bhandari V, Palfree RG, Bateman A. Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1715-9.
8. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(7):999-1009.
9. Plowman GD, Green JM, Neubauer MG, Buckley SD, McDonald VL, Todaro GJ, et al. The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *J Biol Chem*. 1992;267(18):13073-8.
10. Zhou J, Gao G, Crabb JW, Serrero G. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J Biol Chem*. 1993;268(15):10863-9.
11. Bhandari V, Daniel R, Lim PS, Bateman A. Structural and functional analysis of a promoter of the human granulin/epithelin gene. *Biochem J*. 1996;319 ( Pt 2):441-7.
12. He Z, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)*. 2003;81(10):600-12.

13. He Z, Ong CH, Halper J, Bateman A. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med.* 2003;9(2):225-9.
14. Bateman A, Bennett HP. Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *J Endocrinol.* 1998;158(2):145-51.
15. Desmarais JA, Cao M, Bateman A, Murphy BD. Spatiotemporal expression pattern of progranulin in embryo implantation and placenta formation suggests a role in cell proliferation, remodeling, and angiogenesis. *Reproduction.* 2008;136(2):247-57.
16. Diaz-Cueto L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM, Gerton GL. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). *Dev Biol.* 2000;217(2):406-18.
17. Daniel R, Daniels E, He Z, Bateman A. Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. *Dev Dyn.* 2003;227(4):593-9.
18. Qin J, Diaz-Cueto L, Schwarze JE, Takahashi Y, Imai M, Isuzugawa K, et al. Effects of progranulin on blastocyst hatching and subsequent adhesion and outgrowth in the mouse. *Biol Reprod.* 2005;73(3):434-42.
19. Wu H, Siegel RM. Medicine. Progranulin resolves inflammation. *Science.* 2011;332(6028):427-8.
20. Tang W, Lu Y, Tian QY, Zhang Y, Guo FJ, Liu GY, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science.* 2011;332(6028):478-84.
21. Liu C, Li XX, Gao W, Liu W, Liu DS. Progranulin-derived Atsttrin directly binds to TNFRSF25 (DR3) and inhibits TNF-like ligand 1A (TL1A) activity. *PLoS One.* 2014;9(3):e92743.
22. Chen X, Chang J, Deng Q, Xu J, Nguyen TA, Martens LH, et al. Progranulin does not bind tumor necrosis factor (TNF) receptors and is not a direct regulator of TNF-dependent signaling or bioactivity in immune or neuronal cells. *J Neurosci.* 2013;33(21):9202-13.
23. Piscopo P, Rivabene R, Adduci A, Mallozzi C, Malvezzi-Campeggi L, Crestini A, et al. Hypoxia induces up-regulation of progranulin in neuroblastoma cell lines. *Neurochem Int.* 2010;57(8):893-8.
24. Li M, Liu Y, Xia F, Wu Z, Deng L, Jiang R, et al. Progranulin is required for proper ER stress response and inhibits ER stress-mediated apoptosis through TNFR2. *Cell Signal.* 2014;26(7):1539-48.
25. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Basic structure of the villous trees. *Pathology of the human placenta.* 6th ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2012. p. 55-100.

26. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(1):29-39.
27. Levy R, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM. Apoptosis in placental development remodelling and pathology. In: Kingdom J, Jauniaux E, O'Brien S, editors. *The placenta: Basic science and clinical practice.* London: RCOG Press; 2000. p. 27-39.
28. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 2000;157(6):2111-22.
29. Zamudio S. Hypoxia and the placenta. In: Kay HH, Nelson DM, Wang Y, editors. *The placenta: from development to disease.* Hoboken, USA: Wiley-Blackwell; 2011. p. 43-9.
30. Huppertz B, Gauster M, Orendi K, Konig J, Moser G. Oxygen as modulator of trophoblast invasion. *J Anat.* 2009;215(1):14-20.
31. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Architecture of normal villous trees. *Pathology of the human placenta.* 6th ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2012. p. 101-44.
32. Pijnenborg R, Brosens I. Deep trophoblast invasion and spiral artery remodeling. In: Pijnenborg R, Brosens I, Romero R, editors. *Placenta bed disorders: Basic science and its translations to obstetrics.* Cambridge: Cambridge University Press; 2010. p. 97-107.
33. Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol.* 2003;162(1):115-25.
34. Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat.* 2009;215(1):27-35.
35. Huppertz B, Weiss G, Moser G. Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions. *J Reprod Immunol.* 2014;101-102:74-9.
36. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension.* 2008;51(4):970-5.
37. Redman CW, Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Southcombe JH, Collett GP, et al. Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta.* 2012;33 Suppl:S48-54.
38. Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2004;11(6):342-52.
39. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda).* 2009;24:147-58.
40. Huppertz B. Placental pathology in pregnancy complications. *Thromb Res.* 2011;127 Suppl 3:S96-9.

41. Longtine MS, Chen B, Odibo AO, Zhong Y, Nelson DM. Villous trophoblast apoptosis is elevated and restricted to cytotrophoblasts in pregnancies complicated by preeclampsia, IUGR, or preeclampsia with IUGR. *Placenta*. 2012;33(5):352-9.
42. Heazell AE, Sharp AN, Baker PN, Crocker IP. Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast. *Apoptosis*. 2011;16(2):135-44.
43. Widdows K. Gestational related morphological abnormalities in placental villous trophoblast turnover in compromised pregnancies. [PhD Thesis]. Uxbridge, UK: Brunel University; 2009.
44. Jeschke U, Schiessl B, Mylonas I, Kunze S, Kuhn C, Schulze S, et al. Expression of the proliferation marker Ki-67 and of p53 tumor protein in trophoblastic tissue of preeclamptic, HELLP, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Int J Gynecol Pathol*. 2006;25(4):354-60.
45. Brosens I, Khong TY. Placental bed vascular disorders: defective spiral artery remodeling. In: Pijnenborg R, Brosens I, Romero R, editors. *Placenta bed disorders: Basic science and its translations to obstetrics*. Cambridge: Cambridge University Press; 2010. p. 11-21.
46. Smarason AK, Sargent IL, Starkey PM, Redman CW. The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993;100(10):943-9.
47. Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, et al. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta*. 2006;27(1):56-61.
48. Vogel M. Pathologie der Plazenta: Spätschwangerschaft und fetoplazentare Einheit. In: Klöppel G, Dietel M, editors. *Pathologie - Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*. 3 ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013. p. 541-632.
49. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(3):287-99.
50. Huppertz B. Vascular Development in the placenta. In: Kay HH, Nelson DM, Wang Y, editors. *The placenta: from development to disease*. Hoboken, USA: Wiley-Blackwell; 2011. p. 36-42.
51. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(1):S1-S22.
52. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22(2):143-8.

53. Zhang WH, Alexander S, Bouvier-Colle MH, Macfarlane A, Group M-B. Incidence of severe pre-eclampsia, postpartum haemorrhage and sepsis as a surrogate marker for severe maternal morbidity in a European population-based study: the MOMS-B survey. *BJOG*. 2005;112(1):89-96.
54. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2009;9:8.
55. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010;376(9741):631-44.
56. Odegard RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *BJOG*. 2000;107(11):1410-6.
57. Raymond D, Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. 2011;66(8):497-506.
58. Kucukgoz Gulec U, Ozgunen FT, Buyukkurt S, Guzel AB, Urunsak IF, Demir SC, et al. Comparison of clinical and laboratory findings in early- and late-onset preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013;26(12):1228-33.
59. Wright D, Akolekar R, Syngelaki A, Poon LC, Nicolaides KH. A competing risks model in early screening for preeclampsia. *Fetal Diagn Ther*. 2012;32(3):171-8.
60. Redman CW, Sargent IL, Staff AC. IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia - two placental causes of preeclampsia? *Placenta*. 2014;35 Suppl:S20-5.
61. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003;111(5):649-58.
62. Crossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, et al. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ*. 2008;178(6):701-11.
63. Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(2):161 e1- e11.
64. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350(7):672-83.
65. Chappell LC, Duckworth S, Seed PT, Griffin M, Myers J, Mackillop L, et al. Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected preeclampsia: a prospective multicenter study. *Circulation*. 2013;128(19):2121-31.
66. Sitras V, Paulssen RH, Gronaas H, Leirvik J, Hanssen TA, Vartun A, et al. Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta*. 2009;30(5):424-33.

67. Stubert J, Richter DU, Gerber B, Briese V. Expression pattern of progranulin in the human placenta and its effect on cell proliferation in the choriocarcinoma cell line BeWo. *J Reprod Dev.* 2011;57(2):229-35.
68. Stubert J, Schattenberg F, Richter DU, Dieterich M, Briese V. Trophoblastic progranulin expression is upregulated in cases of fetal growth restriction and preeclampsia. *J Perinat Med.* 2012;40(5):475-81.
69. Stubert J, Waldmann K, Dieterich M, Richter DU, Briese V. Progranulin shows cytoprotective effects on trophoblast cells in vitro but does not antagonize TNF-alpha-induced apoptosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;290(5):867-73.
70. Ho JC, Ip YC, Cheung ST, Lee YT, Chan KF, Wong SY, et al. Granulin-epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2008;47(5):1524-32.
71. Yin F, Banerjee R, Thomas B, Zhou P, Qian L, Jia T, et al. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *J Exp Med.* 2010;207(1):117-28.
72. Toh H, Cao M, Daniels E, Bateman A. Expression of the growth factor progranulin in endothelial cells influences growth and development of blood vessels: a novel mouse model. *PLoS One.* 2013;8(5):e64989.
73. Hwang HJ, Jung TW, Hong HC, Choi HY, Seo JA, Kim SG, et al. Progranulin protects vascular endothelium against atherosclerotic inflammatory reaction via Akt/eNOS and nuclear factor-kappaB pathways. *PLoS One.* 2013;8(9):e76679.
74. van der Merwe JL, Hall DR, Wright C, Schubert P, Grove D. Are early and late preeclampsia distinct subclasses of the disease--what does the placenta reveal? *Hypertens Pregnancy.* 2010;29(4):457-67.
75. Stubert J, Ullmann S, Dieterich M, Diedrich D, Reimer T. Clinical differences between early- and late-onset severe preeclampsia and analysis of predictors for perinatal outcome. *J Perinat Med.* 2014;42(5):617-27.
76. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P, et al. New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertension.* 2014;63(2):346-52.
77. Tobinaga CM, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Pendeloski KP, Akita PA, Sass N, et al. Angiogenic factors and uterine Doppler velocimetry in early- and late-onset preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2014;93(5):469-76.
78. Madazli R, Yuksel MA, Imamoglu M, Tuten A, Oncul M, Aydin B, et al. Comparison of clinical and perinatal outcomes in early- and late-onset preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;290(1):53-7.

79. Li H, Gudnason H, Olofsson P, Dubiel M, Gudmundsson S. Increased uterine artery vascular impedance is related to adverse outcome of pregnancy but is present in only one-third of late third-trimester pre-eclamptic women. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005;25(5):459-63.
80. Unterscheider J, O'Donoghue K, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FM, et al. Fetal growth restriction and the risk of perinatal mortality-case studies from the multicentre PORTO study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14:63.
81. McElrath TF, Lim KH, Pare E, Rich-Edwards J, Pucci D, Troisi R, et al. Longitudinal evaluation of predictive value for preeclampsia of circulating angiogenic factors through pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207(5):407 e1-7.
82. Kusanovic JP, Romero R, Chaiworapongsa T, Erez O, Mittal P, Vaisbuch E, et al. A prospective cohort study of the value of maternal plasma concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in early pregnancy and midtrimester in the identification of patients destined to develop preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22(11):1021-38.
83. Stubert J, Ullmann S, Bolz M, Kulz T, Dieterich M, Richter DU, et al. Prediction of preeclampsia and induced delivery at <34 weeks gestation by sFLT-1 and PIGF in patients with abnormal midtrimester uterine Doppler velocimetry: a prospective cohort analysis. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14:292.
84. Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, Bossung V, Noack S, Schaarschmidt W, et al. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation.* 2011;124(8):940-50.
85. Becker R, Keller T, Kiesewetter H, Fangerau H, Bittner U. Individual risk assessment of adverse pregnancy outcome by multivariate regression analysis may serve as basis for drug intervention studies: retrospective analysis of 426 high-risk patients including ethical aspects. *Arch Gynecol Obstet.* 2013;288(1):41-8.
86. Schleussner E, Lehmann T, Kahler C, Schneider U, Schlembach D, Groten T. Impact of the nitric oxide-donor pentaerythryl-tetranitrate on perinatal outcome in risk pregnancies: a prospective, randomized, double-blinded trial. *J Perinat Med.* 2014;42(4):507-14.
87. Roberge S, Giguere Y, Villa P, Nicolaidis K, Vainio M, Forest JC, et al. Early administration of low-dose aspirin for the prevention of severe and mild preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Perinatol.* 2012;29(7):551-6.
88. Villa PM, Kajantie E, Raikkonen K, Pesonen AK, Hamalainen E, Vainio M, et al. Aspirin in the prevention of pre-eclampsia in high-risk women: a randomised placebo-controlled PREDO Trial and a meta-analysis of randomised trials. *BJOG.* 2013;120(1):64-74.

89. Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH. Competing risks model in early screening for preeclampsia by biophysical and biochemical markers. *Fetal Diagn Ther.* 2013;33(1):8-15.
90. Scuzzocchio E, Figueras F, Crispi F, Meler E, Masoller N, Mula R, et al. Performance of a first-trimester screening of preeclampsia in a routine care low-risk setting. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;208(3):203 e1- e10.
91. Kenny LC, Black MA, Poston L, Taylor R, Myers JE, Baker PN, et al. Early pregnancy prediction of preeclampsia in nulliparous women, combining clinical risk and biomarkers: the Screening for Pregnancy Endpoints (SCOPE) international cohort study. *Hypertension.* 2014;64(3):644-52.
92. Zhu L, Chen Y, Liu C, Deng H, Zhang N, Wang S, et al. Transthyretin as a novel candidate biomarker for preeclampsia. *Exp Ther Med.* 2014;7(5):1332-6.
93. Kalkunte SS, Neubeck S, Norris WE, Cheng SB, Kostadinov S, Vu Hoang D, et al. Transthyretin is dysregulated in preeclampsia, and its native form prevents the onset of disease in a preclinical mouse model. *Am J Pathol.* 2013;183(5):1425-36.
94. Pecks U, Seidenspinner F, Rower C, Reimer T, Rath W, Glocker MO. Multifactorial analysis of affinity-mass spectrometry data from serum protein samples: a strategy to distinguish patients with preeclampsia from matching control individuals. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010;21(10):1699-711.
95. Engin-Ustun Y, Ustun Y, Karabulut AB, Ozkaplan E, Meydanli MM, Kafkasli A. Serum amyloid A levels are increased in pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;64(2):117-20.
96. Reimer T, Rohrmann H, Stubert J, Pecks U, Glocker MO, Richter DU, et al. Angiogenic factors and acute-phase proteins in serum samples of preeclampsia and HELLP patients: a matched-pair analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;26(3):263-9.
97. Stubert J, Koczan D, Richter DU, Dieterich M, Ziems B, Thiesen HJ, et al. miRNA expression profiles determined in maternal sera of patients with HELLP syndrome. *Hypertens Pregnancy.* 2014;33(2):215-35.
98. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
99. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010;466(7308):835-40.
100. Chen DB, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2013;88(5):130.
101. Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Schmidt A, Chaiwangyen W, Markert UR. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: origin, evolution and future of placenta miRNAs. *Placenta.* 2014;35 Suppl:S39-45.

102. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18(10):997-1006.
103. Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One.* 2008;3(9):e3148.
104. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009;10(6):R64.
105. Luque A, Farwati A, Crovetto F, Crispi F, Figueras F, Gratacos E, et al. Usefulness of circulating microRNAs for the prediction of early preeclampsia at first-trimester of pregnancy. *Sci Rep.* 2014;4:4882.