

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Professor Dr. med. Achim Rody

**Einfluss von Heparin und Vascular Endothelial Growth Factor auf die
Proliferation und Expression der Endo- β -D-glucuronidase Heparanase in
humanen Chorionkarzinom-Zellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

Vorgelegt von
Jana-Christin Hörster
aus Bielefeld

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Bohlmann

2. Berichterstatter / Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Eberhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.12.2014

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

INHALTSVERZEICHNIS	SEITE
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	10
2. Zielsetzung	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Zelllinien	23
3.1.2 Testsubstanzen	23
3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze	23
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien	23
3.1.5 Lösungen und Puffer	24
3.1.6 cDNA-Herstellung	25
3.1.7 Enzyme und Kits für die quantitative Real-Time-PCR	25
3.1.8 Oligonukleotide	25
3.1.9 Antikörper	26
3.1.10 Verschiedenes	26
3.1.11 Verbrauchsmaterialien	26
3.1.12 Geräte	26
3.2 Methoden	28
3.2.1 Zellkultur	28
3.2.2 Zählen der Zellen	28
3.2.3 Wachstumsversuche mit der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 unter Einfluss von Heparin und VEGF ₁₆₅ und unter hypoxischen und atmosphärischen Bedingungen	29
3.2.4 Wachstumsversuche mit der Chorionkarzinom-Zelllinie JAR unter Heparin-Einfluss sowie unter hypoxischen und atmosphärischen Bedingungen	31
3.2.5 Expression der Heparanase-mRNA in Chorionkarzinom-Zelllinien unter atmosphärischen und hypoxischen Bedingungen sowie unter Einfluss von Heparin und VEGF ₁₆₅	32
3.2.6 RNA-Isolierung	33
3.2.7 cDNA-Synthese	34
3.2.8 Quantitative Real-Time-PCR	35
3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese	36
3.2.10 Proteinisolierung	36
3.2.11 Western Blot	37

3.2.12 Statistik	38
4. Ergebnisse	40
4.1 Einfluss von Heparin auf das Wachstum der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie	40
4.2 Einfluss von VEGF ₁₆₅ auf das Wachstum der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie	42
4.3 Einfluss von Heparin auf das Wachstum der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie	44
4.4 Expression der Heparanase-mRNA	46
4.4.1 Einfluss der Sauerstoffreduktion auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie	46
4.4.2 Einfluss von Heparin auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie	46
4.4.3 Einfluss von VEGF ₁₆₅ auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinomzelllinie	47
4.4.4 Einfluss von Heparin auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie	48
4.5 Gelelektrophoretische Überprüfung der Amplifikate der q-PCR	49
4.6 Nachweis der Heparanase-Proteinexpression	49
5. Diskussion	51
5.1 Einordnung in die Fachliteratur	51
5.2 Konzentrationsabhängige Wachstumsversuche	59
5.2.1 Konzentrationsabhängige Wachstumsversuche der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie mit Heparin	60
5.2.2 Konzentrationsabhängige Wachstumsversuche der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie mit VEGF ₁₆₅	63
5.2.3 Konzentrationsabhängige Wachstumsversuche der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie mit Heparin	64
5.3 Einfluss der Sauerstoffreduktion auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie	64
5.4 Einfluss von Heparin auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie	65
5.5 Einfluss von VEGF ₁₆₅ auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie	65
5.6 Einfluss von Heparin auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie	65
5.7 Ausblick	66

6. Zusammenfassung	73
7. Literaturverzeichnis	75
8. Danksagungen	83
9. Lebenslauf	84

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A.	Absorption, Arteria
Aa.	Arteriae
ACCP	American College of Chest Physicians
ACS	Akutes Koronarsyndrom
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat, Antiphospholipidsyndrom
ASS	Acetylsalicylsäure
B	Bande
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
(c)DNA	(chromosomale) DNA
cfDNA	zell-freie DNA
Co	Kontrolle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cp (engl.)	crossing point
Ct (engl.)	cycle threshold
CTG	Kardiotokografie
d	Tag/e
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBP	Eosinophile Major Basic Protein
engl.	Englisch
et al.	und andere

EZM	Extrazellularmatrix
FGF- 2	fibroblast growth factor-2
FKS	fötales Kälberserum
for (engl.)	forward
g	Erdbeschleunigung, Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HELLP (engl.)	<u>H</u> emolysis (hämolytische Anämie), <u>E</u> levated <u>L</u> iver enzyme levels (erhöhte Leberwerte) <u>L</u> ow <u>P</u> latelet count (Thrombozytopenie)
HIF-1	hypoxia inducible factor-1
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HLA-G	Humanes Leukozytenantigen-G (G bezeichnet hier den Isotyp/Genort)
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HPSE	Heparanase
HPA1	Heparanase 1
HRP (engl.)	horseradish peroxidase
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan(e)
ICAM1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IE	Internationale Einheit(en)
IF-γ	Interferon gamma
Ig G, M	Immunglobulin G, M
inkl.	inklusive
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
mA	Milliampere
M	Marker
(m)M	(Milli-) Molar
m ²	Quadratmeter
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
M-C	MTT-Kontrolle
mg	Milligramm

min	Minute(n)
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMH	Niedermolekulare(s) Heparin(e)
Nr	Nummer
O ₂	Sauerstoff
P	Probe
PAPP-A	serum pregnancy-associated plasma protein-A
pg	Pikogramm
pH	pondus Hydrogenii
PI	Pulsatility-Index
PIGF	placental growth factor
q-PCR	(quantitative) Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RDS	Respiratory Distress Syndrome
rev (engl.)	reverse, rückwärts
RNasen	Ribonukleasen
R	relative Expression
RI	Resistance-Index
RR	Relatives Risiko
s	Sekunde(n)
S	Spur
SDHA	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Natriumdodezylsulfat
sFlt-1	soluble Fms-like tyrosine kinase 1
sog.	sogenannt(e)
src	Akronym aus <u>s</u> ar <u>c</u> oma und <u>c</u> ellular, Tyrosinkinase
SSW	Schwangerschaftswoche
syn.	Synonym
T(B)E-Puffer	Tris-(Borat)-EDTA-Puffer (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, [Salz der Borsäure,] Ethylendiamintetraessigsäure)
TBS-Waschpuffer	Tris-gepufferte Saline-Waschpuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TrisCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
U	Units
u.a.	unter anderem/anderen
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
UFH	unfraktioniertes Heparin
USP	United States Pharmakopeia
UV	Ultraviolett
V	Volt
V.a.	Verdacht auf
v.a.	vor allem/allen
VCAM1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-A, -B, -C, -D	Vascular endothelial growth factor Isoformen
VEGF _{121, 165} (b)	Vascular endothelial growth factor-A Isoformen
VEGFR1	VEGF-Rezeptor
Vol.	Volumen
VTE	Venöse Thrombembolie
z.A.	zur Analyse
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
z.T.	zum Teil

1. EINLEITUNG

Hypertensive Erkrankungen treten in 6 bis 8 % aller Schwangerschaften auf, sind für 20 bis 25 % der Fälle von perinataler Mortalität verantwortlich und nehmen hierbei sogar die drei häufigsten mütterlichen Todesursachen für sich in Anspruch. Diese auch als Gestationshypertonien bezeichneten Erkrankungen stellen, gemeinsam mit prä- und perinatalen Blutungen sowie thrombembolischen Ereignissen, diejenigen Schwangerschaftskomplikationen mit dem höchsten Risiko für Mutter und Kind dar und können im schlimmsten Fall zum Tode der Frau sowie des ungeborenen Kindes führen (46, 47, 48, 66). Eine Gestationshypertonie besteht definitionsgemäß bei einer nach der abgeschlossenen 20. Schwangerschaftswoche (SSW) neu aufgetretenen Hypertonie mit Blutdruckwerten $\geq 140/90$ mmHg einschließlich einer Normalisierung der Werte bis 12 Wochen post partum. Die reine Gestationshypertonie ist nicht mit einer Proteinurie vergesellschaftet. Zu den schwangerschaftsinduzierten Hypertonien zählen die Präeklampsie, sowie die Eklampsie, die eine progrediente Form der Präeklampsie darstellt, jedoch auch primär auftreten kann und das HELLP-Syndrom als eine Sonderform der Präeklampsie (46).

Die synonym auch als Gestose bezeichnete Präeklampsie nimmt hierbei eine besondere Rolle ein, da sie ursächlich für jeden dritten Fall schwerer peripartaler Morbidität ist. Auch steigert die Präeklampsie die perinatale (kindliche) Mortalität um das Fünffache (46) und zieht weltweit jährlich mindestens 60.000 maternale Todesfälle nach sich (77). Die Präeklampsie ist definiert als das Auftreten einer Gestationshypertonie in Kombination mit einer nach der 20. SSW auftretenden Proteinurie ≥ 300 mg im 24-Stunden-Sammelurin. Weiterhin ist die Diagnose zu stellen bei einer Gestationshypertonie und zusätzlich nach der 20. SSW aufgetretener fetaler Wachstumsretardierung, maternaler Leberbeteiligung, Nierenfunktionsstörung, hämatologischer Störung oder neurologischer Symptome. Treten Proteinurie und Gestationshypertonie gemeinsam und in Kombination mit oben genannten Symptomen oder in Kombination mit einem Lungenödem, einer Zyanose, einer Erhöhung des Blutdrucks auf Werte $\geq 170/110$ mmHg oder einer isolierten Proteinurie ≥ 500 mg im 24-Stunden-Sammelurin auf, spricht man von einer schweren Präeklampsie (46). Eine gefürchtete Steigerung der Präeklampsie ist die Eklampsie, definiert als im Rahmen der Präeklampsie auftretende tonisch-klonische Krampfanfälle. Jedoch sind nur 50 % der Eklamsien mit einer

schweren Hypertonie assoziiert, und auch eine Proteinurie kann gänzlich fehlen. So finden sich in 14 bis 34 % der Eklampsie-Fälle beide Leitsymptome nicht (46). Abzugrenzen von der Präeklampsie und Eklampsie ist das HELLP-Syndrom, welches definiert ist durch die Trias: Hämolyse (hemolysis), pathologisch erhöhte Leberenzyme (elevated liver enzymes) und eine auf Werte unter 100.000/ μ l erniedrigte Thrombozytenzahl (low platelets). Auch bei dieser zu den Gestationshypertonien zählenden Erkrankung fehlt in 5 bis 15 % der Fälle eine signifikante Proteinurie und in bis zu 20 % der Fälle eine Hypertonie. In 15 % der Fälle ist keines der beiden Symptome nachweisbar (46). Als chronische Hypertonie wird eine präkonzeptionelle oder in der ersten Schwangerschaftshälfte diagnostizierte Hypertonie mit Werten $\geq 140/90$ mmHg abgegrenzt, welche postpartal länger als 12 Wochen persistiert. Eine Pfropfpräeklampsie, synonym auch als Pfropfgestose bezeichnet, ist zu diagnostizieren bei einer zusätzlich zu einer chronischen Hypertonie auftretenden Gestationsproteinurie vor der 20. SSW oder bei einer zusätzlich nach der 20. SSW eintretenden Entwicklung wie einem plötzlichen Anstieg der Proteinurie, des Blutdrucks oder eines klinischen oder laborchemischen Merkmals einer schweren Präeklampsie (46).

Seit einiger Zeit sind zur Abschätzung des Risikos für das Auftreten einer Präeklampsie u.a. anamnestische Angaben der Patientin etabliert. Das Risiko, an einer Präeklampsie zu erkranken, ist wie in Tabelle 1 und 2 dargestellt, deutlich erhöht bei vorausgegangener Präeklampsie, familiärer Belastung, chronischer Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 1 sowie chronischer Nierenerkrankung. Weiterhin dienen v. a. die Resultate der zwischen der 22. und 24. SSW durchgeführten Dopplersonografie uteriner Gefäße zur Früherkennung. Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie gelten hierbei eine beidseitige persistierend postsystolische Inzisur in der Dopplerkurve der Aa uterinae, ein sog. bilaterales Notching und ein erhöhter Resistance- (RI) und Pulsatility-Index (PI), welche aus selbiger Dopplerkurve berechnet werden können (19, 46). Die Patientinnen, bei denen im Rahmen der Doppler-Untersuchung keine pathologischen Werte feststellbar sind, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an einer Präeklampsie erkranken. Da jedoch pathologische Doppler-Werten nicht zwingend in einer Präeklampsie münden, ergibt sich für diese Untersuchung ein hoher falsch-positiver Wert (19). Pathologische Doppler-Werte im ersten Trimenon, zwischen der 11. und 13. Schwangerschaftswoche, sind lediglich

bezüglich der Feststellung des Rezidivrisikos nach Präeklampsie in vorangegangener Schwangerschaft aussagekräftig, nicht jedoch zur primären Diagnostik (21).

Anamnestische Risikofaktoren (RR: Relatives Risiko für eine Präeklampsie)	Relatives Risiko (RR)
Antiphospholipidsyndrom	RR ~ 9
Z.n. Präeklampsie	RR ~ 7
Body Mass Index > 35 kg/m ²	RR ~ 4
Vorbestehender Diabetes mellitus Typ 1	RR ~ 3,5
Familiäre Belastung	RR ~ 3
Vorbestehende Nierenerkrankung	RR ~ 3
Erstparität	RR ~ 2,5
Alter > 40 Jahre	RR ~ 2
Chronische Hypertonie	Risiko ↑
Sonstige Autoimmunerkrankungen (z.B. systemischer Lupus erythematodes mit Nephritis)	Risiko ↑↑
Maternale hereditäre Thrombophilie	Datenlage unklar
Fetale Thrombophilie	Datenlage unklar

Tabelle 1: Anamnestische Risikofaktoren für Entwicklung einer Präeklampsie ausgedrückt als Relatives Risiko (46)

Schwangerschafts-assoziierte Risiken für die Entwicklung einer Präeklampsie
Bilaterales Notching/erhöhter RI/PI der Aa uterinae, persistierend nach der 24. abgeschlossenen Schwangerschaftswoche
Mehrlingsschwangerschaft
Gestationsdiabetes
Hydrops fetalis, Trisomien, Blasenmole

Tabelle 2: Darstellung Schwangerschaftsassoziierter Risiken für die Entwicklung einer Präeklampsie (46)

So besteht zwar die Möglichkeit, Rezidive frühzeitig zu erkennen und therapeutisch einzugreifen, für die erstmalig auftretende Präeklampsie kommt die Risikoeinschätzung zwischen der 22. und 24. SSW jedoch zu spät für eine erfolgreiche medikamentöse Prophylaxe: Der Einsatz von niedrig dosierter Acetylsalicylsäure (ASS; 50 bis 150 mg/d) reduziert die Präeklampsie-Rate lediglich bei Beginn vor oder spätestens mit der 16. SSW wirkungsvoll (75). Mittlerweile hat man herausgefunden, dass die Fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1), ein löslicher Rezeptor des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), im Blut von Patientinnen mit Präeklampsie erhöht ist. Gleichzeitig kann in vielen Fällen ein erniedrigter, im Blut zirkulierender placental growth factor (PIGF) nachgewiesen werden. Ein erhöhter sFlt-1/PIGF-Quotient kann zwar die Diagnosestellung einer zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits eingetretenen Präeklampsie erleichtern,

erlaubt aber noch keine sichere Aussage darüber, ob und wann eine schwangere Patientin an einer Präeklampsie erkrankt (84). Somit kann der Verdacht einer sich erstmalig entwickelnden Präeklampsie zum heutigen Zeitpunkt erst dann begründet gestellt werden, wenn es für eine zielführende Präventionstherapie bereits zu spät ist. Ein weiteres Problem ist, dass die Therapie mit niedrig dosierter ASS das Präeklampsierisiko nur um 19 % und die perinatale Mortalität lediglich um 16 % senkt (11, 46).

Klinisch zeigen sich hypertensive Erkrankungen in Schwangerschaft und Wochenbett durch die bereits beschriebene reproduzierbare Hypertonie und Proteinurie. Weitere klinische Symptome sind eine Gewichtszunahme von ≥ 1 kg pro Woche während des 3. Trimenons und Veränderungen der Laborparameter, u.a. ein Anstieg des Hämatokrit, ein Abfall der Thrombozyten sowie ein Anstieg von Transaminasen und Retentionswerten. Eine drohende Eklampsie zeigt sich häufig durch Oberbauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und zentral-nervöse Symptome wie Augenflimmern, persistierende Kopfschmerzen und Hyperreflexie (46). Klinische Leitsymptome des HELLP-Syndroms sind der Oberbauchschmerz bzw. der Schmerz im Epigastrium. Wird die Gestationshypertonie rechtzeitig erkannt, ist die Einleitung einer für Mutter und Kind folgenlosen antihypertensiven Therapie in der Regel möglich. Ist die Erkrankung jedoch erst einmal fortgeschritten manifest, birgt die Behandlung Schwierigkeiten und Risiken für werdende Mutter und Fetus. Eine medikamentöse Senkung des Blutdrucks sollte in der Regel erst ab anhaltenden Blutdruckwerten ≥ 170 mmHg systolisch und/oder ≥ 110 mmHg diastolisch und initial nur unter stationären Bedingungen erfolgen. Die Indikation beruht hierbei hauptsächlich auf der Prävention maternaler zerebro- sowie kardiovaskulärer Komplikationen, v.a. jedoch auf der Vermeidung zerebraler Blutungen bei erstmalig aufgetretener schwerer Hypertonie. Allerdings zeigt die aktuelle Entwicklung bezüglich milder bis mittelschwerer Hypertonien lediglich einen geringen mütterlichen Nutzen bei erhöhter Rate wachstumsretardierter Kinder sowie vermindertem Geburtsgewicht (46). Somit kommt die Indikationsstellung einem Drahtseilakt zwischen maternalen und fetalen Bedürfnissen nahe. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der geringen Anzahl medikamentöser Optionen sowohl zur Senkung des Bluthochdrucks als auch zur Prävention bzw. Therapie von Krampfanfällen in Hinblick auf die möglichen Auswirkungen auf die fetale Entwicklung. Jede initiale Senkung deutlich erhöhter

Blutdruckwerte – also fortgeschrittener Befunde – muss unter CTG-Überwachung (Kardiotokografie-Überwachung) des Fetus erfolgen. Die Überwachung ist notwendig, um akute Gefährdungen des Fötus durch zu starke maternale Blutdruckabfälle und eine konsekutive plazentare Hypoperfusion zu vermeiden. Diastolische Zielblutdruckwerte von 90 bis 105 mmHg sollten nicht unterschritten werden (46). Bei foudroyanten (Prä-) Eklampsie-Verläufen besteht die kausale Therapie letztendlich nur in der Entbindung. Diese ist unter Berücksichtigung des Gestationsalters und gegebenenfalls unter Berücksichtigung einer abgeschlossenen Induktion der fetalen Lungenreife (sog. RDS-Prophylaxe [Respiratory-Distress-Syndrom, syn. Atemnotsyndrom]) die Therapie der Wahl. Jedoch tritt speziell die Eklampsie in bis zu 28 % der Fälle erst postpartal auf, weswegen bei Patientinnen mit gestationsassoziiierter Hypertonie auch im direkten postpartalen Zeitraum bis zur Normalisierung der Blutdruckwerte eine Überwachung und ggf. Fortführung der antihypertensiven Therapie indiziert ist (46). Zusammenfassend wird deutlich, dass die hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft und im Wochenbett ernstzunehmende und unter Umständen gesundheits- und lebensbedrohende Erkrankungen darstellen. Da bislang sowohl die Möglichkeiten der Prävention, Früherkennung als auch der adäquaten Therapie für werdende Mutter und Fetus als mäßig einzustufen sind, steht die möglichst exakte Aufschlüsselung der Kausalität und die daraus folgende mögliche Prophylaxe im Zentrum unseres Interesses.

Es wird allgemein angenommen, dass den Gestationshypertonien eine gestörte Plazentation zugrunde liegt (71, 90). Für die mit der Plazentation untrennbar verbundene Implantation sind v.a. die Angiogenese und Dezidualisierung von zentraler Bedeutung (56). Der beschriebene Prozess umfasst jedoch vielfältige Effekte und Wechselwirkungen zwischen Trophoblast und Dezidua (23), welche in ihren Einzelheiten bislang nur unzureichend untersucht sind. So besteht die Blastozyste aus einem innen liegenden Embryoblasten, aus welchem sich ab dem achten Tag post conceptionem die Keimscheiben entwickeln, und dem Trophoblasten. Mit der den Embryoblast enthaltenden Seite voran obliegt dem Trophoblasten als äußere Schicht der Blastozyste die Apposition, Adhäsion sowie die Invasion in das Endometrium (31, 81, 87). Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

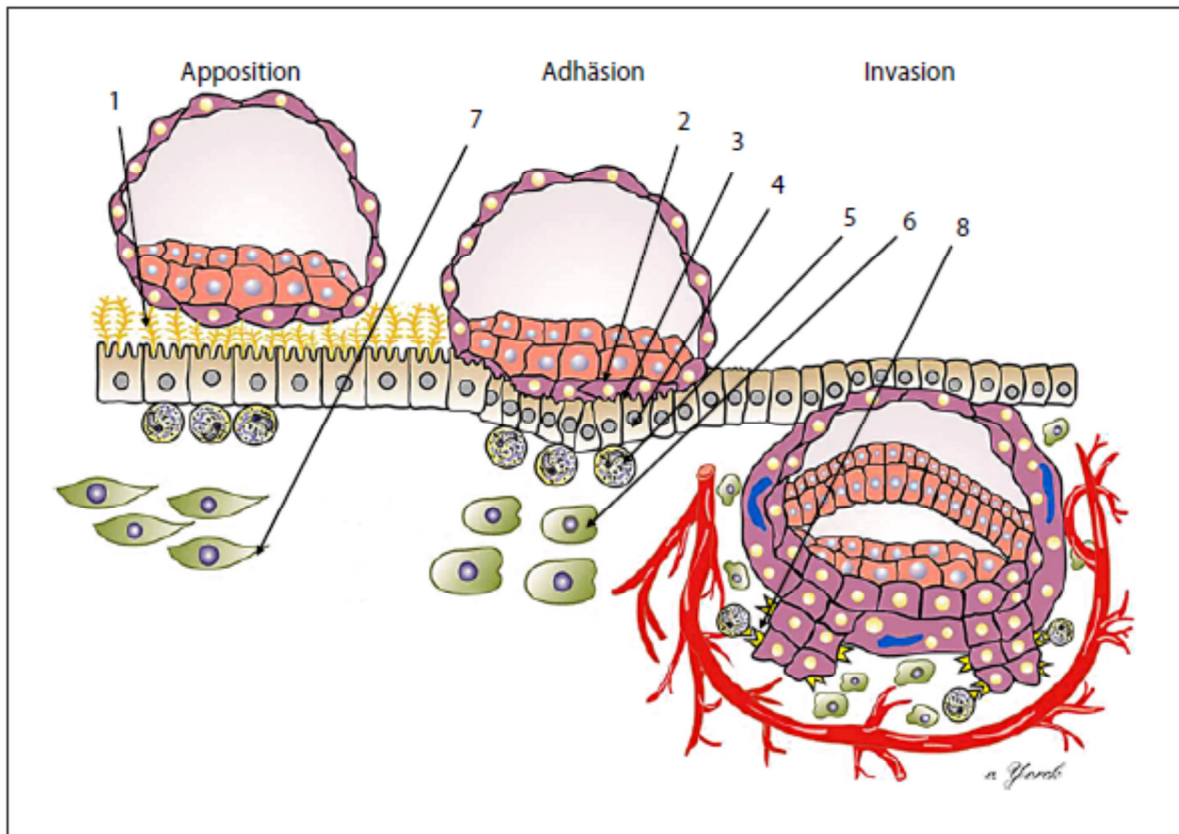


Abbildung 1: Darstellung des Implantationsprozesses. Dieser beinhaltet die Apposition, Adhäsion und Invasion. Die Apposition ist definiert durch die Annäherung der Blastozyste an das Endometrium. Darauf folgend bilden sich epitheliale Muzinglykoproteine (1) zurück, bevor die Adhäsion beginnen kann. Im Rahmen dieser bindet der Trophoblast (2) unter Zuhilfenahme von Adhäsionsproteinen (Integrine und Selektine) (3) an das luminale Epithel (4). Die anschließende Invasion steht u.a. unter dem Einfluss von zu den endometrialen Immunzellen gehörenden natürlichen Killer-Zellen (5) wie auch unter dem Einfluss von dezidualisierten (6) Stromazellen (7). Die Vermittlung zwischen natürlichen Killerzellen und Trophoblasten spielt eine bedeutende Rolle und wird durch das humane Leukozytenantigen HLA-G (8) mitbestimmt. (Abbildung entnommen aus [87])

Die zu Beginn der Plazentation physiologische relative Hypoxie wirkt sich fördernd auf die Proliferation des Trophoblasten aus und stellt dadurch eine Voraussetzung für dessen Invasion der Uterusschleimhaut dar (71). Durch Infiltration der Uterusschleimhaut und der utero-plazentaren Arterien durch den Trophoblasten trägt dieser entscheidend zum Remodeling der Spiralarterien bei. Im Rahmen des Remodelings der Spiralarterien durch den Trophoblasten ersetzt dieser, bis in das innere Myometriumdrittel reichend, sowohl das Endothel als auch die glatten Muskelzellen der Media. Folglich verlieren die Spiralarterien an Elastizität, sodass sie an Durchmesser zunehmen und ihre Kontraktionsfähigkeit bzw.

vasomotorische Kontrolle verlieren. Dadurch sinkt einerseits der maternale Gefäßwiderstand und konsekutiv erhöht sich andererseits der uteroplazentare Blutfluss. Aufgrund des Verlustes der Modulationsfähigkeit des Bluteinstroms in die Plazenta durch Kontraktion der Gefäße ist ein ausreichendes Blutangebot für die Frucht gewährleistet (39, 71). Die Invasion des Trophoblasten in die Dezidua ist bei Patientinnen mit Präeklampsie vermindert, gleiches gilt auch für die Invasion der uteroplazentaren Gefäße und deren Remodeling (39). Als bislang gesichert gilt, dass u.a. diese gestörte Invasion des Trophoblasten in die Dezidua ursächlich für die schwangerschaftsinduzierte Hypertonie ist (67, 71). Die Invasion erfolgt hierbei nicht bis in die Media der Spiralarterien, weshalb das Endothel der Arterien nicht ersetzt wird. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

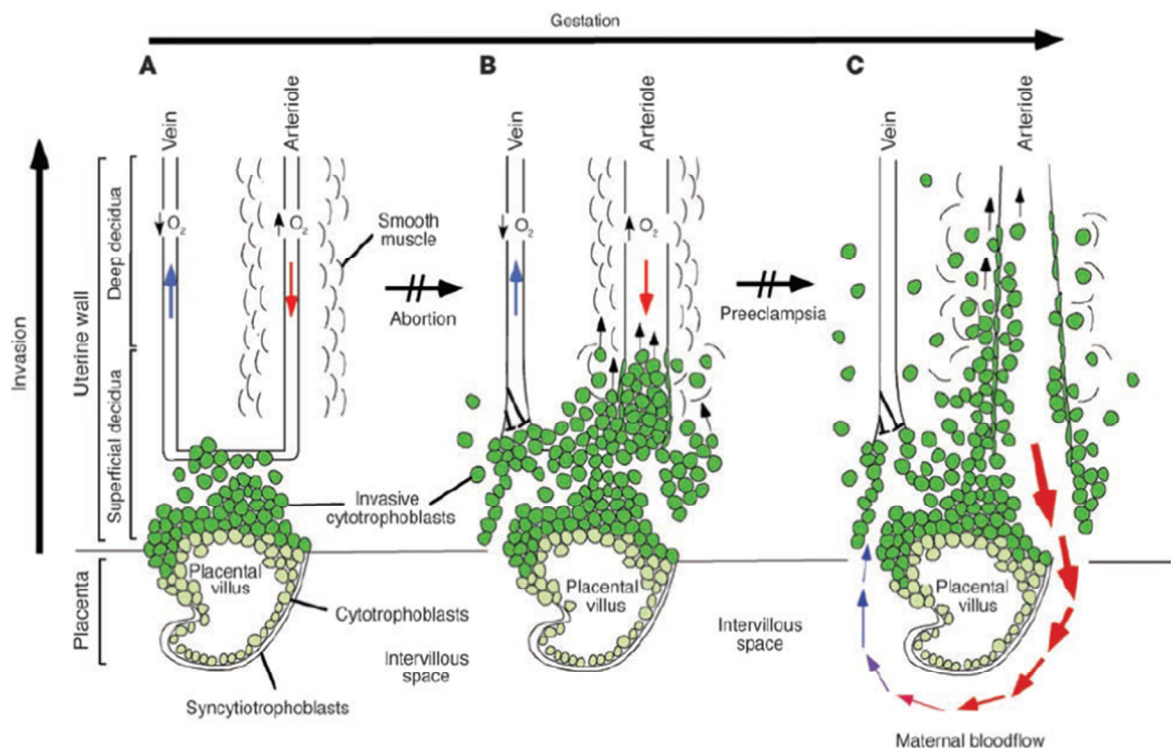


Abbildung 2: Darstellung der Invasion des Trophoblasten in die Dezidua (71). **A)** Proliferation des Trophoblasten **B)** Werden Implantation und Plazentation in einem frühen Stadium gestört, führt dies zum Abort (67). **C)** Sind jedoch die Invasion der Spiralarterien sowie deren Remodeling gestört, bleibt die Schwangerschaft zwar zunächst erhalten, jedoch entwickelt sich eine Präeklampsie. (Abbildung entnommen aus [71])

Die Arterien werden daher nicht genügend dilatiert, um einen ausreichenden Blutstrom in den intervillösen Raum zu ermöglichen (39), was sich, wie auf Seite 11 beschrieben, klinisch im Gefäßdoppler der A. uterina als sogenannter

persistierender Notch darstellt. Weitere Rollen scheinen eine verminderte HLA-G-Expression auf dem extravillösen Trophoblasten (17, 36), eine Mutation des Angiotensinogens (70), sowie vermehrte Adhäsionsmoleküle wie VCAM1 (Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1), ICAM 1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1) und E-Selektin (40) zu spielen.

Um die bis heute nicht vollständig entschlüsselte Pathogenese der schwangerschaftsassozierten Hypertonien zu verstehen, ist die Aufdeckung dieser Details möglicherweise von zentraler Bedeutung. Aktuell erfolgt bei Frauen mit einer anamnestischen schwangerschaftsinduzierten Hypertonie in Folgegraviditäten die auf Seite 12 beschriebene Sekundär-Prophylaxe mit niedrig dosierter Acetylsalicylsäure. Es mehren sich jedoch in der wissenschaftlichen Literatur zudem Hinweise auf therapeutische Effekte von Heparin. Der genaue Wirkmechanismus des Heparins, welches in Studien die Rezidivrate hypertonieassoziierter Komplikationen ebenfalls signifikant verminderte, ist noch nicht geklärt (74). Im Rahmen der Schwangerschaft durchläuft das Gerinnungssystem jedoch signifikante Veränderungen, so nimmt die Aktivität einiger Gerinnungsfaktoren, wie z.B. die des Faktor X mit Dauer der Schwangerschaft progredient zu, die Funktion der Thrombozyten hingegen ist eingeschränkt (11, 12), was in Tabelle 3 dargestellt ist.

Faktor	I. Trimenon	II. Trimenon	III. Trimenon
Fibrinogen	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor VII	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor IX	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor X	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor XII	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor VIII	↑	↑	↑
Von-Willebrand-Faktor	↑	↑↑	↑↑↑
Thrombin-Antithrombin-Komplex		↑	↑↑
Protein S	↓	↓	↓
Thrombozytenzahl		↘	↘
Fibrinolyse-Aktivität	↓	↓↓	↓↓
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1		↑↑	↑↑↑

Tabelle 3: Darstellung der Veränderung ausgewählter Gerinnungsfaktoren während der Schwangerschaft. (Tabelle entnommen aus [11])

Es wird allgemein angenommen, dass eben diese veränderte Aktivität des Gerinnungssystems auch einen negativen Effekt auf die Implantation ausüben kann, vor allem bei einer überschießenden Gerinnungsaktivierung oder autoimmunologischen maternalen Erkrankungen wie einem Antiphospholipid-Syndrom (APS; 57, 62). Die klinische und laborchemische Definition des Antiphospholipid-Syndroms ist in Tabelle 4 dargestellt.

Laborchemische Befunde	Klinische Auffälligkeiten
mittel- bis hochtitrig erhöhte Antikörper (IgG/IgM) gegen Cardiolipin oder gegen β 2-Glykoprotein oder Vorhandensein des Lupus anticoagulans, zweimal im Abstand von mehr als 12 Wochen gemessen, und...	• ...mindestens 3 Frühaborte vor der 10. SSW, bei gleichzeitigem Ausschluss fetaler bzw. maternaler anatomischer und hormoneller Auffälligkeiten sowie chromosomaler Ursachen beider Elternteile, oder...
	• ...eine Fehlgeburt nach der 10. SSW (inkl. intrauteriner Fruchttod), bei Ausschluss fetaler morphologischer Auffälligkeiten, oder
	• ...mindestens eine Frühgeburt vor der 34. SSW bei morphologisch normalem Feten und schwerer, ansonsten ungeklärter fetaler Wachstumsrestriktion (Plazentainsuffizienz), Präeklampsie oder Eklampsie, oder
	• ...arterielle bzw. venöse Thrombose

Tabelle 4: Darstellung der laborchemischen sowie klinischen Definition des Antiphospholipidsyndroms. (Tabelle entnommen aus [11], modifiziert nach [57])

Weiterhin kann eine maternale Hyperkoagulabilität aufgrund hereditärer oder erworbener Gerinnungsstörungen mit diversen Schwangerschaftskomplikationen sowie mit rezidivierenden frühen und späten Aborten, intrauterinem Fruchttod, Präeklampsie, intrauteriner Wachstumsretardierung und vorzeitiger Plazentalösung assoziiert sein (11, 42, 73). In der Behandlung schwangerer Patientinnen, welche an einem Antiphospholipidsyndrom und daraus folgenden rezidivierenden Aborten leiden, gilt die Kombination aus Heparin und ASS als therapeutischer Goldstandard (11, 49, 62). Die vorherrschende Wirkung von Heparin in Bezug auf das Gerinnungssystem besteht in der Verstärkung der Antithrombinwirkung (10), zudem sind multiple weitere Interaktionen von Heparin(en) auf molekularer Ebene mit dem Trophoblast sowie auf deziduale Veränderungen bekannt (12, 30, 79).

Die Endo- β -D-glucuronidase Heparanase (HPSE) wird durch viele Zellen an der Zelloberfläche, in der Basalmembran und in der Extrazellulärmatrrix (EZM) exprimiert, so auch nachgewiesenermaßen in der Dezidua und in der Plazenta. Sie spaltet spezifisch Heparansulfat-Ketten und Heparin und spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen der Zellproliferation, -differenzierung und -migration sowie der Angiogenese, Regulation der Hämostase und Inflammation (23, 61, 59). Weiterhin spielt die Heparanase eine zentrale Rolle bei der Invasion verschiedener Zellen. Vor allem bei der Invasion, Angiogenese und Metastasierung von Karzinomen (24), z.B. beim Mammakarzinom, Prostatakarzinom und Malignen Melanom (20, 59) spielt die Heparanase eine entscheidende Rolle. Die hohe Expression der Heparanase durch Karzinomzellen ist ein prognostischer Marker und korreliert mit deren Metastasierungspotenzial (61).

Niedermolekulare Heparine (NMH) leiten sich durch chemische oder enzymatische Depolarisation von unfraktioniertem Heparin ab (12, 62). Trotz gemeinsamen Ursprungs unterscheiden sich niedermolekulares und unfraktioniertes Heparin (UFH) in molekularem Gewicht, Plasmaproteinbindung, biologischer Halbwertszeit, ihrem Bedarf an Monitoring, welcher für unfraktioniertes Heparin höher ist, und in ihren bedeutenden Nebenwirkungen, wie z.B. Blutung, heparininduzierter Thrombozytopenie und Osteoporose (62, 66). Die niedermolekularen Heparine sind den unfraktionierten Heparinen in ihrem Nebenwirkungsprofil deutlich überlegen (9). Die verschiedenen NMH sind zwar in pharmakologischer Hinsicht sehr ähnlich, jedoch nicht identisch, weshalb auch die gleiche Zahl an Einheiten verschiedener NMH nicht notwendigerweise die gleiche Gerinnungshemmung nach sich ziehen muss (12). In vitro Daten lassen vermuten, dass verschiedene Heparine vergleichbare Effekte auf endometriale Stromazellen durch Modulation der Dezidualisation ausüben könnten (29). Weder unfraktioniertes Heparin noch niedermolekulares Heparin passiert die Plazentaschranke, weshalb keine teratogenen Effekte befürchtet werden müssen (8). U.a. wird von einigen Autoren die Applikation von Heparin empfohlen, um die fehlerhafte Implantation unabhängig von mütterlicher Thrombophilie zu vermeiden (12). Wie genau das systemisch applizierte Heparin auf die Implantation bzw. Plazentation wirkt, ist bislang nicht bekannt. Die Frage, ob appliziertes Heparin in direkten Kontakt mit der sich einnistenden Blastozyste, also mit dem embryonalen

Gewebe, tritt oder nur auf die Dezidua selbst, sprich auf maternales Gewebe, wirkt, ist nicht geklärt (12). Die Interaktionen von Heparin mit Enzymen zwecks Abbau der Extrazellulärmatrix (23) sowie aktuelle Forschungsgegenstände bezüglich Schwangerschaftskomplikationen (52, 59) sind bislang kaum verstanden. Die Familie der vascular endothelial growth factors (VEGF) ist eine Gruppe endothelspezifischer Wachstumsfaktoren, welche als zentraler Bestandteil der Vaskulogenese und Angiogenese eine führende Rolle in der Gefäßmodulation spielt (91). Es existieren verschiedene Isoformen des VEGF und Rezeptor-Tyrosinkinasen (88), an denen diese wirken (16). Wie bereits erläutert, ist die Angiogenese ein essentieller Faktor für die adäquate Implantation und dadurch auch für den Erhalt der intakten Schwangerschaft. VEGF ist der hauptverantwortliche Wachstumsfaktor für die Angiogenese und wird als Antwort auf einen hypoxischen Reiz synthetisiert, was v.a. durch den hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) reguliert wird (76). Eine große Rolle spielt die Hemmung von VEGF in der Therapie verschiedener Karzinome wie dem Bronchial- und Prostatakarzinom, in welchen er vermehrt exprimiert wird (6, 76, 82). VEGF-A steht gemeinsam mit anderen Wachstumsfaktoren im Zentrum der Regulation der plazentaren Gefäßausbildung, Vasodilatation wie auch des vaskulären Remodelings. Die Regulation erfolgt v.a. über die Stimulation der Endothelzellproliferation und -migration (89). Wie genau der VEGF-A in fetoplazentarem Endothel seine Wirkung entfaltet, ist bislang noch wenig verstanden. Jedoch sind sowohl der Trophoblast als auch die Plazentation abhängig von der Neovaskularisation, und da die Heparanase sowohl in Trophoblasten als auch in angiogenetischen Plazentagefäßen exprimiert wird, liegt nahe, dass diese dabei entscheidend Einfluss nehmen könnte. Die proangiogenetischen Eigenschaften der Heparanase stehen in Zusammenhang mit heparansulfatgebundenen Faktoren wie dem VEGF (72), da die Heparanase die Bildung von VEGF Src (Akronym aus sarcoma und cellular, Tyrosinkinase)-vermittelt induziert (20). Die Hemmung von VEGF-A in verschiedenen Studien führte wiederum zu Endotheldysfunktion und zu negativen Einflüssen auf die Gefäße (91). Die Ausschaltung von VEGF-Rezeptoren in Mäusen führte zur Beeinträchtigung von Gefäßwachstum und -entwicklung, was konsekutiv im Untergang frühen embryonalen Gewebes mündete (89). Mit Schwangerschaftskomplikationen wie auch u.a. mit der Präeklampsie wurde

VEGF bereits in Zusammenhang gebracht. So sind der VEGF-A wie auch der PlGF im Blut schwangerer Patientinnen mit Präeklampsie reduziert, die sFlt-1 jedoch erhöht (4).

2. ZIELSETZUNG

Die Heparanase ist eine nahezu auf allen Zellen vorkommende Endo- β -D-glucuronidase, welche potentiell invasions- und angiogenesesteigernde Eigenschaften aufweist und Heparansulfat sowie Heparin an spezifischen Stellen spaltet. In Zusammenhang mit dem noch unbekannten Wirkmechanismus des plazentationsfördernden Heparins als Prophylaktikum der Präeklampsie stellt sich die Frage, ob diese Wirkung über eine Beeinflussung der Heparanase zustande kommt. Die naheliegende Schlussfolgerung, dass sowohl die Heparanase als auch der Angiogenesefaktor VEGF im Rahmen der Implantation und Plazentation eine bedeutende Rolle spielen, legt die Frage offen, ob zwischen diesen beiden Faktoren eine Verbindung bzw. Interaktion bestehen könnte.

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob Heparin sowie VEGF einerseits die Proliferation humaner Chorionkarzinom-Zellen als trophoblastäres Modell und andererseits die Expression der Heparanase in eben diesen Zellen beeinflussen. So soll die Frage beantwortet werden, ob das in Kombination mit ASS zur Therapie der schwangerschaftsinduzierten Hypertonien eingesetzte Heparin wie auch VEGF ihre Wirkung möglicherweise in Zusammenhang mit der Heparanase entfalten und ob diese Endo- β -D-glucuronidase ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein könnte, um dem vollständigen Verständnis der auch in unserer Zeit noch gefährlichen Gestationshypertonien näher zu kommen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1 Zelllinien

Name	Beschreibung	Hersteller/Händler
JAR	humane Chorionkarzinom-Zelllinie; DSMZ Nr.: ACC 462	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig
JEG-3	humane Chorionkarzinom-Zelllinie; DSMZ Nr.: ACC 463	
OVCAR-3	Humane ovarielle Adenokarzinom-Zelllinie	ATCC, Vertrieb durch LGC Standards GmbH, Wesel

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

3.1.2 Testsubstanzen

Substanz	Beschreibung	Hersteller/Händler
Heparin-Natriumsalz Grad I-A	aus intestinaler Schweinemukosa, kulturgetestet ≥ 180 USP Units/mg	Sigma-Aldrich, Steinheim
VEGF ₁₆₅	human, rekombinant	Reliatech GmbH, Wolfenbüttel

Tabelle 6: Testsubstanzen

3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Substanz	Hersteller/Händler
Ceftazidimhydrat 1 mg/ml	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM High Glucose 1x [+] 4,5 g/L D-Glucose [+] L-Glutamin [+] 25 mM HEPES [-] Sodium-Pyruvat	Life Technologies, Gibco® Invitrogen, Darmstadt
fetales Kälberserum-Mycoplex	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Ham's F12 + L-Glutamin	
Penicillin G (10.000 Units/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml); 100x	
RPMI 1640 + L-Glutamin + 25 mM HEPES	Life Technologies, Gibco® Invitrogen, Darmstadt

Tabelle 7: Zellkulturmedien und Zusätze

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller/Händler
2-Mercaptoethanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
2-Propanol für die Molekularbiologie, Minimum 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
10 % Natriumdodezylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Acrylamid : Bisacrylamid (37,5 : 1)	Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe
BCA-Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn
Bromphenol Blau	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform zur Analyse	
Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Analyse (z. A.)	

Substanz	Hersteller/Händler
Ethanol $\geq 99,8$ % z. A.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glyzin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	J.T. Baker, Center Valley, PA U.S.A.
N,N-Dimethylformamid	Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Precision Plus Protein Dual color standards, B1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen GmbH, Hilden
Röntgen Entwickler Konzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Röntgen Fixierer Konzentrat	
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
SDS ultra pure, ≥ 99 % für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA (1x) UV-bestrahlt	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Wasser: Ultrapure, DNase-, RNase frei	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien

3.1.5 Lösungen und Puffer

Substanz	Hersteller/Händler/Rezept
4x Probenpuffer pH 6,8, für den Western Blot	• 0,125 M TrisCl • 4 % SDS • 20 % Glyzin • 2 % 2-Mercaptoethanol • 1 % Bromphenol Blau
6x Probenpuffer (6x Gel loading dye blue), für die Agarose-Gelelektrophorese	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
10-fach Elektrophoresepuffer, pH 8,3/Laufpuffer	• 0,025 M Tris • 0,192 M Glycin • 0,1 % SDS 1-fach-Gebrauchslösung: 1:10 mit aqua dest.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), steril	Life Technologies GmbH, Gibco® Invitrogen, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung	
Mammalian Protein Extraction Buffer	GE Healthcare, München
Milchpulver, blottinggrade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MTT-Lösung	• 250 mg Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] • gelöst in 50 ml DPBS, steril filtriert
MTT-Stopplösung	• 10 % SDS • 50 % N,N-Dimethylformamid • 250 ml aqua dest. • Salzsäure (HCl) bis zu einem pH-Wert von 4,7 zufügen
Natriumchlorid (NaCl) $\geq 99,5$ % z. A.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TBE-Puffer	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Substanz	Hersteller/Händler/Rezept
TBS-Waschpuffer	• 100 mM Tris ○ 1 M Natriumchlorid (NaCl) ≥ 99,5 % z. A. in aqua dest. 1xTBS-T-Waschpuffer Gebrauchslösung: • 1:10 mit aqua dest. • + 500 µl Tween 20 zur Synthese
TE-Puffer, pH 7,5	Qiagen GmbH, Hilden
Transferpuffer, pH 8,3	• 25 mM Tris • 192 mM Glyzin • 20 % Methanol
Tween-20	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 9: Lösungen und Puffer**3.1.6 cDNA-Herstellung**

Substanz	Hersteller/Händler
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat) Mix, 10 mM, alle vier Basen	Fermentas, Vertrieb durch Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Random Primer, 300 µg (3 µg/µl)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
SuperScript II, reverse Transkriptase 10.000 U (200 U/ml), 5x First Strand Buffer, 0,1 M DTT 500 µl	

Tabelle 10: cDNA-Herstellung**3.1.7 Enzyme und Kits für die quantitative Real-Time-PCR**

Substanz	Hersteller/Händler
Master Mix = Platinum® SYBR® Green, q-PCR Super Mix UDG	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Tabelle 11: Enzyme und Kits für die quantitative Real-Time-PCR**3.1.8 Oligonukleotide**

Oligonukleotid	Sequenz
Heparanase (HPSE)	
HPSE1-for	5'-TCC TGC GTA CCT GAG GTT TG-3'
HPSE1-rev	5'-CAA CCG TAA CTT CTC CTC CAC-3'
Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)	
HPRT1 449 for	5'-TCA GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG T-3'
HPRT1 532 rev	5'-AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G-3'
Succinat-Dehydrogenase (SDHA)	
SDHA 114 for	5'-TGG GAA CAA GAG GGC ATC TG-3'
SDHA 119 rev	5'-CCA CCA CTG CAT CAA ATT CAT G-3'

Tabelle 12: Oligonukleotide: Metabion international AG, Martinsried

3.1.9 Antikörper

Substanz	Hersteller/Händler
Heparanase-1 (HPA1) Antikörper, Klon HP3/17, monoklonal, anti-human	Labgen™, Vertrieb durch Acris Antibodies GmbH, Herford
Polyklonaler Ak aus dem Schaf gegen Maus-IgG (ECL™), HRP (Horseradish Peroxidase)-konjugiert	GE Healthcare, München

Tabelle 13: Antikörper

3.1.10 Verschiedenes

Substanz	Hersteller/Händler
Agarose, electrophoresis grade	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Filterpapier: Whatman™ Gel-Blotting-Papier	GE Healthcare, München
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrat	MerckMillipore, Merck KGaA, Darmstadt
Low molecular weight marker (Molekulargewichts-Marker)	NEB, Frankfurt am Main
Nitrozellulosemembran: Whatman™ Protran® Nitrozellulose Transfer-Membran	GE Healthcare, München
Röntgenfilm: Amersham Hyperfilm™ ECL, High Performance Chemiluminescence Film	
Schutzfolie: Overhead Kopierfolie	Soennecken eG, Overath

Tabelle 14: Verschiedenes

3.1.11 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Händler
96-well Multiply®-PCR-Plate	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Gewebekulturflaschen mit Filter; T75, T175	
Gewebekulturplatten; 6-well, 96-well	
Klebefolie, optisch klar	
Multipettenaufsatz: Combitips® 12,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pasteurpipetten	Karl Hecht GmbH & Co KG "Assistent", Sondheim/Rhön
PCR-Tube: Multiply®-µStrip Pro 4er Kette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten; 5, 10, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen 100, 1.000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhrchen, steril; 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Safe-lock Tubes; 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien

3.1.12 Geräte

Gerät	Hersteller/Händler
Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
cDNA-Maschine: Biometra Thermocycler TPersonal 48	Biometra GmbH, Göttingen
CO ₂ -Inkubator, Binder CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen
Elektrophorese Stromgeber-EPS 200	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Gerät	Hersteller/Händler
Elektrophorese-System (Western Blot): Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophorese-System (Agarose- Gelelektrophorese): Mini-Sub® Cell GT Elektrophorese-Kammer	
Feinwaage Scaltec SBC 21	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Flockeneisbereiter Icematic F80C	Icematic Deutschland, Meerbusch
Geldokumentationssystem	Phase GmbH, Lübeck
Blottingapparatur: Hoefer SemiPhor semi- dry transfer unit	Hoefer, Inc., Holliston, Massachusetts, USA
Hypoxie-Kammer THC08 124	Toepffer Lab Systems, Göppingen
Kühlzentrifuge Sigma 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Mikroplatten-Photometer MRX Multiplate- Reader	Dynatech Laboratories, Burlington, USA
Mikroplattenschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Mikroskop Axiovert 135M	Carl Zeiss, Jöttingen
Mikrozentrifuge MC6	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mikrozentrifuge Rotilabo®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Multipette® plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Neubauer Zählkammer: Neubauer Improved, 0,0025 m²/0,1mm	Karl Hecht GmbH & Co KG "Assistent", Sondheim/Rhön
Orbitalschüttler Shaker S4	Elmi Lab. Equipment, Riga, Lettland
Pipetten 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100- 1.000 µl; Variable Einkanalpipetten Eppendorf Research®	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettierhilfe accu-jet®	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Realtime-PCR-Maschine: DNA-Engine- Opticon 2	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Scanner: Scan Maker X12USL	Microtek, Hsinchu, Taiwan
Sicherheitswerkbank NUAIRE NU440-400E	Integra Biosciences, Fernwald
Stromgeber PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Transferpette®-8, 50-200 µl	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
• UV-Transilluminator TI 1 ○ Kamera • Lichtdichter Trichter	• Biometra GmbH, Jöttingen ○ Canon Power Shot A520 • Medizintechnik, UKSH, Lübeck
Vortex-Schüttler Assistent Reamix 2789	Karl Hecht GmbH & Co KG "Assistent", Sondheim/Rhön
Wasserbad GFL1083	GFL, Großburgwedel
Zentrifuge: Biofuge® fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Universal 32	Hettich, Tuttlingen

Tabelle 16: Geräte

3.2 METHODEN

3.2.1 Zellkultur

Die Chorionkarzinom-Zellen JEG-3 (DSMZ, Braunschweig) und JAR (DSMZ, Braunschweig) wurden in Gewebekulturflaschen (T75, T175, mit Filter; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) im CO₂-Inkubator (Binder CB 150, Binder GmbH, Tuttlingen) in einer wassergesättigten Atmosphäre von Raumluft und 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Nach Empfehlung des DSMZ (Braunschweig) wurde für die JEG-3-Zellen das Medium Ham's F12 mit L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) und für die JAR-Zellen das Medium RPMI 1640 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES (Gibco® Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Dem Medium wurden 10 % fötales Kälberserum (FKS; PAA Laboratories GmbH, Cölbe), 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/ml / 10 mg/ml; PAA Laboratories GmbH, Cölbe) und unmittelbar vor Verwendung 1 % Ceftazidim-Lösung (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim) zugefügt. Die zuvor bei -80 °C gelagerten Zellen wurden jeweils schnell im Wasserbad erwärmt, mit dem präinkubierten, Zusätze enthaltenden Medium gemischt und im CO₂-Inkubator kultiviert. Subkonfluent gewachsene Zellkulturen wurden für Versuche oder zur weiteren Kultivierung mit 5 ml Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) ca. 10 min im CO₂-Inkubator inkubiert. Dann wurde die Trypsinaktivität mit 2 Vol. FKS-haltigem Medium gestoppt und die Zellen für 6 min bei 350 x g zentrifugiert (Zentrifuge Universal 32, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette (Karl Hecht GmbH & Co KG "Assistent", Sondheim/Rhön) vorsichtig abgesogen, die JEG-3-Zellen in einer kleinen Menge Medium mit einer Pasteurpipette resuspendiert und dann in 5 ml Medium aufgenommen. Zur besseren Vereinzelung der stark adhärennten JAR-Zellen wurden die Zellpellets mit 0,5 ml Accutase (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) resuspendiert. Ein Drittel der Zellsuspension wurde in einer T75-Gewebekulturflasche weiter kultiviert und der Rest für Versuche verwendet.

3.2.2 Zählen der Zellen

Die resuspendierten Zellen wurden unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (Karl Hecht GmbH & Co KG "Assistent", Sondheim/Rhön) unter dem Mikroskop (Axiovert 135M, Carl Zeiss, Göttingen) gezählt. Um die vitalen von den

bereits abgestorbenen Zellen unterscheiden zu können, wurden 25 µl der Zellsuspension mit 25 µl Trypanblau (0,4 %; Sigma-Aldrich, Steinheim), ein Farbstoff der ausschließlich von vitalen Zellen aufgenommen wird, vermischt. 4x16 quadratische Felder wurden ausgezählt und das arithmetische Mittel berechnet. Um die Zellkonzentration pro ml (Milliliter) zu bestimmen wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Zellkonzentration/ml} = \text{arithmetisches Mittel} \times 10.000 \times 2$$

Die im Röhrchen verbliebene Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur in Bewegung gehalten (Orbitalschüttler Shaker S4, ELMi Lab. Equipment, Riga, Lettland), um die Bildung von Zellaggregaten zu verhindern. Die Zellen wurden auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

3.2.3 Wachstumsversuche mit der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 unter Einfluss von Heparin und VEGF₁₆₅ und unter hypoxischen und atmosphärischen Bedingungen

Für Wachstumsversuche wurden 3.000 Zellen pro well auf 96-well-Gewebekulturplatten (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und mit einer Multipette® (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) durch FKS-freies Medium ersetzt. Durch den FKS-Entzug sollten die Zellen in eine Mangelsituation gebracht werden, in der die Testsubstanzen einen stärkeren Einfluss haben sollen. Nach 1 h im CO₂-Inkubator wurden die Zellen mit Heparin (Sigma-Aldrich, Steinheim) behandelt. Die Wachstumsversuche wurden mit 1 % und 3,3 % FKS durchgeführt, um die optimale Konzentration für den Effekt der Testsubstanzen zu ermitteln. Pro FKS-Konzentration wurden je zwei 96-well-Platten inkubiert, eine unter atmosphärischen und eine unter hypoxischen (O₂-Gehalt = 2 %, CO₂-Gehalt = 5 %; Hypoxie-Kammer THC08 124, Toepffer Lab Systems, Göppingen) Bedingungen. Das Heparin wurde in Medium mit entsprechender FKS-Konzentration gelöst und in 10er-Reihen verdünnt. Die Aufbringung auf die 96-well-Platten ist in Tabelle 16 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Co	0,01	0,1	1	10	100	1.000	Co	M-C		
C		Co	0,01	0,1	1	10	100	1.000	Co	M-C		
D		Co	0,01	0,1	1	10	100	1.000	Co			
E		Co	0,01	0,1	1	10	100	1.000	Co			
F		Co	0,01	0,1	1	10	100	1.000	Co			
G		Co	0,01	0,1	1	10	100	1.000	Co			
H												

Tabelle 17: Behandlungsschema der Wachstumsversuche der Chorionkarzinom-Zelllinien JEG-3 und JAR unter Heparin-Einfluss. Co = Kontrolle, M-C = MTT-Kontrolle, Heparin-Konzentrationen in U/ml

Es wurden drei unabhängige Ansätze mit jeweils zwölf Kulturen der Kontrolle und jeweils sechs Kulturen der Proben angesetzt. Nach einer Behandlungsdauer von 24, 48 und 72 h wurde ein MTT-Test durchgeführt. Mit diesem Test wird die Menge vitaler Zellen bestimmt. Das MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Sigma-Aldrich, Steinheim) wird von vitalen Zellen in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan umgesetzt. Das Behandlungsmedium wurde von den Platten gekippt und die verbliebene Flüssigkeit durch Tupfen der Platten auf Zellstoff entfernt. Danach wurden die Zellen unter Verwendung einer Mehrkanalpipette (Transferpette®-8, 50-200 µl, Brand GmbH + Co KG, Wertheim) mit 100 µl, 1:10 mit DMEM (Life Technologies GmbH, Gibco Invitrogen®, Darmstadt) verdünnter MTT-Lösung (250 mg Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide gelöst in 50 ml DPBS, Life Technologies GmbH, Gibco Invitrogen®, Darmstadt), überschichtet. Nach 4 h im CO₂-Inkubator wurden mit der Mehrkanalpipette 100 µl MTT-Stopplösung (10 % SDS [Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe], 50 % N,N-Dimethylformamid [Merck KGaA, Darmstadt], 250 ml aqua dest., Salzsäure [HCl; Merck KGaA, Darmstadt] bis zu einem pH-Wert von 4,7) hinzupipettiert, um die Reaktion zu stoppen und das wasserunlösliche Formazan über Nacht zu lösen. Nach 12 h unter Lichtabschluss wurden die Platten für 10 s auf dem Mikroplattenschüttler (Titramax 100, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) gerüttelt und die Absorption mit einem Mikroplatten-Photometer (MRX Multiplate-Reader, Dynatech Laboratories, Burlington, USA) mit einem Testfilter von 560 nm und einem Referenzfilter von 650 nm gemessen. Da die Menge des umgesetzten Farbstoffs der Glykolyserate der Zellen entspricht, ist die photometrisch gemessene Absorption proportional zur Proliferation der Zellen. Die Wachstumsversuche der Chorionkarzinom-Zelllinie

JEG-3 wurden außerdem unter dem Einfluss von VEGF₁₆₅ (Reliatech GmbH, Wolfenbüttel) durchgeführt. Der Versuchsablauf entsprach hierbei dem der Heparin-Versuche. Der VEGF₁₆₅ wurde entsprechend der Empfehlung des Herstellers in DPBS mit 0,1 % FKS gelöst, um eine Stammlösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml herzustellen. Die Stammlösung wurde zu Endkonzentrationen von 1, 10 und 100 ng/ml mit Medium verdünnt. Eine fehlende Zugabe von VEGF₁₆₅ diente als Negativkontrolle. Das Medium (1 % FKS) auf den Platten wurde gegen 100 µl VEGF₁₆₅-haltiges Medium (1 %, 3,3 % FKS) ausgetauscht. Die Aufbringung auf die 96-well-Platten ist in Tabelle 17 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Co	1	1	10	10	100	100	Co	M-C		
C		Co	1	1	10	10	100	100	Co	M-C		
D		Co	1	1	10	10	100	100	Co			
E		Co	1	1	10	10	100	100	Co			
F		Co	1	1	10	10	100	100	Co			
G		Co	1	1	10	10	100	100	Co			
H												

Tabelle 18: Behandlungsschema des Wachstumsversuchs der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 unter VEGF₁₆₅-Einfluss. Co = Kontrolle, M-C = MTT-Kontrolle, VEGF₁₆₅-Konzentrationen in ng/ml.

Es wurden jeweils drei unabhängige Ansätze mit jeweils zwölf Kulturen der Kontrolle und der Proben angesetzt. Nach einer Behandlungsdauer von 24 und 48 h erfolgte der MTT-Test. Der Ablauf erfolgte identisch zu denen der Heparin-Versuchsreihe.

3.2.4 Wachstumsversuche mit der Chorionkarzinom-Zelllinie JAR unter Heparin-Einfluss sowie unter hypoxischen und atmosphärischen Bedingungen

Es wurden sowohl 3.000 als auch 6.000 Zellen pro well auf 96-well-Platten ausgesät, um die optimale Zelldichte zu bestimmen, bei der eine Veränderung der Proliferation zur Kontrolle deutlich abgrenzbar ist. Nach 24 h im CO₂-Inkubator wurden die Zellen mit Heparin behandelt. Das in Medium gelöste Heparin wurde in Zehnerreihen verdünnt und entsprechend dem Plattenschema der JEG-3-Versuchsreihe mit Heparin, dargestellt in Tabelle 16, aufgetragen. Die FKS-Konzentration betrug zu jeder Zeit 10 %, da eine Reduktion der FKS-Konzentration in Vorversuchen von den Zellen nicht toleriert wurde. Es wurden

drei unabhängige Ansätze angesetzt. In dem ersten Ansatz wurde zur Bestimmung der optimalen Zelldichte die doppelte Plattenanzahl mit jeweils zwölf Kulturen der Kontrolle und sechs Kulturen der Proben bestückt. In den zwei folgenden Ansätzen wurden jeweils zwölf Kulturen der Kontrolle und jeweils sechs Kulturen der Proben angesetzt. Je eine Platte inkubierte für 72 h unter atmosphärischen und eine unter hypoxischen Bedingungen. Nach 72 h Behandlung erfolgte der MTT-Test analog zu der Durchführung der Wachstumsversuche mit der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3.

3.2.5 Expression der Heparanase-mRNA in Chorionkarzinom-Zelllinien unter atmosphärischen und hypoxischen Bedingungen sowie unter Einfluss von Heparin und VEGF₁₆₅

Die Expression der Heparanase-mRNA und ihre Regulation durch Heparin bzw. VEGF₁₆₅ wurden mittels der quantitativen Real-Time-PCR (q-PCR) untersucht.

Die Schritte vor der Behandlung sowie das Lösen der Testsubstanzen entsprechen denen der Wachstumsuntersuchungen. Jedoch wurden Gewebekulturplatten mit 6-wells (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) verwendet und 600.000 JEG-3-Zellen bzw. 300.000 JAR-Zellen pro well ausgesät. Sämtliche Behandlungen erfolgten jeweils unter atmosphärischen und hypoxischen Bedingungen.

Die Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 wurde für 3 h mit Heparin bzw. VEGF₁₆₅, jeweils mit FKS-Konzentrationen des Mediums von 1 % und 3,3 % behandelt. 24 h nachdem die Zellen ausgesät wurden, wurde das Medium auf den Platten mit einem FKS-Gehalt von 10 % gegen testsubstanzenhaltendes Medium, mit entsprechend reduziertem FKS-Gehalt ausgetauscht. Die untersuchte Heparin-Konzentration betrug 0,1 U/ml Heparin, da bei dieser Konzentration die höchste Proliferation in den Wachstumsversuchen zu verzeichnen war. Eine fehlende Zugabe von Heparin diente als Negativkontrolle. In die Ergebnisse dieser Arbeit fließen die Werte eines Ansatzes mit jeweils einer Kultur von Kontrolle und Proben exemplarisch ein, die in der q-PCR jeweils doppelt bestimmt wurden.

Die Expression der Heparanase mRNA wurde unter dem Einfluss von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml VEGF₁₆₅ untersucht. Eine fehlende Zugabe von VEGF₁₆₅ diente als Negativkontrolle. Für den Ansatz mit 3,3 % FKS fließen drei, mit 1 %

FKS zwei Ansätze mit jeweils einer Kultur für Kontrolle und Proben in die Ergebnisse dieser Arbeit ein, die in der q-PCR jeweils doppelt bestimmt wurden. Die Heparanase-Expression der JAR-Zellen wurde bei vollständigem FKS-Entzug untersucht. Die Zellen wurden für 24 h mit 10 U/ml und 100 U/ml Heparin behandelt, nachdem ca. zwei Stunden zuvor das FKS vollständig entzogen wurde. Die Behandlung erfolgte in zwei unabhängigen Ansätzen, mit jeweils zwei Kulturen für Kontrollen und Proben, die jeweils in Doppelbestimmung in der q-PCR untersucht wurden. Die Konzentrationen wurden beispielhaft als mittlere Konzentrationen der Wachstumsversuche gewählt. Im Anschluss an die Behandlung wurde die RNA isoliert.

3.2.6 RNA-Isolierung

Die RNA wurde mit der Qiazol-Methode unter einem Abzug isoliert. Es wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit Filter verwendet, um eine Kontamination der RNA mit RNasen zu vermeiden. Das Medium wurde von den 6-well-Gewebekulturplatten abgekippt, 1 ml Qiazol Lysis Reagent (Qiagen GmbH, Hilden) hinzupipettiert und kräftig geschüttelt, um die Zellen zu lysieren. Das hierzu verwendete Trizol erhält die Integrität der RNA, während es die Zellen lysiert und Zellkomponenten auflöst. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das die lysierten Zellen enthaltende Trizol in 2 ml Safe-lock Tubes (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) überführt und 200 µl Chloroform (Merck KGaA, Darmstadt) hinzupipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden 15 s stark per Hand geschüttelt. Nach 2 - 3 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen bei 4 °C und 12.000 x g für 15 min zentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 2K15, Sigma, Osterode am Harz). Dies führte zu einer Trennung der wässrigen RNA-enthaltenden Phase von einer organischen roten Phenol-Chloroform Phase. Die zwischen wässriger und organischer Phase liegende Interphase enthält die chromosomale DNA (cDNA). Die wässrige Phase wurde in neue 2 ml-Safe-lock Tubes überführt, nach Zugabe von 500 µl Isopropylalkohol (Sigma-Aldrich, Steinheim) gevortext (Vortex-Schüttler Assistent Reamix 2789, Karl Hecht GmbH & Co KG "Assistent", Sondheim/Rhön) und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 4 °C und 12.000 x g 10 min zentrifugiert, um die RNA zu präzipitieren. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 1 ml 75 %-igem

Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) gewaschen und bei 4 °C und 7.500 x g für 5 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in 30 µl Wasser (Ultrapure, DNase-, RNase frei; Life Technologies GmbH, Darmstadt) resuspendiert und für 10 min bei 55 °C inkubiert (Thermomixer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf).

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt. Da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm haben, wurde die Absorption der RNA bei dieser Wellenlänge (A₂₆₀) gemessen. Eine Absorption von 1 ist hierbei gleichbedeutend mit einer RNA-Konzentration von 44 µg/ml. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.7 cDNA-Synthese

Das Auftauen der Substanzen sowie sämtliche Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Es wurden ausschließlich Pipetten mit Filterspitzen verwendet, um eine Verunreinigung mit RNasen und DNasen zu vermeiden. 1 µg RNA wurde mit 1 µl der reversen Transcriptase SuperScript II (10.000 U [200 U/MI]; Life Technologies GmbH, Darmstadt) und Randomprimern revers transkribiert.

In ein nukleasefreies 0,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-Tube: Multiply®-µStrip Pro 4er Kette; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) wurden die in Tabelle 18 aufgeführten Substanzen pipettiert, zentrifugiert (Mikrozentrifuge MC6, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) und im Biometra Thermocycler TPersonal 48 (Biometra GmbH, Göttingen) bei 65 °C für 5 min inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf 4 °C abgekühlt und sofort auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 6 µl einer zuvor hergestellten Mischung aus 4 µl 5x First Strand Buffer (Life Technologies GmbH, Darmstadt) und 2 µl 0,1 M DTT (Life Technologies GmbH, Darmstadt) in jedes Reaktionsgefäß. Das 0,1 M DTT wurde, bevor es hinzugefügt wurde, sorgfältig gevortext, um Präzipitate zu lösen. Der Ansatz wurde bei 25 °C für 2 min inkubiert um die Primerhybridisierung zu ermöglichen. Anschließend wurde 1 µl der reversen Transkriptase SuperScript II in jedes Reaktionsgefäß gegeben. Die Reaktionsgefäße durchliefen nacheinander 10 min bei 25 °C, 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C. Die cDNA wurde auf 4 °C abgekühlt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Substanz	Hersteller / Händler	Menge
Random Primer, 300 µg (3µg/µl), verdünnt 1 µg/µ	Life Technologies GmbH, Darmstadt	1 µl
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat) Mix, 10 mM, alle vier Basen	Fermentas, Vertrieb durch Fisher Scientific GmbH, Schwerte	1 µl
1 µg Gesamt-RNA		x µl
Ultrapure, DNase-, RNase-frei	Life Technologies GmbH, Darmstadt	auf 12 µl

Tabelle 19: Mix zur Auflösung der RNA-Sekundärstrukturen

3.2.8 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der quantitativen Real-Time-PCR erfolgt die Quantifizierung während der exponentiellen Phase der Amplifikation mithilfe von Fluoreszenzmessungen des an die doppelsträngige DNA gebundenen DNA-Farbstoffes SYBR-Green I nach jedem Syntheseschritt. Hierfür wurde der Platinum® SYBR® Green q-PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die Amplifikation der RNA wurden spezifische Oligonukleotide für das HPSE-Gen (GenBank accession-no. NM_006665; metabion international AG, Martinsried) entworfen. Als Referenz-Gene wurden HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase, Metabion international AG, Martinsried) und SDHA (Succinat-Dehydrogenase, Metabion international AG, Martinsried) eingesetzt.

Die cDNA sowie sämtliche Substanzen wurden auf Eis aufgetaut und ausschließlich unter Verwendung von Filterspitzen pipettiert. 2 µl cDNA, bzw. zur Kontrolle 2 µl Wasser (Ultrapure, DNase-, RNase-frei; Life Technologies GmbH, Darmstadt), wurden in die wells einer 96-well-PCR-Platte (96-well Multiply®-PCR-Plate; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) vorgelegt. Aus den in Tabelle 22 aufgeführten Substanzen wurde ein Supermix hergestellt und 23 µl hiervon in jedes well nachgelegt.

Substanz	Hersteller / Händler	Menge/well
Master Mix = Platinum® SYBR® Green, q-PCR Super Mix UDG	Life Technologies GmbH, Darmstadt	12,5 µl
Oligonukleotidmix (forward + reverse) jeweils 10 mM für HSPE, HPRT1, SDHA	metabion international AG, Martinsried	1 µl
Ultrapure, DNase- und RNase-frei	Life Technologies GmbH, Darmstadt	9,5 µl

Tabelle 20: Zusammensetzung des Supermixes für die q-PCR

Die Platte wurde mit einer Klebefolie (optisch klar; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) verschlossen und bei 1.000 x g für 1 min zentrifugiert (Zentrifuge Universal 32,

Hettich, Tuttlingen), um alle Flüssigkeiten am Boden zu konzentrieren. Die q-PCR wurde nach dem Protokoll in Tabelle 23 im DNA Engine Opticon 2 (Biozym, Oldendorf) durchgeführt.

1.) 50 °C, 2 min	Aktivierung der Polymerase
2.) 95 °C, 2 min	Aufschmelzen der cDNA Überstrukturen
3.) 95 °C, 15 s	Denaturierung
4.) 60 °C, 30 s	Primerhybridisierung und Elongation
5.) Messung des Fluoreszenzsignals	
6.)	44 Zyklen 3.)-5.)
7.) 65 °C – 95 °C in 0,3 °C Schritten mit jeweiliger Messung	Schmelzkurvenanalyse

Tabelle 21: Protokoll der quantitativen Real-Time-PCR

3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Spezifität der q-PCR zu überprüfen, wurde das PCR-Produkt in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Auf ein 1,5 %iges Agarosegel wurden ein Probenmix und ein Molekulargewichts-Marker (Low Molecular Weight Marker, NEB, Frankfurt am Main) aufgetragen. Der Probenmix bestand aus 10 µl DNA des PCR-Produkts und 2 µl 6x Probenpuffer (6x Gel loading dye blue, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main). Die für 1 h 20 min angelegte Spannung entsprach 100 V (Stromgeber PowerPac 300). Die Banden wurden auf UV-Transilluminator TI1 (Biometra GmbH, Göttingen) dargestellt und mit dem Geldokumentationssystem (Phase GmbH, Lübeck) fotografiert.

3.2.10 Proteinisolierung

Zur Extraktion der Proteine wurden JEG-3-, JAR-, und OVCAR-3-Zellen trypsinisiert und in 15 ml Probenröhrchen für 6 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml DPBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5 ml DPBS gewaschen. Das Pellet wurde mit Mammalian Protein Extraction Buffer (GE Healthcare, München) entsprechend Protokoll resuspendiert. Um eine komplette Lyse der Zellen zu erreichen, wurden die Zellen für 30 min bei -20 °C eingefroren und dann wieder aufgetaut. Das Lysat wurde für 15 min auf Eis inkubiert und in Abständen von 5 min gevortext (Assistent Reamix 2789, Hecht-Assistent, Sondheim), bevor es bei 4 °C für 30 min bei 15.400 x g zentrifugiert wurde, um grobe Zellreste von den gelösten Proteinen zu separieren. Der klare Proteinüberstand wurde für die weiteren Untersuchungen bei -80 °C asserviert.

Um die Konzentration der extrahierten Proteine zu bestimmen, wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn) verwendet. 200 µl von einem Mix aus Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1 wurden mit 10 µl jeder Probe und den Proteinlösungen der Standardreihe in Doppelbestimmung auf einer 96-well-Platte gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Mit dem MRX Multiplate-Reader wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Mit der GraphPad Prism 5 Software (GraphPad, La Jolla, USA) wurde eine Standardkurve errechnet und anhand dieser die Konzentrationen der Proben-Extinktionen in µg/ml bestimmt. 20 µg des Proteins wurden in 15 µl Wasser und 4x Probenpuffer (0.125 M TrisCl, 4 % SDS, 20 % Glyzerol, 2 % 2-Mercaptoethanol, pH 6,8 und 1 % Bromphenol Blau) verdünnt. Das Protein wurde 5 min bei 95 °C denaturiert.

3.2.11 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Darstellung spezifischer Proteine und wurde angewendet, um die Heparanase in den Chorionkarzinom-Zellen JEG-3 und JAR nachzuweisen.

Ein 12,5 %iges SDS-Polyacrylamid-Trenngel sowie ein 4 %iges SDS-Polyacrylamid-Sammelgel wurden nach Tabelle 25 hergestellt.

Trenngel, 12,5 %	Sammelgel, 4 %	Substanzen	Hersteller/Händler
4.165 µl	223,3 µl	Acrylamid : Bisacrylamid 37,5 : 1	Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe
1,5 M, pH 8,8 2.500 µl	0,5 M, pH 6,8, 416,6 µl	TrisCl	Tris, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
100 µl	16,6 µl	10 % Natriumdodezylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
125 µl	33,3 µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
22,5 µl	3,3 µl	N,N,N',N'- Tetramethyldiamid (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
3.155 µl	1.000 µl	aqua dest.	

Tabelle 22: Zusammensetzung des 12,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Trenngels sowie des 4 %igen SDS-Polyacrylamid-Sammelgels

15 µl der Proteinlösung bzw. 7 µl des Markers Precision Plus Protein Dual Color Standard B1 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurden auf das Gel aufgetragen und bei 100 V aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde die ovarielle Adenokarzinom-Zelllinie OVCAR-3 (ATCC, Vertrieb durch LGC Standards GmbH,

Wesel) verwendet. Die Proteine wurden horizontal bei 10 V und 35 mA für 1 h mit der Blottingapparatur (Hoefer SemiPhor semi-dry transfer unit, Hoefer, Inc., Holliston, Massachusetts, USA; Stromgeber: Electrophoresis Power Supply – EPS 200, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare, München) geblottet.

Zur Immundetektion wurde der Blot 1 h in Block-Puffer (5 % Milchpulver [Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe] gelöst in TBS-Waschpuffer [100 mM Tris, 1 M NaCl mit 0,1 % Tween 20; Merck KGaA, Darmstadt) bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde der Blot mit dem monoklonalen Antikörper gegen Heparanase (Heparanase-1 [HPA1] Antikörper, Klon HP3/17, monoklonal, anti-human; Labgen™, Vertrieb durch Acris Antibodies GmbH, Herford) in einer Verdünnung von 1:4.000 mit handelsüblicher Kuhmilch über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde dreimal für 5 min in TBS-Waschpuffer gewaschen. Dann wurde der Blot mit dem Sekundärantikörper (Schaf gegen Maus-IgG, HRP-konjugiert; GE Healthcare, München) in einer Verdünnung von 1:4.000 mit handelsüblicher Kuhmilch für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde der Blot dreimal mit TBS-Waschpuffer für 15 min gewaschen. Zur ECL (enhanced chemiluminescence)-Detektion wurde das Immobilon™-Western-Chemiluminescent-HRP-Substrate (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt) verwendet. Mit dem Blot wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ ECL, High Performance Chemiluminescence Film, GE Healthcare, München) belichtet und entwickelt. Die Filme wurden eingescannt (Scanner: Scan Maker X12USL, Microtek, Hsinchu, Taiwan) und die Banden des Markers auf den Film übertragen.

3.2.12 Statistik

Die statistische Auswertung des Wachstums nach unterschiedlichen Behandlungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erfolgte mit der Computersoftware GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, USA) mittels einfaktorieller ANOVA-Varianzanalyse und dem Dunnett's Post-hoc-Test. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt. Ausreißer wurden mit einem Outlier calculator (GraphPad, La Jolla, USA), welcher den Grubb's Test verwendet, bestimmt und aus der Statistik ausgeschlossen.

Die statistische Auswertung der q-PCR erfolgte mit der REST-MCS beta Software, Version 2 (August 2006; REST.gene-quantification.info; 30.09.2013).

Die Änderung der Expression des Zielgens (HPSE) in Bezug zur unbehandelten Probe normalisiert mit dem Housekeeping-Gen bzw., wie in diesem Fall, mit zwei Housekeeping-Genen (HPRT1, SDHA) wird als relative Expression (R) bezeichnet. Diese wurde anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Housekeeping-Gen}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe a}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Probe b}}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Δ = Differenz

Ct = engl. cycle threshold, auch als Cp-Wert, engl. crossing point, bezeichnet. Beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant messbar ist

R = relative Expression

4. ERGEBNISSE

4.1 Einfluss von Heparin auf das Wachstum der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie

Die Proliferation der JEG-3-Zellen konnte durch Heparin in Konzentrationen von 0,01 U/ml bis 10 U/ml unter atmosphärischen Bedingungen (wassergesättigte Atmosphäre von Raumluft und 5 % CO₂) und einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % signifikant gesteigert werden. Nach Behandlung der JEG-3-Zellen mit 0,01 U/ml Heparin stieg die Proliferation auf 119,5 % im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$), mit 0,1 U/ml Heparin auf 133,75 % im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$), mit 1 U/ml Heparin auf 129,9 % im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$) und mit 10 U/ml Heparin auf 115,93 % im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Nach Behandlung mit 100 U/ml Heparin (104,1 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) und 1.000 U/ml (104,74 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) wurde keine signifikante Steigerung erreicht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3a dargestellt.

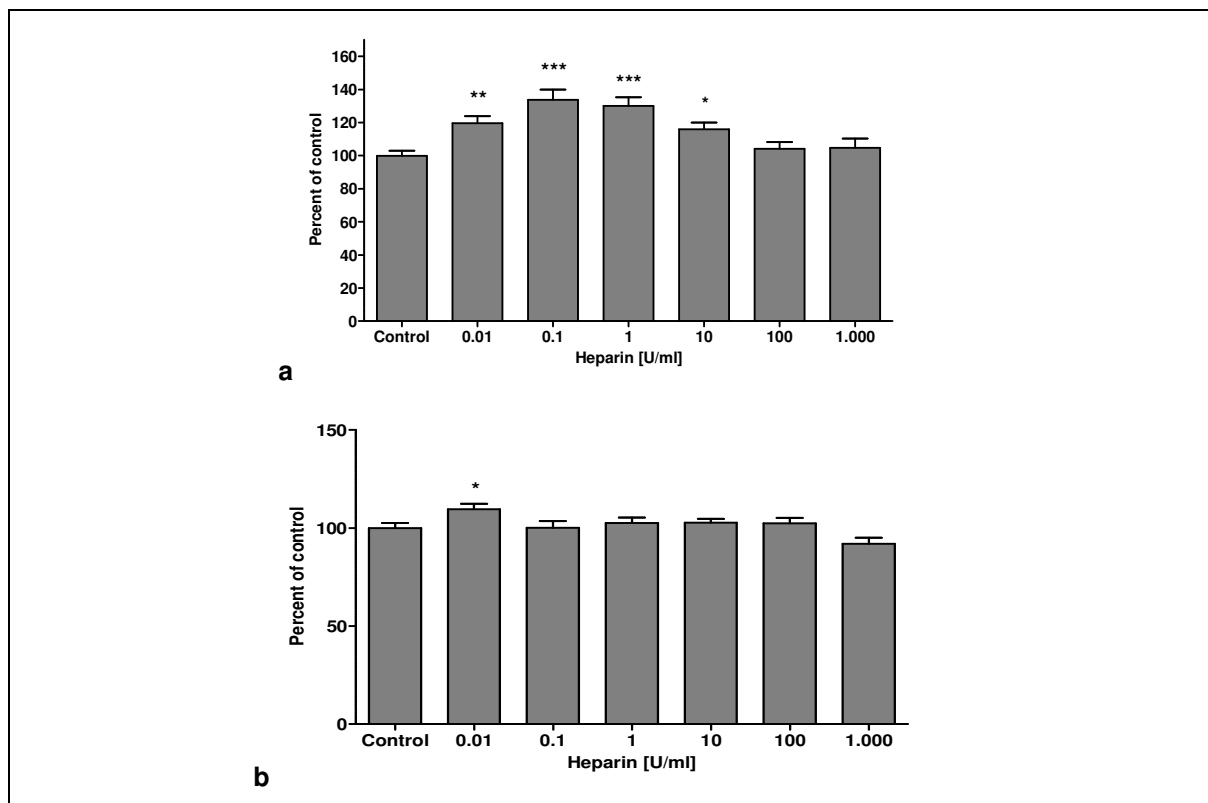


Abbildung 3: Darstellung der Mittelwerte der Proliferation der JEG-3-Chorionkarzinom-Zellen in Bezug zur Kontrolle unter einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % und unter Einfluss von Heparin [U/ml]. Die signifikanten Ergebnisse mit p-Werten $< 0,05$ sind wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. **a:** Atmosphärische Bedingungen **b:** Hypoxische Bedingungen

Nach Behandlung mit 0,01 U/ml Heparin stieg die Proliferation unter Sauerstoffreduktion (2 % O₂, 5 % CO₂) bei ansonsten identischen Bedingungen signifikant auf 109,73 % im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Nach Behandlung mit 0,1 U/ml Heparin (97,4 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 1 U/ml Heparin (100,1 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 10 U/ml Heparin (100,9 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 100 U/ml Heparin (101,6 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) und 1.000 U/ml Heparin (92 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) wurden unter hypoxischen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3b dargestellt.

Weder nach Behandlung mit 0,01 U/ml Heparin (108,7 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), noch mit 0,1 U/ml Heparin (101,48 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 1 U/ml Heparin (99,67 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 10 U/ml Heparin (99,54 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 100 U/ml Heparin (101,43 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) oder 1.000 U/ml Heparin (91,37 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) konnte, nachdem unter atmosphärischen Bedingungen der FKS-Gehalt des Mediums auf 1 % reduziert wurde, eine signifikante Veränderung der Proliferation erzielt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4a dargestellt.

Nach Sauerstoffreduktion konnte die Proliferation bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen mit 0,01 U/ml Heparin signifikant auf 114,18 % im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$) und mit 0,1 U/ml Heparin signifikant auf 111,05 % im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$) gesteigert werden. Mit 1 U/ml Heparin (109,71 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 10 U/ml Heparin (108,03 % der Kontrolle; $p > 0,05$), 100 U/ml Heparin (98,66 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) und 1.000 U/ml Heparin (92,67 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) konnte keine signifikante Veränderung der Proliferation erzielt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4b dargestellt.

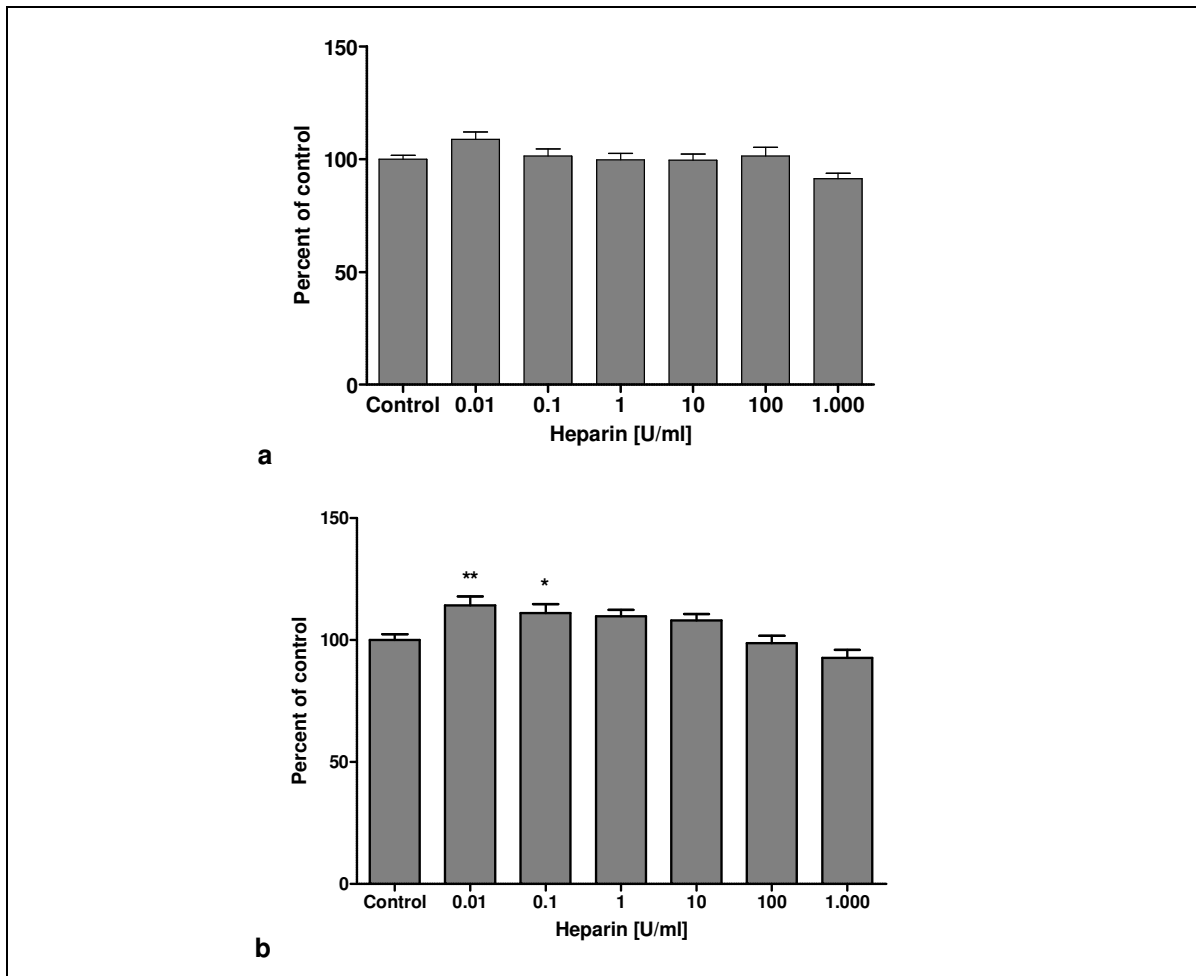


Abbildung 4: Darstellung der Mittelwerte der Proliferation der JEG-3-Chorionkarzinom-Zellen in Bezug zur Kontrolle unter einem FKS-Gehalt des Mediums von 1 % und unter Einfluss von Heparin [U/ml]. Die signifikanten Ergebnisse mit p-Werten < 0,05 sind wie folgt gekennzeichnet: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001. **a:** Atmosphärische Bedingungen **b:** Hypoxische Bedingungen

4.2 Einfluss von VEGF₁₆₅ auf das Wachstum der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie

Wie in Abbildung 5a dargestellt, konnte die Proliferation der JEG-3-Zellen nach Behandlung mit 10 ng/ml VEGF₁₆₅ (91,77 % im Vergleich zur Kontrolle; p < 0,05) und mit 100 ng/ml VEGF₁₆₅ (81,51 % im Vergleich zur Kontrolle; p < 0,001), unter atmosphärischen Bedingungen und einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 %, signifikant gehemmt werden. Mit 1 ng/ml VEGF₁₆₅ (95,93 % im Vergleich zur Kontrolle; p > 0,05) konnte im selben Versuch keine signifikante Veränderung der Proliferation erzielt werden.

Die Proliferation der JEG-3-Zellen konnte nach Behandlung mit 100 ng/ml VEGF₁₆₅ (86,78 % im Vergleich zur Kontrolle; $p < 0,01$) signifikant gehemmt werden, nachdem bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % hypoxische Bedingungen geschaffen wurden. Nach Behandlung mit 1 ng/ml VEGF₁₆₅ (108,94 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) und mit 10 ng/ml VEGF₁₆₅ (100,48 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) konnte unter identischen Bedingungen keine signifikante Veränderung der Proliferation erzielt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5b dargestellt.

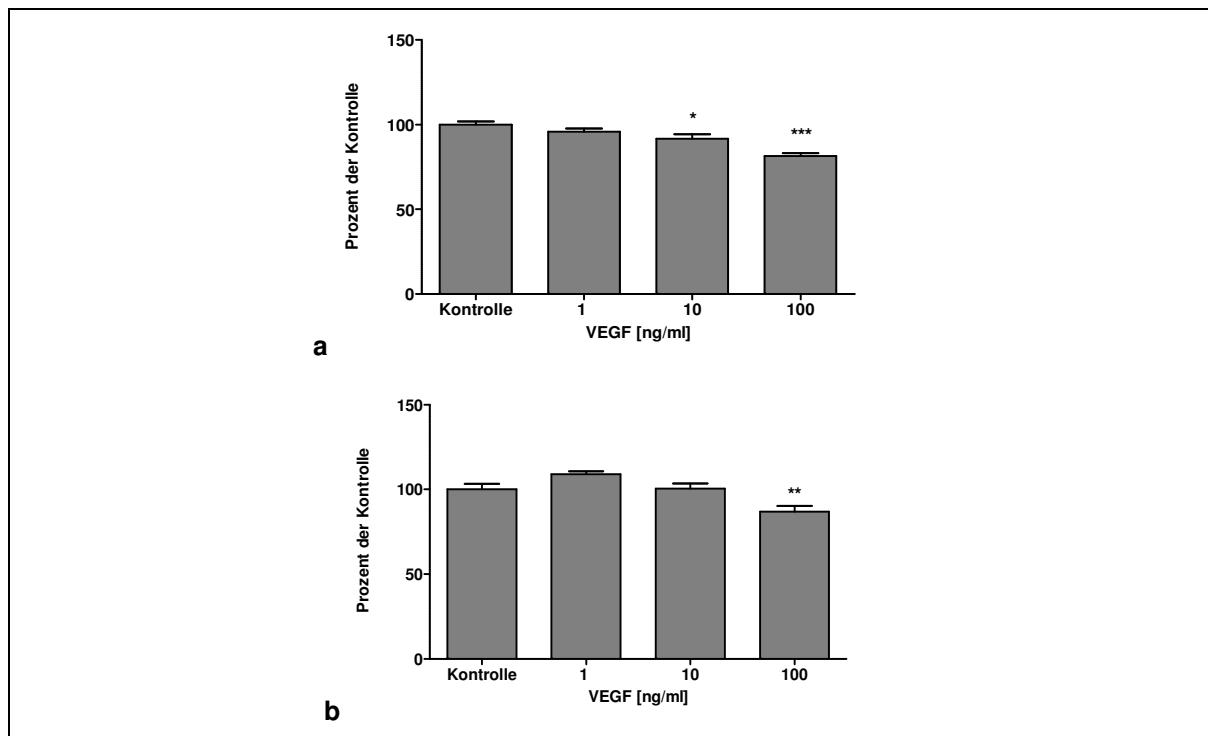


Abbildung 5: Darstellung der Mittelwerte der Proliferation der JEG-3-Chorionkarzinom-Zellen in Bezug zur Kontrolle, einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % und unter VEGF₁₆₅-Einfluss [ng/ml]. Die signifikanten Ergebnisse in Bezug zur Kontrolle mit p-Werten $< 0,05$ sind wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. **a:** Atmosphärische Bedingungen **b:** Hypoxische Bedingungen

Die Proliferation der JEG-3-Zellen konnte, wie in Abbildung 6a dargestellt, nach Behandlung mit 10 ng/ml VEGF₁₆₅ (88,61 % im Vergleich zur Kontrolle; $p < 0,01$) und 100 ng/ml VEGF₁₆₅ (77,17 % im Vergleich zur Kontrolle; $p < 0,001$), unter atmosphärischen Bedingungen und nach Reduktion des FKS-Gehalt des Mediums auf 1 %, signifikant gehemmt werden. Mit 1 ng/ml VEGF₁₆₅ (101,88 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) konnte unter identischem Versuchsaufbau keine signifikante Veränderung der Proliferation erreicht werden.

Nach Behandlung mit 1 ng/ml VEGF₁₆₅ konnte die Proliferation der JEG-3-Zellen nach Sauerstoffreduktion und Verringerung des FKS-Gehalts des Mediums auf 1 % signifikant auf 111,15 % im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$) gesteigert werden. Nach Behandlung mit 10 ng/ml VEGF₁₆₅ (105,61 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) und 100 ng/ml VEGF₁₆₅ (100,62 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) konnte bei identischem Versuchsablauf keine signifikante Veränderung der Proliferation gemessen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6b dargestellt.

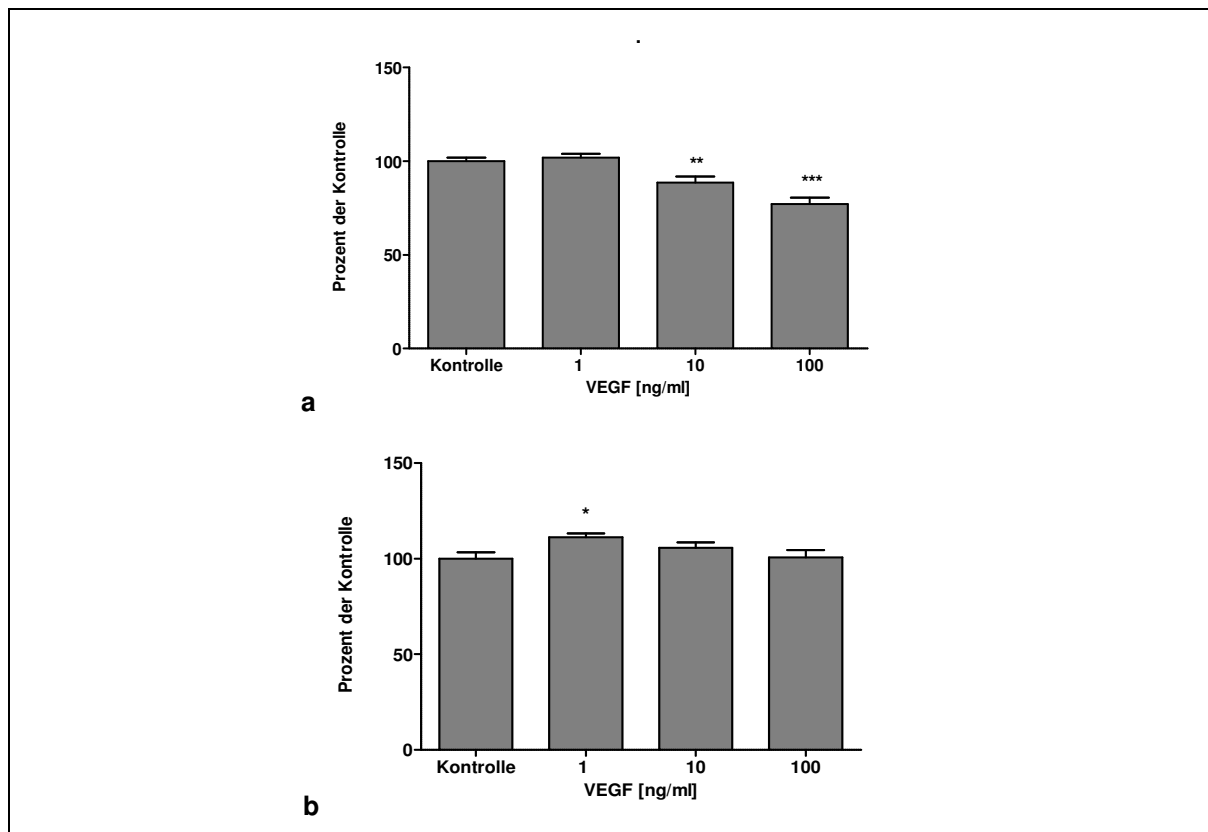


Abbildung 6: Darstellung der Mittelwerte der Proliferation der JEG-3-Chorionkarzinom-Zellen in Bezug zur Kontrolle, einem FKS-Gehalt des Mediums von 1 % und unter VEGF₁₆₅-Einfluss [ng/ml]. Die signifikanten Ergebnisse in Bezug zur Kontrolle mit p-Werten $< 0,05$ sind wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. **a:** Atmosphärische Bedingungen **b:** Hypoxische Bedingungen

4.3 Einfluss von Heparin auf das Wachstum der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie

Die Proliferation der JAR-Zellen konnte durch Behandlung mit 0,01 U/ml Heparin (108,98 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 0,1 U/ml Heparin (111,82 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 1 U/ml Heparin (112,47 % im Vergleich zur

Kontrolle; $p > 0,05$), 10 U/ml Heparin (103,76 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 100 U/ml Heparin (93,73 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) und 1.000 U/ml Heparin (92,17 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) unter atmosphärischen Bedingungen und einem FKS-Gehalt des Mediums von 10 % nicht signifikant beeinflusst werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7a dargestellt.

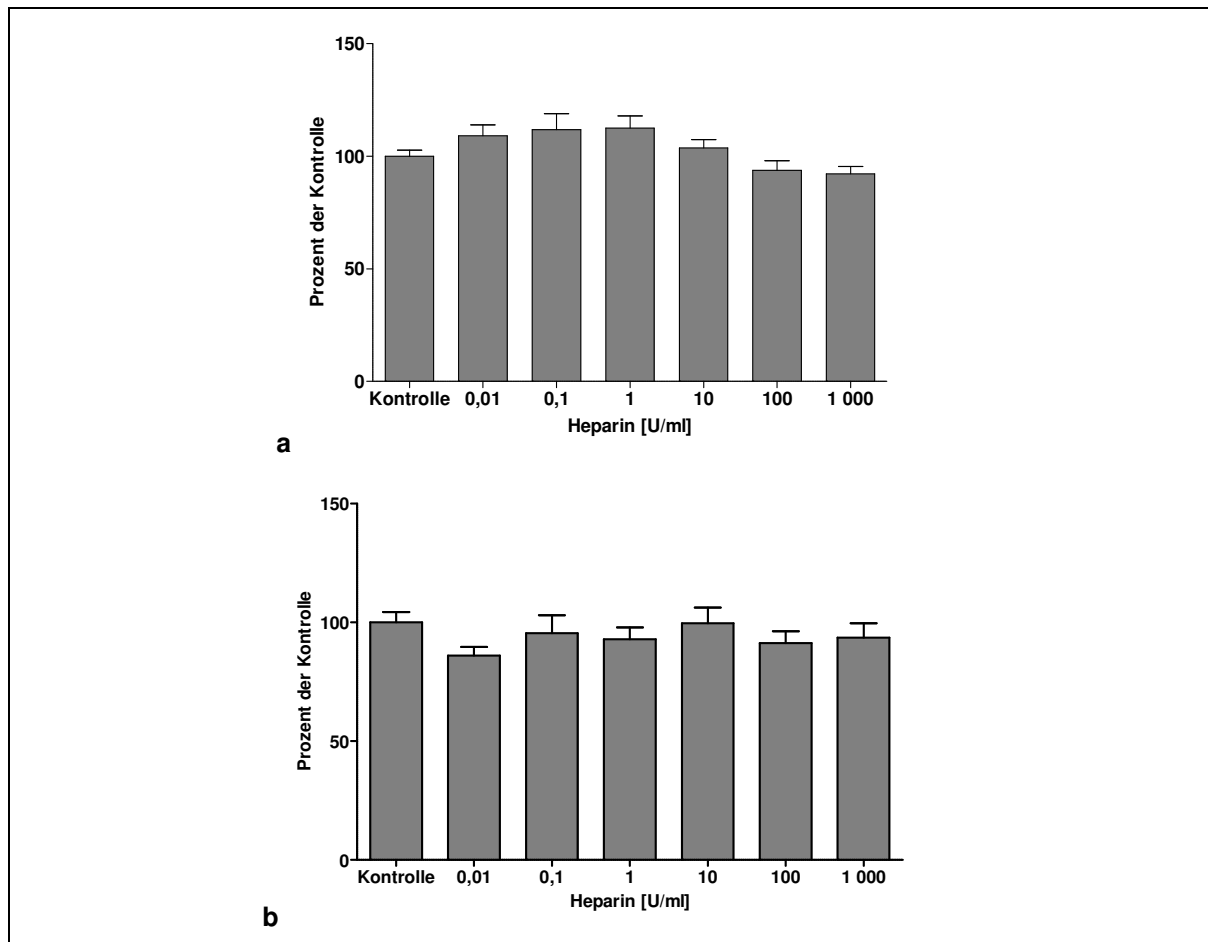


Abbildung 7: Darstellung der Mittelwerte der Proliferation der JAR-Chorionkarzinom-Zellen in Bezug zur Kontrolle unter einem FKS-Gehalt des Mediums von 10 % und unter Einfluss von Heparin [U/ml]. Die signifikanten Ergebnisse mit p-Werten $< 0,05$ sind wie folgt gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. **a:** Atmosphärische Bedingungen **b:** Hypoxische Bedingungen

Nach Behandlung mit 0,01 U/ml Heparin (86,06 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 0,1 U/ml Heparin (95,54 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 1 U/ml Heparin (92,96 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$), 10 U/ml Heparin (99,66 % im Vergleich zur Kontrolle), 100 U/ml Heparin (91,31 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$) und 1.000 U/ml Heparin (93,58 % im Vergleich zur Kontrolle; $p > 0,05$),

unter Sauerstoffreduktion und einem FKS-Gehalt des Mediums von 10 %, konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Proliferation verzeichnet werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7b dargestellt.

4.4 Expression der der Heparanase-mRNA

Die Analyse der Expression der Heparanase-mRNA erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR (q-PCR). Als Zielgen diente HPSE und als Referenz-Gene, welche zur Normalisierung benötigt werden, SDHA und HPRT1.

4.4.1 Einfluss der Sauerstoffreduktion auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie

Die Expression des HPSE-Gens in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie konnte durch Sauerstoffreduktion (2 % O₂, 5 % CO₂) im Vergleich zu atmosphärischen Bedingungen (wassergesättigte Atmosphäre von Raumluft und 5 % CO₂ bei 37 °C) nicht signifikant reguliert werden. Somit hat die Hypoxie als alleiniger Faktor keinen Einfluss auf die Expression der Heparanase in selbigen Zellen.

4.4.2 Einfluss von Heparin auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie

Nach dreistündiger Behandlung der JEG-3-Zelllinie mit 0,1 U/ml Heparin konnte keine signifikante Regulation der Expression des HPSE-Gens festgestellt werden. Zwar zeigte sich eine tendenzielle Hemmung der Expression um 3,9 % im Vergleich zur Kontrolle ($p > 0,05$) unter atmosphärischen Bedingungen bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % und eine ebenfalls tendenzielle Hemmung der Expression um 15,8 % im Vergleich zur Kontrolle ($p > 0,05$) unter atmosphärischen Bedingungen bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 1 %, diese waren jedoch nicht signifikant. Nach Sauerstoffreduktion zeigten sich tendenzielle Steigerungen der Expression um 44,9 % im Vergleich zur Kontrolle ($p > 0,05$) bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % und um 9,8 % im Vergleich zur Kontrolle ($p > 0,05$) bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 1 %, diese waren jedoch nicht signifikant. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 23 dargestellt.

	1 % FKS			3,3 % FKS		
	R	E (%)	p	R	E (%)	p
A	0,842	↓ 15,8	0,665	0,961	↓ 3,9	0,672
H	1,098	↑ 9,8	0,824	1,449	↑ 44,9	0,484

Tabelle 23: Ergebnisse der q-PCR der mit 0,1 U/ml Heparin behandelten JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie unter atmosphärischen und hypoxischen Bedingungen und Reduktion des FKS-Gehaltes des Mediums auf 1 % und 3,3 %. Dargestellt ist die relative (R) sowie prozentuale (E [%]) Expression des HPSE-Gens in Bezug zu den Referenzgenen SDHA und HPRT1 sowie der p-Wert (p), welcher bei Werten < 0,05 eine signifikante Veränderung der Expression anzeigt.

4.4.3 Einfluss von VEGF₁₆₅ auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie

Nach dreistündiger Behandlung mit 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml VEGF₁₆₅ konnte unter atmosphärischen Bedingungen weder bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % noch von 1 % eine signifikante Veränderung der HPSE-Expression festgestellt werden ($p > 0,05$). Tendenziell war jedoch, mit Ausnahme der Behandlung mit 10 ng/ml VEGF₁₆₅ bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 %, eine Hemmung der HPSE-Expression angedeutet.

Unter einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % konnte keine signifikante Regulation des HPSE-Gens festgestellt werden ($p > 0,05$). Nach Behandlung mit 1 ng/ml VEGF₁₆₅ (Steigerung der Expression um 35,2 % im Vergleich zur Kontrolle; $p < 0,001$) und 10 ng/ml VEGF₁₆₅ (Steigerung der Expression um 10,2 % im Vergleich zur Kontrolle; $p < 0,001$) konnte nach Sauerstoffreduktion und Verringerung des FKS-Gehalts des Mediums auf 1 % in einem ersten Versuch eine signifikante Steigerung der Expression des HPSE-Gens induziert werden. Dieses Ergebnis war jedoch in zwei darauffolgenden Wiederholungen des Versuchs nicht reproduzierbar. Nach Behandlung mit 100 ng/ml VEGF₁₆₅ war in derselben Versuchsreihe zu keiner Zeit ein signifikantes Ergebnis induzierbar.

Tendenziell war jedoch, mit Ausnahme der Behandlung mit 100 ng/ml VEGF₁₆₅ bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 1 %, eine Steigerung der HPSE-Expression zu vermuten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 und 25 dargestellt.

	1 ng/ml			10 ng/ml			100 ng/ml		
	R	E (%)	p	R	E (%)	p	R	E (%)	p
A	0,977	↓ 2,3	0,898	1,053	↑ 5,3	0,811	0,912	↓ 8,8	0,929
H	1,746	↑ 74,6	0,177	1,380	↑ 38	0,680	1,103	↑ 10,3	0,885

Tabelle 24: Ergebnisse der q-PCR der mit VEGF₁₆₅ behandelten JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie unter Reduktion des FKS-Gehaltes des Mediums auf 3,3 % unter atmosphärischen (A) und hypoxischen (H) Bedingungen. Dargestellt sind die relative (R) und prozentuale (E %) Expression des HPSE-Gens in Bezug zu den Referenzgenen SDHA und HPRT1 sowie der p-Wert (p), welcher bei Werten < 0,05 eine signifikante Veränderung der Expression anzeigt.

	1 ng/ml			10 ng/ml			100 ng/ml		
	R	E (%)	p	R	E (%)	p	R	E (%)	p
A	0,720	↓ 28	0,638	0,739	↓ 26,1	0,609	0,847	↓ 15,3	0,834
H	1,197	↑ 19,7	0,578	1,211	↑ 22,1	0,719	0,962	↓ 3,8	0,918

Tabelle 25: Ergebnisse der q-PCR der mit VEGF₁₆₅ behandelten JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie unter Reduktion des FKS-Gehaltes des Mediums auf 1 % unter atmosphärischen (A) und hypoxischen (H) Bedingungen. Dargestellt sind die relative (R) und prozentuale (E %) Expression des HPSE-Gens in Bezug zu den Referenzgenen SDHA und HPRT1 sowie der p-Wert (p), welcher bei Werten < 0,05 eine signifikante Veränderung der Expression anzeigt.

4.4.4 Einfluss von Heparin auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie

Tendenziell scheint Heparin die HPSE-Expression in unserem Modell herunter zu regulieren. Sowohl unter 100 U/ml Heparin und atmosphärischen (R = 0,125) als auch unter 10 U/ml Heparin und hypoxischen (R = 0,35) Bedingungen zeigten sich entsprechende Ergebnisse. Die HPSE-Expression in der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie war in den durchgeführten q-PCRs jedoch so niedrig, dass sich die HPSE nur schwer quantifizieren ließ. Die JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie war bereits auf der Ebene der Kultivierung äußerst schwierig zu führen, weshalb der FKS-Gehalt des Mediums in Wachstums- und Expressions-Versuchen nicht unter 10 % reduziert werden konnte. Die gewonnenen Ergebnisse der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie sind dabei in einem Kontext mit den technisch anspruchsvollen q-PCR-Ergebnissen und der schwierigen Kultivierung zu sehen.

4.5 Gelelektrophoretische Überprüfung der Amplifikate der q-PCR

Die Längen der in der Gelelektrophorese überprüften Amplifikate der q-PCR sind von erwartungsgemäßer Länge. Die Anordnung der Proben ist in Tabelle 26 dargestellt, das Agarose-Gel in Abbildung 8. Die Bande für das Amplikon für HPSE läuft bei 163 bp, für SDHA bei 86 bp und für HPRT1 bei 84 bp.

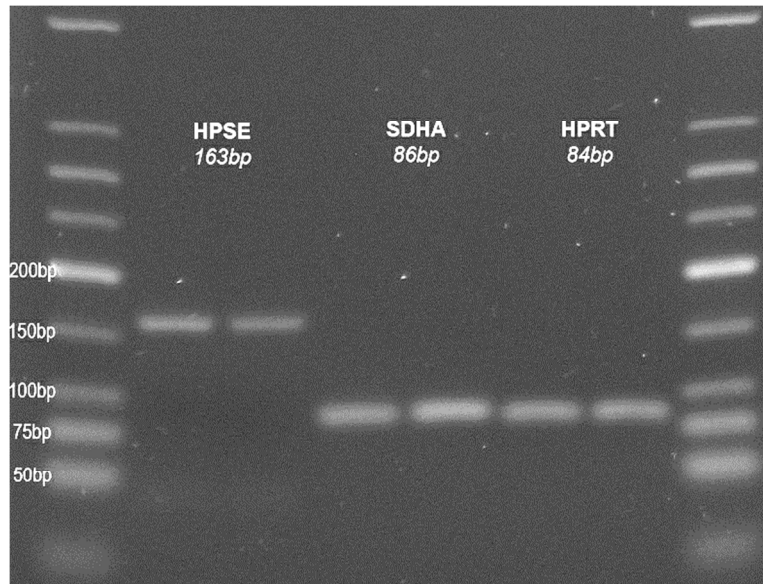


Abbildung 8: Darstellung des Agarose-Gels zur Überprüfung der Amplifikate der q-PCR.

S	1	2	3	4	5	6	7	8
P	M 8µl	HPSE Co	HPSE Heparin 0,1 U/ml	SDHA Co	SDHA Heparin 0,1 U/ml	HPRT1 Co	HPRT1 Heparin 0,1 U/ml	M 10 µl

Tabelle 26: Anordnung der Spuren mit den Amplifikaten der q-PCR und Marker im Agarose-Gel.

S = Spur, M = Marker, Co = Kontrolle, P = Probe

4.6 Nachweis der Heparanase-Proteinexpression

Die Heparanase-Expression wurde mit einem Western Blot nachgewiesen, der in Abbildung 9 dargestellt ist. Der hierfür verwendete Antikörper reagiert laut Hersteller mit der aktiven 50 kDa Form sowie mit dem latenten 65 kDa Präkursor. Als Referenz wurde die ovarielle Adenokarzinom-Zelllinie OVCAR-3 verwendet, welche eine deutliche Bande bei 50 kDa aufweist. In der Spur der JEG-3-Chorionkarzinom-Zellen ist eine schwache Bande im Bereich von 50 kDa und kaum sichtbar eine zweite Bande im Bereich von 65 kDa zu sehen, sodass von der Anwesenheit einer geringen Menge Heparanase auszugehen ist. In der Spur der JAR-Chorionkarzinom-Zellen sind eine deutliche Bande bei 50 kDa und eine

schwache Bande bei 65 kDa zu sehen. Die somit nachgewiesene Heparanase-Expression in den JAR-Zellen übersteigt die nachgewiesene Heparanase-Expression in den JEG-3 Zellen quantitativ deutlich.

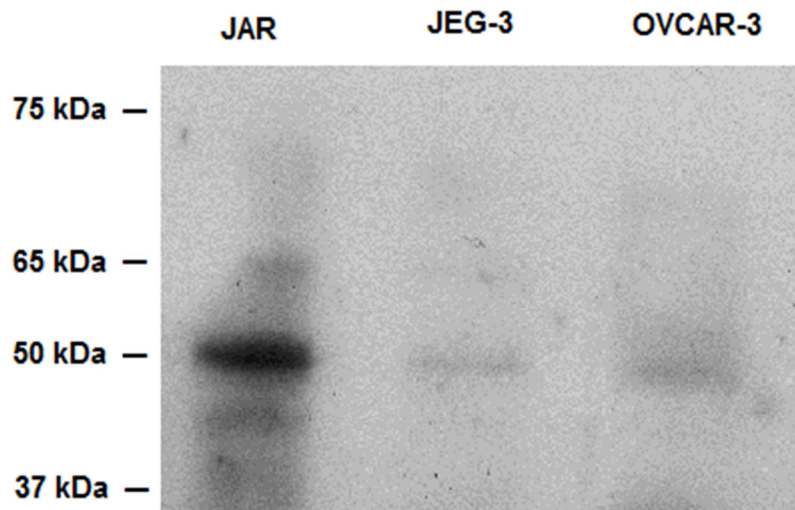


Abbildung 9: Western Blot zum Nachweis der Endo- β -D-glucuronidase Heparanase in den Chorionkarzinom-Zellen JAR, JEG-3 sowie in den Referenz-Zellen OVCAR-3.

5. DISKUSSION

5.1 Einordnung in die Fachliteratur

Schwangerschaftsassozierte hypertensive Erkrankungen, wie die Präeklampsie, spielen aufgrund der hohen Komplikationsrate für die werdenden Mütter und ungeborenen Kinder sowie ihrer Häufigkeit eine wichtige Rolle im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge und Geburtshilfe. Die Bedeutung dieses Erkrankungskomplexes liegt nicht zuletzt in den auch heute noch eingeschränkten und zum Teil wenig verstandenen Möglichkeiten der Prävention, Früherkennung und Therapie. Es liegen Hinweise auf einen präventiven Aspekt von Heparin in der Sekundärprophylaxe plazentaassoziierter Erkrankungen wie der Präeklampsie vor (28, 74). Der exakte Wirkmechanismus ist hierbei jedoch noch nicht entschlüsselt (12). Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Heparin und Vascular Endothelial Growth Factor₁₆₅ (VEGF₁₆₅) auf die Proliferation der als Modell für den Trophoblasten verwendeten Chorionkarzinom-Zelllinien zu untersuchen. Zudem sollte dargestellt werden, ob diese Beeinflussung über eine Regulation der Heparanase vermittelt wird.

Bereits 2006 fanden Nobuhisa et al. (64) in einem in-vitro-Modell heraus, dass die Heparanase sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert ist. Nach Behandlung von HL-60-Zellen, einer Promyelozytenleukämie-Zelllinie, mit dem die Zelldifferenzierung stimulierenden Stoff TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat), wurde lediglich die aktive Form der Heparanase im Zellkern nachgewiesen. Die aktive 50-kDa-Form geht durch Cathepsin-L-abhängige proteolytische Spaltung aus einer inaktiven 65-kDa-Proform hervor, gelangt mittels Translokation in den Zellkern und ist dort in den Prozess der Zelldifferenzierung involviert (41, 61, 64, 85, 86). Eine erhöhte Expression der Heparanase korreliert mit dem Fortschreiten verschiedener Malignome, wie z.B. Mamma, Kolon, Ovar, Gallenblase, Pankreas, akuter myeloischer Leukämie, nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom und dem multiplen Myelom (61, 63, 85). Die Heparanase fördert zwar die Metastasierung, Invasivität und Angiogenese, nicht jedoch die Proliferation humaner Magenkarzinom-Zellen (93). Im Rahmen von Versuchen mit in Ratten injizierten hochinvasiven 13762 MAT-Adenokarzinom-Zellen hemmt PI-88, ein sulfatiertes Oligosaccharid und Heparanase-Inhibitor, das primäre Tumorwachstum um ca. 50 %, die Lymphknotenmetastasierung um ca.

40 %, die Vaskularität von Tumoren um ca. 30 % und die hämatologische Metastasierung um mehr als 90 % (65). Diese allseits signifikanten Ergebnisse weisen auf die starke Involvierung der Heparanase in Wachstum, Invasivität und Vaskularisation von Tumorzellen hin. Diese Annahme wird auch durch die im weiteren auf S. 55 ausführlich beschriebenen Ergebnisse am Modell humaner pädiatrischer Sarkomzellen, unter Einsatz eines weiteren Heparanase-Inhibitors, dem zur Gruppe der Heparine gehörenden SST0001, unterstützt (14). Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass sowohl Heparin als auch einige chemisch modifizierte Heparine die Heparanase-Aktivität von Tumorzellen hemmen, was mit einem erniedrigten Metastasierungspotenzial korreliert (13, 15, 63).

Der Nachweis der Lokalisation der Heparanase in der humanen Plazenta, hier v.a. im Zytotrophoblasten, und ihre spezifische Inhibition durch Heparin wurden bereits in den 1990er Jahren beschrieben (32). Die humane Heparanase wurde unter Verwendung monoklonaler Antikörper sowohl in invasiven extravillösen Trophoblasten der humanen Plazenta als auch in Arterienwänden normaler Gewebe lokalisiert (22). Die Expression der Heparanase konnte im uterinen Epithel, der Dezidua und dem Trophoblasten der Maus sowie im humanen Trophoblasten nachgewiesen werden (41). Haimov-Kochman et al. (34) wiesen die Heparanase in villösen Zytotrophoblasten, Synzytiotrophoblasten und in intermediären trophoblastären Zellkolumnen im ersten Trimester normal verlaufender Schwangerschaften, sowie in molaren und ektopen Schwangerschaften nach. Das Heparanase-Protein wurde zudem v.a. im Endothel fetaler Kapillaren und in geringerer Konzentration auch in großen fetalen Gefäßen lokalisiert. Auch der die Dezidua und die mütterlichen Gefäße invadierende extravillöse Trophoblast zeigte sich HPSE-positiv. Im zweiten und dritten Trimester zeigten sich der villöse Zytotrophoblast und der die plazentare Implantationsseite invadierende extravillöse Trophoblast weiterhin HPSE-positiv. Der Synzytiotrophoblast zeigte im zweiten und dritten Trimester hingegen eine variable HPSE-Expression. Diese Ergebnisse gelten sowohl für Patientinnen mit normal verlaufenen Schwangerschaften, als auch für Patientinnen, welche an einer Plazenta accreta oder auch an einer Präeklampsie leiden. Die Ergebnisse des ersten und zweiten Trimesters resultieren aus zwanzig Gewebeproben normaler intrauteriner Schwangerschaften, zwischen 6. und 20. Schwangerschaftswoche, und aus jeweils vier kompletten und partiellen Molen im Gestationsalter von 6 bis

14 Schwangerschaftswochen. Die stereologischen Stichproben wurden jeweils nach elektiver Abruptio gewonnen. Weiterhin wurden fünf nicht rupturierte ektope Schwangerschaften in der sechsten bis neunten Schwangerschaftswoche chirurgisch reseziert. Die Ergebnisse des dritten Trimesters resultieren aus zehn Plazenten unkompliziert verlaufender und gesunder Schwangerschaften nach spontaner Entwicklung oder Sektio und aus zehn Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen ebenfalls nach normaler Entbindung oder Sectio (34). Revel et al. identifizierten einerseits die Heparanase im Blastozystenstadium bzw. der Morula der Maus und induzierten andererseits durch Zugabe von Heparanase einen ca. zweifachen Anstieg der Embryoimplantationsrate in der Maus (72). D'Souza et al. wiesen ebenfalls eine gesteigerte Embryo-Implantationsrate nach exogener HPSE-Zufuhr nach. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe einen dramatischen Anstieg der uterinen Heparanase-Expression und eine etwa vierzigfache Aktivitätssteigerung in der Frühschwangerschaft der Maus nachweisen. Die Heparanase-mRNA sowie das Protein werden zusätzlich in der Dezidua exprimiert und stark auf der Implantationsseite induziert. Konsekutiv zeigte die Arbeitsgruppe, dass die Gabe von PI-88 die Embryo-Implantation der Maus in vivo hemmt (23). Ein Teil dieser Ergebnisse wurde auch am Pavian-Tiermodell bestätigt. Hier überstieg die HPSE-Expression in der Pavian-Dezidua in der Mitte der Schwangerschaft die HPSE-Expression in der apikalen Oberfläche des Drüsenepithels und in Drüsensekreten nichtschwangerer Paviane deutlich. Weiterhin schlugen D'Souza et al. die Brücke zu dem HPSE-abhängigen Anstieg der Freisetzung der vaskularisationsfördernden und Heparin-gebundenen Wachstumsfaktoren aus der Extrazellulärmatrix während der embryonalen Implantation (23). Die HPSE-abhängige Freisetzung von Wachstumsfaktoren beruht auf der spezifischen Spaltung von u.a. in der EZM der Plazenta (34) reichlich vorhandenen HSPGs durch die Heparanase (61). Daher können durch HSPG-Degradation die Matrix zerlegt und die Plazentation und Trophoblast-Invasion gefördert werden (34).

Dem entgegen sprechen die Ergebnisse von Harris et al., die feststellten, dass während des ersten Trimesters isolierte humane Trophoblasten zwar einen hohen Gehalt an Heparanase exprimieren, ein funktionshemmender Antikörper bei Normoxie jedoch nicht die Invasion primärer Zytotrophoblasten oder extravillöser Trophoblasten hemmt. In einer Folgekultur unter 3 % Sauerstoff war die

Heparanase-Expression nicht erhöht und die Trophoblasteninvasion durch den blockierenden Antikörper nicht verlangsamt (35).

Es existieren jedoch zwei natürliche Inhibitoren der Heparanase, das Eosinophile Major Basic Protein (EMBP) und HIP/RPL29. Kirn-Safran et al. stellten die Expression der mRNA des EMBP in der humanen Plazenta fest und wiesen die akkumulierende Expression von HIP/RPL29 in der Dezidua der Maus in einem komplementären Muster zu HSPG nach (41).

Die Ergebnisse von Harris et al. von 2008 (35) legen zwar nahe, dass die Heparanase keinen direkten Einfluss auf die Trophoblasten-Invasion ausübt und eine Sauerstoffunterversorgung in diesem Zusammenhang weder Einfluss auf die Heparanase selbst noch auf die Invasion nimmt, die auf Seite 52 bis 53 beschriebene hohe Expression der Heparanase in plazentations- und implantationsrelevanten Zellen und Geweben spricht jedoch weiterhin für eine zentrale Rolle des Enzyms. Auch haben Harris et al. die natürlichen Heparanase-Inhibitoren EMBP und HIP/RPL29 nicht in ihre Untersuchungen eingeschlossen, sodass zum jetzigen Zeitpunkt keine definitive Aussage über die Rolle der Heparanase im Prozess der Plazentation, Implantation und der damit einhergehenden Invasion getroffen werden kann.

Alle bisher erarbeiteten und hier erwähnten Ergebnisse bezüglich der Interaktion zwischen Trophoblast, Dezidua und der Heparanase sind unter Berücksichtigung der verwendeten Modelle als problematisch zu betrachten. Die Herausforderung an eine Zellkultur, die Interaktion zwischen Trophoblast, repräsentative Embryo, und Dezidua einerseits und den Einfluss von Heparanase und Heparin auf die Interaktion andererseits, sind immens und technisch kaum zu bewältigen. Die direkte Untersuchung der Interaktion zwischen Embryo und Dezidua im Rahmen der Implantation und Plazentation sind aus ethischen Gesichtspunkten ausnahmslos im Tiermodell untersuchbar, welches letztendlich nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden kann.

In Zusammenspiel mit der physiologischen Lokalisation der Heparanase in plazentarem und trophoblastärem Gewebe stellt sich somit weiterhin die Frage, ob invasions- und vaskularisationssteigernde Effekte auch hier über die Heparanase vermittelt werden könnten.

Die hemmende Wirkung von Heparin auf die Metastasierung verschiedener Tumore (37, 80) wird u.a. über die Hemmung der Heparanase und im Weiteren

über Modulation von Wachstumsfaktoren wie dem fibroblast growth factor-2 (FGF-2) und VEGF vermittelt (15, 45), was die Frage nach der Rolle der Heparanase in der Frühschwangerschaft noch untermauert. Spezifisch auf die Heparanase wirkende Heparine hemmen die Metastasierung jedoch nur in Heparanase-produzierenden Tumoren (37). In einer klinischen, randomisierten Studie mit Patienten mit fortgeschrittenen Prostata-, Lungen- oder Pankreaskarzinomen konnte durch Gabe von Nadroparin, einem niedermolekularen Heparin, zusätzlich zur Standard-Therapie kein Überlebensvorteil im Vergleich zu nicht zusätzlich mit Nadroparin behandelten Patienten festgestellt werden. Jedoch geht aus den veröffentlichten Daten nicht hervor, ob die untersuchten Tumore Heparanase produzierten (83). Die Fähigkeit von Heparinen zur Inhibierung der Heparanase ist schon lange etabliert (32, 60). SST0001, ein Heparanase-Inhibitor aus der Familie der Heparine, hat in-vitro einerseits die Fähigkeit, sowohl die Konzentration, als auch die Freisetzung verschiedener Angiogenese-Faktoren - wie auch dem VEGF - im konditionierten Medium von Sarkomzellen herunter zu regulieren und inhibiert andererseits den pro-invasiven Effekt Heparin-bindender Faktoren wie VEGF signifikant. Die Gabe von SST0001 resultierte bei pädiatrischen Malignom-Modellen in einer signifikanten Wachstumshemmung der untersuchten Zellkulturen um 64 bis 95 % (14). Da die Metastasierung von Karzinomen, ähnlich dem Prozess der Implantation und Plazentation im Rahmen der Schwangerschaft, ein hohes Invasions- und Vaskularisationspotential voraussetzt, drängt sich die Frage auf, ob die prophylaktische bzw. therapeutische Gabe von Heparin im Rahmen der Präeklampsie ebenfalls die Heparanase hemmen und dadurch die Implantation und Plazentation behindern würde, was eine absolute Kontraindikation für Heparine in frühen Schwangerschaftswochen nach sich ziehen müsste. Dem gegenüber steht die Wirkung von Heparin auf das Gerinnungssystem, dessen quantitative und qualitative Zusammensetzung während der Schwangerschaft signifikante physiologische Veränderungen durchläuft. Verschiedene Gerinnungsfaktoren, u.a. der Faktor X, nehmen mit Dauer der Schwangerschaft progredient in Ihrer Aktivität zu, während die Thrombozytenaktivität reduziert ist (12). Diese in der Schwangerschaft veränderte Aktivität von Elementen des Gerinnungssystems kann sich bei einer überschießenden Fehlregulation negativ auf die Implantation der Blastozyste auswirken (62). So ist v.a. die in einer

gestörten plasmatischen Gerinnung, jedoch auch auf hereditären oder erworbenen Thrombozytenfunktionsstörungen, beruhende maternale Hyperkoagulabilität mit diversen Schwangerschaftskomplikationen wie mit rezidivierenden frühen und späten Aborten, intrauterinem Fruchttod, intrauteriner Wachstumsretardierung, vorzeitiger Plazentalösung und der Präeklampsie assoziiert (11, 12, 42, 73).

Heparin übt seine Wirkung auf das Gerinnungssystem neben Verstärkung der Antithrombinwirkung (10) durch Beeinflussung der plasmatischen Gerinnung im Sinne einer Inaktivierung aktivierter Gerinnungsfaktoren, wie z.B. dem Faktor Xa, aus (12, 62) und wirkt also den potentiell zu Schwangerschaftskomplikationen führenden Veränderungen des maternalen Gerinnungssystems entgegen. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der modulierende Einfluss von Heparinen auf die Dezidualisation endometrialer Stromazellen, abhängig von ihrer Molekulargröße und -ladung, jedoch unabhängig von ihren antikoagulatorischen Funktionen (30). Der genaue Mechanismus des Heparins bzw. die exakten Wechselwirkungen zwischen Heparin und Dezidua sind jedoch noch unklar (30).

Da weder unfraktioniertes, noch niedermolekulares Heparin die Plazentaschranke passieren, müssen keine teratogenen Effekte befürchtet werden (8), was Heparin zu einem optimalen Medikament für die Schwangerschaft macht. Einsatz findet Heparin in Kombination mit ASS bereits zur Therapie von Patientinnen, welche an einem Antiphospholipidsyndrom und damit einhergehenden rezidivierenden Aborten leiden (11, 62). Die Definitionskriterien des Antiphospholipidsyndroms, einer erworbenen Thrombophilie, welche zu rezidivierenden Aborten führt und in engem Zusammenhang mit der Präeklampsie und Eklampsie steht (11), sind in Tabelle 4 dargestellt. In Anbetracht dieser Aspekte ist der positive Einfluss von Heparin auf Implantation und Plazentation weiter in Betracht zu ziehen und näher zu untersuchen.

In vielen, in Implantation und Plazentation involvierten Zellen und Geweben, wie dem Synzytiotrophoblast, villösem und extravillösem Zytotrophoblast und der Dezidua sind in der Extrazellulärmatrix sowie auf der Zelloberfläche zahlreiche HSPGs lokalisiert, welche mithilfe von Heparansulfaten unter anderem Wachstumsfaktoren, wie den VEGF, gebunden halten (23, 35, 41, 61). Damit der (extravillöse) Trophoblast die Dezidua infiltrieren kann, muss zuvor die Extrazellulärmatrix degradiert werden. Dies geschieht unter anderem mithilfe der vom Trophoblasten und später von der Plazenta exprimierten Heparanase, welche

wie bereits auf Seite 19 f. erwähnt, Heparansulfate spalten und so für die Freisetzung von VEGF und konsekutiv für deren Aktivierung Sorge tragen kann (23, 35, 61). Dieser Prozess ist schematisch in Abbildung 10 dargestellt.

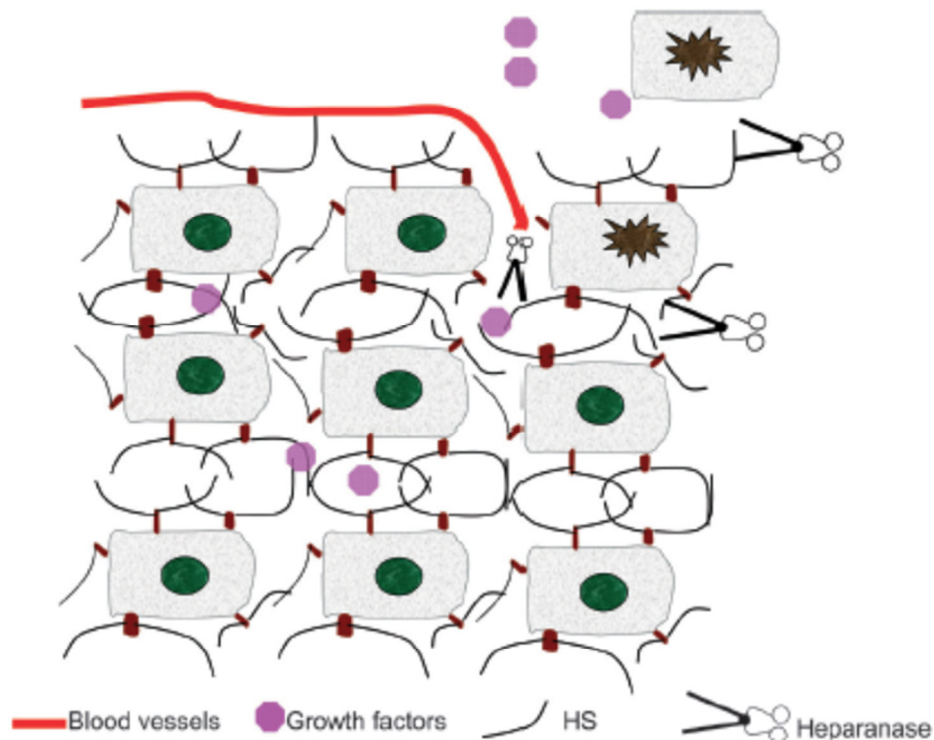


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Wirkweise der Heparanase. Die Heparanase, hier als Schere dargestellt, spaltet Heparansulfate (HS). Hierdurch werden Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF freigesetzt und dadurch befähigt, Angiogenese, Tumorstadium und Metastasierung zu stimulieren (Abbildung entnommen aus [61]).

Vascular Endothelial Growth Factors, deren Expression durch Hypoxie bzw. Ischämie induziert und gesteigert wird (6, 7, 38), gelten als Gruppe wichtiger proangiogenetischer Faktoren (5, 7). Die Familie der humanen Vascular Endothelial Growth Factors besteht aus fünf Mitglieder: VEGF-A, -B, -C, -D und PlGF. Zum heutigen Zeitpunkt am besten untersucht ist der VEGF-A. Eine der vielen Isoformen des VEGF-A ist der VEGF₁₆₅, welcher eine dominante Rolle unter den angiogenetischen Molekülen sowohl in der physiologischen als auch der pathologischen Angiogenese einnimmt (27) und u.a. vom placentaren Synzytiotrophoblasten und von placentaren Endothelzellen produziert wird (18, 78). Aus diesen Gründen war die VEGF₁₆₅-Isoform für die Zielsetzung dieser Arbeit von besonderem Interesse.

Weiterhin stimulieren VEGF konzentrationsabhängig die Proliferation humaner extravillöser Trophoblastzellen im ersten Trimester und werden auch in der Dezidua exprimiert (5). Zwischen den nachweislich in humanen Trophoblasten exprimierten VEGF (41), im Einzelnen veränderten VEGF-Proteinen und VEGF-Rezeptoren, und der Präeklampsie ist mittlerweile ein Zusammenhang hergestellt worden. So wurde gezeigt, dass die Antwort von Endothelzellen intakter Gefäße auf Plasma von Präeklampsie-Patientinnen VEGF-abhängig ist, dass diese Antwort spezifisch für die VEGF₁₆₅b-Isoform sein dürfte und durch Zugabe von rekombinantem humanem PlGF gehemmt werden kann. Mit Plasma von Präeklampsie-Patientinnen inkubierte Endothelzellen, sowie auch in Sectiones gewonnene Widerstandsgefäße des Myometriums, wiesen eine erhöhte Permeabilität und reduzierte Vasodilatation auf. Blockiert werden konnten diese Veränderungen durch neutralisierende VEGF₁₆₅b-Antikörper, durch VEGFR1-Kinase-Inhibitoren und Zugabe von humanem rekombinantem PlGF. Nach Inkubation mit Plasma gesunder Schwangerer zeigten sich diese Veränderungen nicht (7). Die durch diese Ergebnisse betonte zentrale Rolle der VEGF₁₆₅-Isoformen war ein weiteres Argument dafür, die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung dieser Isoform durchzuführen.

Unter Sauerstoffentzug wurde in Retinazellen eine vermehrte Expression sowohl der Heparanase als auch von VEGF beobachtet. Die Expression der Heparanase konnte durch Einsatz von Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂), einem Hypoxie-Induktor, stimuliert und durch Einsatz von PI-88, einem Heparanase-Inhibitor, wieder gehemmt werden. Auch die vermehrte VEGF-Expression konnte durch Einsatz von PI-88 gehemmt werden. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die Heparanase eine zentrale Rolle in der hypoxie-induzierten Neovaskularisation bzw. Angiogenese durch Stimulation der VEGF-Expression spielt (38). Hierfür spricht ebenfalls, dass eine Überexpression der Heparanase in bestimmten humanen Embryonen, Mammakarzinomen und Gliomzellen der Ratte nachgewiesenermaßen in einem drei- bis vierfachen Anstieg der VEGF-Protein- und mRNA-Spiegel resultierten (61).

In Zusammenschau aller genannten Aspekte, die eine zentrale und eng mit der Heparanase verknüpfte Rolle der VEGF im Rahmen der Implantation und Plazentation implizieren, stellt sich die Frage, ob die Beeinflussung der VEGF-Expression durch die Heparanase wechselseitig sein könnte und der topische

Einsatz von VEGF zu Beginn der Schwangerschaft konsequent die Plazentation verbessern könnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten immortalisierten Chorionkarzinom-Zellen dienen als Modell für den Trophoblasten und dessen zentrale Rolle bei der Implantation und Plazentation. Dieses für diesen Zusammenhang etablierte Modell (3, 51, 92) beinhaltet eine optimale Vergleichbarkeit als Grundlage darauf aufbauender Untersuchungen. Nicht immortalisierte, primäre trophoblastäre Zellen wären ausschließlich im Rahmen von Tierversuchen oder unter Verwendung von Abortgewebe bzw. von Gewebe aus elektiven Abruptiones zu erhalten. Unsere Entscheidung gegen diese Formen der Primärkultur beruht zum einen auf ethischen Aspekten und zum anderen auf der mangelnden Vergleichbarkeit verschiedener Abortgewebe. Diesbezüglich wäre v. a. problematisch, dass ein z.B. in der achten SSW abgestorbener Embryo möglicherweise chromosomale Störungen oder anderweitige Defekte aufweist, welche der Vergleichbarkeit der Gewebe entgegenspräche und somit für die Grundlagenforschung nicht geeignet wäre. Eine zweite Möglichkeit wäre gewesen, leicht zugängliches, postpartales plazentares Gewebe zu verwenden. Dazu würde man eine repräsentative Probe, gegenüber der Insertionsstelle der Nabelschnur, entnehmen (52). Hierbei kämen zwei Möglichkeiten in Frage: Einerseits könnte man postpartale Plazenten aus normal verlaufenden Schwangerschaften verwenden. Hierbei wären jedoch ausgeprägte Unterschiede zwischen frühen Plazenten im ersten Trimester und reifen Plazenten im dritten Trimester zu erwarten. Da die Präeklampsie jedoch in der Frühschwangerschaft ihren Ursprung hat, eignen sich postpartale Plazenten nicht in Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit. Weiterhin bestünde die Möglichkeit, trophoblastäres Gewebe postpartaler Plazenten von Patientinnen mit einer bereits stattgehabten Präeklampsie zu gewinnen, welches somit Merkmale der voll ausgeprägten Erkrankung aufweisen würde. Somit wäre auch unter dieser Möglichkeit kein trophoblastäres Gewebe erhaltbar, welches im Rahmen der Grundlagenforschung für die Vergleichbarkeit unter Stimulation geeignet wäre.

5.2 Konzentrationsabhängige Wachstumsversuche

Um den Einfluss von Heparin und VEGF₁₆₅ auf die Proliferation von Chorionkarzinom-Zellen, als Modell für den Trophoblasten, zu untersuchen, führten wir konzentrationsabhängige Wachstumsversuche durch.

5.2.1 Konzentrationsabhängige Wachstumsversuche der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie mit Heparin

Die JEG-3-Zellen zeigten nach Behandlung mit 0,01, sowie 0,1, 1 und 10 U/ml Heparin unter atmosphärischen Bedingungen und einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % eine signifikante Steigerung der Proliferation. Die konzentrationsabhängige Stimulation der Proliferation ist mit den Ergebnissen ähnlicher Proliferationsversuche vergleichbar (54). Nach Sauerstoffentzug konnte dieses Ergebnis nicht für alle Fälle reproduziert werden. Jedoch wurde die Proliferation unter hypoxischen Bedingungen nach Behandlung mit 0,01 U/ml Heparin signifikant gesteigert.

Der oben beschriebene Einfluss von Heparin auf die Proliferation von JEG-3-Zellen unter atmosphärischen Bedingungen, bei 3,3 % FKS ließ sich unter weiterer FKS-Reduktion auf 1 % zwar tendenziell wiedererkennen, zeigte jedoch keine Signifikanz. Unter Sauerstoffentzug verhielt sich die Proliferation tendenziell ähnlich zu der unter atmosphärischen Bedingungen bei 3,3 % FKS, zeigte jedoch nur bei 0,01 U/ml und 0,1 U/ml Heparin eine Signifikanz. Dies deutet darauf hin, dass die durch FKS- und Sauerstoffreduktion erzeugte Mangelsituation hier so groß war, dass sie durch Heparin nicht ausgeglichen werden konnte.

In Zusammenschau aller Wachstumsversuche der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie unter Einfluss von Heparin fällt auf, dass die Proliferation der JEG-3-Zellen v. a. nach Behandlung mit Heparin in niedrigen Konzentrationen wie 0,01 und 0,1 U/ml ansteigt und mit zunehmenden Konzentrationen tendenziell abfällt. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass niedrig dosiertes Heparin unter physiologischen Bedingungen Chorionkarzinom-Zellen und konsekutiv somit auch trophoblastäre Zellen zur Proliferation anregt. Dieser Effekt wiederholt sich unter Sauerstoffmangel, wie er durch die Mangelversorgung bei Präeklampsie entsteht jedoch nicht bzw. nicht in ebenso relevanter Ausprägung. Die Proliferation trophoblastärer Zellen spielt jedoch v.a. in der frühen Phase der Implantation und Plazentation eine zentrale Rolle und tritt zum Zeitpunkt einer schon bestehenden Präeklampsie bereits in den Hintergrund. Würde eine zeitig begonnene niedrig dosierte Heparin-Prophylaxe die Proliferation der Trophoblasten in der Frühschwangerschaft anregen, könnten so die Basisbedingungen für eine gesunde Implantation und Plazentation geschaffen werden, bevor es zu der Entwicklung einer Präeklampsie kommt. Die Heparin-Therapie einer bereits

bestehenden Präeklampsie wäre vor diesem Hintergrund wirkungslos. Zur Wirksamkeit der prophylaktischen Heparin-Applikation in der Frühgravidität liegen noch keine adäquaten klinischen Studien vor. Die bereits zitierte Arbeit von Rey et al. beschreibt solche prophylaktische Heparin-Effekte bei Anwendung im zweiten Schwangerschaftstrimester, wenn die trophoblastäre Invasion bereits abgeschlossen ist (74).

Da jedoch im Rahmen der Wachstumsversuche mit der JEG-3-Zelllinie dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden konnte, dass Heparin einen signifikanten Einfluss auf den Trophoblasten hat, in diesem Fall auf die Proliferation, wird Heparin als mögliches, die Frühschwangerschaft von Präeklampsie-Risikopatientinnen positiv beeinflussendes Medikament, nur umso vielversprechender. Klinische Studien zur Förderung einer adäquaten Frühschwangerschaft bei Präeklampsie-Risikopatientinnen mit der Kombination aus Heparin und zu diesem Zweck bereits eingesetzten ASS scheinen daher diskussionswürdig. Dies gilt v.a., da Heparine, wie bereits erläutert nicht plazentagängig sind und in Kombination mit ASS bei Patientinnen mit Antiphospholipidsyndrom und einhergehenden rezidivierenden Aborten bereits therapeutisch eingesetzt werden.

Das Hauptproblem in der Prophylaxe der Präeklampsie ist, dass es aktuell keine verlässliche Methode gibt, um vor der 22. bis 24. SSW Risikopatientinnen für eine erstmalige Präeklampsie sicher zu identifizieren. Im Zentrum der Forschung zur Detektion von Risikopatientinnen stehen im Vergleich zu nicht-betroffenen Schwangeren in ihrer Konzentration veränderte maternale Serum-Proteine wie z.B. ein erniedrigter PIGF-Spiegel in der 30. bis 33. Schwangerschaftswoche (44). Der 2013 neu auf den Markt gebrachte Alere Triage® PIGF Kit (Alere GmbH, Köln) schätzt unter Bezugnahme auf das maternale Serum-PIGF als Schnelltest das Risiko von Frauen mit Verdacht auf Präeklampsie vor der 35. SSW ab. Dennoch stellt dieser Schnelltest keine zuverlässige Methode zur vorzeitigen Identifizierung von Risikopatientinnen oder zur Früherkennung der Präeklampsie dar. Der Schnelltest wird lediglich als Hilfsmittel bei bereits symptomatischen Patientinnen mit erstmalig und isoliert auftretenden Symptomen der Präeklampsie, wie z.B. Bluthochdruck, starken Kopfschmerzen oder Sehstörungen empfohlen (2). Somit ist auch bei diesem Test das Dilemma des langen Intervalls zwischen den Ursachen für das Auftreten einer Präeklampsie und der entsprechenden

Symptomatik – und damit der Anwendungsmöglichkeit des Tests – nicht gelöst. Bei korrekter Anwendung liefert er nach Angaben des Herstellers bei Frauen mit Verdacht auf Präeklampsie und einem PIGF-Wert < 12 pg/ml vor der 35. SSW einen positiv prädiktiven Wert von 94 % für eine Frühgeburt. In diesem Fall wird eine mittlere verbleibende Zeit bis zur Entbindung von 9 Tagen angegeben. Liegt der PIGF-Wert jedoch ≥ 12 pg/ml und < 100 pg/ml, sinkt der positiv prädiktive Wert auf 60 %, und die mittlere verbleibende Zeit bis zur Entbindung steigt auf 23 Tage. Somit dient dieser Schnelltest lediglich dazu, die Wahrscheinlichkeit einzugrenzen, ob eine Schwangere mit isoliert auftretenden Präeklampsie-Symptomen innerhalb kurzer Zeit auch an einer Präeklampsie erkranken wird, mit konsekutiver Einschätzung darüber, ob eine vorzeitige Entbindung nötig sein wird. Der Test sagt somit nichts über das Langzeit-Risiko für das Entstehen einer Präeklampsie aus. Damit erscheint auch eine präventive medikamentöse Intervention auf Grundlage eines prognostisch auffälligen, biochemischen Tests nicht möglich. Dies gilt v.a. in Zusammenhang damit, dass die aktuell eingesetzte leitliniengerechte medikamentöse Prophylaxe mit niedrig dosierter ASS (50 bis 150 mg/d) lediglich bei Beginn vor oder spätestens in der 16. Schwangerschaftswoche positive Auswirkungen auf den Schwangerschaftsverlauf nimmt, indem sie die Rate von schwerer Präeklampsie signifikant zu reduzieren vermag (75).

Das Forschungsfeld zur rechtzeitigen Detektion von Risikopatientinnen ist weit. Unter der Hypothese, dass der Präeklampsie eine systemische Inflammation vorangehe oder mit dieser einherginge, wurde die Konzentration inflammatorischer Zytokine im maternalen Serum zwischen der 30. und 33. SSW untersucht, die jedoch keinen prädiktiven Wert zu haben scheint (58). Auch der Spiegel fetaler und maternaler cfDNA (zell-freie DNA) im maternalen Plasma zwischen der 11. und 13. Schwangerschaftswoche steht in keinem Zusammenhang mit späteren Schwangerschaftskomplikationen wie der Präeklampsie (69). Ein an 60.000 Schwangeren durchgeführtes Ersttrimester-Screening, beruhend auf der Kombination von mütterlicher Biochemie, Doppler der A. uterina mit Augenmerk auf den Pulsatilitätsindex, MAP (mittlerer arterieller Blutdruck), PAPP-A (serum pregnancy-associated plasma protein-A), ein schwangerschaftsassoziertes Plasmaprotein im maternalen Serum, und PIGF ergab eine ausreichend hohe Aussagekraft für die Prädiktion der frühen

Präeklampsie (1, 68). Aktuell liegen jedoch keine Interventionsstudien vor, die bei diesen im Rahmen des Ersttrimester-Screenings als Risikopatientinnen identifizierten Frauen den Vorteil einer wie auch immer gearteten medikamentösen Intervention nachgewiesen hätten. Somit gibt es zur Zeit keine Untersuchung, die Risikopatientinnen einer Präeklampsie rechtzeitig identifiziert, und konsekutiv die Notwendigkeit einer medikamentösen Prophylaxe anzeigt.

5.2.2 Konzentrationsabhängige Wachstumsversuche der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie mit VEGF₁₆₅

Nach Behandlung mit 1 ng/ml VEGF₁₆₅ zeigte sich nach Sauerstoffentzug bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 3,3 % eine nicht signifikante und bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 1 % eine signifikante Stimulation der Proliferation. Für jeden der vier Versuchsarme zeigte sich konstant eine Abnahme der Proliferation mit steigender VEGF₁₆₅-Konzentration, welche z.T. tendenziell erkennbar, z.T. jedoch auch im signifikanten Bereich lag.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass VEGF₁₆₅ in niedrigen Konzentrationen, v. a. unter hypoxischen Bedingungen, die Proliferation von Chorionkarzinom-Zellen und somit Trophoblasten fördert und eine steigende VEGF₁₆₅-Konzentration invers mit der Hemmung der Proliferation der Chorionkarzinom-Zellen bzw. Trophoblasten einhergeht. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen der Arbeitsgruppe um Athanassiades et al. (5). Diese zeigte, dass VEGF₁₂₁ konzentrationsabhängig die Proliferation humaner extravillöser Trophoblastzellen im ersten Trimester stimuliert, jedoch konnten diese Effekte mit exogen zugeführtem VEGF₁₆₅ nur nach zusätzlicher Verwendung von Plasmin, um die Heparin-Bindungsstellen aufzuspalten, oder HSPGs, um die Heparin-Bindungsstellen zu blockieren, erreicht werden. VEGF₁₆₅, eine heparinbindende Isoform, wurde hier in einem Versuchs-Arm zusammen mit Plasmin inkubiert, um die Heparin-Bindungsstellen aufzuspalten, in einem anderen Versuchs-Arm mit HSPGs, um die Heparin-Bindungsstellen zu blockieren. Somit wäre eine Fortführung unserer Versuche in Kombination mit zusätzlichem Einsatz von Plasmin oder HSPGs interessant, um die Veränderung in der Proliferationssteigerung im Vergleich zu den hier ohne Plasmin und HSPGs durchgeführten Versuchen zu sehen. Bei Bestätigung der konzentrationsabhängigen Stimulation der Trophoblasten-Proliferation durch VEGF₁₆₅ wäre nach umfangreichen Sicherheitstests ähnlich wie bei Heparin sein

Einsatz im Rahmen klinischer Studien zur Förderung einer sich adäquat entwickelnden Frühschwangerschaft bei Risikopatientinnen zu diskutieren.

5.2.3 Konzentrationsabhängige Wachstumsversuche der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie mit Heparin

Nach Behandlung der JAR-Zellen zeigte sich unter atmosphärischen Bedingungen eine ähnliche, jedoch nicht signifikante, Entwicklung wie bei der Behandlung der JEG-3-Zellen mit Heparin. Nach Sauerstoffreduktion ließ sich keine verwertbare Veränderung der Proliferation verzeichnen. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es zwar so, als wäre der Heparin-Einfluss auf die JAR-Zellen deutlich niedriger als auf die JEG-3-Zellen, jedoch lässt sich auch durch Betrachtung dieser Ergebnisse die These stützen, dass Heparin seine Wirkung lediglich unter atmosphärischen Bedingungen entfaltet und diese verliert, sobald ein Sauerstoffmangel im Gewebe besteht. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der FKS-Gehalt des Mediums zu niedrig war und somit das Nährstoffangebot nicht ausreichte um die Zellen zu einer adäquaten Reaktion auf den angebotenen Reiz zu befähigen. Daher wäre auch hier eine Fortführung der Versuchsreihe mit höheren FKS-Konzentrationen des Mediums interessant, um etwaige Defizite der Untersuchungsbedingungen auszugleichen und ein deutlicheres, vielleicht sogar signifikantes Ergebnis zu erzielen. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse zu der Versuchsreihe mit der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie stützt dennoch die Hoffnung auf eine positive Beeinflussung der Frühschwangerschaft von Präeklampsie-Risikopatientinnen durch den Einsatz von Heparin.

5.3 Einfluss der Sauerstoffreduktion auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie

Die Expression des HPSE-Gens unter atmosphärischen Bedingungen (wassergesättigte Atmosphäre von Raumluft und 5 % CO₂ bei 37° C) unterscheidet sich nicht signifikant von der Expression des HPSE-Gens unter Sauerstoffreduktion (2 % O₂, 5 % CO₂). Es ist lediglich eine minimal vermindert exprimierte HPSE unter Sauerstoffreduktion zu beobachten. Die Hypoxie hat als alleiniger Faktor somit keine Auswirkung auf die Heparanase-Expression in Chorionkarzinom-Zellen und somit putativ auch nicht auf die des Trophoblasten.

5.4 Einfluss von Heparin auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie

Die Ergebnisse zeigen tendenziell, jedoch nicht signifikant, eine Hemmung der Expression der Heparanase-mRNA unter atmosphärischen und eine Stimulierung der Expression der Heparanase-mRNA unter hypoxischen Bedingungen in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie. Somit lässt sich die etablierte Ansicht einer unter hypoxischen bzw. ischämischen Bedingungen vermehrt exprimierten Heparanase zwar tendenziell auch im trophoblastären Modell nachvollziehen, dieses Ergebnis bezieht sich jedoch ausschließlich auf den Einfluss des Heparins, da die Hypoxie allein keine Stimulation der Expression auslöst. Der beschriebene proliferationsfördernde Effekt des Heparins scheint jedoch nicht in direktem Zusammenhang mit der Heparanase zu stehen, da die Heparanase unter atmosphärischen Bedingungen sogar vermindert exprimiert wird.

5.5 Einfluss von VEGF₁₆₅ auf die Expression der Heparanase-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie

Unter Einfluss von VEGF₁₆₅ zeigt sich unter atmosphärischen Bedingungen überwiegend eine nicht signifikante Hemmung der Heparanase-Expression und unter hypoxischen Bedingungen überwiegend eine nicht signifikante Stimulation der Heparanase-Expression. Hierzu passt, dass VEGF seine Wirkung als Reaktion auf einen hypoxischen Reiz ausübt (6, 38), um die Blutversorgung der Gewebe bei Unterversorgung zu gewährleisten bzw. wieder zu normalisieren. Jedoch lässt sich keine konstante Korrelation zwischen der VEGF₁₆₅-Konzentration und dem Ausmaß der HPSE-Expression feststellen, sodass VEGF₁₆₅ wahrscheinlich keinen direkten Einfluss auf die trophoblastäre Heparanase-Expression ausübt.

5.6 Einfluss von Heparin auf die Expression der Heparanase in der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie

Die Expression der HPSE-mRNA konnte in diesem Versuchsansatz durch Behandlung mit Heparin nicht signifikant beeinflusst werden. Es zeigte sich zwar eine tendenzielle Hemmung der HPSE-mRNA-Expression, die Expression war jedoch insgesamt in den durchgeführten q-PCRs so niedrig, dass sich die Heparanase nur schwer quantifizieren ließ und die Ergebnisse wie bereits auf S.

48 ausgeführt, als technisch anspruchsvoll anzusehen sind. Auch die schwierige Kultivierung der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie mag zu diesen Ergebnissen beitragen. Eine Wiederholung der Experimente unter veränderten Kultivierungsbedingungen, wie z.B. einem höheren FKS-Gehalt des Mediums wäre daher in Betracht zu ziehen, um die hier nur tendenziell erkennbare Regulierung der HPSE in der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie zu reproduzieren und eventuelle Signifikanzen herausarbeiten zu können.

5.7 Ausblick

Die Durchführung der Wachstumsversuche wie auch der Untersuchung der HPSE-mRNA in einer wassergesättigten Atmosphäre von Raumluft und 5 % CO₂ bei 37 °C einerseits und unter Sauerstoffreduktion mit 2 % O₂ und 5 % CO₂ andererseits erfolgte, um in einem Versuchsarm möglichst physiologische Bedingungen und in dem anderen Versuchsarm möglichst die Bedingungen zu schaffen, welche in utero bei Patientinnen mit fehlerhafter Plazentation, Implantation und daraus resultierender Präeklampsie herrschen. Durch Veränderung dieser Einflussfaktoren ließen sich eventuell noch deutlichere Ergebnisse provozieren. Die Reduktion des FKS-Gehalt des Mediums auf 3,3 % und 1 % im Rahmen der Versuche mit der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie wiederum sollte eine Mangelsituation provozieren, in der ein für die Zellen minimales Angebot an für ihren Stoffwechsel notwendigen Substanzen herrschte. Hierdurch konnte ausgeschlossen werden, dass die durch die Testsubstanzen erzielten Effekte auf einem Nährstoffüberangebot bzw. näherungsweise physiologischen Bedingungen beruhte. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Wachstumsversuche fällt jedoch auf, dass mit Zunahme der Mangelsituation durch Reduktion des FKS-Gehalt des Mediums und durch zusätzliche Sauerstoffreduktion die Signifikanz der Ergebnisse nach Behandlung mit Heparin, tendenziell jedoch auch nach Behandlung mit VEGF₁₆₅, rückläufig ist. Es stellt sich hierdurch die Frage, ob die provozierte Mangelsituation so groß war, dass die Zellen unfähig waren, auf den gebotenen Reiz einer Zugabe von VEGF₁₆₅ bzw. Heparin zu reagieren. Es wäre eine interessante Folge-Fragestellung, ob und wenn ja, wie sich die Ergebnisse bestätigen bzw. verändern lassen würden, wenn man den FKS-Gehalt des Mediums weniger stark reduzieren, eventuell sogar über die vom Hersteller empfohlene Kulturkonzentration von 10 % erhöhen würde.

Diese Fragestellung scheint umso interessanter, da die JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie in Vorversuchen mit reduziertem FKS-Gehalt des Mediums nicht führbar war. Die von Matziolis et al. bei in-vitro Versuchen verwendeten Konzentrationen unfractionierten Heparins zur Proliferationssteigerung humaner Osteoblasten dienten uns als Orientierungshilfe und lieferten hierzu weitere interessante Aspekte. Die Arbeitsgruppe stellte einen Anstieg der Proliferation beginnend ab 0,1 IE/ml Heparin fest, welcher sein Maximum bei 1 IE/ml Heparin aufwies. Nach Behandlung mit 100 und 1.000 IE/ml Heparin trat hier eine Hemmung der Zellproliferation ein. Die Arbeitsgruppe vermutete eine komplexe Signalkaskade als Ursache der konzentrationsabhängig ambivalenten Beeinflussung der Proliferation durch Heparin. Weiterhin konnten Matziolis et al. eine Abhängigkeit der Osteoblastenproliferation von dem FKS-Anteil im Medium feststellen. Untersucht wurden hierbei FKS-Konzentrationen von 0 % bis 40 %. Im Synergismus beider Substanzen konnte eine optimale Stimulation der Osteoblasten-Proliferation im Patientenserum bei einem FKS-Gehalt des Mediums von 10 % und einer Heparin-Konzentration zwischen 0,1 und 1 IE/ml nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse bestätigen somit die Annahme, dass im FKS für die Zellproliferation unabdingbare Substanzen enthalten sind (54). Daher scheint es vielversprechend, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuche mit der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie und der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie und Behandlung der Zellen mit Heparin zu ergänzen. Im Rahmen erweiterter Untersuchungen sollten dann analog zu der Arbeit von Matziolis et al. breit gestreute FKS-Konzentrationen von 0 % bis 40 % bei der JEG-3-Zelllinie und 10 % bis mindestens 40 % bei der JAR-Zelllinie untersucht und in Zusammenhang mit den auch in dieser Arbeit untersuchten Heparin-Konzentrationen gebracht werden. Bezüglich der Wachstumsversuche mit der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie und VEGF₁₆₅ ist in Erwägung zu ziehen, diese Versuche orientierend an der Arbeitsgruppe von Athanassiades et al. durchzuführen. Dies würde Behandlungen mit VEGF₁₆₅ in Kombination mit Plasmin bzw. HSPGs oder auch mit VEGF₁₂₁, einer nicht Heparin-bindenden Isoform, beinhalten. Die letztgenannte Arbeitsgruppe hat mit diesen Versuchen aussagekräftigere bzw. signifikante Ergebnisse bezüglich der Proliferation humaner invasiver extravillöser Trophoblasten im ersten Trimenon im Vergleich zu ausschließlicher Behandlung mit VEGF₁₆₅ erzielt (5). Weiterhin kann in Erwägung

gezogen werden, die Versuchswiederholungen, wie auch die mit Heparin, analog zu der Arbeit von Matziolis et al. mit einer Austestung verschiedener FKS-Konzentrationen des Mediums von 0 % bis 40 % zu kombinieren. Ließe sich die Trophoblasten-Proliferation durch Modulation dieser Aspekte signifikant beeinflussen, würden Heparin und VEGF₁₆₅, als die Entwicklung der Frühschwangerschaft fördernde Substanzen in ihrer Bedeutung für die Präeklampsie-Forschung zunehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Heparin-Natriumsalz aus intestinaler Schweinemukosa mit einem Molekulargewicht zwischen 17 und 19 kDa verwendet. Diese Entscheidung basiert auf den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Fluhr et al. von 2011. Diese vermutete, dass Größe und Ladung des verwendeten Heparins und seine antikoagulatorischen Effekte die Dezidualisierung humaner endometrialer Stromazellen beeinflussen. Versuche mit hochsulfatierten Polysacchariden mit einem Molekulargewicht über 17 kDa galten daher als vielversprechend (30). Weiterhin wäre es interessant, eventuelle Unterschiede in der Wirkung zwischen dem hier verwendeten unfraktionierten, also hochmolekularen Heparin und niedermolekularen Heparinen bezüglich der von uns gestellten Fragestellung herauszuarbeiten. Dies gilt v.a. unter dem Gesichtspunkt, dass Heparine in der Schwangerschaft sämtlich keine Zulassung haben und somit lediglich als off-label-use einsetzbar sind (11). Für sämtliche antikoagulatorische Indikationen auf Heparinbasis in der Schwangerschaft werden aktuell niedermolekulare Heparine empfohlen (9), da bei diesen Substanzen von einer sehr guten Effektivität bei gleichzeitig akzeptablem Sicherheitsprofil ausgegangen wird (8, 33). Laut den aktuellen ACCP- (American College of Chest Physicians) Leitlinien sind NMH (niedermolekulare Heparine) bezüglich der Therapie von VTE (Venöse Thrombembolie), ACS (Akutes Koronarsyndrom) und der Prophylaxe bei Hochrisiko-Patientinnen mindestens so sicher und effektiv wie UFH (unfraktioniertes Heparin). Die Inzidenz von Blutungen bei Anwendung von NMH in der Schwangerschaft ist insgesamt niedrig und signifikant geringer als bei unfraktioniertem (Standard-) Heparin. Weiterhin ist sowohl das Risiko einer HIT als auch einer symptomatischen Osteoporose unter Therapie mit NMH deutlich niedriger als mit UFH. Daher empfiehlt das ACCP NMH statt UFH zur Prävention und Therapie venöser thrombembolischer Ereignisse bei Schwangeren (9). In Zusammenschau stellt sich somit die Frage, ob hoch- oder niedermolekulare

Heparine im Rahmen der Präeklampsie-Prophylaxe bzw. ggf. -behandlung verwendet werden könnten. Diese Frage erscheint umso zentraler, da leitlinienkonform bis heute zur Sekundär-Prophylaxe lediglich niedrigdosierte Acetylsalicylsäure (50 bis 150 mg/d) eingesetzt wird. Die Verwendung von Heparin zur Präeklampsie-Prophylaxe bleibt aktuell experimentellen Therapieansätzen vorbehalten. In der Literatur finden sich kontroverse Stellungnahmen. Einerseits gab es Hinweise auf ein verbessertes Outcome von Mutter und Kind nach Behandlung mit niedrigdosierter Acetylsalicylsäure in Kombination mit niedermolekularem Heparin (28, 55) oder nach alleiniger Behandlung mit niedermolekularen Heparinen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (43). Andererseits zeigte sich in anderen Untersuchungen ein fehlender Benefit bei alleiniger Gabe niedermolekularer Heparine im Vergleich zur lediglich überwachten Kontrollgruppe (53). Heparin selbst wird in diversen Veröffentlichungen als Hemmstoff der HPSE und daraus folgend als Hemmstoff der Invasivität und Metastasierung verschiedener Krebsentitäten beschrieben (13, 14, 15). Wenn nun die Heparanase, wie von Harris et al. 2008 (35) vermutet, keinen Einfluss auf Implantation und Plazentation nimmt, sondern eine anderweitige, bislang nicht bekannte Funktion ausübt, würde eine Hemmung der Heparanase durch eine prophylaktische Gabe von Heparin in der Frühschwangerschaft keinen negativen Einfluss auf die Implantation der Frucht und Plazentation ausüben. Die vermutete positive Wirkung von Heparin auf die Entwicklung der Frühschwangerschaft und seine hemmende Wirkung auf die Heparanase stünden somit in keinem direkten Widerspruch zueinander.

Die Expression der HPSE-mRNA in der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie wird durch 0,1 U/ml Heparin unter atmosphärischen Bedingungen tendenziell gehemmt, unter Sauerstoffreduktion tendenziell stimuliert. Auch hier wäre es interessant, die Veränderung der Ergebnisse unter einem erhöhten FKS-Gehalt des Mediums zu beobachten. Sollten den Chorionkarzinom-Zellen unter den in dieser Arbeit reduzierten FKS-Werten des Mediums essentielle, z.T. noch nicht näher zu bezeichnende Wachstumsfaktoren fehlen, könnte durch das ausreichende Angebot dieser Faktoren eventuell eine Signifikanz in den Ergebnissen erreicht werden. Zu erwarten wäre in diesem Fall eine signifikante, konzentrationsabhängige Beeinflussung der HPSE-mRNA-Expression bei 0,1 U/ml Heparin, im Einzelnen eine signifikante Hemmung unter atmosphärischen

Bedingungen und eine signifikante Stimulation unter Sauerstoffreduktion. Sollten sich die Stimulation der Proliferation, wie nach der Arbeit von Matziolis et al. zu erwarten, erhöhen, der erhöhte FKS-Gehalt jedoch keinen Einfluss auf die Expression der HPSE-mRNA nehmen, könnte man weitestgehend ausschließen, dass dieser Effekt in Zusammenhang mit der Heparanase stünde. Nach Behandlung der JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie mit VEGF₁₆₅ zeigt sich eine tendenzielle Hemmung der HPSE-mRNA-Expression unter atmosphärischen und eine tendenzielle Stimulation der HPSE-mRNA-Expression unter hypoxischen Bedingungen. Die Regulationen bewegen sich jedoch überwiegend in so minimalen Bereichen, dass nicht von einer konstanten und deutlichen Reproduzierbarkeit gesprochen werden kann. Auch diese Versuchsreihe könnte durch Austestung höherer FKS-Gehalte des Mediums deutlichere, vielleicht sogar signifikante Werte annehmen. Sollte dies nicht der Fall sein, die Proliferation sich unter erhöhten FKS-Gehalten des Mediums jedoch deutlich verändern, würde dieser Effekt nicht über die Heparanase reguliert. Die Expression der HPSE-mRNA in der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie nach Behandlung mit Heparin zeigt eine konstante Herunter-Regulierung des Gens. Diese ist zwar nur tendenziell zu verzeichnen, ließe sich aber eventuell durch Erhöhung des FKS-Gehalts steigern. Diese Versuche sollten somit im Rahmen aufbauender Untersuchungen der HPSE-mRNA-Regulation wiederholt und bestätigt werden. Die Hemmung der Heparanase-Expression durch Heparin ist fest etabliert und wurde in der Literatur bereits u.a. in Myelomzellen im Tiermodell (15), in humanen pädiatrischen Sarkomzellen (14) und in Mammakarzinom-Zellen (50), jedoch bislang noch nicht im Trophoblasten-Modell beschrieben. Der im Rahmen dieser Arbeit festgestellte konstante Zusammenhang zwischen Heparin und einer Hemmung der Heparanase-Expression im Trophoblasten unter atmosphärischen Bedingungen deckt sich somit mit den Ergebnissen bezüglich anderer Zellmodelle und stellt gleichzeitig aufgrund seiner erstmaligen Aufdeckung einen neuen Aspekt in Zusammenhang mit der Implantation und Plazentation und konsekutiv mit der Präeklampsie dar. Wie bereits ausgeführt, sollten die Versuche auf Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse fortgeführt werden, um die bisherigen Ergebnisse zu stützen und die Validität der beobachteten Zusammenhänge auszubauen. Dies ist insbesondere in Betracht zu ziehen, da das Vorhandensein der Heparanase v.a. in den JAR-Chorionkarzinom-Zellen im Western Blot deutlich

nachgewiesen wurde und die tendenzielle Hemmung der HPSE-mRNA-Expression mit der bereits beschriebenen Hemmung der HPSE durch Heparin in Karzinom- und Metastasierungs-Modellen übereinstimmen würde. Eine Hemmung der HPSE-Expression durch Faktoren, die in diesem Versuchsmodell nicht untersucht wurden, liegt als Grund für die Diskrepanz zwischen kaum quantifizierbarer HPSE-mRNA in der q-PCR und deutlichem HPSE-Nachweis im Western Blot in der JAR-Chorionkarzinom-Zelllinie im Bereich des Möglichen. In der Literatur finden sich entsprechende Hinweise, z. B. auf eine Inaktivierung des Heparanase-Promotors durch Cytosin-Methylierung, u.a. in humanen JAR-Chorionkarzinom-Zellen. In diesen Zellmodellen konnte erst nach Anwendung demethylierender Substanzen Heparanase mRNA, Protein und enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Weitere Regulationsmöglichkeiten der Heparanase, etwa durch p53, TNF- α , IF- γ , Östrogen und Glukose, sind bekannt (61). Somit bleibt die Möglichkeit, dass die Expression der Heparanase in unserem JAR-Modell durch eine diesbezüglich nicht bekannte Regulation möglicherweise verhindert wurde. Die JEG-3-Zelllinie hingegen zeigt im Western Blot eine deutlich niedrigere HPSE-Konzentration, reagiert jedoch, zumindest bezüglich der Proliferation, deutlich stärker auf den Einfluss von Heparin und auch auf den von VEGF₁₆₅. Dieser Einfluss scheint v.a. in Zusammenhang mit den Wachstumsversuchen unter Einfluss von Heparin umso mehr abzunehmen, desto größer die Mangelsituation ist, in welcher sich die Zellen befinden. Die Wachstumsversuche mit VEGF₁₆₅ scheinen davon deutlich weniger beeinflusst zu sein. Die Expression der HPSE-mRNA zeigt sich unter Heparin deutlicher, jedoch auch unter VEGF₁₆₅ unter atmosphärischen Bedingungen tendenziell gehemmt, unter hypoxischen Bedingungen tendenziell stimuliert. In Hinblick auf beide Chorionkarzinom-Zelllinien fällt auf, dass die JAR-Zelllinie zwar mehr Heparanase exprimiert, jedoch nur eine minimale Reaktion auf die angebotenen Reize zeigt. Die JEG-3-Zelllinie hingegen exprimiert deutlich weniger Heparanase, reagiert jedoch deutlich stärker auf Heparin und auch auf VEGF₁₆₅. Diese Konstellation legt die Vermutung nahe, dass der Einfluss von Heparin auf die Proliferation beider Chorionkarzinom-Zelllinien unabhängig von der Heparanase vermittelt wird. Dennoch ist auch eine Inaktivierung der Heparanase, wie auf S. 71 beschrieben, als mögliche Ursache in Erwägung zu ziehen. Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen scheinen zu gering, um einen fundierten Vergleich

aufstellen zu können. Es findet sich in der Tendenz jedoch eine Hemmung der mRNA-Expression unter atmosphärischen und eine Stimulation unter hypoxischen Bedingungen. Ein Zusammenhang zu den getesteten Heparin- und VEGF₁₆₅-Konzentrationen lässt sich jedoch nicht finden. Umso wichtiger wäre es, wie bereits erläutert, v.a. die Expressionsversuche unter Verwendung anderer FKS-Konzentrationen des Mediums fortzuführen, da eine Beeinflussung der HPSE-Expression durch Heparin und VEGF₁₆₅ zwar aktuell unwahrscheinlich scheint, jedoch nicht ausgeschlossen werden kann. Besonders eine Stabilisierung der Kultivierung und Testung der JAR-Zelllinie scheint mit dem hohen HPSE-Gehalt vielversprechend.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zur Beantwortung der Interaktion von Heparin(en) mit dem Trophoblasten und der Heparanase in einem ersten Schritt die Proliferation der Chorionkarzinom-Zellen als Modell für den Trophoblasten nach Behandlung mit Heparin oder VEGF₁₆₅ bestimmt. Die Proliferationsrate der Zellen lässt jedoch nicht auf die Invasivität dieser Zellen schließen, welche für eine adäquate Plazentation und Implantation unabdingbar ist. Da die Frage, ob die Heparanase unter bestimmten Bedingungen Einfluss auf die Invasion des Trophoblasten in die Dezidua nimmt noch nicht abschließend geklärt ist, könnte in weiterführenden Untersuchungen somit auch ein Fokus auf der Änderung der Invasivität der Chorionkarzinom-Zelllinien liegen.

In einem zweiten Schritt wurde die Konzentration der Heparanase, welche nachweislich in den untersuchten Zelllinien exprimiert wird, nach Behandlung mit Heparin oder VEGF₁₆₅ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Die Konzentration des Enzyms spiegelt allerdings nicht zwingend dessen Aktivitätsgrad wieder. Somit müsste, um eine weitere Aussagen über die Beeinflussung der Heparanase durch Heparin und VEGF₁₆₅ treffen zu können, die Aktivität der Heparanase nach Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe näher bestimmt werden.

Würden Invasivität der Chorionkarzinom-Zelllinien sowie die Aktivität der Heparanase in diesem Setting bestimmt, wäre die Aussage über die Beeinflussung der trophoblastären Implantation und Plazentation durch Heparin und VEGF₁₆₅ um relevante Aspekte erweitert.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zu den für Schwangere und Fötus die höchste Gefahr bezüglich Morbidität und Mortalität darstellenden Erkrankungen zählen schwangerschaftsassozierte Hypertonien, allen voran die Präeklampsie. Ihnen zugrunde liegt nach heutigem Wissensstand eine gestörte Plazentation und Implantation sowie eine veränderte Aktivität des maternalen Gerinnungssystems. Die Heparanase fördert, beeinflusst durch Heparin, das Fortschreiten karzinomatöser Erkrankungen u.a. durch Förderung der Zellproliferation und Metastasierung und bewirkt dies z.T. über eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Hierzu gehört der proangiogenetische Vaskular Endothelial Growth Factor, dessen Synthese durch Hypoxie induziert wird und der mit der Präeklampsie in Zusammenhang steht. Da sich der Progress einer karzinomatösen Erkrankung ähnlich der Einnistung in der Frühschwangerschaft gestaltet, nämlich auf der Invasion eines Gewebes in ein anderes und der Ausbildung neuer versorgender Blutgefäße beruht, liegt nahe, dass die Heparanase in beiden Prozesse eine ähnliche Rolle einnimmt. Genauere Erkenntnisse dieses Zusammenhangs könnten für die Entwicklung prophylaktischer Maßnahmen zur Präeklampsie von Bedeutung sein. Im Zentrum dieser Arbeit steht die Frage nach Zusammenhängen zwischen im Trophoblasten exprimierter Heparanase und dem Einfluss von Heparin und VEGF₁₆₅ auf deren Expression und auf das Wachstum der Zellen. Als Modell für den Trophoblasten dienten etablierte Chorionkarzinom-Zelllinien, deren Proliferation im Rahmen von Wachstumsversuchen und deren Expression der Heparanase-mRNA mit der q-PCR unter Einfluss von Heparin oder VEGF₁₆₅ unter atmosphärischen und hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle untersucht wurde. Die Expression der Heparanase in den Zelllinien wurde durch einen Western Blot bestätigt.

Heparin fördert in niedrigen Konzentrationen unter atmosphärischen Bedingungen signifikant die Proliferation von Chorionkarzinom-Zellen. Dieser Effekt scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch nicht über die Heparanase vermittelt zu werden, da diese unter identischen Bedingungen tendenziell verringert exprimiert wird. Unter hypoxischen Bedingungen konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse unter Heparin-Einfluss verzeichnet werden, was jedoch daran liegen könnte, dass die provozierte Mangelsituation zu groß war. VEGF₁₆₅ hemmt mit steigender Konzentration v.a. unter atmosphärischen, weniger unter hypoxischen

Bedingungen, z.T. deutlich signifikant das Wachstum der Chorionkarzinom-Zellen, die Heparanase selbst zeigt sich jedoch kaum vermindert exprimiert, womit ein Zusammenhang zwischen der VEGF-Konzentration und der Heparanase-Expression in unserem trophoblastären Modell nicht bestätigt werden konnte.

Die erstmalig gezeigte, signifikante konzentrationsabhängige Stimulation der Trophoblast-Zellproliferation durch Heparin, welches nicht die Plazentaschranke passiert, spricht für Heparin als eine vielversprechende Substanz in Hinblick auf die Präeklampsie-Prophylaxe und scheint in Bezug auf klinische Studien zur Förderung der Frühschwangerschaft bei Präeklampsie-Risikopatientinnen diskussionswürdig. Die Heparanase-Präsenz in einer der Zelllinien könnte für eine zentrale Rolle im Prozess der Plazentation und Implantation sprechen, die es im Rahmen von Aktivitäts- und Invasivitäts-Untersuchungen sowie in nativem Gewebe weiter zu definieren gilt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) 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.* 33: 8-15; 2013
- 2) Alere Triage® PLGF Broschüre: Alere GmbH 2013, Dok.-Nr. 21V-0028 · Version 03 · FLY
- 3) Anderle C, Hammer A, Polgár B, Hartmann M, Wintersteiger R, Blaschitz A, Dohr G, Desoye G, Szekeres-Barthó J, Sedlmayr P: Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *J Reprod Immunol.* 79: 26-36; 2008
- 4) Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT: The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod Update.* 18: 436-57; 2012
- 5) Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK: Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 59: 643-54; 1998
- 6) Bao B, Ahmad A, Kong D, Ali S, Azmi AS, Li Y, Banerjee S, Padhye S, Sarkar FH: Hypoxia induced aggressiveness of prostate cancer cells is linked with deregulated expression of VEGF, IL-6 and miRNAs that are attenuated by CDF. *PLoS One.* 7: e43726; 2012
- 7) Bates DO: An unexpected tail of VEGF and PlGF in pre-eclampsia. *Biochem Soc Trans.* 39: 1576-82; 2011
- 8) Bates SM, Greer IA, Pabinger I, Sofaer S, Hirsh J: Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy. *Chest.* 133: 844–886; 2008
- 9) Bates SM, Greer IA, Middeldorp S, Veenstra DL, Prabulos AM, Vandvik PO: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: ACCP guidelines; VTE, Thrombophilia, Antithrombotic Therapy, and Pregnancy; 2012
- 10) Bick RL, Frenkel EP, Walenga J, Fareed J, Hoppensteadt DA: Unfractionated heparin, low molecular weight heparins, and pentasaccharide: basic mechanism of actions, pharmacology, and clinical use. *Hematol Oncol Clin North Am.* 19: 1–51; 2005
- 11) [1] Bohlmann MK: Thrombophilie und Antikoagulation in der Schwangerschaft. *Gynakol Geburtsmed Gynakol Endokrinol* 6: 30–42; 2010
- 12) [2] Bohlmann MK: Effects and effectiveness of heparin in assisted reproduction. *J Reprod Immunol.* 90: 82-90; 2011
- 13) Borsig L: Antimetastatic activities of modified heparins: selectin inhibition by heparin attenuates metastasis. *Semin Thromb Hemost.* 33: 540-6; 2007

- 14) Cassinelli G, Lanzi C, Tortoreto M, Cominetti D, Petrangolini G, Favini E, Zaffaroni N, Pisano C, Penco S, Vlodavsky I, Zunino F: Antitumor efficacy of the heparanase inhibitor SST0001 alone and in combination with antiangiogenic agents in the treatment of human pediatric sarcoma models. *Biochem Pharmacol.* 85: 1424-32; 2013
- 15) Casu B, Vlodavsky I, Sanderson RD: Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 36: 195-203; 2008
- 16) Cébe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, Manlius C, Wood J, Ballmer-Hofer K: A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci.* 63: 2067-77; 2006
- 17) Cecati M, Giannubilo SR, Emanuelli M, Tranquilli AL, Saccucci F: HLA-G and pregnancy adverse outcomes. *Med Hypotheses.* 76: 782-4; 2011
- 18) Chung JY, Song Y, Wang Y, Magness RR, Zheng J: Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *Pregnancies J Clin Endocrinol Metab.* 89: 2484-90; 2004
- 19) Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, Zwinderman AH, Robson SC, Bindels PJ, Kleijnen J, Khan KS: Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ.* 178: 701–711; 2008
- 20) Cohen-Kaplan V, Naroditsky I, Zetser A, Ilan N, Vlodavsky I, Doweck I: Heparanase induces VEGF C and facilitates tumor lymphangiogenesis. *Int J Cancer.* 123: 2566–2573; 2008
- 21) Demers S, Bujold E, Arenas E, Castro A, Nicolaides KH: Prediction of recurrent preeclampsia using first-trimester uterine artery doppler. *Amer J Perinatol*: DOI: 10.1055/s-0033-1338172; 2013
- 22) Dempsey LA, Plummer TB, Coombes SL, Platt JL: Heparanase expression in invasive trophoblasts and acute vascular damage. *Glycobiology.* 10: 467-75; 2000
- 23) D'Souza SS, Daikoku T, Farach-Carson MC, Carson DD: Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. *Biol Reprod.* 77: 433-41; 2007
- 24) Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T, Vlodavsky I: Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 96: 1219-30; 2004

- 25) Erkens PM, Prins MH: Fixed dose subcutaneous low molecular weight heparins versus adjusted dose unfractionated heparin for venous thromboembolism. *Cochrane Database Syst Rev.*: CD001100; 2010
- 26) Ferrans JV, Hibbs RG, Burda CD: The heart in fabry's disease. A histochemical and electron microscopic study. *Am J Cardiol.* 24: 95-110; 1969
- 27) Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 25: 581-611; 2004
- 28) Ferrazzani S, D'Alessio MC, Fatigante G, Soreca G, De Carolis S, Paradisi G, Caruso A: Prophylaxis of recurrent preeclampsia: low-molecular-weight heparin plus low-dose aspirin versus low-dose aspirin alone. *Hypertens Pregnancy* 25: 115-27; 2006
- 29) Fluhr H, Spratte J, Ehrhardt J, Steinmüller F, Licht P, Zygmunt M: Heparin and low-molecular-weight heparins modulate the decidualization of human endometrial stromal cells. *Fertil. Steril.* 93: 2581–2587; 2010
- 30) Fluhr H, Spratte J, Heidrich S, Ehrhardt J, Greinacher A, Zygmunt M: The molecular charge and size of heparins determine their impact on the decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 17: 354-9; 2011
- 31) Gallego MJ, Porayette P, M Kaltcheva MM, Bowen R, Vadakkadath Meethal S, Atwood CS: The pregnancy hormones human chorionic gonadotropin and progesterone induce human embryonic stem cell proliferation and differentiation into neuroectodermal rosettes. *Stem Cell Res Ther.* 1: 28; 2010
- 32) Goshen R, Hochberg AA, Korner G, Levy E, Ishai-Michaeli R, Elkin M, de Groot N, Vlodavsky I: Purification and characterization of placental heparanase and its expression by cultured cytotrophoblasts. *Mol Hum Reprod.* 2: 679-84; 1996
- 33) Greer IA, Nelson-Piercy C: Low-molecular-weight heparins for thromboprophylaxis and treatment of venous thromboembolism in pregnancy: a systematic review of safety and efficacy. *Blood.* 106: 401-7; 2005
- 34) Haimov-Kochman R, Friedmann Y, Prus D, Goldman-Wohl DS, Greenfield C, Anteby EY, Aviv A, Vlodavsky I, Yagel S: Localization of Heparanase in normal and pathological human placenta. *Mol Hum Reprod.* 8: 566-73; 2002
- 35) Harris LK, Baker PN, Brenchley PE, Aplin JD: Trophoblast-derived heparanase is not required for invasion. *Placenta.* 29: 332-7; 2008
- 36) He YD, Li YL, Chen Q: Expression of various subtypes of human leukocyte antigen-G in placenta of patients complicated with severe pre-eclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 47: 29-32; 2012

- 37) Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodavsky I, Borsig L: P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J.* 21: 3562-72; 2007
- 38) Hu J, Song X, He YQ, Freeman C, Parish CR, Yuan L, Yu H, Tang S: Heparanase and vascular endothelial growth factor expression is increased in hypoxia-induced retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53: 6810-7; 2012
- 39) Kaufmann P, Black S, Huppertz B: Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction* 69: 1-7; 2003
- 40) Kim SY, Ryu HM, Yang JH, Kim MY, Ahn HK, Lim HJ, Shin JS, Woo HJ, Park SY, Kim YM, Kim JW, Cho EH: Maternal serum levels of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in preeclampsia. *J Korean Med Sci.* 19: 688-92; 2004
- 41) Kirn-Safran CB, D'Souza SS, Carson DD: Heparan sulfate proteoglycans and their binding proteins in embryo implantation and placentation. *Semin Cell Dev Biol.* 19: 187-93; 2008
- 42) Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB: Increased frequency of the genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med.* 340: 9-13; 1999
- 43) Kupfermanc M, Rimon E, Many A, Maslovitz S, Lessing JB, Gamzu R: Low molecular weight heparin versus no treatment in women with previous severe pregnancy complications and placental findings without thrombophilia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 22: 123-6; 2011
- 44) Lai J, Pinas A, Poon LC, Agathokleous M, Nicolaides KH: Maternal serum placental growth factor, pregnancy-associated plasma protein-a and free β -human chorionic gonadotrophin at 30-33 weeks in the prediction of pre-eclampsia. *Fetal Diagn Ther.* 33: 164-72; 2013
- 45) Läubli H, Borsig L: Heparins attenuate cancer metastasis: are selectins the link? *Cancer Invest.* 27: 474-81; 2009
- 46) Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Schwangerschaftshochdruck/Gestose der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG): Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen; 05/2008
- 47) Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Angiologie gemeinsam mit der Dt. Ges. für Chirurgie (DGCh), der Dt. Ges. für Gefäßchirurgie (DGG), der Dt. Ges. für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), der Dt. Ges. für Hämatologie und Onkologie (DGHO), der Dt. Ges. für Internistische Intensivmedizin und Notfallmedizin (DGIIN), der Dt. Ges. für Kardiologie (DGK), der Dt. Ges. für Phlebologie (DGP), der Dt. Ges. für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP),

- der Dt. Röntgengesellschaft (DRG), der Dt. Ges. für Thrombose und Hämostase (GTH) und der Dt. Ges. für Ultraschall in der Medizin (DEGUM): Diagnostik und Therapie der Venenthrombose und der Lungenembolie; 06/2010
- 48) Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) Interdisziplinäre Expertengruppe: Diagnostik und Therapie peripartaler Blutungen; 06/2008
- 49) Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) und der Arbeitsgemeinschaft Immunologie in Gynäkologie und Geburtshilfe (AGIM): Diagnostik und Therapie beim wiederholten Spontanabort; 05/2008
- 50) Li Y, Liu H, Huang YY, Pu LJ, Zhang XD, Jiang CC, Jiang ZW: Suppression of endoplasmic reticulum stress-induced invasion and migration of breast cancer cells through the downregulation of heparanase. *Int J Mol Med*. 31: 1234-42; 2012
- 51) Liu X, Gu W, Li X: HLA-G regulates the invasive properties of JEG-3 choriocarcinoma cells by controlling STAT3 activation. *Placenta*. DOI: 10.1016/j.placenta.2013.07.070; 2013
- 52) Luedders DW, Bundschuh D, Hornemann A, Hoerster JC, Boemicke P, Köster F, Bohlmann MK: Heparanase expression in term placentas of diabetic patients and healthy controls. *Arch Gynecol Obstet*. 284: 287-92; 2011
- 53) Martinelli I, Ruggenenti P, Cetin I, Pardi G, Perna A, Vergani P, Acaia B, Facchinetti F, La Sala GB, Bozzo M, Rampello S, Marozio L, Diadei O, Gherardi G, Carminati S, Remuzzi G, Mannucci PM; HAPPY Study Group: Heparin in pregnant women with previous placenta-mediated pregnancy complications: a prospective, randomized, multicenter, controlled clinical trial. *Blood*. 119: 3269-75; 2012
- 54) Matziolis G, Erli HJ, Rau HM, Klever P, Bosserhoff AK, Paar O: Heparin beschleunigt die Proliferation humaner Osteoblasten in vitro. *Orthopäde* 31: 575-581; 2002
- 55) Mello G, Parretti E, Fatini C, Riviello C, Gensini F, Marchionni M, Scarselli GF, Gensini GF, Abbate R: Low-molecular-weight heparin lowers the recurrence rate of preeclampsia and restores the physiological vascular changes in angiotensin-converting enzyme DD women. *Hypertension* 45: 86-91; 2005
- 56) Merviel P, Carbillon L, Challier JC, Rabreau M, Beaufrils M, Uzan S: Pathophysiology of preeclampsia: links with implantation disorders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 115: 134-47; 2004
- 57) Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA: International consensus statement on an

- update of the classification criteria for definite Antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 4: 295-306; 2006
- 58) Mosimann B, Wagner M, Poon LC, Bansal AS, Nicolaides KH: Maternal serum cytokines at 30-33 weeks in the prediction of preeclampsia. *Prenat Diagn.* 33: 823-30; 2013
- 59) Nadir Y, Brenner B: Heparanase procoagulant effects and inhibition by heparins. *Thromb Res.* 125 Suppl 2: 72-6; 2010
- 60) [1] Nasser NJ, Sarig G, Brenner B, Nevo E, Goldshmidt O, Zcharia E, Li JP, Vlodavsky I: Heparanase neutralizes the anticoagulation properties of heparin and low-molecular-weight heparin. *J Thromb Haemost.* 4: 560-5; 2006
- 61) [2] Nasser NJ: Heparanase involvement in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci.* 65: 1706-15; 2008
- 62) Nelson SM, Greer IA: The potential role of heparin in assisted conception. *Hum Reprod Update* 14: 623-45; 2008
- 63) Niers TM, Klerk CP, DiNisio M, Van Noorden CJ, Büller HR, Reitsma PH, Richel DJ: Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol.* 61: 195-207; 2007
- 64) Nobuhisa T, Naomoto Y, Okawa T, Takaoka M, Gunduz M, Motoki T, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Haisa M, Matsuoka J, Kurebayashi J, Nakajima M, Taniguchi S, Sagara J, Dong J, Tanaka N: Translocation of heparanase into nucleus results in cell differentiation. *Cancer Sci.* 98: 535-40; 2007
- 65) Parish CR, Freeman C, Brown KJ, Francis DJ, Cowden WB: Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res.* 59: 3433-41; 1999
- 66) Pettilä V, Kaaja R, Leinonen P, Ekblad U, Kataja M, Ikkala E: Thromboprophylaxis with low molecular weight heparin (dalteparin) in pregnancy. *Thromb Res.* 96: 275-82; 1999
- 67) Plaisier M: Decidualisation and angiogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 25: 259-71; 2011
- 68) [1] Poon LC, Syngelaki A, Akolekar R, Lai J, Nicolaides KH: Combined screening for preeclampsia and small for gestational age at 11-13 weeks. *Fetal Diagn Ther.* 33: 16-27; 2012
- 69) [2] Poon LC, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH: Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and

- maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther.* 33: 215-23; 2013
- 70) Radkov OV, Kalinkin MN, Zavarin VV: Genophenotypic analysis of angiotensinogen gene M235T polymorphism and preeclampsia. *Bull Exp Biol Med.* 154: 354-6; 2013
- 71) Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ: Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 114: 744–754; 2004
- 72) Revel A, Helman A, Koler M, Shushan A, Goldshmidt O, Zcharia E, Aingorn H, Vlodavsky I: Heparanase improves mouse embryo implantation. *Fertil Steril.* 83: 580-6; 2005
- 73) Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I: Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 361: 901-908; 2003
- 74) Rey E, Garneau P, David M, Gauthier R, Leduc L, Michon N, Morin F, Demers C, Kahn SR, Magee LA, Rodger M: Dalteparin for the prevention of recurrence of placental-mediated complications of pregnancy in women without thrombophilia: a pilot randomized controlled trial. *J Thromb Haemost* 7: 58-64; 2009
- 75) Roberge S, Nicolaides KH, Demers S, Villa P, Bujold E: Prevention of perinatal death and adverse perinatal outcome using low-dose aspirin: a meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 41: 491-9; 2013
- 76) Rogoziński P, Bruliński K, Malinowski E, Kucharzewska M: Is the vascular-endothelial growth factor responsible for the malignancy of lung cancer? *Pol Merkur Lekarski.* 33: 213-6; 2012
- 77) Savaj S, Vaziri N: An overview of recent advances in pathogenesis and diagnosis of preeclampsia. *Iran J Kidney Dis.* 6: 334-8; 2012
- 78) Sgambati E, Marini M, Zappoli Thyron GD, Parretti E, Mello G, Orlando C, Simi L, Tricarico C, Gheri G, Brizzi E: VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *BJOG.* 111: 564-70; 2004
- 79) Spratte J, Meyer zu Schwabedissen H, Endlich N, Zygmunt M, Fluhr H: Heparin inhibits TNF- α signaling in human endometrial stromal cells by interaction with NF- κ B. *Mol Hum Reprod.* 19: 227-36; 2013
- 80) Stevenson JL, Choi SH, Varki A: Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins-correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res.* 11: 7003-11; 2005
- 81) Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M: The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 12: 617-30; 2006

- 82) Taira T, Yamamoto N: Anti-VEGF therapy for lung cancer. *Nihon Rinsho*. 70: 2159-64; 2012
- 83) Van Doormaal FF, Di Nisio M, Otten HM, Richel DJ, Prins M, Buller HR: Randomized trial of the effect of the low molecular weight heparin nadroparin on survival in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 29: 2071-6; 2011
- 84) Verlohren S, Stepan H, Dechend R: Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 122: 43-52; 2012
- 85) [1] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I: Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 5: 793-802; 1999
- 86) [2] Vlodavsky I, Elkin M, Abboud-Jarrous G, Levi-Adam F, Fuks L, Shafat I, Ilan N: Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression. *Connect Tissue Res*. 49: 207-10; 2008
- 87) Von Wolff M, Germeyer A, Strowitzki T: Implantation: Physiologie, Pathologie und therapeutische Optionen bei Implantationsstörungen. *Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch* 49: 69-79; 2009
- 88) Wagner SJ, Craici IM, Grande JP, Garovic VD: From placenta to podocyte: vascular and podocyte pathophysiology in preeclampsia. *Clin Nephrol*. 78: 241-9; 2012
- 89) Wang K, Zheng J: Signaling Regulation of Fetoplacental Angiogenesis. *J Endocrinol*. 212: 243–255; 2012
- 90) Wang K, Ahmad S, Cai M, Rennie J, Fujisawa T, Crispi F, Bailly J, Miller MR, Cudmore M, Hadoke PW, Wang R, Gratacós E, Buhimschi IA, Buhimschi CS, Ahmed A: Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation* 127: 2514-22; 2013
- 91) Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J: Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*. 49: 1015-26; 2007
- 92) Yu LL, Chang K, Lu LS, Zhao D, Han J, Zheng YR, Yan YH, Yi P, Guo JX, Zhou YG, Chen M, Li L: Lentivirus-mediated RNA interference targeting the H19 gene inhibits cell proliferation and apoptosis in human choriocarcinoma cell line JAR. *BMC Cell Biol*.: DOI: 10.1186/1471-2121-14-26; 2013
- 93) Zheng LD, Jiang GS, Pu JR, Mei H, Dong JH, Hou XH, Tong QS: Stable knockdown of heparanase expression in gastric cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol*. 15: 5442-8; 2009

8. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Professor Achim Rody dafür, dass er es mir ermöglicht hat, meine Dissertation in seinem Hause anzufertigen.

Herrn PD. Dr. med. Michael Bohlmann danke ich für die Überlassung des Themas, die allzeit exzellente Betreuung, Unterstützung und Förderung.

Herrn PD. Dr. rer. nat. Frank Köster danke ich für die Unterstützung in sämtlichen wissenschaftlichen Fragen, Herrn Stephan Polack, Frau Sabine Glasl, Frau Gabriele Marschner wie auch allen anderen Kollegen für Rat und Tat im Labor.

Frau PD. Dr. med. Dörte Lüdders danke ich für die Eröffnung der Möglichkeiten.

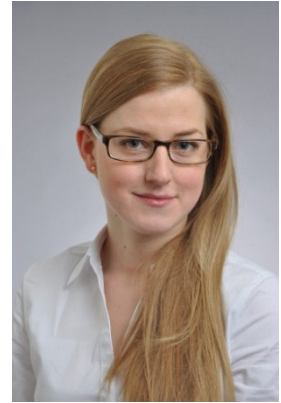
Ich danke den Kollegen der Mikrobiologie für die Möglichkeit der Nutzung Ihrer Hox-Box.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter dafür, dass sie mir in jeder Lebenslage mit guten Ratschlägen und Liebe zur Seite steht. Ich danke meiner Schwester und ihrer Familie für ihren moralischen Beistand. Sinem Tunc und Insa Schneegans danke ich für den regelmäßigen Austausch von Motivation und Gedanken. Sebastian Hauck danke ich dafür, dass er jeden Weg leichter macht.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name Jana-Christin Hörster
Alter 26 Jahre



Ärztliche Tätigkeit

Seit 10/2013 Assistenzärztin in der Klinik für Neurochirurgie, Knappschafts Krankenhaus Bochum, Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum

Studium

10/2006 – 04/2013 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 03/2009
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 04/2013

Praktisches Jahr

12/2012 – 01/2013 Innere Medizin, Hämatologie/Onkologie, Sana Kliniken Lübeck, Lehrkrankenhaus der Universität zu Lübeck
10/2012 – 12/2012 Innere Medizin, Zentrale Notaufnahme, Sana Kliniken Lübeck, Lehrkrankenhaus der Universität zu Lübeck
08/2012 – 10/2012 Sektion für Unfallchirurgie, UK-SH, Campus Lübeck
06/2012 – 08/2012 Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß, und Thoraxchirurgie, UK-SH, Campus Lübeck
02/2012 – 06/2012 Klinik für Neurochirurgie, Evangelisches Krankenhaus Bielefeld gGmbH, Lehrkrankenhaus der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Beschäftigungsverhältnisse/Tutorien

2009 – 2011 Tätigkeit als Extrawache im UK-SH, Campus Lübeck, Tätigkeitsprofil: Pflegerische Hilfskraft im stationären Bereich sowie Einsatz als Sitzwache überwachungsbedürftiger Patienten in verschiedenen Kliniken, z.B. Neurochirurgie, Innere Medizin, Urologie

2007 – 2008

Studentische Hilfskraft als Tutorin des Kurses Übungen zur Makroskopischen Anatomie I, II (Allgemeine Anatomie, Bewegungsapparat, Situs), Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck

Tätigkeitsprofil: Anleitung zweier Studentengruppen von jeweils 5 Studenten im vorklinischen Abschnitt zur selbstständigen Präparation anatomischer Strukturen und Festigung des theoretischen Wissens am menschlichen Modell

Zeitraum der Dissertation

08/2010 – 02/2012

Zeitraum der experimentellen Untersuchungen

Publikationen

- 1) Luedders DW, Bundschuh D, Hornemann A, Hoerster JC, Boemicke P, Köster F, Bohlmann MK: Heparanase expression in term placentas of diabetic patients and healthy controls. Arch Gynecol Obstet 284: 287-292; 2011. DOI: 10.1007/s00404-010-1636-5
- 2) Hoerster JC, Koester F, Luedders DW, Boemicke P, Bundschuh D, Bohlmann MK: Einfluss von Heparin auf die Proliferation humaner Chorioncarcinom-Zellen sowie deren Expression der Endoglycosidase Heparanase. Vorgestellt beim 25. Deutschen Kongress für Perinatale Medizin; 01.-03.12.2011, Berlin. Z Geburtsh Neonat 2011; S1: PO11.06

Lübeck, 16. November 2013