

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

(Komm. Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Henner Graeff, em.)

**Veränderung des Mitogen-activated protein kinase-
Signaltransduktionsweges in der Plazenta von Patientinnen mit
Präeklampsie**

Almut Hannke-Lohmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt
2. Privatdozentin Dr. U. Reuning

Die Dissertation wurde am 25.10.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 6.12.2000 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	4
A.1 Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen: Präeklampsie und HELLP-Syndrom	4
A.2 Überblick über zelluläre Signaltransduktionswege	5
A.3 Der MAPK-Signaltransduktionsweg	6
B. Fragestellung	9
C. Material und Methoden	10
C.1 Materialien	10
C.2 Zellkultur	11
2.1 Zelllinien	11
2.2 Zellkultivierung	12
2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	12
2.4 Zellstimulation	13
C.3 Patientenkollektiv	13
C.4.1 Gewebeextraktion	14
4.2 Lyse der Zellen	14
C.5.1 MAPKinase Assay	15
5.2 Erk-Western Blot nach Kinasereaktion	17
C.6 Rac1-Aktivitätsassay	18
C.7 Western Blot Analyse	19
C.8 Western Blot nach c-Jun Phosphorylierung	21
C.9 Präparation von pGEX-GST-Fusionsproteinen	22
C.10 Statistik	24
D. Ergebnisse	25
D.1 Charakterisierung der Patientinnen	25
D.2 Herunterregulierung des Jnk-MAPK Signaltransduktionsweges bei hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen	25

D.3 Erniedrigte c-Jun Phosphorylierung bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom	28
D.4 Verminderte Rac1 Aktivität bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom	30
E. Diskussion	31
F. Zusammenfassung	35
G. Literaturverzeichnis	36
H. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	42
I. Abkürzungsverzeichnis	42
J. Danksagung	44

A. Einleitung

A.1 Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen: Präeklampsie und HELLP-Syndrom

Hochdruckerkrankungen treten bei ca. 10-15 % aller Schwangeren auf und gefährden Mutter und Kind. Präeklampsie ist eine Form der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen. Weltweit ist sie der Hauptgrund für mütterliche und perinatale Morbidität¹². Die betroffenen Patientinnen sind schwer krank und lagern unkontrolliert Wasser als Ödeme ein. Daneben entwickeln sie eine schwer beherrschbare Hypertonie und verlieren über den Urin Protein in großen Mengen. In der Hälfte aller Fälle kommt es infolge einer Plazentainsuffizienz zu einer Mangelentwicklung des Feten. Selten kommt es bei der Mutter zusätzlich zu einem eklampthischen Krampfanfall, der ähnlich einem epileptischen Anfall zur Bewußtlosigkeit der Patientinnen und zum Tod des Feten führen kann. Obgleich sich bei der Präeklampsie nicht immer dieselben Zeichen und Symptome manifestieren, wird das Syndrom bestehend aus den Symptomen Hämolyse, erhöhten Leberenzymen und erniedrigten Thrombozyten (HELLP-Syndrom) als Variante der Präeklampsie^{49,50,54} betrachtet. Das HELLP-Syndrom kann die Mutter durch diffuse Blutungen und Organschädigungen bis hin zur Leberruptur gefährden. Die Therapie von Präeklampsie und HELLP-Syndrom ist bisher nur symptomatisch möglich (Bettruhe, Blutdrucksenkung, Hämodilution). Oft gelingt es nicht, die Erkrankung konservativ zu beherrschen, so daß die unverzügliche Entbindung notwendig wird. Da sich sowohl Präeklampsie als auch das HELLP-Syndrom oft schon im 2. Trimenon manifestieren, führt die Entbindung häufig zur iatrogenen Frühgeburtlichkeit mit den entsprechenden Komplikationen beim Neugeborenen (Atemprobleme, Infektion, Hirnblutung)¹².

Die Ätiologie der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen ist noch immer ungeklärt, auch wenn Details aus der Pathogenese und prädisponierende Faktoren⁵¹ bekannt sind. Folgende pathogenetische Mechanismen werden diskutiert: gestörte endovaskuläre Invasion, Überempfindlichkeit gegenüber vasopressorischen Substanzen, ein gestörtes Gleichgewicht zwischen vasoaktiven Prostaglandinen Thromboxan A₂ und Prostazyklin oder eine pathologische Immunreaktion der Mutter gegenüber der Frucht.

Ein großes Problem der Präeklampsie und vermutlich auch des HELLP-Syndroms ist die Insuffizienz des uteroplazentaren Zirkulationssystems und chronische Hypoxie in der Plazenta, herrührend von der gestörten endovaskulären Invasion der Trophoblastzellen in die mütterlichen Spiralarterien^{12,40}.

Zelluläre Invasionsprozesse in die extrazelluläre Matrix werden durch Proteasen vermittelt⁴⁵; während der Implantation der Plazenta spielen Matrixmetalloproteinasen eine entscheidene

Rolle³³. Bei Präeklampsie /HELLP-Syndrom wurde eine verminderte Expression der Metalloproteinase MMP-9 beobachtet^{18,29,34}, aber auch eine ausbleibende Differenzierung der Trophoblastzellen mit gestörter Anpassung ihrer Adhäsionsmoleküle während dieses Invasionsprozesses^{34,55}.

A.2 Überblick über zelluläre Signaltransduktionswege

Die Übertragung von Signalen von der Zelloberfläche zum Zellkern ist eines der grundsätzlichen Vorgänge lebender Zellen. 90 % aller eukaryontischen Gene werden auf Transkriptionsebene reguliert^{48,26}. Es erlaubt den Zellen, auf die Anforderungen der Umwelt angemessen zu reagieren. Es werden viele verschiedene Signaltransduktionswege unterschieden, die aber nicht strikt getrennt sind, sondern ein kompliziertes, ineinander verwobenes Signalnetzwerk bilden. Auf die Zelloberfläche auftreffende Signale werden über zahlreiche Signalmoleküle (z.B. Rezeptoren, G-Proteine, "second messenger"-Moleküle und Enzyme (z.B. Kinasen, Phosphatasen, Lipasen) an den Zellkern weitergeleitet. Abbildung 1 gibt einen kleinen Überblick über bekannte zelluläre Signaltransduktionswege, die im folgenden Text erläutert werden.

Ein möglicher Weg ist der *JAK/STAT-Signaltransduktionsweg* (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription), der hauptsächlich Zytokin-vermittelte Signale an den Zellkern weiterleitet¹⁶. Nach Stimulierung von Zytokinrezeptoren an der Zellmembran durch ihre Liganden kommt es zur Interaktion von JAK-Familienmitgliedern mit dem intrazellulären Anteil des Rezeptors, die STAT-Proteine phosphorylieren.

STAT-Proteine sind latente Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma, sie binden phosphorylierte JAKs und werden dadurch aktiviert. Nach Homo- bzw. Heterodimerisierung wandern sie in den Zellkern und binden an die DNA, wodurch die Transkription reguliert wird.

Über die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) an der Plasmamembran durch ein aktiviertes G-Protein kommt es zum *cAMP-vermittelten Signaltransduktionsweg*. Die Erhöhung der zellulären cAMP-Konzentration (second messenger) führt zur Konformationsänderung der Proteinkinase A (PKA), die wiederum an der Regulation der Genexpression beteiligt ist.

Über die Aktivierung von *Phospholipasen und -kinasen* werden Signale von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und siebenständigen G-Proteinrezeptoren²⁰ weitergeleitet. Dabei werden Lipide gespalten, und kleine Signalmoleküle, sogenannte second messenger, gebildet.

Die Plasmamembran enthält verschiedene Signalmoleküle, die in die Zelle gebracht werden, wenn ein Signal auf die Zelle trifft¹⁴. Ein Hormon wie Adrenalin aktiviert eine spezifische Phospholipase C in der Zelle. Sie spaltet Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3). DAG aktiviert Proteinkinase C (PKC), die unter anderem den MAPKinase-Weg aktivieren kann. IP3 mobilisiert intrazelluläres Ca²⁺ (CA), das viele Enzyme aktivieren kann. Weitere second messenger-vermittelte Signalwege sind neben Phospholipase C die Phospholipase A2, Phosphatidylinositol-3-Kinase und Phosphatidylinositol-4-Kinase.

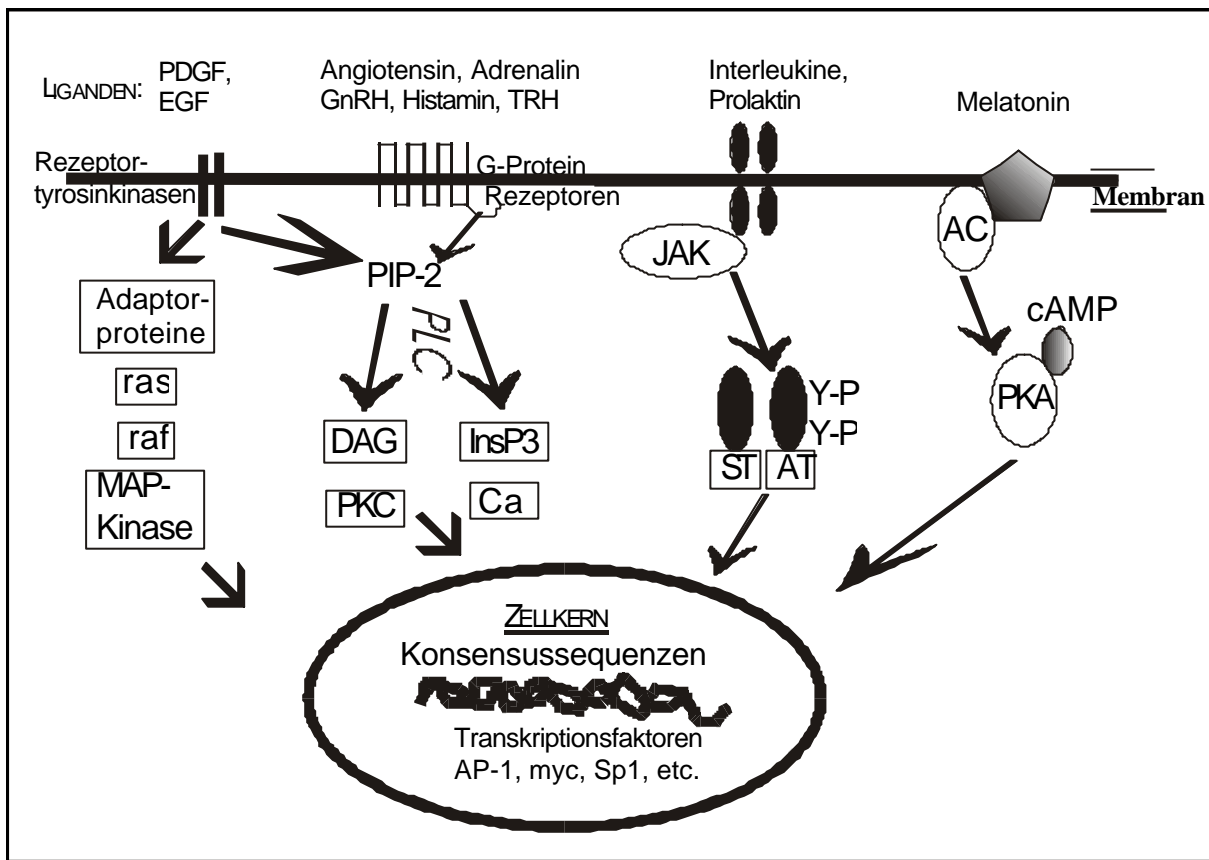


Abbildung 1: Überblick über wichtige zelluläre Signaltransduktionswege

A.3 Der MAPK-Signaltransduktionsweg

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg zur Regulierung zellulärer Schlüsselfunktionen ist der MAPK-Signaltransduktionsweg^{23,53}. Nach Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK)²³, sieben-spannigen Rezeptoren²⁰ oder zytoplasmatischen Onkogenen³⁶ übermitteln sie mitogene Signale ins Zellinnere. Es handelt sich um drei parallele Proteinkinasekaskaden (Abbildung 2), bezeichnet nach ihrer letzten Kinase: Jun aminoterminal kinase (Jnk), extracellulär

regulated kinase (Erk), und p38^{44,24}. Die Kaskaden greifen wie Zahnräder ineinander und aktivieren Transkriptionsfaktoren. Während Erk mitogene Signale weiterleitet, reagiert die Zelle bei Stress infolge von Hitze und UV-Bestrahlung mit der Jnk-MAPK, die p38-MAPK wird durch Zytokine oder osmotischen Stress aktiviert. Biochemische Studien haben gezeigt, daß jeder dieser Signaltransduktionswege aus einer Kaskade von drei Proteinkinasen besteht, einer Mitogen activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK), einer Mitogen activated protein kinase kinase (MAPKK) und einer Mitogen activated protein kinase (Jnk-, Erk- und p38-MAPK) (Abbildung 2). Die Übermittlung der Signale wird durch aufeinanderfolgende Phosphorylierung und Aktivierung der Komponenten erreicht.

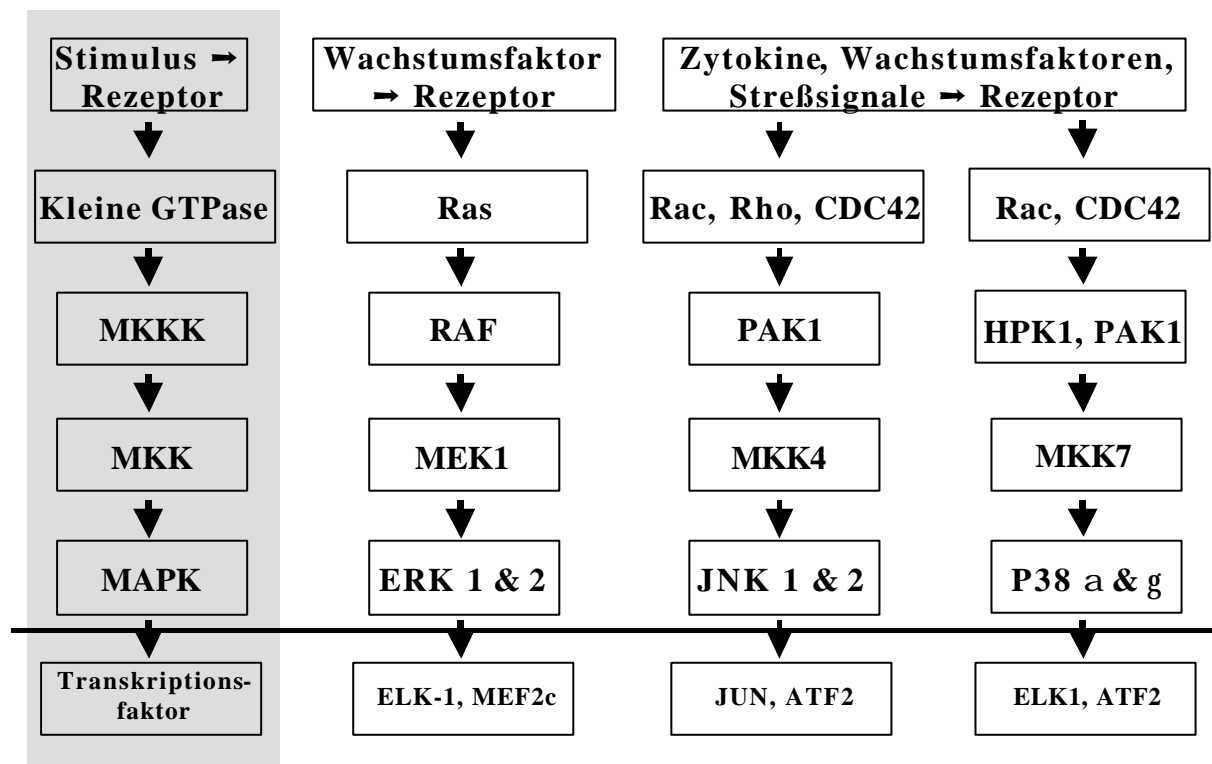


Abbildung 2. Zelluläre Signaltransduktionswege vom Rezeptor der Zellmembran zu den Transkriptionsfaktoren im Zellkern über verschiedene MAPK Signaltransduktionsmodule. GTPase = Guanosintriphosphat; MAPKKK = miogen-activated kinase kinase kinase; PAK = p21-activated kinase-1; MLK = mixed lineage kinase; MEKK = mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1; HPK = hematopoetic progenitor kinase-1; MAPKK = mitogen-activated kinase kinase; MEK = mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-1; MKK = mitogen-activated protein kinase kinase-4; MAPK = mitogen-activated kinase; ERK = extracellular regulated kinase; JNK = Jun aminoterminal kinase; MEF = myocyte enhancer factor-2c; ATF = activated transcriptions factor-2

Jeder Weg wird von einer "kleinen" Guanosin-Triphosphatase (GTPase), wie Ras oder Rac1, aktiviert. Zum Beispiel wird der Jnk-Signaltransduktionsweg dadurch aktiviert, daß Zellen

osmotischen Änderungen, Wachstumsfaktoren oder proinflammatorischen Zytokinen³² ausgesetzt werden. Dies führt zur Aktivierung des "kleinen" Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Proteins Rac²⁹, das dann die Drei-Komponenten-Kinasekaskade aktiviert, deren dritte Komponente die Jnk-Mitogen-activated protein kinase ist. Die Aktivierung von Jnk führt zur Phosphorylierung des Transskriptionsfaktors c-Jun, dieser erhöht das transkriptionale Aktivierungspotential und beeinflusst damit die Expression verschiedener Gene^{43,42}.

B. Fragestellung

Präeklampsie und HELLP-Syndrom gehen auf molekularer Ebene mit Beeinträchtigungen verschiedener Zellfunktionen der Trophoblastzellen wie Invasion, Motilität und Differenzierung einher^{55,57}. Es ist deshalb naheliegend, eine Störung in einer gemeinsamen Regulation dieser Zellfunktionen zu vermuten, z.B. in gestörten Signaltransduktionswegen. Ziel der Arbeit war es, von Patientinnen mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom die Signaltransduktionswege vom Rezeptor in den Zellkern näher zu charakterisieren. Weil die Wirkung der Mitogen-activated protein kinase auf zelluläre Regulationsprozesse durch ihre Aktivität bestimmt wird, testeten wir die Aktivität der drei MAPK in Plazenten von Patientinnen mit hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen, verglichen mit normalen Plazenten.

C. Material und Methoden

C.1 Materialien

Reagentien:

- Amicon Millipore Corp., Bedford, USA: Centricon Filter (Nr. 4206)
- Amresco, Solon, USA: Ammoniumpersulfat (APS)
- Becton Dickinson, Bedford, USA: EGF (Nr. 40001)
- Boehringer Mannheim, Penzberg: Anti-rabbit-IgG-POD (Nr. 1238850), Protein-A-Agarose (Nr. 85008821), Lysozym (Nr. 83525820-03)
- Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA: Bacto Yeast Extract, Tryptone Peptone, Bacto Agar
- Gibco BRL Life Technology, Karlsruhe: Bench Mark Molekulargewichtmarker (Nr. 10748-010), Hepes (Nr. 15630-056)
- ICN Biomedicals, Aurora, USA: [γ -³²P]-dATP, SDS (78541),
- Kodak, Rochester, USA: X-OMAT AR Filme
- Merck, Darmstadt: Bromphenolblau, Chloroform, Coomassie blue R250 (Nr. 1.12553), DMSO, Essigsäure, Ethanol absolut z. A., Gelatine (Nr. 1.04070), Magnesiumdichlorid, Natriumhydroxid, 2-Propanol
- Pharmacia, Biotech: Glutathion Sepharose 4B beads (Nr. 17-0756-01)
- Pierce, Rockford, USA: BCA Protein Reagent Kit (Nr. 23223/23224)
- Roth, Karlsruhe: Glycerin, Methanol, Natriumchlorid (Nr. 3957.1), Polyacrylamid, Tris-HCl, Triton X-100
- Santa Cruz, Santa Cruz, USA: Antikörper gegen Erk1 (C-16, SC-093), gegen Maus-IgG (SC-2025), gegen Jnk1 (C-17, SC-474), gegen p38 (N-20, SC-728)
- Schleicher&Schüll, Dassel: Nitrocellulose Optitran BA-S85 0,45 μ m (Nr. 439194)
- Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim: p-Aminobenzamidin, Ampicillin, Aprotinin, ATP, Dithiothreitol (D-8255), EDTA, Ethidiumbromid, Formaldehyd, Glutaraldehyd, Glycin (G-4392), IPTG (I-6758), Kaliumchlorid, β -Mercaptoethanol, MBP (M-1891), p-Nitrophenylphosphat, oNPG, PMSF, Proteinase K, RNase freies Wasser, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumfluorid, Natriumdihydrogenphosphat, di-Natriumhydrogenphosphat, Natrium-ortho-vanadat (S-6508), Natriumpyrophosphat, Sorbitol (S 6021), Temed (T-7024)
- Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA: monoklonaler Rac1 Antikörper

- Whatman, Maidstone, England: Dünnschichtchromatographie (TLC) Platten (Nr. 4410221), Whatman 3mm Filterpapier

Zellkultur:

- Gibco BRL Life Technology, Karlsruhe: Fötale Kälberserum (Nr. 10270-106), HEPES, DMEM mit Glutamax, PBS
- Falcon / Becton Dickinson, Plymouth, England: Gewebekulturplatten Ø 10cm, Gewebekulturflaschen T175, Gewebekultur-flaschen T75, Gewebekulturflaschen T25, Gewebekultur Sixwell, 96-well-Mikrotiterplatten
- Seromed Biochrom KG, Berlin: BSA, EDTA (1%), Penicillin/Streptomycin, Trypsin (2,5%)
- Sigma- Aldrich GmbH, Steinheim: L-Arginin (Nr. A-3909), L-Asparagin (Nr. A- 4159)

Auswertung:

Die Western Blots wurden mit Hilfe eines Epson 9500-GT Scanners eingescannt. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Phosphor Imager 445SI von Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA) quantifiziert.

C.2 Zellkultur

2.1 Zelllinien

Alle Versuche wurden unter Verwendung der NIH 3T3 Zelllinie, die von der American Type Culture Collection bezogen wurde, durchgeführt.

Medien und Lösungen:

Komplettmedium	DMEM mit Glutamax 10 mM HEPES 272 mM Asparagin 550 mM Arginin 1000 U Penicillin-Streptomycin 10 % fötales Kälberserum
Serumfreies Medium	DMEM mit Glutamax

	10 mM HEPES 272 mM Aspargin 550 mM Arginin
Einfriermedium	95 % fötales Kälberserum 5 % DMSO
Trypsin/EDTA-Lösung	0,125 % Trypsin 0,02 % EDTA
PBS	7,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl; pH 7,2

2.2 Zellkultivierung

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert und alle zwei bis drei Tage passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und zum Ablösen 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 3- 5 min zugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in Kompletmedium resuspendiert, 5 min bei 1.600 rpm abzentrifugiert, und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 1 ml frischem Kompletmedium resuspendiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Dann wurden die Zellen auf neue Gewebekulturflaschen oder -platten in Kompletmedium verteilt.

2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei 80 – 90 % Konfluenz von den Gewebekulturflaschen abgelöst. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und zum Ablösen 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 3 - 5 min zugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in Kompletmedium resuspendiert, 5 min bei 1.600 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, schnell in Kryoröhrchen pipettiert und bei –80 °C eingefroren. Zur Lagerung wurden diese Zellen nach 48 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die tiefgefrorenen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und das Kryoröhrchen kurzzeitig bei 37 °C erwärmt. 10 ml Kompletmedium wurden in ein 15 ml Röhrchen vorgelegt und die aufgetauten Zellen zupipettiert. Dann wurden die Zellen bei 1.600 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Kompletmedium resuspendiert und in einer Gewebekulturflasche ausgesät.

2.4 Zellstimulation mit EGF, Sorbitol und Anisomycin

Zur Standardisierung der plazentaren Jnk, Erk und p38 MAPK Aktivität wurden NIH3T3-Zellen durch jeweils 0,5 M Sorbitol (15 min), 10 ng/ml EGF (30 min) und 10 µg/ml Anisomycin (30 min) stimuliert.

C.3 Patientinnenkollektiv

32 Patientinnen aus der Abteilung für Perinatalmedizin und Perinatalphysiologie der Frauenklinik der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, wurden im Zeitraum von 1992 bis 1997 in die Studie eingebracht. Das schriftliche Einverständnis liegt vor.

Acht Frauen hatten eine schwere Präeklampsie entsprechend den ACOG Kriterien² (Bluthochdruck > 160/110 mmHg, Proteinurie mit 3+ im Urinschnelltest (Combur-9, Merck) oder > 5 g in 24 Std., neurologische Symptome, Oligurie).

Acht Frauen zeigten die Symptome eines schweren HELLP- Syndroms⁴⁹, definiert durch Thrombozyten < 100.000/µl, GOT im Serum > 45 U/l, Laktat-Dehydrogenase im Serum > 600U/l, sowie rechtsseitigem Oberbauchschmerz und Kopfschmerzen.

Sieben von acht Frauen mit HELLP-Syndrom hatten einen Bluthochdruck von > 160/110 mmHg. Vier von acht Frauen zeigten eine signifikante Proteinurie. Alle Patientinnen mit HELLP-Syndrom wurden per Kaiserschnitt entbunden, wie es den therapeutischen Richtlinien unseres Hauses (Prof. KTM Schneider, Geburtshilfliches Manual, Frauenklinik rechts der Isar) entspricht, alle Patientinnen mit Präeklampsie aufgrund der Schwere ihrer Erkrankung per sectionem entbunden.

Ausschlusskriterien waren Multiparität, Mehrlingsschwangerschaften und Vorerkrankungen wie chronischer Bluthochdruck, Nierenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Diabetes.

Als Kontrollen wurden Frauen nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf mit normalen vaginalen Entbindungen (n=8) oder elektivem Kaiserschnitt wegen Beckenendlage (n=8) ausgewählt. Niemand aus dieser Kontrollgruppe zeigte Hinweise auf Präeklampsie, HELLP-Syndrom, schwangerschaftsinduzierten Hochdrucks, einer Chorioamnionitis oder eine Pathologie der Plazenta, die in einer histologischen Untersuchung hätte erkannt werden können.

C.4.1 Gewebeextraktion

Verwendete Puffer:

Lysispuffer	50 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerin 1 % Triton X-100 <i>frisch zugeben:</i> 10 mM Natriumfluorid 1 mM Natriumorthovanadat 10 µg/ml Aprotinin 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
-------------	---

Plazentagewebe wurde unmittelbar nach der Geburt entnommen und etwa dreimal mit steriler Kochsalzlösung auf Eis gewaschen. Die 0,5 x 0,5 cm großen Gewebestückchen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von -80 °C aufbewahrt. Zur Aufarbeitung des Gewebes wurden die Plazentastücke in flüssigen Stickstoff gegeben und nur zur Bestimmung des Gewichtes kurz herausgenommen. Die Proben wurden in stickstoffvorgekühlten Gefäßen im Mikrodismembrator pulverisiert (30 s, höchste Stufe). Zum Pulver wurden entsprechende Mengen an kaltem Lysispuffer (4 °C) gegeben und bei 13.000 rpm 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 15 µl zur Proteinbestimmung (BCA Proteinassay²⁵) entnommen. Die Lysate wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2 Lyse der Zellen

Verwendete Lösungen:

Lysispuffer	50 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerin 1 % Triton X-100 <i>frisch zugeben:</i> 10 mM Natriumfluorid 1 mM Natriumorthovanadat 10 µg/ml Aprotinin 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
reduzierender Lämmli-Puffer (2x)	62,5 % Tris-HCl; pH 6,8 4 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol

Zur Standardisierung der plazentaren Jnk-, Erk- und p38-MAPK Aktivität wurden NIH3T3-Zellen durch jeweils 0,5 M Sorbitol (15 min), 10 ng/ml EGF (30 min) und 10 µg/ml Anisomycin (30 min) stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit kaltem PBS auf Eis gewaschen, 5 min in Lysispuffer lysiert und dann abgeschabt. Das Zellysate wurde bei 14.000 rpm, 4 °C, für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in neue Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von -80 °C eingefroren.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde der BCA-Proteinassay²⁵ eingesetzt. Die Proben wurden auf gleichen Proteingehalt normalisiert und unter reduzierenden Bedingungen mit reduzierendem Lämmli-Puffer elektrophoretisch in einer 10 % SDS/PAGE aufgetrennt.

C.5.1 MAPKinase Assay

Mit Hilfe eines MAPKinase Assays läßt sich die enzymatische Aktivität von MAPKinasen (Erk, Jnk und p38) bestimmen. Der MAPK Assay³² besteht aus der Immunopräzipitation der jeweiligen Mitogen activated protein kinase mit einem Antikörper und nachfolgender Inkubation mit einem geeigneten Proteinsubstrat (MBP für Erk, Glutathione S-Transferase (GST)-c-Jun für Jnk und GST-ATF-2 für p38) und radioaktivem ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP). Die Kinaseaktivität wird durch Messung der im Substrat gebundenen Radioaktivität bestimmt⁴¹. Von gleichen Proteinmengen ausgehend, je aktiver die MAPK ist, umso mehr Substrat wird phosphoryliert. Die Proben werden in einer SDS/PAGE aufgetrennt, und das radioaktiv phosphorylierte Substrat wird autoradiographisch detektiert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Lysispuffer	50 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerin 1 % Triton X-100 <i>frisch zugeben:</i> 10 mM Natriumfluorid 1 mM Natriumorthovanadat 10 µg/ml Aprotinin 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
-------------	---

HNTG-Puffer		20 mM HEPES 150 mM NaCl 10 % Glycerin 10 mM Natriumpyrophosphat
Waschpuffer		20 mM Hepes 10 mM MgCl ₂ <i>frisch zugeben:</i> 400 µM Natriumorthovanadat 1 mM DTT
Kinasepuffer		Waschpuffer <i>frisch zugeben:</i> 1 µg/µl MBP 50 µM ATP 1 µCi [γ - ³² P] ATP 5 mM para-Nitrophenylphosphat
reduzierender Lämmli-Puffer (2x)		62,5 % Tris-HCl; pH 6,8 4 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β -Mercaptoethanol
SDS/PAGE	15% Trenngel	40 % Total Bis Acrylamide, 2,67 % Crosslinker (BIS) 1,5 M Tris, pH 8,8 0,1 % SDS 0,01 % Temed 10 % APS ad 50 ml H ₂ O _{bidest.}
	Sammelgel	40 % Total Bis Acrylamide, 2,67 % Crosslinker (BIS) 0,5 M Tris, pH 6,8 0,1 % SDS 0,01 % Temed 10 % APS ad 10 ml H ₂ O _{bidest.}
Laufpuffer		1,92 M Glycine 0,25 M Tris 0,01 % SDS

Tiefgekühltes Plazentagewebe wurde pulverisiert, und das entstandene Pulver in Lysispuffer suspendiert und durch Zentrifugieren gereinigt.

Nach einer BCA-Proteinbestimmung (C.7) und Normalisierung der Proben (Proteingehalt jeweils 400 µg) wurden die Extrakte für 4 h mit 30 µl Protein A-Agarose (Boehringer Mannheim, Nr. 85008821), die vor Gebrauch dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen wurde und jeweils 1 µg monoklonalen Antikörper gegen Erk-Protein (Sc-093), Jnk-Protein (SC-474) oder p38-Protein (SC-728) auf einem Drehrad bei 4°C rotiert. Im Anschluß wurden die

Beads dreimal mit 500 µl HNTG-Puffer gewaschen, jeweils bei 3.000 rpm abzentrifugiert, und der Überstand wurde vorsichtig mit einer dünnen Nadel abgesaugt. Pro Reaktion wurden 750 µl Waschpuffer zugegeben, kurz gemischt, 10 min inkubiert und 3 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Beads mit Kinasepuffer für 15 min bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert (Substrate für Erk-, Jnk- und p38-MAPK im Kinasepuffer waren jeweils basisches Myelin (MBP), GST-c-Jun (Glutathione S-Transferase) und GST-ATF-2). Durch Zugabe von reduzierendem Lämmli-Puffer und Erhitzen auf 95 °C für 3 min wurde die Reaktion gestoppt. Die Reaktionsgefäßdeckel wurden durch Kappen gesichert. Nach 5 min Zentrifugation bei 14.000 rpm wurden die Beads entfernt und der Überstand in einer 12-15 % (abhängig vom MAPK-Protein) SDS/PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und bei -80 °C für mehrere Stunden autoradiographiert. Die Radioaktivität wurde quantitativ mittels Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) bestimmt. Für jeden Versuch wurden Kontroll-Western Blots (C.7) mit einem Antikörper gegen das jeweilige MAPK-Protein durchgeführt.

Zur Standardisierung der placentaren Jnk-, Erk- und p38-MAPK Aktivität wurden NIH3T3-Zellen durch jeweils 0,5 M Sorbitol (15 min), 10 ng/mL EGF (30 min) und 10 µg/ml Anisomycin (30 min) stimuliert. Jedes Gel enthielt eine Probe derselben Zellstimulation (C.2.4). Die MAPK-Aktivität in der Plazenta wurde in Beziehung zu NIH3T3 MAPK-Aktivität gleich 100 % gesetzt. Jedes Experiment wurde 3 mal zur Untersuchung von Erk-, Jnk- und p38-MAPK Aktivität wiederholt.

5.2 Erk-Kontroll-Western Blot nach Kinasereaktion

Nach Auftrennung der radioaktiven Proben in einer 15 % SDS/PAGE wurde das Gel bei der 30 kDa Bande des Molekulargewichtsmarkers mit dem Skalpell durchtrennt. Der untere Teil des Gels, in dem sich bei 21 kDa die Bande des radioaktiv phosphorylierten MBP befindet, wurde getrocknet und bei -80 °C für zwei Stunden autoradiographisch detektiert (s.o.).

Erk-Proteine (42-44 kDa), die im oberen nichtradioaktiven Teil des Gels liegen, wurden auf Nitrocellulose geblottet (C.7) und entsprechend dem Western Blot Protokoll verfahren.

C.6 Rac1-Aktivitätsassay

Ein distaler Bindungspartner von Rac1 ist die Serin-Threonine Kinase Pak1 oder p21-activated kinase, die den Jnk-Signaltransduktionsweg stimulieren kann. Pak1 wird aktiviert, indem seine p21-Bindungsdomäne aktives Rac1 (aktives GTP-Rac1) bindet. Die Rac1 Aktivität wurde mittels Pull-down Assay bestimmt, indem aktives GTP-Rac1 spezifisch im Plazentagewebe mittels der p21 proteinbindenden Domäne (GST-PBD) von PAK1, präzipitiert wurde⁴⁶. Anschließend wurde aktives GTP-Rac1 mit einem Rac1 monoklonalen Antikörper⁶ im Western Blot bestimmt. Diese Methode wurde zum ersten Mal im Gewebe angewandt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Bindungspuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM DTT 30 mM MgCl ₂ 40 mM NaCl 0,5 % Nonidet P-40
Waschpuffer mit NP-40	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM DTT 30 mM MgCl ₂ 40 mM NaCl 1 % Nonidet P-40
Waschpuffer ohne NP-40	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM DTT 30 mM MgCl ₂ 40 mM NaCl
Lämmli-Puffer reduzierend (3 x)	62,5 % Tris-HCl; pH 6,8 6 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol

Durchführung:

Plazentaextrakte (400 µg) wurden mit 10 µg Glutathion S-Transferase (GST)-PBD und 15 µl gewaschene Glutathione Sepharose 4B-Beads in Bindungspuffer für 1 Stunde bei 4° C auf dem Drehrad inkubiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 3.000 rpm, wurde der Überstand, der das GDP-gebundene Rac1 enthält, abgenommen und asserviert. Die Beads wurden 3 mal in Bindungspuffer mit 1 % Nonident P-40 gwaschen, 2 mal mit demselben Puffer ohne Nonidet P-40 und zum Schluß in 3 x reduzierendem Ladungspuffer resuspendiert. Sowohl die

Proteine an den Beads mit aktivem GTP-Rac1 (mit Hilfe rekombinanter GST-PBD (PAK1)), als auch ungebundenes inaktives GDP-Rac1 des Überstandes wurde in einer 12.5 % SDS-PAGE aufgetrennt.

Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem monoklonalen Rac1-Antikörper detektiert (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Die quantitative Auswertung von Rac1 erfolgte nach Einscannen (Epson GT-4000 Scanner) des Blots mit der Scan Pack 3.0 Software (Biometra, Göttingen) und densitometrischer Auswertung.

C.7 Western Blot Analyse

Der Western Blot^{41,31} wird zur Detektionen von Proteinen angewandt. Die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht in einer SDS/PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (Optitran BA-S85 0,45µm; Schleicher&Schüll) geblottet. Auf der Membran fixierte Proteine können durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Folgende monoklonale Antikörper der Firma Santa Cruz, USA, wurden eingesetzt; gerichtet gegen Erk- (SC-093), Jnk- (SC-474), und p38- (SC-728).

Verwendete Puffer und Lösungen:

Lysispuffer	50 mM HEPES; pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerin 1 % Triton X-100 <i>frisch zugeben:</i> 10 mM Natriumfluorid 1 mM Natriumorthovanadat 10 µg/ml Aprotinin 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
Lämmli-Puffer reduzierend (3x)	62,5 % Tris-HCl; pH 6,8 6 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20 % Methanol

NET-Puffer (10x)	1,5 M NaCl 0,05 M EDTA 0,5 M Tris-HCl 0,5 % Triton X-100
NET-Gelatine-Puffer (1x)	100 ml 10 x NET 0,25 % (w/v) Gelatine ad 1 Liter H ₂ O _{bidest.}

Durchführung:

Die NIH3T3-Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen, 5 min in Lysispuffer lysiert und dann abgeschabt. Das Zellysate wurde bei 14.000 rpm, 4 °C, für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde der BCA-Proteinassay²⁵ eingesetzt. Die Proben wurden auf gleichen Proteingehalt normalisiert und unter reduzierenden Bedingungen mit reduzierendem Lämmli-Puffer elektrophoretisch in einer 10 % SDS/PAGE aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer, einer sogenannten „Wet-Blot“-Apparatur (Firma Biorad, München), auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Benötigt wurden vier Whatman Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran, die mit Transferpuffer benetzt wurden. Zwischen den beiden Schwämme der Transfertasche wurde wie folgt vorgegangen: Das Gel wurde auf zwei feuchte Whatman Filterpapiere gelegt, darauf kam die Nitrocellulosemembran und wieder zwei Whatman Filter als Abschluß. Die Transfertasche wird so in die Transferkammer eingesetzt, daß die Nitrocellulosemembran in Richtung Anode orientiert ist. Der Proteintransfer wurde bei 30 V über Nacht im Kühlschrank durchgeführt.

Die Nitrocellulosemembran wurde in NET-Gelatine-Puffer überführt und dreimal 20 min geblockt. Der Blot wurde anschließend mit dem Primärantikörper in NET-Gelatine-Puffer 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (oder über Nacht bei 4 °C inkubieren). Dann wurde die Membran zweimal 15 min mit NET-Gelatine-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation des Blots mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper in NET-Gelatine-Puffer für 1 h. Die Membran wurde erneut zweimal 15 min mit NET-Gelatine-Puffer gewaschen. Reaktive Proteine wurden mit ECL Reagenz nach Angabe des Herstellers sichtbar gemacht.

C.8 Western Blot nach c-Jun Phosphorylierung

Die c-Jun Phosphorylierung wurde mit einem phosphospezifischen Antikörper, der nur an Ser63 phosphoryliertes c-Jun (NEB, Beverly, MA) erkennt, detektiert. Nach Analyse der c-Jun Phosphorylierung, wurde der Blot mit einem Antikörper gegen das gesamte c-Jun (NEB, Beverly, MA) detektiert. Um die Erk-, Jnk- und p38-Expression zu bestimmen, wurden jeweils die Antikörper C16, C17 und N20 (alle von Santa Cruz, CA) benutzt. Die Proteinexpression wurde densitometrisch quantifiziert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Transferpuffer	25 mM Tris 0,2 M Glycin 20 % Methanol, pH 8,5
SDS-Ladungspuffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25 °C 2 % SDS 10 % Glycerol 50 mM DTT 0,1 % Bromphenolblau
Blocking-Puffer	1 x TBS 0,1 % Tween-20 mit 5 % fettarme Trockenmilch
10 x TBS	200mM Tris 1,4 M NaCl pH 7,6 mit HCl
Erstantikörper-Lösung	1 x TBS 0,1 % Tween-20 mit 5 % BSA
Waschpuffer	1 x TBS 0,1 % Tween-20

Durchführung:

Die Zellen wurden in SDS-Ladungspuffer (4 °C) aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min bei 95-100 °C gekocht und im Eis abgekühlt. Nach 5 min Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4 °C, wurden die Proben auf eine SDS/PAGE aufgetragen und aufgetrennt. Nach dem Transfer auf die Nitrocellulosemembran (Optitran BA-S85 0,45 µm; Schleicher und Schüll), wurde diese mit 25 ml TBS einmal bei Raumtemperatur 5 min gewaschen. Die Membran wurde mit 25 ml Blocking-Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert, anschließend wurde dreimal mit 15 ml TBST für 5 min gewaschen und dann der Erstantikörper (Phospho-specific c-Jun Ak, New England Biolabs, Inc.) mit 10 ml Erstantikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C auf

einer Wippe langsam geschüttelt. Am folgenden Tag wurde wieder dreimal mit 15 ml TBST für jeweils 5 min gewaschen.

Im Anschluß wurde die Membran mit HRP konjugiertem 2. Antikörper (1:2000) und HRP-konjugiertem anti-Biotin Antikörper (1:1000) in 10 ml Blocking-Puffer für 1 Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 15 ml TBST für 5 min, wurde die Membran mit 10 ml LumiGLO (New England Biolabs, Beverly, USA) inkubiert und nach Angabe des Herstellers detektiert.

C.9 Präparation von pGEX-GST-Fusionsproteinen

Verwendete Puffer und Lösungen:

TS-Puffer	50 mM Tris-HCL pH 8,0 25 % Saccharose ad 25 ml H ₂ O _{bidest}
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCL pH 8 10 mM DTT 15 mM reduziertes Glutathion ad 10 ml H ₂ O _{bidest}
reduzierender Lämmli-Puffer (2x)	62,5 % Tris-HCl; pH 6,8 4 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol

Durchführung:

Bakterienkultur: Eine 50 ml-Übernachtskultur der transformierten Bakterien (LB mit entsprechendem Antibiotikum, 50 µl Ampicillin (100 mg/ml), mit einer Spatelspitze Bakterien (bei -80°C eingefroren)) wurde vorbereitet und angelegt.

Kontrollinduktion: Mit der 50 ml-Übernachtskultur wurde eine 1000 ml LB-Kultur angeimpft, mit ca. 1000 µl Ampicillin (100 mg/ml) versehen und bei 37 °C für ca.1 h im Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl 1 M IPTG-Stammlösung (500 µm) wurde weitere 4 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Es wurde bei 5.700 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag in 20 ml eiskaltem TS-Puffer ohne Blasenbildung bei 4 °C resuspendiert, danach in einen Zentrifugenbecher für eine Tischzentrifuge überführt. Nach Zugabe von 4 ml Lysozym (20 mg/ml), wurde das Ganze 2 mal vorsichtig geschwenkt (nicht schütteln!) und für 15 min auf Eis inkubiert. Es wurden

2 ml EDTA (0,5 M, pH 8) und 100µl Aprotinin-Stammlösung (2mg/ml) zugegeben, wiederum 2 mal geschwenkt (nicht schütteln!) und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml 100 % Triton X-100 wurde wieder 2 mal vorsichtig geschwenkt (nicht schütteln!) und für 1 weitere Stunde auf Eis inkubiert. Es wurde bei 15.000 rpm (Rotor FO685 der Tischzentrifuge) und bei 4 °C für 45 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 ml Glutathion-Sepharose 4B-Beads wurde über Nacht bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Die Beads wurden in der Tischzentrifuge (Rotor CO 650) mit 2.000 rpm für 30 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verwahrt, die Beads 3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen, dabei wurden die Beads jeweils in 40 ml eiskaltem PBS durch Schütteln resuspendiert und in der Tischzentrifuge bei 2.000 rpm, 10 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für Kontrollen auf dem Gel aufbewahrt.

Die Präparation des Fusionsproteins erfolgte im Kühlraum (4 °C): Die Beads wurden in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert und für 10 min zum Sedimentieren in eine Kolumne gefüllt.

Zunächst wurden 10 ml ausgelassen, wobei die Beads dabei nicht trockenlaufen dürfen. Danach erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Elutionspuffer, um anschließend die ersten 500 µl als 1. Fraktion (30 µl für *Gelprobe 1* aufbewahren) aufzufangen, in der jedoch noch kein Fusionsprotein enthalten ist. Die nächsten vier 1 ml-Fraktionen wurden durch jeweilige Zugabe von 1 ml Elutionsfraktionen gewonnen.

Aus den einzelnen Proben wurden jeweils 30 µl für die SDS/PAGE aufbewahrt

(Gelproben 2-5)

Kontrollauftrag auf 10 % SDS/PAGE: Fusionsproteine aus den unterschiedlichen Fraktionen, Molekulargewichtsmarker, und ein Kontrollprotein (BSA) wurden in einer 10 % SDS/PAGE aufgetrennt. Dazu wurde gleiche Menge Probe und Lämmli-Puffer 10 min bei 100 °C gekocht, 5 s bei 14.000 rpm zentrifugiert und 20 µl des Überstandes zur Proteintrennung aufgetragen. Das Gel wurde 30 min fixiert, etwa 10 min mit Coomassie gefärbt, 1 h entfärbt und mit Wasser gespült. Das Gel wurde im Gelrockner bei 80 °C für 1 h 30 min getrocknet. Zum Tiefgefrieren des Fusionsproteins wurden 1 ml Fusionsfraktion mit 1 ml 100 % Glycerin (15 µl Probe entsprechen etwa 15 µg Protein) versetzt.

C.10 Statistik

Die statistische Signifikanz der Daten wurden mit dem Programm SPSS 8.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) berechnet. Um die Unterschiede der gesamten Niveaus der Jnk-, Erk- und p38-MAPK, Rac1 und c-Jun in den unterschiedlichen Gruppen zu analysieren, wurde ein nicht-parametrischer Vergleich von mehr als 2 Gruppen mittels des Kruskal-Wallis Test ausgeführt. Im Falle signifikanter Unterschiede wurde ein nicht-parametrischer Vergleich von 2 Gruppen mit dem Mann-Whitney U-Test ausgeführt. Es wurden nur Ergebnisse mit einer Signifikanz von $p < 0.05$ berücksichtigt.

D. Ergebnisse

D.1 Charakterisierung der Patientinnen

Demografische Daten der Frauen, die für diese Studie als Teilnehmerinnen ausgewählt wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen, die das mütterliches Alter und die Parität betreffen

Das Geburtsgewicht war in den Gruppen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom signifikant niedriger als in den Kontrollgruppen der vaginalen Entbindungen und Kaiserschnittentbindungen. Der Median des kindlichen Geburtsgewichtes von Müttern mit HELLP-Syndrom war 600 g höher als das der Patientinnen mit Präeklampsie, was zumindestens teilweise durch das fortgeschrittene Schwangerschaftsalter bei der Entbindung (38,2 gegenüber 35,2 Wochen) zu erklären ist.

Tabelle 1. Patientinnencharakteristik

	Präeklampsie (n=8)		HELLP (n=8)		Vaginale Entbindung (n=8)		Kaiserschnitt (n=8)	
	Median	Bereich	Median	Bereich	Median	Bereich	Median	Bereich
Alter der Mutter (J)	30.5	19-39	29.1	24-37	31.2	22-34	32.9	26-38
SSW bei Geburt	35.2	28-41	38.2	29-41	38.8	37-42	38.2	38-39
Geburtsgewicht (g)	2045	910- 3250	2650	1010- 4250	3360	2960- 3820	3220	2570- 3810
Kaiserschnitt (n)	8		8		0		8	

SSW = Schwangerschaftswoche, n = Anzahl, J = Jahre

D.2 Herunterregulierung des Jnk-MAPK-Signaltransduktionsweges bei hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen

Die Funktion des Mitogen activated protein kinase-Weges wird im wesentlichen über die Aktivität, nicht über die Proteinexpression der entsprechenden Signaltransduktionsmoleküle reguliert⁴². Deswegen untersuchten wir Jnk-, Erk- und p38-MAPK-Aktivität.

Die MAPK-Aktivität wurde durch einen Immunopräzipitations-Kinase-Assay aus Biopsien der Plazenta, die direkt nach vaginalen Entbindungen oder Kaiserschnittentbindungen entnommen wurden, bestimmt. Die Jnk-MAPK Aktivität war im Plazentagewebe von Frauen mit Präeklampsie signifikant erniedrigt (Abbildung 3, obere Banden), verglichen mit Kontrollplazenten von vaginalen Entbindungen ($p = 0,001$) oder Schnittentbindungen ($p = 0,006$). Jnk-MAPK-Aktivität in Plazenten von Frauen mit HELLP-Syndrom unterschieden sich nicht von denen mit Präeklampsie, waren aber signifikant niedriger, verglichen mit der Gruppe von Frauen mit vaginalen Entbindung ($p = 0,002$) oder Schnittentbindungen ($p = 0,027$).

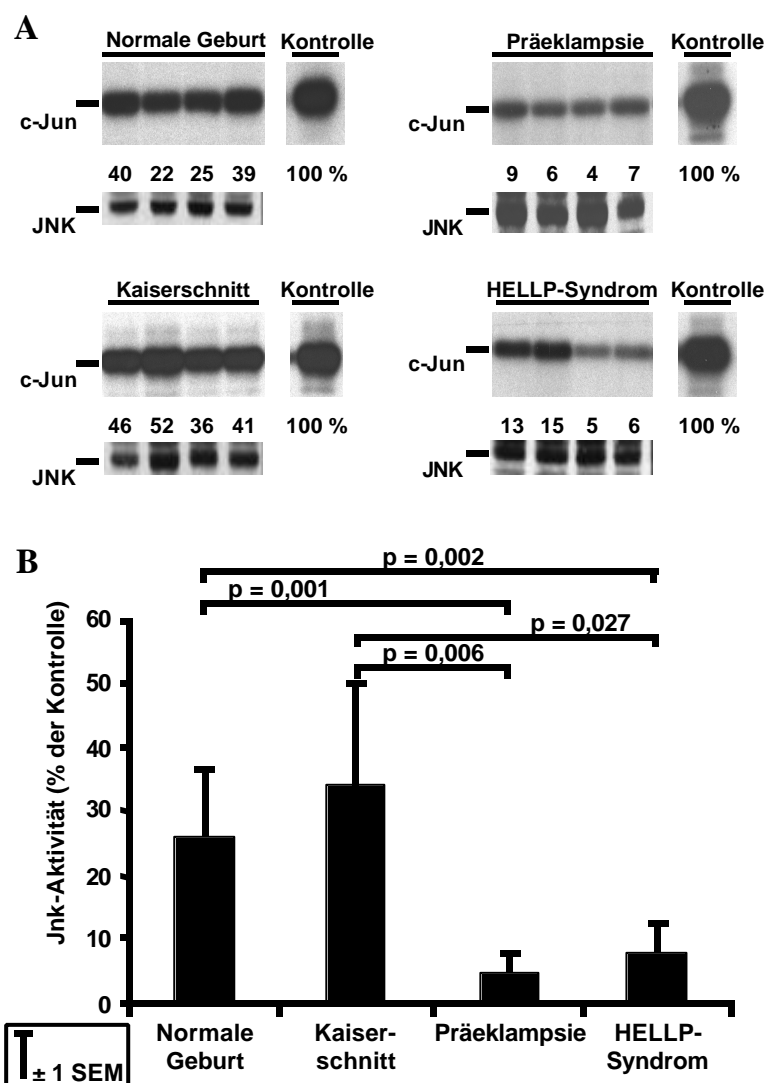


Abbildung 3. "Downregulierung" der Jnk-MAPK-Aktivität im Plazentagewebe von Patientinnen mit Präeklampsie oder HELLP. Die Aktivität der Jnk-MAPK im Plazentagewebe der untersuchten Patientinnen wurde mit rekombinantem c-Jun als Substrat durch den Immunopräzipitations-Kinase-Assay bestimmt (obere Banden). Die Radioaktivität wurde mit dem Phosphorimager quantifiziert und in Bezug zu Sorbitol-stimulierten NIH3T3-Zellen als Kontrollen gesetzt. Jede Jnk-Proteinexpression wurde durch Immunoblots bestätigt (untere Banden).

Im Western Blot mit einem gegen Jnk-MAPK gerichteten Antikörper fanden sich in allen untersuchten Geweben gleiche Mengen an Jnk-Protein (Abbildung 3, untere Banden). Diese Daten zeigen, daß sich nur die Jnk-Aktivität, nicht aber die Jnk-Proteinexpression, in den analysierten Gruppen unterscheidet.

Die p38-MAPK-Aktivität war in Plazenten von Patientinnen mit HELLP-Syndrom signifikant niedriger als bei Präeklampsie ($p = 0,022$), jeweils unter und über dem Median der Aktivität in den Kontrollgruppen liegend und damit zu diesen nicht signifikant verändert (Abbildung 4). Es gab keine Unterschiede in der p38-MAPK-Proteinexpression zwischen allen Untergruppen.

Die Erk-MAPK-Aktivität war bei der Präeklampsie ähnlich dem HELLP-Syndrom und den Kontrollgruppen; dafür konnte keine statistische Signifikanz gefunden werden (Daten nicht aufgeführt).

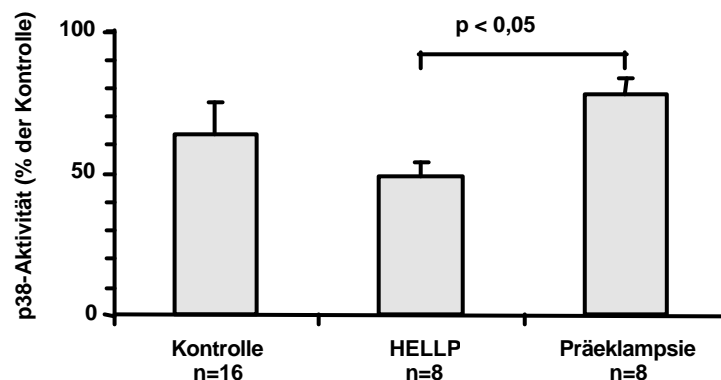


Abbildung 4: p38-Aktivität im Plazentagewebe bei HELLP-Syndrom und Präeklampsie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Aktivität ist angegeben in Prozent des mitgeführten Standards.

D.3 Eingeschränkte c-Jun Phosphorylierung bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom

Um zu untersuchen, ob andere Mitglieder des Jnk-Signaltransduktionsweges (Abbildung 2) im Plazentagewebe von Frauen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom herunterreguliert sind, untersuchten wir ein dem Jnk-Signaltransduktionsweg übergeordnetes Protein, das Jnk aktiviert Rac1⁹, und den durch Jnk-MAPK phosphorylierten Transkriptionsfaktor c-Jun^{43,42}. Durch die Phosphorylierung von c-Jun wird seine Transkriptionsfaktor-Aktivität reguliert. Daher wurde der Status der Phosphorylierung von endogenem c-Jun untersucht (Abbildung 5).

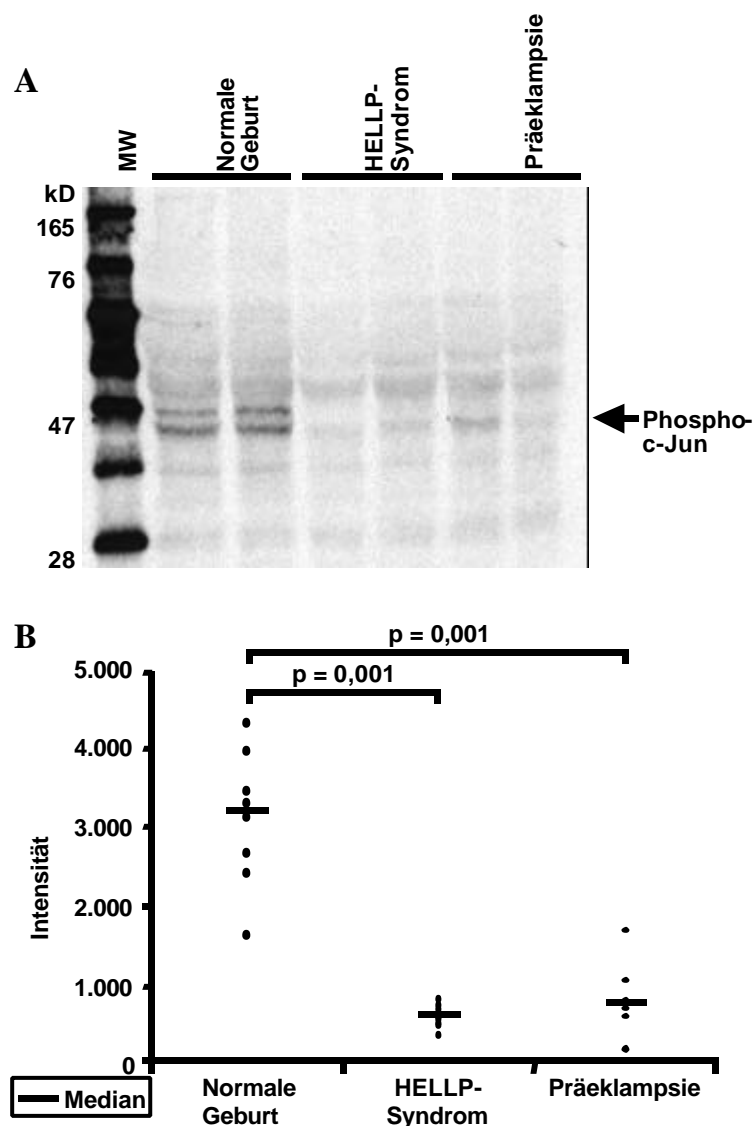


Abbildung 5. Eingeschränkte c-Jun Phosphorylierung im Plazentagewebe von Patientinnen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom, bestimmt durch Western Blot/Immunoblotting mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes c-Jun. Ergebnisse bei Kaiserschnitt waren denen bei vaginalen Entbindungen ähnlich.

Übereinstimmend mit der "Downregulierung" der Jnk-Aktivität bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom, wurde kein phosphoryliertes c-Jun im Plazentagewebe dieser Patientengruppen gefunden, konnte aber in Plazenten von Frauen mit vaginaler Entbindung bzw. Schnittentbindung nachgewiesen werden ($p = 0,001$). Versetzt man auf dem Blot mit einem Antikörper gegen phosphorylierte und unphosphorylierte Formen von c-Jun, so zeigt sich eine ähnliche Proteinexpression für c-Jun in allen Proben (Daten nicht gezeigt). Auch hier liegt die aktivierte Form in vermindertem Umfang vor, die Expression des Proteins ist nicht betroffen.

D.4 Verminderte Rac1-Aktivität bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom

Die Rac1Aktivität wurde in einem "Pull-down"-Assay bestimmt, der die Bindung von aktivem GTP-Rac1 an PAK1 (einem downstream effector von Rac1, Abbildung 2) mißt, gefolgt von einem Western Blot mit einem Rac1 spezifischem Antikörper (Abbildung 6). Rac1 im aktiven, GTP-gebundenen Zustand war in Plazenten von normaler Geburten und Schnittgeburten stärker nachweisbar als in Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie ($p = 0,003$) oder HELLP-Syndrom ($p = 0,002$). Im Gegensatz dazu war die Detektion von nicht aktivem GDP-Rac1 (Abbildung 6) in allen Plazentageweben ähnlich (Abbildung 6, untere Bande).

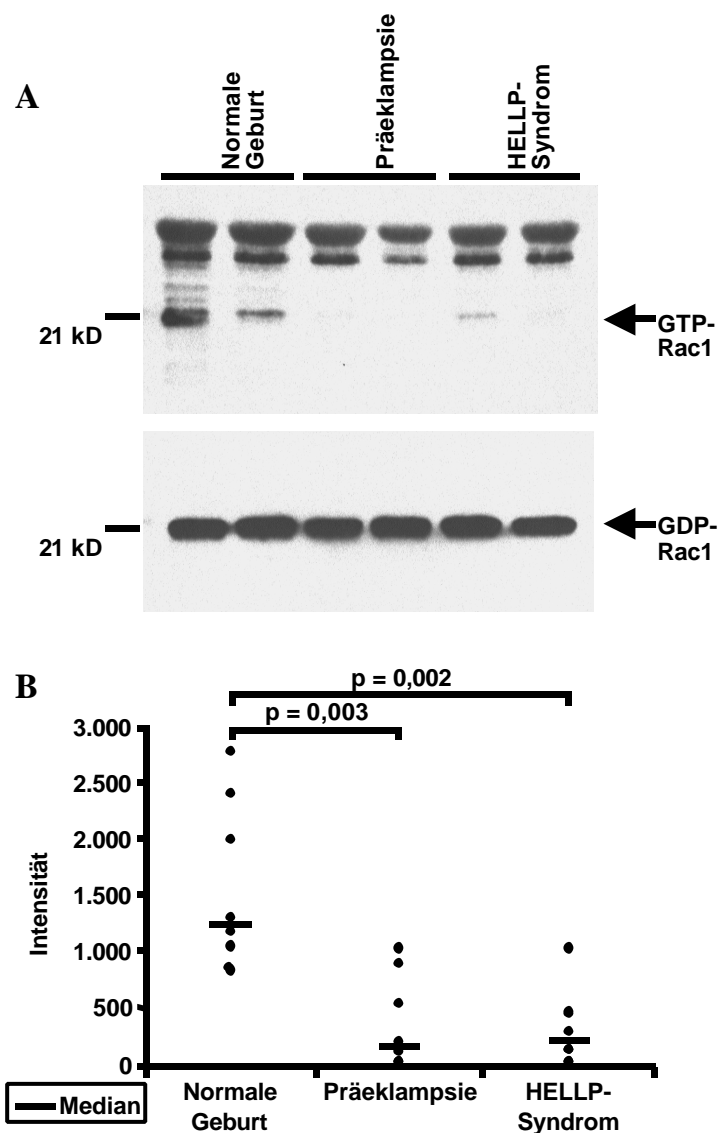


Abbildung 6. Verminderte Rac1-Aktivität im Plazentagewebe von Patientinnen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom. Gleiche Mengen Gewebeextrakt der Plazenta der gezeigten Patientinnen wurden im pull-down assay mit Hilfe von GST-PAK1/PBD, das nur aktiviertes GTP-Rac1 bindet, untersucht. Die Beads (obere Banden) enthalten aktives GTP-Rac1 und der Überstand (untere Banden), inaktives GDP-Rac1 enthaltend, wurde auf ein SDS/PAGE aufgetragen und anschließend mit einem gegen Rac1 gerichteten Antikörper geblottet. Ergebnisse bei Kaiserschnitt waren denen bei vaginalen Entbindungen ähnlich.

E. Diskussion

Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen sind Hauptursache maternaler und perinataler Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt^{12,39}. Die Ätiologie ist bisher ungeklärt, es gibt aber Hinweise, daß verschiedene Funktionen (Invasion, Motilität, Adhäsion) der Trophoblastzellen gestört sind. Durch eine verminderte Invasion der Trophoblastzellen in den Uterus kommt es zu einer gestörten Implantation der Plazenta und einer unzureichenden Erweiterung der dezidualen Spiralarterien^{7,55,36} in der Frühschwangerschaft. Ferner ist die ausbleibende Differenzierung der Trophoblastzellen beeinträchtigt, mit gestörter Anpassung ihrer Adhäsionsmoleküle während dieses Invasionsprozesses^{34,55}. Wichtige Prinzipien über die plazentare Entwicklung von Mäusen sind durch von Cross et al. berichtet worden. Danach können verschiedene molekulare Wege die Differenzierung verschiedener Trophoblastzell-Untertypen regulieren, was u.a. zu Veränderungen der Trophoblastinvasion führen kann¹⁰. Andere Untersuchungen zeigen Veränderungen des Endothels; vasoaktive Systeme des Endothels (vor allem Stickstoffmonoxid, Prostazyklin und Endothelin)⁵, führen bei Präeklampsie zur Vasokonstriktion. Endothelveränderungen werden auch von Haller et al. beschrieben; dabei erhöht die Zugabe von Serum von Frauen mit Präeklampsie die endotheliale Permeabilität im Laborversuch signifikant. Serum von präeklampsischen Patientinnen enthält Faktoren, die die Zellpermeabilität erhöhen, ein Effekt, der durch Proteinkinase-Isoformen vermittelt sein könnte²¹. Wieder andere Untersuchungen beschreiben Präeklampsie als Zustand eines möglichen Stickstoffmonoxidmangels⁸. Es wird eingeräumt, daß NO eines von verschiedenen Systemen sein kann, die in ihrer Gesamtheit wirken, um eine symbiotische Beziehung zwischen Mutter und Kind aufrecht zu erhalten.

Die Regulierung von Vorgängen wie Differenzierung oder Invasion von Zellen kann in Reaktion auf externe Stimuli über zelluläre Signaltransduktionswege erfolgen. Diese Signaltransduktionswege vermitteln den Informationstransport von Signalen, die auf die Zellmembran treffen, in den Zellkern, so daß eine spezifische Reaktion der Zelle auf Signale von außen ermöglicht wird. So leitet der MAPK-Signaltransduktionsweg nach Aktivierung von membranständigen Rezeptortyrosinkinasen mitogene aber auch Streßsignale weiter, um schließlich Transkriptionsfaktoren und deren Zielgene zu aktivieren⁴².

An Faktoren des MAPK-Signaltransduktionsweges ist vor allem im Zusammenhang mit der Onkogenese geforscht worden; es finden sich bisher nur wenige Angaben in der Literatur über entsprechende Vorgänge in der Plazenta: In isolierten Trophoblastzellen aktiviert Placenta Growth Factor (PlGF), ein Mitglied der VEGF-Familie, den Jnk- und in geringerem Umfang

auch den p38-MAPK-Weg, bewirkt aber wenig bis keine Induktion von Erk-Aktivität¹³. PIGF ist bei Präeklampsien im mütterlichen Serum signifikant reduziert⁵². Zur plazentaren Expression von PIGF bei Präeklampsien finden sich keine Daten in der Literatur, nur der indirekte Hinweis, daß PIGF unter hypoxischen Bedingungen, wie sie in Präeklampsie-Plazenten herrschen, von kultivierten Trophoblastzellen vermindert exprimiert wird, im Gegensatz zu VEGF, das hochreguliert wird^{47,27}.

Experimente aus der Arbeitsgruppe von S. Fisher, San Francisco, zeigten, daß der Wachstumsfaktor EGF, der zur Aktivierung des Jnk-Signaltransduktionsweges führen kann, die Invasion von Trophoblastzellen verstärkt⁴. In derselben Arbeitsgruppe wurde auch gefunden, daß isolierte Trophoblastzellen, die unter den üblichen Kulturbedingungen mit 20 % Sauerstoff differenzieren und invadieren, unter hypoxischen Bedingungen, wie sie in Plazenten bei Präeklampsie angenommen werden, ihr Integrinrepertoire nicht entsprechend anpassen und nicht zur Invasion fähig sind; damit zeigen sie zum Teil Veränderungen wie bei Präeklampsie¹⁷. Es findet sich in der Literatur jedoch kein Hinweis auf Untersuchungen der MAPK-Signaltransduktionswege in der Plazenta, mit Ausnahme der von unserer Arbeitsgruppe im Oktober erschienen Publikation²².

Unsere Untersuchungen zeigen auf, daß der Rac1/Jnk/c-Jun-abhängige Signaltransduktionsweg bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom herunterreguliert wird. Der Entbindungsmodus beeinflußt die MAPK-Aktivität nicht; keine der drei untersuchten MAPK (Jnk-, Erk-, p38-MAPK) zeigte Unterschiede in der Proteinaktivität oder Expression zwischen den Untergruppen der Patientinnen vaginaler Entbindungen oder Kaiserschnittentbindungen. Einige Signalproteine können die GTPase Rac1 an Jnk-MAPK binden und sind Teil der Jnk Signalkaskade (Abbildung 2). Ein möglicher Effektor³ von Rac1 ist die Serin-Threonin-Kinase PAK1, die den Jnk-Signaltransduktionsweg stimulieren kann²⁸ und durch Bindung ihrer proteinbindenden Domäne an GTP-Rac1 aktiviert wird.

Andere mögliche Brücken zwischen Rac1 und Jnk sind die *mixed lineage kinase* (MLK) und MEKK, welche beide durch Bindung von GTP-Rac1 effektive Aktivatoren des Jnk-Signaltransduktionsweges sind^{3,1,15}. Die Aktivität und das Expressionsniveau dieser Proteine in der Plazenta sind momentan unbekannt, und weitere Studien sind notwendig, um die vollständige Jnk-Signalkaskade aufzuklären, die bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom beeinträchtigt ist.

Ein Hauptproblem bei Hochdruckerkrankungen in der Schwangerschaft ist die Insuffizienz des uteroplacentaren Zirkulationssystems, die von einer mangelnden endovaskulären Invasion der Trophoblastzellen in mütterliche Spiralarterien zwischen der 14. und 20.

Schwangerschaftswoche herrührt^{40,56}. Dies führt zu chronischer Hypoxie in der Plazenta¹⁷. In einem Hypoxiemodell mit Rattennieren und -herzen konnte gezeigt werden, daß verlängerte Ischämie zur "Herunter-Regulierung" der Jnk-MAPK-Aktivität führt, wohingegen akute Hypoxie zur "Hoch-Regulierung" der Jnk-MAPK-Aktivität führt^{38,30}.

Eine Erklärung für die verminderte Jnk-MAPK-Aktivität in Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie oder HELLP-Syndrom könnte der chronisch hypoxische Zustand dieser Plazenten sein. Für Präeklampsie ist eine gestörte Expression bestimmter Proteasen und ihrer Inhibitoren in der Plazenta gezeigt worden³⁴. Eine Protease³³, die eine wichtige Rolle in der Trophoblastinvasion spielt, ist die Matrixmetalloprotease-9 (MMP-9), deren Expression in der Plazenta bei einer hypertensiven Erkrankung reduziert ist^{29,34}. Bei der Invasion von Tumorzellen wird die MMP-9 Expression über den Jnk-Signaltransduktionsweg reguliert¹⁹. Deshalb kann unser Befund, daß der Jnk-Signaltransduktionsweg bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom herunterreguliert wird, die reduzierte plazentare MMP-9-Expression bei Präeklampsie erklären.

Da wir MAPK-Aktivität bei der Entbindung, bis zu 20 Wochen nachdem die Trophoblastinvasion abgeschlossen war, gemessen haben, können wir eigentlich noch keine Aussagen darüber machen, ob Veränderungen der MAPK-Aktivität bereits früher in der Schwangerschaft auftreten. Ein HELLP-Syndrom kann eine bereits bestehende Präeklampsie komplizieren oder es kann unabhängig davon ohne Hypertonie, Ödeme und Proteinurie auftreten¹². Es ist nach wie vor strittig, ob Präeklampsie und HELLP-Syndrom ein gemeinsames Krankheitsbild mit gemeinsamen pathophysiologischen Ursprung darstellen, oder ob sie voneinander vollständig unabhängige Entitäten sind^{49,50}. Hinweise auf unterschiedliche Pathomechanismen von Präeklampsie und HELLP-Syndrom finden sich in der Literatur nicht¹¹. Unsere Ergebnisse zeigen, daß bei beiden Krankheitsbildern eine verminderte Aktivität des Jnk-Signaltransduktionsweges vorliegt, was auf Ähnlichkeiten in der Pathophysiologie hindeutet. Jedoch unterscheiden sich die p38-MAPK-Aktivitäten in diesen Krankheiten signifikant mit erhöhter p38-MAPK-Aktivität bei Präeklampsie gegenüber dem HELLP-Syndrom. Die offensichtlichen Unterschiede der p38-MAPK-Aktivität bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom könnten ein erster Hinweis auf die Unterschiede in der Pathogenese der beiden Erkrankungen sein, die schließlich zur Entwicklung unterschiedlicher Krankheitssymptome führen.

Wir konnten somit zeigen, daß die Aktivität eines Rac1/Jnk/c-Jun-abhängigen Signaltransduktionsweges bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom herunterreguliert ist²². Unter der Annahme, daß die Veränderungen bereits zu Beginn des 2. Trimenons vorliegen,

kann man spekulieren, daß die verminderte Aktivität des Jnk-Signaltransduktionsweges eine verminderte Transkription der Gene, die für Invasion, Proliferation und Adhäsion von Trophoblastzellen wichtig sind, zur Folge hat. Hierin könnte die Ursache für einige der beobachteten Störungen der Trophoblastzell-Funktionen zu finden sein, die über eine gestörte Trophoblastinvasion in die mütterlichen Spiralarterien zur Hypoxie in der Plazenta und letztlich zur Entwicklung der systemischen Erkrankung der Mutter führen.

Ausblick

Da der MAPK-Signaltransduktionsweg viele Zellfunktionen reguliert, die bei Präeklampsie oder HELLP-Syndrom in der Plazenta gestört sind, und wir nun eine Inaktivierung des Jnk-MAPK-Weges zeigen konnten, liegt die Vermutung nahe, daß man mit einer iatrogenen Aktivierung des Jnk-Signaltransduktionsweges Schwangerschaftshochdruckerkrankungen behandeln könnte. Hierfür müßten jedoch noch genauere Kenntnisse über Zusammenhänge der Signaltransduktionswege, z.B. auch der Veränderung der MAPK-spezifischen Phosphatasen, erworben werden.

Eine neue Technik zur Erforschung differentieller Genexpression in Geweben ist die der Gene-Microarrays, mit Hilfe derer die mRNA-Expression Hunderten oder Tausender von Genen in einem Ansatz untersucht werden kann. In Weiterführung der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München mit dieser Technik durchgeführt und bereits einige andere Gene, die in der Plazenta bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom in reduziertem oder gesteigertem Umfang exprimiert werden (z.B. TIMP-2, VEGF-Rezeptor Typ-1 oder Integrin $\beta 4$), identifiziert³⁷.

Da wir allerdings jene Frauen, die im Verlauf der Schwangerschaft eine Gestose entwickeln, nicht frühzeitig identifizieren können, ist eine Überführung unserer Erkenntnisse in die Klinik derzeit noch nicht möglich. Unter der Leitung von GA Dekker, Adelaide, Australien, unter Einschluß unserer Frauenklinik, sollen in einer weltweiten Studie der WHO (mit einer Fallzahl von ca. 6000 Frauen) aus deren Blut verschiedene Parameter mit dem Ziel der Früherkennung der Präeklampsie bestimmt werden. Diese Untersuchungen sollen zur weltweiten Etablierung von Screening-Tests zur Früherkennung gefährdeter schwangerer Frauen führen.

F. Zusammenfassung

Hintergrund: Mitogen aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signaltransduktionswege regulieren verschiedene Gene, die der Pathophysiologie der Präeklampsie und HELLP-Syndrom involviert sind. Wir untersuchten, ob die Aktivität der drei MAPK (jun-aminoterminal kinase (Jnk), extracellular regulated kinase (Erk), und p38) im Plazentagewebe von Frauen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom verändert ist.

Methoden: In der Plazenta wurde die Aktivität (bestimmt mit dem Immunopräzipitation-Kinase Assay) und die Proteinexpression (bestimmt durch Western Blot) der Jnk-, Erk- und p38-MAPK in vier Gruppen von jeweils 8 Frauen mit Präeklampsie, HELLP-Syndrom, normal vaginaler und Kaiserschnittentbindung bestimmt. Zur weiteren Charakterisierung des Jnk-Signaltransduktionsweges wurde die Phosphorylierung von c-Jun, einem durch Jnk phosphorylierten Transkriptionsfaktor, durch Western Blot analysiert, und die Aktivität von Rac1, einem übergeordneten Aktivator im Jnk-Signaltransduktionsweges, durch einen "pull-down"-Assay bestimmt.

Ergebnisse: Die Aktivität der Jnk-Mitogen activated protein kinase ist in Plazenten von Patienten mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom signifikant erniedrigt, verglichen mit normal vaginalen Entbindungen, Kaiserschnittentbindungen und Frühgeburten, während die Jnk-Proteinexpression ähnlich war. Auch die Phosphorylierung des c-Jun Transkriptionsfaktors sowie die Rac1-Aktivität waren in den Fällen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom signifikant niedriger als in den Kontrollgruppen. Die p38-MAPK Aktivität war signifikant höher bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom. Es gab keine Veränderungen der Erk-Aktivität und der Proteinexpression zwischen den Untergruppen.

Interpretation: In Plazenten von Patienten mit Präeklampsie oder HELLP-Syndrom ist der Rac1/Jnk/c-Jun-abhängige Signaltransduktionsweg herunterreguliert.

G. Literaturverzeichnis

1. van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes and Development* 1997; 11:2295-2322.
2. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG technical bulletin no. 219. ACOG 1996;
3. Aspenström P. Effectors of the Rho GTPases. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1999; 11:96-102.
4. Bass KE, Morrish D, Roth I, Bhardwaj D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Dev Biol* 1994; 164(2):550-561
5. Beinder E, Frobenius W. Die Präeklampsie: Eine Endothelerkrankung? *Dt. Ärzteblatt* 2000; 41:2044-2047
6. Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. Characterization of Rac and Cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J.Biol.Chem.* 1999; 274:13198-13204.
7. Brosens I, Robertson W, Dixon H. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1972; 1:177-191.
8. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in preeclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 1998; 4(1):25-42
9. Coso O, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind S. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc 42 regulate the activity of the JNK/SAPK signalling pathway. *Cell* 1995; 81:1137-1146.
10. Cross JC. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11(2):105-13

11. Curtin WM WL. A review of HELLP syndrome. *J Perinatol* 1999; 19(2):138-143.
12. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Amer J Obstet Gynecol* 1998; 179:1359-1375.
13. Desai J, Holt-Shore V, Torry R, Caudle M, Torry D. Signal transduction and biological funktion of placenta growth factor in primary human trophoblast. *Biol Reprod* 1999; 60(4):887-892.
14. Divecha N, Irvine RF. Phospholipid Signaling. *Cell* 1995; 80:269-278.
15. Fenger GR, Lassignal Johnson N, Johnson GL. MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J.* 1997; 16:4972
16. Garcia R, Jove R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *Journal of Biomedical Science* 1998; 5:79-85.
17. Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Pollioti BM, Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasaion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J.Clin.Invest.* 1996; 97:540-550.
18. Graham CH MKR. Altered expression of gelatinase and surface-associated plasminogen activator activity by trophoblast cells isolated from placentas of preeclamptic patients. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1996; 175(3):555-562.
19. Gum R, Wang H, Lengyel E, Juarez C, Boyd D. Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the Jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades. *Oncogene* 1997; 14:1481-1493.
20. Gutkind S. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 1998; 17:1331-1343.
21. Haller H, Hempel A, Homuth V, Mandelkow A, Busjahn A, Maasch C, Drab M, Lindschau C, Jupner A, Vetter K, Dudenhausen J, Luft FC. Endothelial-cell permeability and protein kinase C in pre-eclampsia. *Lancet* 1998; 351:945-949.

22. Hannke-Lohmann A, Pildner von Steinburg S, Dehne K, Benard V, Kolben M, Schmitt M, Lengyel E. Downregulation of a Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in the Placenta of Women with Preeclampsia. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2000; 96(4):582-587.
23. Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997; 88:333-346.
24. Hunter T. Signaling-2000 and Beyond. *Cell* 2000; 100:113-127.
25. Jänicke F, Pache L, Schmitt M, Ulm K, Thomssen C, Pechtl A, Graeff H. Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1. *Cancer Res.* 1994; 54:2527-2530.
26. Karin M, Smeal T. Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *TIBS* 1992; 17:418-422.
27. Khaliq A, Dunk C, Jiang J, Shams M, Li X, Acevedo Cea. Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in growth restriction. *Lab Invest* 1999; 79(2):151-170.
28. Knaus U, Morris S, Dong HJ, Chernoff J, Bokoch GM. Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G-protein-coupled receptors. *Science* 1995;269:221-224
29. Kolben M, Lopens A, Bläser J, Ulm K, Schmitt M, Schneider KTM, Tschesche H. Proteases and their inhibitors are indicative in gestational disease. *Europ.J.Obstet.Gyn.Reprod.* 1996; 68:59-65.
30. Laderoute KR, Mendonca HL, Calaoagan JM, Knapp AM, Giaccia AJ, Stork PJ. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression is induced by low oxygen conditions found in solid tumor microenvironments - A candidate MKP for the inactivation of hypoxia-inducible SAPK/JNK activity. *J.Biol.Chem.* 1999; 274:12890-12897.

31. Lengyel E, Stepp E, Gum R, Boyd D. Involvement of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promoter activity by *c-Ha-ras*. *J.Biol.Chem.* 1995; 270:23007-23012.
32. Lengyel E, Wang H, Gum R, Simon C, Wang Y, Boyd D. Elevated urokinase-type plasminogen activator receptor expression in a colon cancer cell line is due to a constitutively activated extracellular-signal regulated kinase 1 dependent signaling cascade. *Oncogene* 1997; 14:2563-2574.
33. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ. 92-kD Type IV Collagenase Mediates Invasion of Human Cytotrophoblasts. *J.Cell Biol.* 1991; 113:437-449.
34. Lim K-H, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun S-H, Fisher SJ. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am.J.Path.* 1997; 151:1809-1818.
35. Luttrell DK, Lee A, Lansing TJ, Crosby RM, Jung KD, Willard D, Luther M, Rodriguez M, Berman J, Gilmer TM. Involvement of pp60-*c-src* with two major signaling pathways in human breast cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1994; 91:83-87.
36. Pijnenborg R. Uterine haemodynamics as a possible driving force for endovascular trophoblast migration in the placental bed. *Med Hypotheses* 2000; 55(2):114-8
37. Pildner von Steinburg S, Kolben M, Schneider KTM, Graeff H, Schmitt M, Krüger A. Proteasen und ihre Inhibitoren in Placenten von Patientinnen mit HELLP-Syndrom. Abstract. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 2000; 1: 64
38. Pombo CM, Bonventre JV, Avruch J, Woodgett JR, Kyriakis J, Force T. The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion. *J.Biol.Chem.* 1994; 269:26546-26551.
39. Rath W, Faridi A, Dudenhausen JW. HELLP syndrome. *J Perinat Med* 2000; 28(4):249-60.
40. Redman CWG. Cytotrophoblasts: Masters of disguise. *Nature Med.* 1997; 3:610-611.

41. Ried S, Jäger C, Jeffers M, Vande Woude GF, Graeff H, Schmitt M, Lengyel E. Activation mechanisms of the urokinase-type plasminogen activator promoter by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). *J.Biol.Chem.* 1999; 274:16377-16386.
42. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1997; 9:180-186.
43. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: Activation of the jnk cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 1996; 274:1194-1197.
44. Schaefer H, Weber M. Mitogen-activated protein kinase: Specific messages from ubiquitous messengers. *Mol.Cell Biol.* 1999; 19:2435-2444.
45. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373:699-702.
46. Schnelzer A, Knaus U, Prechtel D, Dehne K, Harbeck N, Gerhard M, Schmitt M, Lengyel E. Rac1 in human breast cancer: Overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1^{ins}. submitted 1999;
47. Shore V, Wang T, Wang C, Torry R, Caudle M, Torry D. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997; 18(8):657-665.
48. Smith CL, Hager GL. Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. *J.Biol.Chem.* 1997; 272:27493-27496.
49. Smith CV. HELLP syndrome: A variant of severe preeclampsia. *Nebr.Med.J.* 1994; 79:86-87.
50. Stone JH. HELLP syndrome: hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets. *JAMA* 1998; 280:559-562.
51. Taylor R. Review: immunobiology of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:79-86.

52. Torry D, Wang HS, Wang T, Caudle M, Torry R. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2000; 179(6 Pt 1):1539-1544.
53. Vojtek AB, Der CJ. Increasing complexity of the ras signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 1998; 273:19925-19928.
54. Weinstein L. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: A severe consequence of hypertension in pregnancy. *Amer J Obstet Gynecol* 1982; 142:159-167.
55. Zhou, Y., Damsky, C. H., Chiu, K., Roberts, J. M., and Fisher, S. J. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *Journal of Clinical Investigation* , 950-960. 1993. (GENERIC)
Ref Type: Generic
56. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype - One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J.Clin.Invest.* 1997; 99:2152-2164.
57. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate - A strategy for successful endovascular invasion? *J.Clin.Invest.* 1997; 99:2139-2151.

H. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Überblick über wichtige zelluläre Signaltransduktionswege	6
Abb. 2: Kaskaden des MAPK-Signaltransduktionsweges	7
Abb. 3: Downregulierung des Jnk-MAPK bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom	26
Abb. 4: p38-MAPK-Aktivität bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom	27
Abb. 5: Eingeschränkte c-Jun Phosphorylierung bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom	28
Abb. 6: Verminderte Rac1-Aktivität bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom	30
Tabelle 1: Patientinnencharakteristik	25

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole:

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ATF2	activated transcriptions factor-2
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BSA	bovine serum albumin
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
Erk	extracellular regulated kinase
GDP	Guanosindiphosphat
GST-PBD	p21-protein binding domain
GTP	Guanosintriphosphat
HELLP	hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets Hämolyse, erhöhte Leberwerte, niedrige Thrombozyten
HPK1	hematopoetic progenitor kinase-1
IgG	Immunglobulin G
Jnk	Jun aminoternale kinase
LB	Luria Broth
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MEF2c	myocyte enhancer factor-2c

MEK	mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-1
MEKK1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1
MKK4	mitogen-activated protein kinase kinase-4
MLK	mixed lineage kinase
MBP	Myelinisch-basisches Protein
MMP	Matrixmetalloprotease(n)
PAK1	p21-activated kinase-1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Triton	Triton X-100, Octylphenolpolyethylenglykol

Einheiten:

°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
l	Liter
MM	millimolar
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s	Sekunden

J. Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, bei Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt (Leiter der Klinischen Forschergruppe) und Herrn Prof. Dr. Henner Graeff (Direktor der Frauenklinik und Poliklinik) angefertigt, denen ich für die Arbeitsmöglichkeit in der klinischen Forschergruppe und die Unterstützung dieser wissenschaftlichen Dissertation danken möchte.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Ernst Lengyel für die umfassende Betreuung dieser wissenschaftlichen Doktorarbeit. Mit viel Geduld hat er mich in die Geheimnisse der Molekularbiologie eingeführt und mir naturwissenschaftliches Denken und Arbeiten vermittelt.

Frau Kerstin Dehne danke ich für die tatkräftige Mitarbeit, Teamfähigkeit und Zuverlässigkeit.

Frau Dr. Sabine Ried, Frau Dr. Stephanie Pildner von Steinburg, Frau Claudia Jäger, Frau Sandra Hapke, Frau Dr. Fenn-Rottler, Herrn Alfred Eichbichler, Herrn Andreas Schnelzer, danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe und Hilfsbereitschaft im Labor, aber auch allen anderen Kollegen und Kolleginnen in der Klinischen Forschergruppe für ihre Hilfsbereitschaft und eine angenehme Laboratmosphäre.

Für die finanzielle Unterstützung durch Gewährung eines Stipendiums im Rahmen des Dritten Hochschulsonderprogramms (HSP III) des Freistaats Bayern möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Besonders danke ich meinem Ehemann Christian, meinen Kindern Felix und Clara, der Familie und Freunden, die mir fachlichen und menschlichen Beistand geleistet haben.