Untersuchungen der Immuncheckpoints VISTA und PD-L1 in der Plazenta von Präeklampsie-Patientinnen

Von der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
– Fakultät für Medizin und Gesundheitswissenschaften
zur Erlangung des Grades Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigte Dissertation

von
Frau Kristin Wedermann
geboren am 10. Mai 1993 in Jever

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Rudy Leon De Wilde
Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulrich Gembruch
Tag der Disputation: 26. Juni 2025

Inhaltsverzeichnis

Gendererklärung I
Abkürzungsverzeichnis II
1 Einleitung 1
1.1 Themeneinführung und Definition 1
1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren 2
1.3 Klinik und Komplikationen 3
1.4 Screening und Prädiktion 4
1.5 Prävention 5
1.6 Diagnostik 5
1.7 Therapie 6
1.8 Immuntoleranz in der Schwangerschaft 7
1.9 Immuncheckpoints, ihr Einfluss auf die Präeklampsie und pathophysiologische Zusammenhänge 9
1.9.1 PD-1 und PD-L1 10
1.9.2 VISTA 10
1.9.3 Entstehung der Präeklampsie: Zwei-Phasen-Modell 12
1.10 Zielsetzung 19
2 Materialien und Methoden 20
2.1 Studiendesign 20
2.2 Material 20
2.3 Methoden 21
2.3.1 Immunhistologische Färbung 21
2.3.2 RNS-Isolation aus einer Probe Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe 23
2.3.3 RNS-Konzentrationsmessung 24
2.3.4 DNase-Behandlung 24
2.3.5 Umschreiben der RNS in cDNS 25
2.3.6 qRT-PCR SybrGreen 25
2.3.7 Auswertung der mikroskopischen Bilder mittels FIJI ImageJ Software 27
2.3.8 Statistische Analyse 29
3 Ergebnisse 31
3.1 Auswertung der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) 31
3.2 Ergebnisse der Auswertung mikroskopischer Bilder mittels FIJI ImageJ 35
3.2.1 Mittlerer Grauwert 35
3.2.2 Fläche DAB-Signal 39
3.2.3 Intensität/Nukleus 42
3.2.4 Fläche positiver Kerne 45
4 Diskussion 49
4.1 PD-L1 in Expression in Plazenten mit und ohne Präeklampsie 49
4.2 VISTA in Expression in Plazenten mit und ohne Präeklampsie 51
4.3 Einfluss der Immuncheckpoints PD-L1 & VISTA auf präeklamptische Plazenten 52
4.4 Limitationen der Arbeit 53
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick 55

5 Zusammenfassung 57
6 Summary 59
7 Literaturverzeichnis 60
8 Anhang 66
8.1 Ergänzendes Material 66
8.2 Tabellenverzeichnis 71
8.3 Abbildungsverzeichnis 71
9 Danksagung 74
10 Eidesstattliche Erklärung 75

Gendererklärung

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Femininum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht und falls notwendig – auf alle Geschlechter.

Abkürzungsverzeichnis

°C ..... Grad Celcius
Aa ..... Arterien
ANOVA ..... Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
ASS ..... Acetylsalicylsäure
AT1-Autoantikörper ..... anti-Angiotensin 1-Autoantikörper
CD ..... Unterscheidungsgruppen (engl. Cluster of Differentiation)
cq ..... Quantifizierungszyklus (engl. quantification cycle)
DAB ..... Diaminobenzidin
DEPC-H_2O ..... Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
df ..... Anzahl der Freiheitsgrade (Statistik) (engl. number of degrees of freedom)
DNA ..... Desoxyribonukleinsäure
DNase ..... Desoxyribonuklease
EDTA ..... Ethylendiamintetraessigsäure
EVT ..... extravillöse Trophoblasten, extravillöse Trophoblasten
FC ..... Fc-Rezeptor (engl. fragment crystallisable)
FCS ..... Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FFPE ..... Formalin-fixierte Paraffin-eingebettet
FIJI ..... "Fiji Is Just ImageJ"
g ..... Gramm
GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF ..... Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h ..... Stunde
HELLP ..... Hämolyse, erhöhte Lebertransaminasen, erniedrigte Thrombozytenzahlen (engl. hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets)
HLA ..... humanes Leukozytenantigen
HRP ..... Meerrettichperoxidase-Polymer (engl. horseradish peroxidase polymer)
IC ..... Immuncheckpoint
IFN ..... Interferon
IgG ..... Immunoglobulin-G
IHC ..... Immunhistochemie
IL-10 ..... Interleukin-10
IUGR. Intrauterine fetale Wachstumsretardierung (engl. intrauterine fetale growth retardation)
KIR ..... Killerzell-Immunglobulin-artigen Rezeptoren (engl. killer cell immunoglobulin-like receptors)
L ..... Liter
m ..... Meter

M ..... Molar
MHC..... maternale Haupthistokompatibilitätskomplexe
min ..... Minute
mmHg ..... Millimeter-Quecksilbersäule
mol ..... Mol
Na ..... Natrium
NaCl..... Natriumchlorid, Natriumchlorid
NCR ..... Negative Checkpoint Regulator
NK-Zellen..... Natürliche Killerzellen
PAPP-A..... Schwangerschafts-assoziiertes Plasmaprotein A (engl. pregnancy-associated plasma protein A)
PD-1..... Programmed Death-1
PD-L1..... Programmed Death Ligand-1
PlGF..... Plazenta-Wachstumsfaktor (engl. placental growth factor)
qRT-PCR ..... quantitative Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
RNS ..... Ribonukleinsäure
RPLP0 ..... Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
RT ..... Reverse Transkriptase
s ..... Sekunde
s-ENG ..... lösliches Endoglin (engl. soluble Endoglin)
s-Flt-1..... lösliche fsm-ähnliche Tyrosinkinase-1 (engl. Soluble fms-like tyrosine kinase 1)
TBS ..... Tris-gepufferte Salzlösung (engl. Tris-buffered saline)
Th T-Zellen ..... T-Helfer-Zellen
TNF ..... Tumornekrosefraktor (engl. tumor necrosis factor)
Treg T-Zellen ..... regulatorische T-Zellen
uNK..... uterine natürliche Killerzellen
Upm ..... Umdrehungen pro Minute
UV ..... ultraviolett
VEGF ... Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. Vascular endothelial growth factor)
VISTA ..... V-domain containing Ig suppressor of T-cell activation
xg ..... relative Zentrifugalkraft

1 Einleitung

1.1 Themeneinführung und Definition

Die Präeklampsie gehört zur Gruppe der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen und zeichnet sich per Definition vor allem durch eine Hypertonie (Blutdruckwerte im Gesamtmittel ≥ 140/90 mmHg) und eine Proteinurie von ≥ 300 mg/d oder eine Protein-Kreatinin-Ratio von ≥ 30 mg/mmol im Spontanurin aus (1). Außerdem können auffällige Präeklampsie-Serummarker hinweisend auf eine bestehende Präeklampsie sein (2).
Bei fehlender Proteinurie wird jedoch auch von einer Präeklampsie gesprochen, wenn eine neu aufgetretene Gestationshypertonie begleitet wird von folgenden Symptomen und Laborparametern (3):

- Thrombozytopenie: Serum-Konzentration der Thrombozyten < 100 000/µL
- Niereninsuffizienz: Serum-Kreatinin Konzentration > 1,1 mg/dL, oder Verdopplung des Serum-Kreatinins
- Eingeschränkte Leberfunktion: Verdopplung der physiologischen Leber-Transaminasen-Werte
- Lungenödem
- Neu aufgetretene, therapieresistente Kopfschmerzen (ohne Hinweis auf einen anderen Ursprung) und visuelle Symptome

Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen treten frühestens in der 20. Schwangerschaftswoche und spätestens bis zum 42. Wochenbetttag auf. Wobei die meisten Fälle im dritten Trimenon auftreten (1).
Etwa 2 % aller Schwangeren in Europa entwickeln nach aktuellen epidemiologischen Angaben eine Präeklampsie, wobei die Ursachen für diese Erkrankung bisher nicht ausreichend belegt sind.
Eines ist klar: Die Plazenta spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung (2).
Diskutiert werden maternale Ursachen bzw. Umweltfaktoren, genetische und immunologische Ursachen (4).
Die immunologischen Aspekte der Ätiologie der Präeklampsie sollen genauer betrachtet werden, da in vielfachen Studien die Einflussnahme des Immunsystems Auswirkungen auf das Krankheitsbild der Präeklampsie beschrieben werden (5,6).
Insgesamt wird eine fehlgesteuerte maternal-fetale Immuntoleranz diskutiert. Um eine intakte Immuntoleranz überhaupt ermöglichen zu können, spielen die negativen Checkpoint Regulatoren (NCRs) - auch genannt Immuncheckpoints (IC)- eine essenzielle Rolle (7).

Bisherige Untersuchungen beschreiben die erniedrigte Expression von PD-L1 als Immuncheckpoint in Schwangerschaften mit Präeklampsie im Vergleich zu unauffälligen Schwangerschaften (43).

1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Rund 6-8 % aller Schwangerschaften sind von hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen betroffen. Die Präeklampsie nimmt mit ca. 2 % aller Schwangerschaften in Europa einen beträchtlichen Teil davon ein.
Innerhalb von Europa ist die Präeklampsie für 10-15 % maternaler Todesfälle verantwortlich. Mit bis zu 100 000 Todesfällen pro Jahr ist die Präeklampsie eine der führenden Gründe für die Müttersterblichkeit. Besonders in den Entwicklungsländern ist der Anteil, der durch Präeklampsie bedingten maternalen Todesfälle von großer Bedeutung und neben den postpartalen Blutungen einer der Haupttodesursachen in Verbindung mit der Schwangerschaft (8).
Insgesamt kann man von einer geringeren Prävalenz in industrialisierten Ländern im Vergleich zu Entwicklungsländern sprechen (2).
Die Risikofaktoren für das mögliche Entstehen einer Präeklampsie können unterteilt werden in allgemeine und schwangerschaftsbedingte Risikofaktoren.
Besondere Bedeutung bei den allgemeinen Risiken haben bestehende Autoimmunerkrankungen (z.B. Systemischer Lupus Erythemathodes), Adipositas (Body-Mass-Index > 35), Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 sowie das Bestehen einer chronischen Hypertonie oder einer chronischen Nierenerkrankung. Ebenfalls schienen ein mütterliches Alter > 40 Jahre und vorausgegangene Präeklampsie-Fälle in der Familie Risikofaktoren darzustellen.
Wenn die schwangerschaftsassoziierten Risikofaktoren betrachtet werden, fällt vor allem auf, dass Schwangere mit einer positiven Eigenanamnese zur Präeklampsie in einer vorherigen Schwangerschaft sowie Erstgebärende und Schwangere mit Mehrlingsschwangerschaften betroffen waren.
Dieses betraf ebenso Schwangerschaften, bei denen die assistierte Reproduktion zum Einsatz kam.
Von ebenfalls großer Bedeutung mit daraus resultierendem erhöhtem Risiko sind der Gestationsdiabetes und auffällige Doppleruntersuchungen der Arteriae uterinae nach der 24. Schwangerschaftswoche (1).

1.3 Klinik und Komplikationen

Diese Merkmale einer Präeklampsie entstehen üblicherweise nach der 20. Schwangerschaftswoche.
Bei Präeklampsien, die vor der 34. Schwangerschaftswoche entstehen, spricht man von der Early-Onset-Präeklampsie. Wohingegen die Entstehung nach der 34. Schwangerschaftswoche die Late-Onset-Präeklampsie beschreibt.
Bei der erstgenannten Early-Onset-Präeklampsie wird im Allgemeinen eine höhere maternale und fetale/neonatale Morbidität und Mortalität beschrieben.
Die Präeklampsie kann sich durch eine Vielzahl anderer Vorboten und Symptome präsentieren, da es sich dabei um eine milde systemische Beteiligung bis hin zum Multiorganversagen handeln kann.
Da nahezu alle Organe beteiligt sein können, sind typische Symptome die zunehmende Ödembildung, Kopfschmerzen, Anurie/Oligurie und epigastrische Schmerzen.
Weitere typische klinische Vorboten sind die fetale Wachstumsretardierung und erhöhte Leber-Transaminasen.
Spricht man von einer schweren Präeklampsie, muss mindestens eines der folgenden genannten Kriterien erfüllt sein (1):

- Nierenbeteiligung mit einem Kreatininwert von > 0,9 g/l oder einer Oligurie von < 500 ml in 24 h
- Leberbeteiligung mit daraus resultierend erhöhten Transaminasenwerten und möglichen epigastrischen Beschwerden
- Neurologische Symptomatik mit Kopfschmerzen und/oder Augenflimmern
- Hämatologische Komplikationen mit Zeichen der Hämolyse, Thrombozytopenie (< 100000/µl)
- Pathologische Doppler der A. umbilicalis
- Blutdruckwerte ≥ 160/110 mmHg

Eine gefürchtete mögliche Komplikation stellt dabei die Eklampsie. Dabei handelt es sich um die Präeklampsie mit tonisch-klonischen Krämpfen. Es sollte bei den Krämpfen keine andere Ursache geben. Als typische Vorboten für das mögliche Krampfgeschehen werden insbesondere Augenflimmern, zunehmende Kopfschmerzen und innerliche Unruhe der Patientin beschrieben.
Die zuvor genannten Indizien einer schweren Präeklampsie können alle die Grundlage für mögliche Komplikationen wie Nierenversagen, Gerinnungsstörungen, Bildung eines Lungenödems, Apoplex oder HELLP-Syndrom (**h**emolysis, **e**levated **l**iver enzymes, **l**ow **p**latelets) sein.

1.4 Screening und Prädiktion

Bisher gibt es für das Screening beziehungsweise die Diagnose der Präeklampsie keinen alleinigen aussagekräftigen Test, weshalb die Präeklampsie und mögliche Screening-Methoden auch weiterhin großer Bestandteil der Forschung sind.
Ein wichtiger Baustein für die Risikoermittlung stellt die detaillierte Anamneseerhebung der Patientin dar. Dazu sollten besonders das Alter der Patientin, die bereits oben besprochenen Risikofaktoren und der Body-Mass-Index der Patientin ermittelt werden.
Im Ersttrimester-Screening auf Präeklampsie (11. – 13. Schwangerschaftswoche) kann dann zusammen mit weiteren Faktoren wie Doppleruntersuchungen, Blutdruckmessungen und laborchemischen Markern eine Berechnung des Risikos eine Präeklampsie zu entwickeln durch eine Bayes-basierte Methode erfolgen. Dazu finden die Messung der Widerstände (Pulsatilitätsindex) der uterinen Gefäße (Aa. uterinae) und die Bestimmung des Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) und dem Placental growth factor (PlGF) statt.
Hiermit wird vor allem das Risiko an einer früheinsetzenden, der sogenannten Early-Onset Präeklampsie, vor der 34. Schwangerschaftswoche ermittelt (9,10).
Insgesamt zeigt sich bei diesem Frühscreening ein beträchtlicher negativer prädiktiver Wert von über 95 % (1,11).
Zu den Screening-Methoden im zweiten und dritten Trimenon gehören vor allem die regelmäßigen Blutdruckmessungen und die Detektion einer Proteinurie im Rahmen der geltenden Richtlinien der Mutterschaftsvorsorge.
In Kombination mit den Doppleruntersuchungen des Pulsatilitätsindexes und der postsystolischen Inzisur (notching) in den Aa. uterinae beidseits spricht man hier von einer Prädiktion mit Sensitivität von 93% (11).
Ab der 30. Schwangerschaftswoche können ergänzende Untersuchungen der angiogenen Faktoren, welche lediglich als unterstützend zur Diagnosestellung Präeklampsie angesehen werden, erfolgen. Hier ist das Screening mit Bestimmung des s-Flt-1/PlGF-Quotienten gemeint. S-Flt-1 steht dabei für soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 (12–14).
Eine Studie (PROGNOSIS-Studie) konnte zeigen, dass ein sFlt-1/PlGF-Quotient ≤ 38 einen hohen negativen prädiktiven Wert von 99,3 % für die Entwicklung einer Präeklampsie binnen einer Woche aufweist (15). Weitere Studien konnten Prognoseraten von ca. 30 % in der 28. Schwangerschaftswoche beschreiben (16).

1.5 Prävention

Um das bestehende Risiko der Schwangeren, die eine Präeklampsie hatten oder bei denen ein positives Screening im ersten Trimenon vorliegt, zu senken, sollte bereits in der Frühschwangerschaft (bis spätestens zur 16. Schwangerschaftswoche) mit der Einnahme von täglich 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) begonnen werden (17). Die Einnahme sollte bis zur 34. – 36. Schwangerschaftswoche fortgeführt werden und dient der Prävention einer Early-Onset-Präeklampsie, senkt das Risiko einer schweren Präeklampsie und schwangerschaftsinduzierter Hypertonie (18,19).
Eine generelle prophylaktische Gabe von ASS sollte vermieden werden (1).

1.6 Diagnostik

Um eine Präeklampsie diagnostizieren zu können, stehen vor allem die Blutdruckmessung und die Detektion einer signifikanten Eiweißausscheidung im Fokus.
Bei auffälligen erhöhten Einzelblutdruckmessungen sollte eine 24-Stunden-Blutdruckmessung erfolgen, um eine mögliche Weißkittelhypertonie der Patientin ausschließen zu können.
Auch im ambulanten Setting sollten Patientinnen mit auffälligen Blutdruckwerten oder einer diagnostizierten Präeklampsie regelmäßige (zwei- bis dreimal täglich) Blutdruckselbstmessungen durchführen.
Auf eine im Urin-Streifentest detektierte Eiweißausscheidung von ≥ 1+ Eiweiß sollte eine Proteinurie-Quantifizierungsmethode folgen. Dabei lassen sich zwei Methoden anwenden:
Zum einen die 24-Stunden-Sammelurin-Messung auf Eiweiß, bei der ein Wert von ≥ 300 mg/Tag als signifikant gewertet wird, und zum anderen die Bestimmung des Protein-Kreatinin-Quotienten aus dem Spontanurin. Hier ist ein Wert von ≥ 30 mg/mmol signifikant und kann mit den ≥ 300 mg Eiweiß aus der 24 h-Messung gleichgesetzt werden (20,21).
Die oftmals vorkommende Ödembildung im Rahmen der Präeklampsie ist ein eher unspezifisches Symptom, sollte jedoch bei ≥ 1 kg Gewichtszunahme pro Woche im dritten Trimenon nicht außer Acht gelassen werden (22).
Ebenfalls können folgende laborchemische Parameter Veränderungen zeigen:

Tabelle 1: Empfohlene Laborparameter bei Hypertonie in der Schwangerschaft (1)

Parameter	**pathologisch**
Blut	
Hämoglobin	< 13 g/dl (Abfall bei HELLP-Syndrom)
Hämatokrit	> 38 %
Erythrozytenanzahl	↑

Thrombozytenanzahl	< 100 000/µl
Leber	
ALT	↑
AST	↑
LDH	↑
Bilirubin (indirekt)	> 1,2 mg/Tag
Gerinnung	
Antithrombin III	< 70 %
D-Dimere	↑
Fibrinogen	↓ < 150 mg/dl
Verschiedene	
Harnsäure	> 5,9 mg/dl ab 32. Schwangerschaftswoche
Eiweiß im Urin	≥ 300 mg in 24 Stunden
Kreatinin	≥ 0,9 mg/dl
Haptoglobin	↓ (Abfall bei HELLP-Syndrom)
sFlt-1/PlGF-Quotient	> 85

1.7 Therapie

Das Therapieziel besteht vor allem in der Verhinderung von zerebrovaskulären und kardiovaskulären Komplikationen der Schwangeren.

Dabei ist die antihypertensive Therapie bei Blutdruckwerten von ≥ 150 systolisch und/oder ≥ 100 mmHg diastolisch indiziert. Das Medikament der ersten Wahl ist dabei alpha-Methyl-Dopa. Die Blutdruck-Zielwerte liegen dabei bei < 150/80-100 mmHg (1).

Die Eklampsie-Prophylaxe wird in der Regel mittels einer Magnesium-Applikation durchgeführt und bei möglichen Vorboten wie unter anderem Kopfschmerzen, Erbrechen, Übelkeit, Hyperreflexie begonnen.

Die Entbindung ist die einzige kausale Therapie und sollte anhand der Klinik mit Blick auf den fetalen und maternalen Zustand sowie auf die Schwangerschaftswoche erfolgen. Hierzu gibt die Sk2-Leitlinie Geburtseinleitung die entsprechenden Empfehlungen (1,23).

Bei der Entscheidung zur Entbindung gilt es immer abzuwägen zwischen Frühgeburtlichkeit mit möglichen fetalen Komplikationen und erhöhter maternaler Morbidität. Das Ziel ist es, die richtige Entscheidung zu finden zwischen abwartendem Verhalten und Prolongation der Schwangerschaft, um eventuell eine Frühgeburtlichkeit zu verhindern.

Die Entscheidung zur Entbindung hängt somit zu einem Großteil von der Schwangerschaftswoche ab. Hierzu spricht die Leitlinie entsprechende Empfehlungen für die jeweiligen Schwangerschaftswochen aus.

1.8 Immuntoleranz in der Schwangerschaft

Eine intakte und physiologische Schwangerschaft erfordert eine regulierte Immuntoleranz an der maternalen-plazentaren Schnittstelle. Dies erfordert ein Zusammenspiel unter anderem zwischen den fetalen Trophoblasten, dezidualen Stromazellen sowie mütterlichen dezidualen Immunzellen an der Grenzzone zwischen Mutter und Kind.

Der äußere Teil der Blastozyste entwickelt sich zum Trophoblasten, welcher sich dann wiederum in einen villösen und einen extravillösen Trophoblasten (EVT) unterteilt. Der extravillöse Trophoblast invadiert dazu in die Dezidua und der villöse Teil bildet später die plazentaren Zotten. Die Dezidua sollte Immuntoleranz aufbringen, aber auch immunologische Protektion gegen mögliche lokale Infektionen bieten (24).

Die beteiligten Immunzellen lassen sich einteilen in Zellen, die zur angeborenen Immunität gehören sowie in Zellen, die Teil der erworbenen oder der adaptiven Immunität gehören.

Die folgende Abbildung 1 gibt uns dazu einen Überblick zu den unterschiedlichen Zellen.

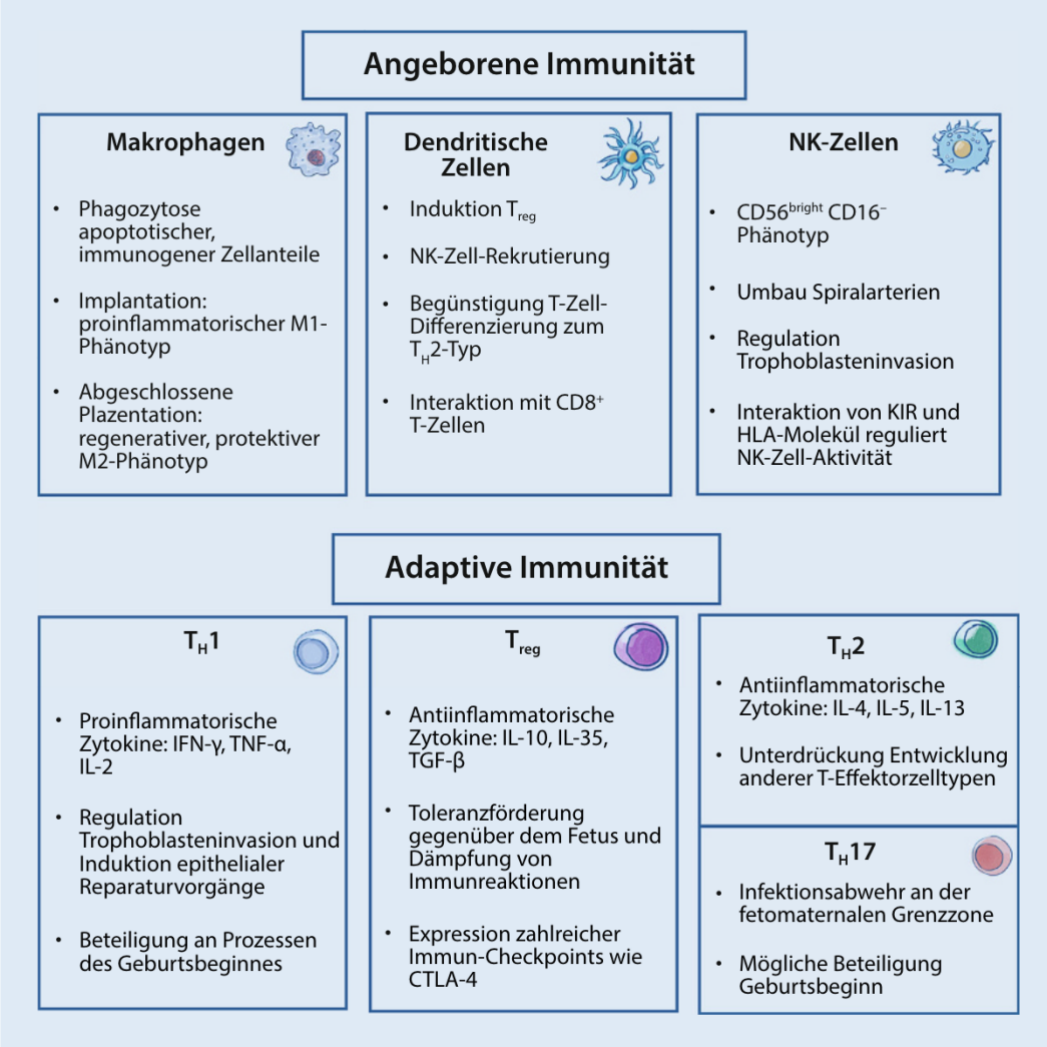

Abbildung 1: Übersicht der Immunzellen der angeboren und der adaptiven Immunität in der Schwangerschaft (25)

Die **natürlichen Killerzellen** (NK-Zellen) der Dezidua sind vom Phäntotyp $CD56^{bright}$ $CD16^{-}$ und machen circa 50-70 % der dezidualen Immunzellen aus (25). Dieser Phänotyp ist im Vergleich zu den peripheren NK-Zellen weniger zytotoxisch und spielt eine sehr wichtige Rolle im Umbau der uterinen Spiralarterien sowie die Regulation der Trophoblasteninvasion (26).

An den Trophoblasten der menschlichen Plazenta mangelt es an den klassischen humanen Leukozytenantigenen (kurz: HLA; Englisch: human leukocyte antigen) der Klasse I HLA-A, -B und -C. Stattdessen dominiert das nicht-klassische HLA der Klasse Ib HLA-G auf der mütterlichen Seite der Plazenta.
Die Interaktion zwischen den NK-Zellen mit dem HLA-G schraubt die NK-Zellen-Zytotoxizität herunter und unterstützt eine adäquate Plazentation (27).
Eine weitere Zellpopulation, die zur angeborenen Immunität gehört, circa 20 % der Immunzellen der Dezidua ausmacht und eine wesentliche Rolle in der Immuntoleranz der Schwangerschaft spielt, sind die **Makrophagen** (25). Zu den Hauptaufgaben dieser Zellen gehören im Allgemeinen die Phagozytose mit Elimination von toten Zellen und Mikroben sowie die Antigen-Präsentation zu T-Zellen.
Makrophagen lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: M1-Makrophagen und M2-Makrophagen. Dabei zählen die M1-Makrophagen zu den proinflammatorischen Zellen und die M2-Makrophagen zu den anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Zellen. Die dezidualen Makrophagen in einer physiologisch ablaufenden Schwangerschaft, die wir an der maternalen-fetalen Schnittstelle der Plazenta finden, ähneln den M2-Makrophagen, haben eine immunosuppressive Funktion und exprimieren hohe Level an Interleukin-10 (IL-10). Sie tragen zur regulierten Phagozytose von apoptotischen Zellen, die durch die Plazentation entstanden sind, sowie zur physiologischen Umformung der Spiralarterien bei.
Die Interaktionen zwischen dem EVT und den Zellen der angeborenen Immunität sind in der frühen Schwangerschaft von großer Bedeutung.
Aufgrund der zuvor beschriebenen Besonderheit der HLA-G des extravillösen Trophoblasts wird die Zytotoxizität der dezidualen NK-Zellen heruntergeschraubt und die Apoptoserate hält sich somit begrenzt. Die dezidualen Makrophagen können effizient arbeiten und es kommt nicht zu einer Freisetzung und Anhäufung von intrazellulären Partikeln, die eine mögliche letale Auswirkung auf den Fetus haben können (28).
Die **dendritischen Zellen** der angeborenen Immunität gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems und lassen sich anhand ihres Reifegrades unterteilen in unreife, semi-reife und reife dendritische Zellen. Sie machen circa 1 % der dezidualen Immunzellen aus (29). Die unreifen dendritischen Zellen induzieren mithilfe der Anergie die Immuntoleranz, die semi-reifen dendritischen Zellen unterstützen die Entwicklung

von regulatorischen T-Zellen (Treg T-Zellen) und die reifen dendritischen Zellen aktivieren T-Zellen mittels Antigen-Präsentation.
In der gesunden Plazenta dominieren deziduale dendritische Zellen, die den unreifen Zellen entsprechen und eine T-Helfer-Zelldifferenzierung (Th-Zelldifferenzierung) von CD4 T-Zellen zum Th2-Phänotypen unterstützen.
Bis das **adaptive Immunsystem** aktiv wird, vergehen üblicherweise einige Tage. Zu den Hauptakteuren gehören die $CD4^+$ T-Zellen mit den Subpopulationen der regulatorischen Treg T-Zellen, den Th17 T-Zellen sowie den Th1 und Th2 T-Zellen.
Erniedrigte Serumlevel des Zytokins Interleukin-10 (IL-10) führen außerdem zu einem Ungleichgewicht zwischen Th1 T-Zellen und Th2 T-Zellen. Dabei dominieren die Th1 T-Zellen im Vergleich zu den immunsuppressiven Th2 T-Zellen. In physiologischen Schwangerschaften wird jedoch ein Überwiegen der Th2 T-Zellen beschrieben (30).
Die Treg T-Zellen können ebenfalls mithilfe von anti-inflammatorischen Zytokinen wie dem IL-10 ein Supprimieren der Immunantwort und die Aufrechterhaltung von zentraler und peripherer Toleranz gewährleisten, die die Basis für die Immuntoleranz gegenüber der Plazenta und des Fetus ist. Die „Gegenspieler“ dazu sind die Th17 T-Zellen, welche wiederum vorwiegend proinflammatorische Zytokine freisetzen. Kommt es zu einer Dysbalance zwischen Treg und Th17 T-Zellen, können chronische Inflammation, inadäquate Toleranz und mangelnde Weitstellung der uterinen Spiralarterien die Folgen sein. Eine Präeklampsie könnte entstehen (31).

1.9 Immuncheckpoints, ihr Einfluss auf die Präeklampsie und pathophysiologische Zusammenhänge

Bei den Immuncheckpoints handelt es sich um Moleküle, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zell gesteuerten Immunreaktionen und der zellulären Immunität einnehmen. Sie dienen dabei als Barriere für mögliche Überaktivierungen des Immunsystems und die Eigentoleranz.
Bei heruntergeschraubter Aktivität der Immuncheckpoints (IC) werden vor allem Autoimmunreaktionen, Verlust der peripheren Immuntoleranz und chronische Erkrankungen beschrieben (32–34).
ICs werden durch Rezeptoren und auch Liganden gebildet. Dabei befinden sich die Rezeptoren als Oberflächenproteine auf zytotoxischen T-Zellen und die Liganden auf als Pendent auf den Antigen-präsentierenden Zellen, die die Antigene den T-Zellen präsentieren und so mit diesen interagieren (35).

Bei den beiden in dieser Arbeit untersuchten ICs handelt es sich um zwei inhibitorische Immuncheckpoints der B7-Superfamilie: Programmed Death-1 (PD-1) mit dem Liganden Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) und V-domain containing Ig suppressor of T-cell activation (VISTA) (auf Deutsch: V-Domänen Ig-Suppressor der T-Zell Aktivierung). Der IC PD-1 hat noch einen weiteren Liganden - Programmed Death Ligand-2 (PD-L2). In dieser Arbeit wird jedoch nur PD-L1 betrachtet.
Die B7 Familie wird als eine der wichtigsten Superfamilien hinsichtlich T-Zell-Aktivierung und Immuntoleranz gesehen (6,7,36).

1.9.1 PD-1 und PD-L1

PD-1 wurde im Jahr 1992 entdeckt, gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie CD28-B7 und ist ein viel untersuchter IC mit großer Relevanz in der heutigen Immuntherapie (35).
PD-1 befindet sich auf T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, natürlichen Killerzellen und Antigen-präsentierenden Zellen (wie dendritische Zellen). Dabei übt PD-1 insbesondere als Rezeptor auf den B- und T-Zellen immuninhibierende Funktionen aus und führt zur Suppression von Entzündungsreaktionen und erhält die periphere Toleranz (37).
Die Interaktion zwischen PD-1 und dem dazugehörigen Liganden PD-L1 führt zu einer Verringerung von Zytokinausschüttung und Antikörperproduktion und somit zu einer supprimierten Autoimmunreaktion, Anti-Tumor- und Anti-Infektionsreaktion (38).
Beim Liganden zu PD-1 – auch CD274 oder B7-H1 - handelt es sich um PD-L1, welcher ebenfalls zur B7-Superfamilie der Oberflächen-Glykoproteine gehört. PD-L1 kommt weitverbreitet auf Immunzellen im gesamten menschlichen Körper vor. Die Expression des Liganden wird durch Zytokine der γ-Kette (Interleukin-2, -4, -7, -15, Interferon- γ, GM-CSF/Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) induziert (39).

1.9.2 VISTA

Bei VISTA handelt es sich um ein Typ I Transmembranprotein der B7 Familie (B7-H5) mit großer Ähnlichkeit zu PD-L1.
Proteine der B7 Familie befinden sich auf aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen und können entweder ko-stimulierende oder -inhibierende Wirkung auslösen. Dabei kommt VISTA hauptsächlich auf $CD4^+$, $CD8^+$ T-Zellen sowie Treg T-Zellen und tumorinfiltrierenden Lymphozyten vor. Dort agiert VISTA nicht nur als Rezeptor auf den T-Zellen, sondern auch als Ligand auf den Antigen-präsentierenden Zellen (wie Makrophagen, Monozyten, Dendritischen Zellen und Neutrophilen) (40). Man spricht von einer bidirektionalen Funktion, die der von PD-L1 ähnelt (32).

VISTA ist verantwortlich für eine Balance im Immunsystem mit peripherer Toleranz und Immunsuppression in dem $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen supprimiert werden, was dann wiederum zu einer niedrigeren Zytokinausschüttung führt (41).
Außerdem hat VISTA einen inhibierenden Einfluss auf die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen sowie die Differenzierung zu Treg T-Zellen (32).
Insgesamt sollten einer Schwangerschaft herunterregulierte immunologische Bedingungen zu Grunde liegen, die die periphere Toleranz ermöglichen können. VISTA, welches sich in den Dezidualzellen der Plazenta befindet, kann zur Regulation der maternal-fetalen Immuntoleranz beitragen (7).
Der IC VISTA kann durch sein Vorkommen auf Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen Einfluss auf die Regulierung des angeborenen und das erworbenen Immunsystems nehmen.
Die nachfolgende Abbildung soll die Funktion von VISTA als Ligand auf einer Antigen-präsentierenden Zelle mit daraus resultierendem Supprimieren der T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion versus die Funktion als Rezeptor auf einer T-Zelle darstellen.
In beiden Fällen resultiert es in der Unterdrückung von T-Zellen (42).

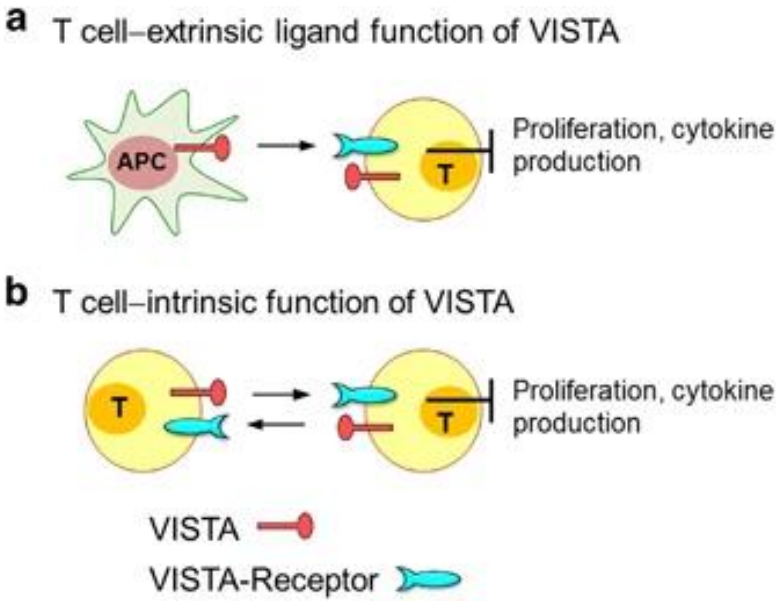

Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Ligand-oder-Rezeptor Paradigma von VISTA hinsichtlich der Regulierung von T-Zellen (42)

1.9.3 Entstehung der Präeklampsie: Zwei-Phasen-Modell

Eine klare Antwort auf die Frage des Entstehungsmechanismus der Präeklampsie gibt es bisher nicht und ist dadurch weiterhin Teil von vielen Forschungsprojekten.
Dazu werden drei große Hypothesen diskutiert: die hereditäre Hypothese, die maternale Hypothese/Hypothese der Umweltfaktoren und die immunologische (4).
Untermauert wird die hereditäre Hypothese dadurch, dass oftmals die Frauen, bei denen vorherige Präeklampsie-Fälle in der Familie vorkamen oder bei denen der Fetus genetische Veränderungen wie zum Beispiel eine Trisomie 13 aufweist, eine Präeklampsie entwickeln (43). In einer dänischen Studie, die 2013 publiziert wurde und Schwangerschaften zwischen den Jahren 1978 und 2008 untersuchte, wird davon berichtet, dass Frauen mit einer positiven Familiengeschichte ein sehr hohes Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie aufweisen – besonders die Entwicklung der früheinsetzenden Präeklampsie (44).
Risikofaktoren wie unter anderem Adipositas und eine vorangegangene Schwangerschaft mit Präeklampsie untermauern die Hypothese der maternalen Faktoren und Umweltfaktoren (45,46).
Die Grundlage dieser Forschungsarbeit wird vornehmlich durch die immunologische Hypothese gebildet. Die Annahme der immunologischen Ätiologie wird hauptsächlich durch eine Maladaption des maternalen Immunsystems gegenüber dem Fetus gebildet (47). Oftmals seien gerade junge Erstgebärende und Frauen, bei denen es sich um das erste Kind mit dem zugehörigen Partner handelt, von einer Präeklampsie betroffen (1).
Die zentrale Rolle der Plazenta in der Entstehung der Präeklampsie steht bereits fest und wird dadurch untermauert, dass die Entbindung der Schwangeren mit der daraus resultierenden Entfernung der Plazenta die kausale Behandlung darstellt.
Die Grundlage für eine physiologische Schwangerschaft ist ein gut funktionierendes Gefäßsystem der Plazenta.
Mit Hilfe der nachfolgenden Abbildung, in der die Präeklampsie vereinfacht dargestellt und in zwei Phasen eingeteilt wird, soll die Pathophysiologie mit den möglichen Entstehungsmechanismen und Folgen schrittweise erklärt werden.

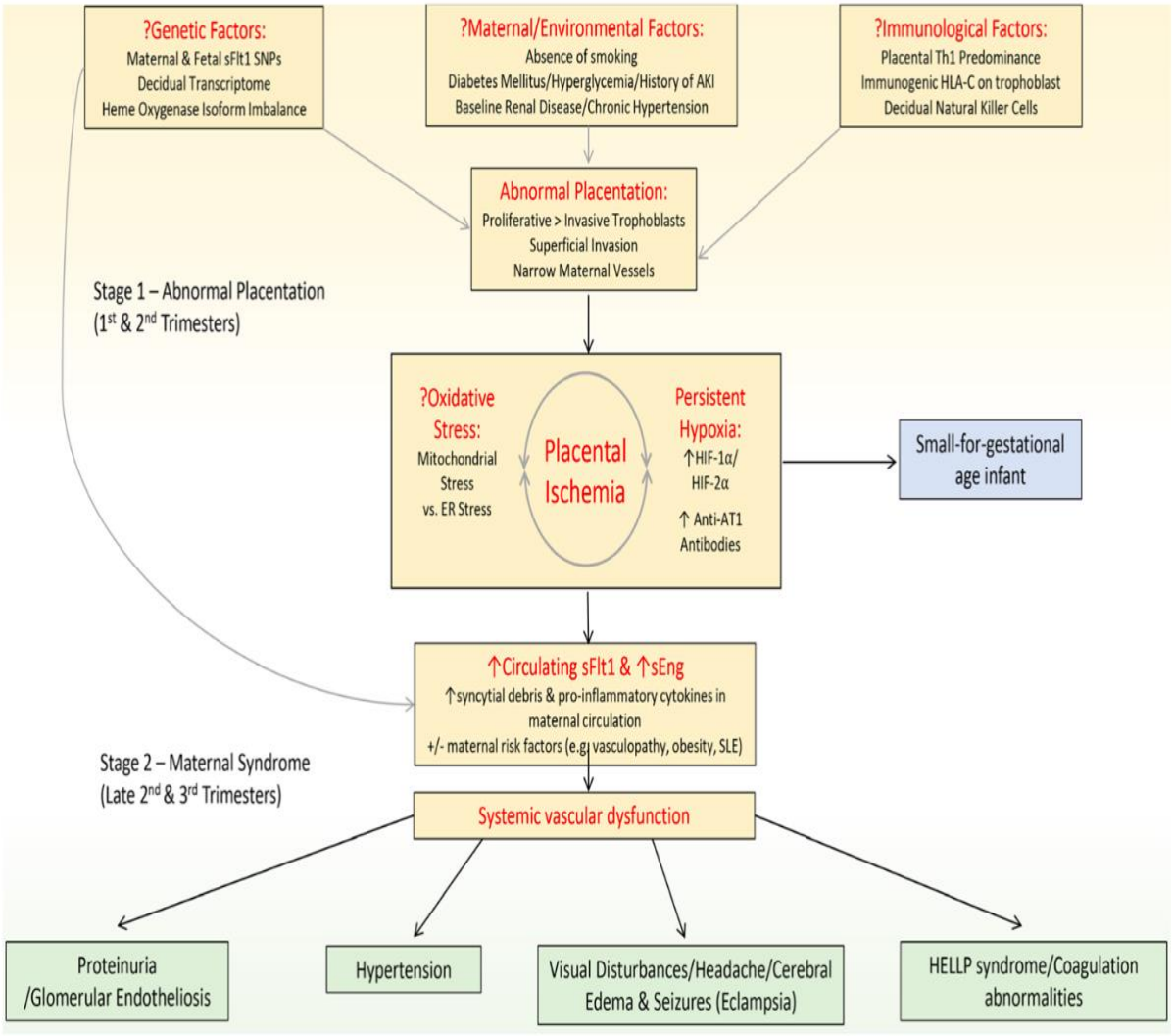

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entstehung der Präeklampsie. Genetische Faktoren, immunologische Faktoren, andere maternale Faktoren verursachen die plazentare Dysfunktion, was wiederum zur Freisetzung von antiangiogenetischen Faktoren und anderen Entzündungsmediatoren führt (4)

Das zwei-Phasen-Model der Präeklampsie beinhaltet die Phase 1, die das erste und frühe zweite Trimester und die Phase 2, die das späte zweite und dritte Trimester der Schwangerschaft betrifft.

In der ersten Phase besteht eine fehlgesteuerte Implantation, die aufgrund der unzureichenden Gefäßumformung (das sogenannte Remodeling) der Spiralarterien zur plazentaren Ischämie führt.

Die zweite Phase bezieht sich auf das daraus resultierende maternale Syndrom mit all seinen klinischen Symptomen bis hin zum möglichen maternalen Multiorganversagen.

Bleibt die optimale Umformung der kleinlumigen in großlumige uterine Spiralarterien zwischen dem Ende des ersten Trimenons bis hin zur 18. – 20. Schwangerschaftswoche aus, entsteht ein gestörtes Gefäßsystem.

Die daraus bedingte verminderte Perfusion der Plazenta führt zu einer Unterfunktion der Plazenta mit daraus resultierender möglicher Wachstumsretardierung des Fetus (48).

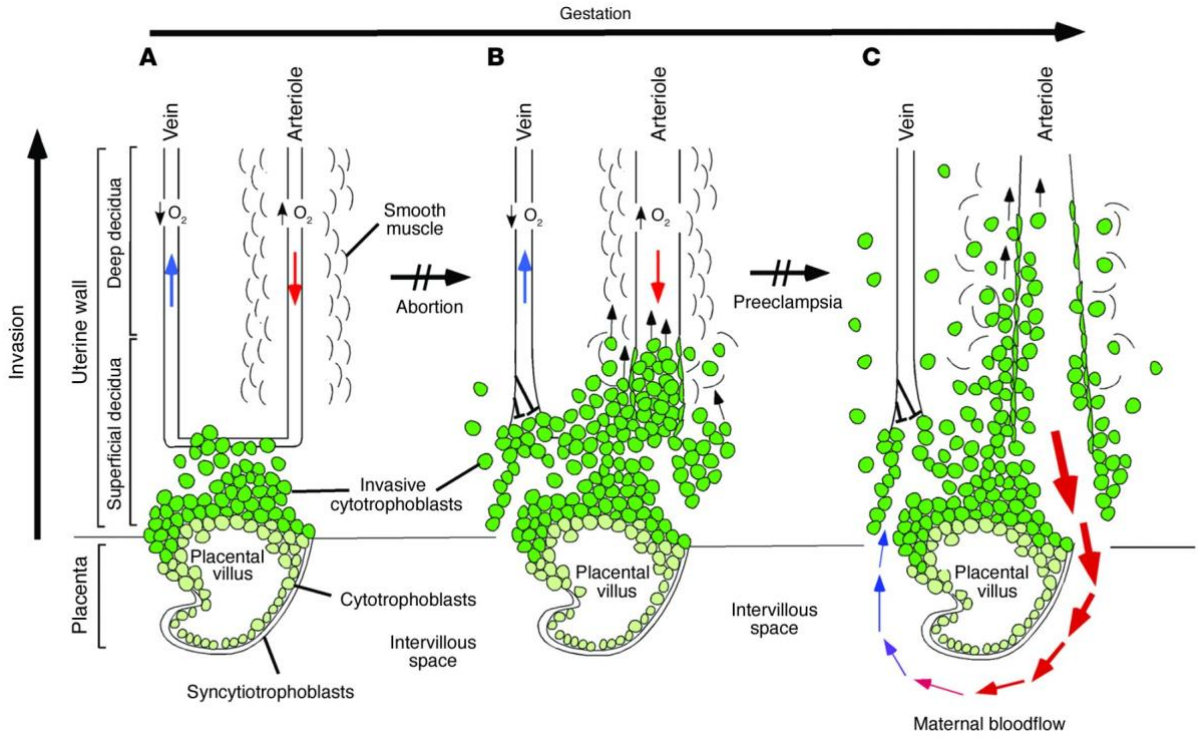

Abbildung 4: Trophoblastendifferenzierung (48)

In Abbildung 4 wird die Plazentaentwicklung in drei aufeinanderfolgenden Schritten dargestellt. Im Abschnitt A der Abbildung wird die frühe Entwicklung gezeigt mit der typischen Proliferation der Zytotrophoblasten. Im nächsten Schritt – hier in B dargestellt – migrieren die zuvor proliferierten Zytotrophoblasten in die maternalen Arterien der uterinen Dezidua.

In der frühen Phase der Implantation herrscht eine sauerstoffarme Umgebung, welche die Proliferation von Trophoblasten positiv beeinflusst. Die Trophoblasten verbinden die Blastozyten mit den Spiralarterien des maternalen Gewebes und intervillöse Räume der Plazenta können entstehen, der maternale Blutfluss und der Sauerstoffpartialdruck werden gesteigert.

Im Abschnitt B zu C finden weitere essenzielle Schritte statt, sodass es zu der adäquaten Umwandlung vom kleinlumigen, proliferativen zum großlumigen, invasiven Phänotyp der Spiralarterien kommt. Diese Umwandlung ist dadurch bedingt, dass die Zytotrophoblasten weiter in die Arteriolen migrieren und das maternale Endothel dieser Arterien ersetzen und somit zu einer Weitstellung dieser führen (4).

Findet jedoch eine inadäquate Trophoblasteninvasion statt, kann sich eine Präeklampsie entwickeln (48).

Bei der Präeklampsie ist die Zytotrophoblasteninvasion gestört und flacher. Die Transformation der Spiralarterien unterbleibt. Dadurch kann schon früh eine Veränderung in den Doppleruntersuchungen aufgewiesen werden, da sich bereits im ersten Trimenon ein erhöhter Pulsatilitätsindex der A. uterina zeigen kann (49).

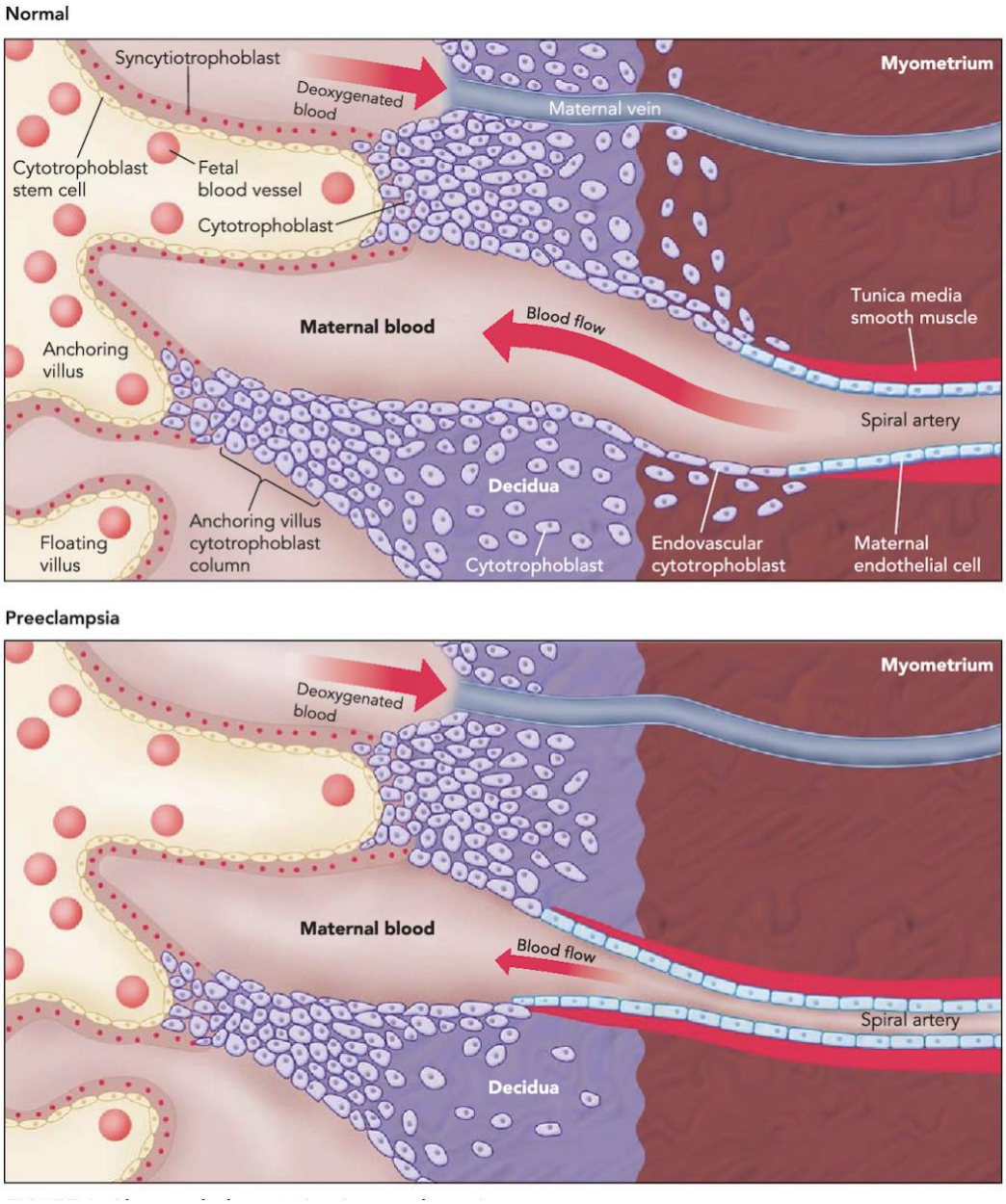

Abbildung 5: Abnormale Plazentation in der Präeklampsie (50)

Die mangelhafte Spiralarterieninvasion kann zu oxidativem Stress führen. Dieser wiederum soll durch erhöhte mitochondriale Aktivität die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und antiangiogenetischen Faktoren (wie sFlt-1) fördern. Zurückzuführen auf die mangelhafte Spiralarterieninvasion herrsche in der Präeklampsie-erkrankten Plazenta somit ein erhöhtes Level des oxidativen Stresses (4).

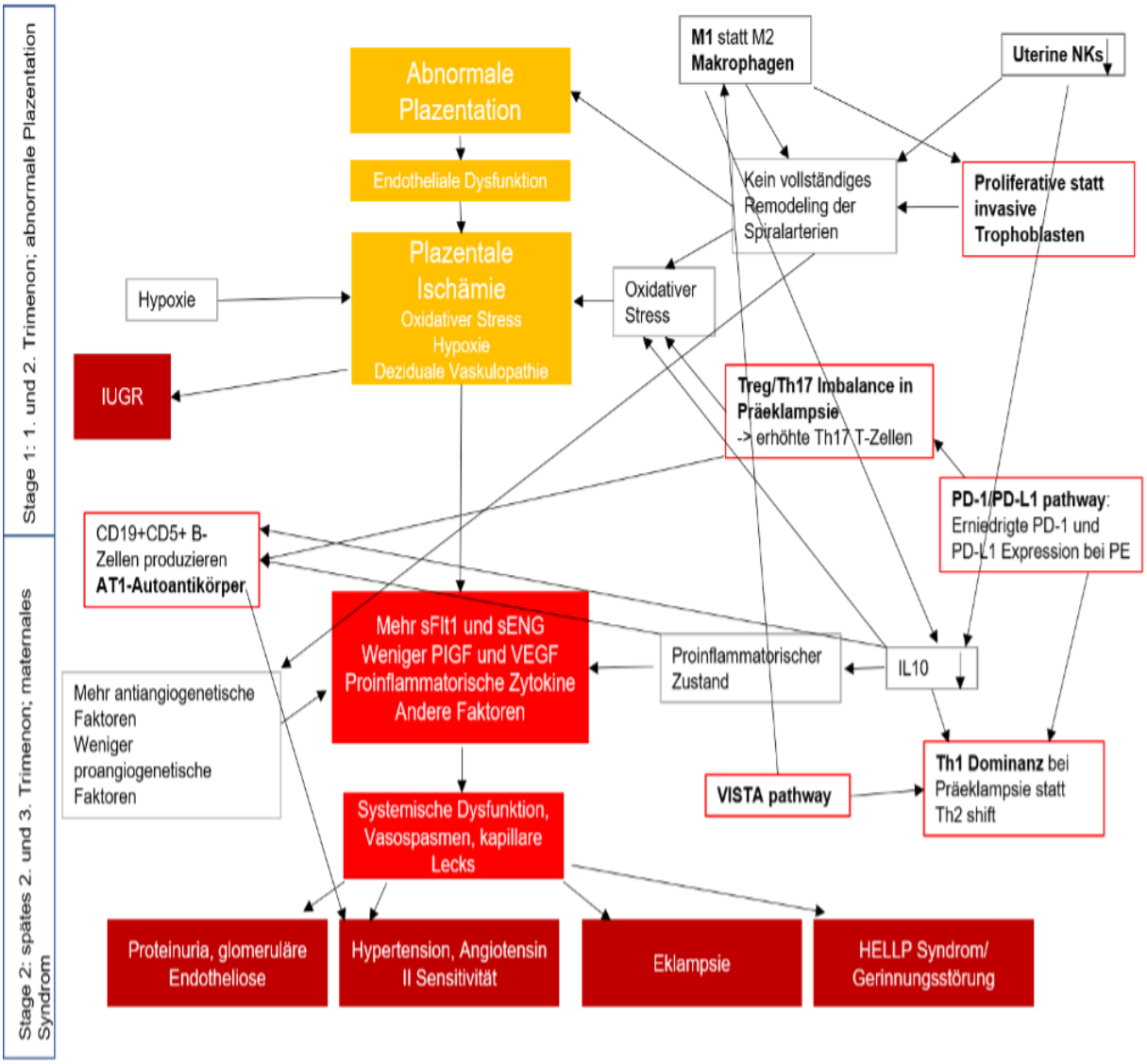

Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der immunologischen Regulation der Präeklampsie (rot umrandet = Einfluss der negativen Immuncheckpoints PD-1/PD-L1; dunkelrot ausgefüllt = Hauptmerkmale der Phase 2 der Präeklampsie) (Quelle: Studienprotokoll „Eine Pilotstudie zur Erforschung der immunologischen Regulation der Präeklampsie“ von Dr. rer. nat. L. Dübbel)

Um die in Abbildung 6 rot dargestellte Symptomatik des maternales Syndroms (Phase 2 der Präeklampsie) und ihre Entstehungsweise genauer zu beleuchten, soll in den folgenden Abschnitten die dazugehörige Pathogenese weiter beschrieben werden. Dabei wird der Fokus auf die immunologische Hypothese der Entstehung einer Präeklampsie gelegt.

Die uterinen natürlichen Killerzellen (uNK) gehören zu den Hauptbeteiligten der erforderlichen Immuntoleranz und spielen ebenfalls eine Rolle in der Regulierung der Trophoblasteninvasion und Umwandlung der Spiralarterien (26).
Die uNK erkennen die eigenen maternalen Haupthistokompatibilitätskomplexe (abgekürzt MHC von Englisch Major Histocompatibility Complex) und nicht-eigenen allogenen väterlichen

MHCs. Maternale uNKs exprimieren Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) und die fetalen Trophoblasten die KIR Liganden Humanes Leukozytenantigen-C (HLA-C) (51). Diese für jede Schwangerschaft einzigartigen Kombinationen beeinflussen den Erfolg der Plazentation. Somit kann eine Inhibierung der uNK zur fehlgesteuerten Spiralarterienumwandlung führen (52).

Eine Vielzahl von Untersuchungen beschreiben die Dominanz von proinflammatorischen Zellen. Diskutiert werden dabei als möglicher Mitauslöser erniedrigte PD-L1 Level, die eine Imbalance zwischen Treg T-Zellen und Th17 T-Zellen mit dabei dominierenden Th17 Zellen zur Folge haben können (53).
Auf diese beschriebene Treg/Th17 T-Zellen-Imbalance folgt ein erhöhtes Vorkommen von $CD19^{+}CD5^{+}$ B-Zellen, die wiederum zur vermehrten Produktion von anti-Angiotensin 1-Autoantikörpern (AT1-Autoantikörpern) führen. Die Folge daraus ist die Entwicklung der Hypertonie im Rahmen des maternalen Syndroms (54), welche ebenfalls durch die gesteigerte Sensitivität auf Angiotensin II angestoßen wird (55,56).
Statt dass ein Überwiegen der Th2 T-Zellen wie in physiologischen Schwangerschaften herrscht, kann durch erniedrigte Serumlevel des Zytokins IL-10 ein Ungleichgewicht zwischen Th1 T-Zellen und Th2 T-Zellen hervorgerufen werden. Dabei dominieren die proinflammatorischen Th1 T-Zellen im Vergleich zu den immunsuppressiven Th2 T-Zellen (30).
Auch VISTA ist ein wichtiger Teil bei der T-Zell Differenzierung in Hinblick auf die physiologischen Treg T-Zellen, welche in der Präeklampsie reduziert scheinen im Vergleich zu den, wie oben beschriebenen, proinflammatorischen Th17 T-Zellen (32).
Ebenso wird eine Überlegenheit der proinflammatorischen M1-Makrophagen in der Präeklampsie, im Gegensatz zu den dominierenden anti-inflammatorischen M2-Makrophagen in gesunden Plazenten, genannt (53).
Zusammenfassend überliegen somit proinflammatorische Verhältnisse im Rahmen der Präeklampsie - M1-Makrophagen, Th17 T-Zellen, Th1 T-Zellen sowie Bildung von Angiotensin-II-Rezeptor 1-Autoantikörpern. Im Vergleich dazu sind die immunologischen Zellen in physiologischen Schwangerschaften die anti-inflammatorischen M2-Makrophagen, Treg T-Zellen und Th2 T-Zellen überlegen.
Erhöhte Level der antiangiogenetischen Faktoren wie sFlt-1, welcher die lösliche Form des VEGF-1-Rezeptors (Vascular endothelial growth factor) ist, und von s-ENG (soluble Endoglin) werden in den Blutserumuntersuchungen detektiert. Sowohl sFlt-1 als auch sENG korrelieren mit dem Schweregrad der Präeklampsie und fallen nach der Entbindung ab (4). Im Gegensatz dazu sind die angiogenetischen Faktoren VEGF und PlGF erniedrigt (57).

Weitere Konsequenz der Durchblutungsstörung im plazentaren Gefäßsystem und Einschwemmung von plazentaren Faktoren in den maternalen Kreislauf ist eine generalisierte Fehlfunktion des Endotheliums, welche alle Organsysteme betreffen kann. Besonders darauf hinweisend ist der Anstieg des Plasmalevels von Fibronektin, einem Glykoprotein der extrazellulären Matrix und Marker für Gefäßendothelschädigung (58).
Die dadurch bedingte Gefäßpermeabilität kann ursächlich sein für die oftmals zu beobachtende Ödembildung im Rahmen der Präeklampsie. Mit der schon oben beschriebenen gesteigerten Empfindlichkeit der Gefäße auf Vasopressoren wie Angiotensin II mit folgender Überaktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System kommt es zur Präeklampsie typischen Hypertonie (59).
Eine unkontrollierte Aktivierung von Gerinnungsfaktoren kann zu Veränderungen in der Hämostase mit unter anderem disseminierter intravasaler Koagulation führen (58).
Aufgrund von mangelnden frühzeitigen diagnostischen Testmöglichkeiten zur Früherkennung beziehungswiese Prognosebestimmung einer Präeklampsie soll in dieser Arbeit auf die immunologische Hypothese zur Entstehung einer Präeklampsie weiter eingegangen werden.
Es wird angenommen, dass der Präeklampsie eine gestörte Immuntoleranz zu Grunde liegt.
Um eine intakte Immuntoleranz zwischen Fetus und Mutter ermöglichen zu können, spielen die Immuncheckpoints eine essenzielle Rolle. Immuncheckpoints sind dazu in der Lage, zytotoxische Zellen zu blocken. Dieses führt wiederum zur Immuntoleranz (7).
Außerdem spielt der immuninhibierende Effekt der ICs eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Differenzierung von Th2 T-Zellen und Treg T-Zellen.

1.10 Zielsetzung

Die Diagnose der Präeklampsie ist oftmals mit längeren stationären Aufenthalten verbunden, was viel Zeit und Kosten in der Klinik in Anspruch nehmen und auch zu Überdiagnostik und Übertherapien führen kann.
Aufgrund von mangelnden frühzeitigen diagnostischen Testmöglichkeiten zur Früherkennung beziehungswiese Prognosebestimmung einer Präeklampsie soll das Ziel dieser Arbeit sein, auf die immunologische Hypothese zur Entstehung einer Präeklampsie weiter einzugehen.
Es wird angenommen, dass der Präeklampsie eine gestörte Immuntoleranz zu Grunde liegt. Um eine intakte Immuntoleranz zwischen Fetus und Mutter ermöglichen zu können, spielen die ICs eine essenzielle Rolle. ICs sind dazu in der Lage, zytotoxische Zellen zu blocken. Dieses führt wiederum zur Immuntoleranz (7).
Außerdem spielt der immuninhibierende Effekt der ICs eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Differenzierung von Th2 T-Zellen und Treg T-Zellen. Beide kommen in reduzierter Menge in Präeklampsien vor und führen zur typischen Klinik der Präeklampsie (32,60).
Bisherige Untersuchungen bezogen sich bisher vornehmlich auf den Immuncheckpoint PD-1 und den dazugehörigen Liganden PD-L1 und beschreiben vor allem die erniedrigte Expression von diesem in Schwangerschaften mit Präeklampsie im Vergleich zu unauffälligen Schwangerschaften (30,61).
In dieser Arbeit sollen die bisherigen Untersuchungen von PD-L1 durch den Immuncheckpoint VISTA ergänzt werden.
Gemeinsam sind PD-L1 und VISTA in der Lage einen Großteil des Immunsystems zu steuern. Diese Arbeit soll uns zeigen, dass sowohl PD-L1 als auch VISTA niedrigere Expressionen in Plazenten von Schwangeren mit bekannter Präeklampsie aufweisen und uns damit einen Schritt näher zur Optimierung der Prädiktion einer Präeklampsie bringen.
Optimalerweise sollte die Früherkennung der Präeklampsie zukünftig verbessert werden können und zur Entwicklung von Prognosemarkern beitragen, um sowohl die maternale als auch fetale Morbidität und Mortalität weiter zu senken.

2 Materialien und Methoden

2.1 Studiendesign

Für die Untersuchungen wurde fixiertes Plazentagewebe verwendet. Dabei wurden Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie und Plazenten von Patientinnen ohne Hinweis auf eine Präeklampsie miteinander verglichen.
Aus fixiertem Plazentagewebe wurden Gewebeschnitte angefertigt und mithilfe einer immunhistologischen Färbung am Mikroskop ausgewertet. Die Auswertung erfolgte anhand der Intensität der Färbung und Anzahl der gefärbten Zellen.
Um eine spezifische von einer unspezifischen Färbung zu unterscheiden, nutzten wir Zweitantikörper-Kontrollen und Immunoglobulin-G-Kontrollen (IgG).
Anschließend konnte die Ribonukleinsäure (RNS) aus dem Plazentagewebe isoliert werden, um eine qRT-PCR (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, *engl.: quantitative real-time polymerase chain reaction*) durchzuführen.
Alle Patientinnen wurden durch uns angeschrieben und um eine Einwilligung zur Untersuchung der bereits in der Pathologie vorliegenden Plazenten gebeten. Sobald das Einverständnis vorlag, konnten wir mit den Probenanalysen am fixierten Plazentagewebe beginnen.
Es handelt sich um eine Pilotstudie, da noch keinerlei Daten zu VISTA bei Präeklampsie vorliegen und nur wenige Daten zu PD-L1 bei Präeklampsie bisher erhoben wurden. Diese Arbeit dient zur Hypothesengenerierung und soll einen Überblick über die Expression beider NCRs liefern. Diese Arbeit beinhaltet ein Patientinnen-Kollektiv von zehn Patientinnen mit diagnostizierter Präeklampsie und zehn Patientinnen ohne Präeklampsie.
Der Ethikantrag „Eine Pilotstudie zur Erforschung der immunologischen Regulation der Präeklampsie“ (2021-116) lag uns vor Beginn der Studie vor.

2.2 Material

Tabelle 2: Verwendetes Pufferrezept

Pufferrezept	
TBS-T 500 ml für die Immunhistochemie	<u>1x TBS 1L:</u> 2,423 g Tris 20 mM 9 g NaCl 154 mM Auf 1 L mit H_2O auffüllen, pH auf 7,4 einstellen. <u>TBS-T:</u> 500 ml 1x TBS 250 µl Tween 20 0,05%

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Wirt	Hersteller/Herkunft
Maus IgG1 kappa	G3A1	Maus IgG1	Cell Signaling Technology
Kaninchen IgG	DA1E	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
PD-L1	405.9A11	Maus IgG1	Cell Signaling Technology
VISTA	D1L2G	Kaninchen IgG1	Cell Signaling Technology

Tabelle 4: Verwendetes Kit

Kit	Hersteller
Kit Reagenzien des ZytoChem Plus (HRP) Polymer Kits	Zytomed
DAB (3,3‘-Diaminobenzidin) Substrat Kit	Zytomed

Tabelle 5: Verwendete Primer

Primer	Funktion	Vorwärts Basenfolge 5‘->3‘	Rückwärts Basenfolge 5‘->3
GAPDH	Referenzgen	AATGGGCAGCCG TTAGGAAA	GCCCAATACGAC CAAATCAGAG
RPLP0	Referenzgen	CCTCATATCCGG GGGAATGTG	CCTCATATCCGG GGGAATGTG
PD-L1	Immuncheckpoint-Ligand	TGGCATTTGCTGA ACGCATTT	AGTGCAGCCAGG TCTAATTGT
VISTA	Immuncheckpoint	GCGGATGGACAG CAACATTC	TGACTTTGGCCTC GGGTATC

2.3 Methoden

2.3.1 Immunhistologische Färbung

Die Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeblöcke lagen uns durch die Pathologie Oldenburg bereits vor. Bei den Gewebeblöcken handelte es sich um zur Untersuchung postpartal eingeschickte Plazentaproben.

Die 3 µm Gewebeschnitte, die mithilfe des Rotationsmikrotoms erstellt wurden, wurden auf die SuperFrost Objektträger übertragen und über Nacht getrocknet. Anschließend folgte die 30-minütige Fixierung bei 52 °C im Trockenschrank.

Die darauffolgende Deparaffinierung erfolgte folgendermaßen über eine absteigende Alkoholreihe: 10 Minuten in Xylol, 2 Minuten 99,8 % Ethanol, 2 Minuten 80 % Ethanol, 2 Minuten 70 % Ethanol, 2 Minuten 50 % Ethanol, 2 Minuten 20 % Ethanol und als letzter Schritt 2 Minuten deionisiertes Wasser.

Für die VISTA Färbung folgte im nächsten Schritt das Aufkochen der Schnitte in 98 °C Citrat (10 Minuten) sowie für PD-L1 in 98 °C kochendem EDTA (15 Minuten). Zum Kühlen folgte das Tauchen der Objektträger im Eiswasser.

Die nächsten Schritte waren das dreimalige Waschen der Schnitte für je 5 Minuten mit deionisiertem Wasser, 10-minütiges Bedecken der Schnitte mit 3 %-igem H_2O_2 und zwei weitere Male die Waschung mit deionisiertem Wasser (je 5 Minuten).

Im nächsten Schritt erfolgte die Spülung mit dem Puffer TBS-T (Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,03 % Triton X-300) sowie eine einstündige Blockierung mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum/Fetales Kälberserum) in TBS-T und FC Block (1:500) verdünnt.

Eine weitere Waschung in TBS-T für 5 Minuten folgte.

Im weiteren Prozess wurden Primärantikörper in TBS-T verdünnt (VISTA und PD-L1 je 1:200), FC-Block hinzugegeben und alles über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Als nächstes folgte eine weitere Waschung mit TBS-T (zweimal je 5 Minuten).

Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle weiteren Schritte mittels Kit Reagenzien des ZytoChem Plus (HRP) Polymer Kits. Die zweimal 5-minütige Waschung mit Waschpuffer folgte. Im Anschluss fand der 20-minütige Postblock statt. Dazu wurde Reagenz 2 des Kits verwendet.

Mit den folgenden Schritten wurde fortgeführt: zweimal 5-minütige Waschung mit Waschpuffer, 30-minütige Inkubation mit dem HRP Polymer (Horseradish Peroxidase Polymer/Meerrettichperoxidase-Polymer) (Reagenz 3 des Kits) und anschließender 5-minütiger Waschung mittels Waschpuffer.

Zur Immunfärbung mit einer Meerrettichperoxidase wird DAB (3,3‘-Diaminobenzidin) (50 µl DAB Chromogen auf 1 ml Substrat Puffer) für 5 Minuten auf die Objektträger gegeben.

Als nächstes folgte eine weitere Waschung mit deionisiertem Wasser und darauf die Färbung mit Hämalaun (2 Minuten). Im Anschluss wurde alles mit Leitungswasser abgespült, bis keine Farbwolken mehr abgingen.

Die weiteren Schritte dienten zur Rehydrierung. Die Objektträger wurden jeweils für eine Minute in eine aufsteigende Alkoholreihe (20 %, 50 %, 70 %, 80 %, 99,8 %) und anschließend zweimal für 10 Minuten in Xylol gegeben.

Zum Eindeckeln gab man erst einige Tropfen Eukitt Eindeckelmedium auf die Objektträger mit den Gewebeschnitten und dann je ein Deckgläschen.

Die komplettierten Färbungen wurden dann über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

2.3.2 RNS-Isolation aus einer Probe Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe

Für die Isolation wurden 4-11 x 16 µm dicke Schnitte aus den Paraffinblöcken geschnitten (abhängig von der Menge des benötigten Gewebes auf dem Block) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
Die Entfernung des Paraffins erfolgte folgendermaßen: 1000 µl Xylol wurden hinzugegeben und mittels Vortex vermengt. Dann folgte die 5-minütige Zentrifugation (16 200 xg bei Raumtemperatur). Das dabei entstandene Pellet wurde belassen. Das Ganze wurde ein weiteres Mal wiederholt.
In den weiteren Schritten folgte die Rehydrierung: Dazu wurden 1000 µl 99,8 %-iger Ethanol hinzugegeben und dann für 5 Minuten bei 1500 Upm RT auf dem Schüttler inkubiert.
Im nächsten Schritt folgte dann die Zentrifugation für 5 Minuten bei 16 200 xg RT. Das dabei entstandene Pellet wurde wieder belassen.
Der letzte Schritt wurde daraufhin mit 75 % Ethanol wiederholt.
Zum Pellet wurden 1000 µl DEPC-H_2O (Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser) gegeben und für 90 Minuten auf Eis gelegt. Im nächsten Schritt folgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 16 200 xg bei Raumtemperatur. Der Pellet wurde belassen.

Für die geplante Lyse wurden pro Probe 750 µl Digestion Solution, 5,5 µl β-Mercaptoethanol und 300 µl Proteinase K gegeben und gründlich vermischt. Das Ganze wurde für eine Nacht bei 1500 Upm (Inkubation auf Schüttler) und 55 °C inkubiert.
Um die RNS-Isolation durchzuführen, wurden die Reaktionsgefäße für 5 Minuten bei 13.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. 500 µl der verdauten Lösung wurden anschließend in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,5), 630 µl ROTI-Aqua-Phenol (pH 7,7) und 270 µl Chloroform versetzt, gründlich vermischt, für 15 Minuten zur Phasentrennung auf Eis gegeben und dann 20 Minuten bei 16 200 xg und 4 °C zentrifugiert. Der dabei entstandene wässrige Überstand wurde vorsichtig von der darunterliegenden organischen Phase mit Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Proteinen sowie der darüberliegenden Interphase mit Proteinfragmenten abpipettiert und mit 1 µl Glykogen und 1 Volumen Isopropanol für eine Stunde bei Raumtemperatur versetzt. Im Anschluss folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 16 200 xg und 4 °C. Der entstandene Überstand wurde entsorgt. Das Pellet wurde daraufhin mit 75 % Ethanol (eiskalt) versetzt, für 15 Minuten bei 16 200 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde entsorgt. Der letzte Schritt wurde dann ein weiteres Mal mit 75 % Ethanol wiederholt. Um ein vollkommen trockenes Pellet zu bekommen, musste das Ethanol für eine gewisse Zeit verdampft werden lassen.

2.3.3 RNS-Konzentrationsmessung

In einem weiteren Schritt wurde das Pellet in 20 µl DEPC-H_2O gelöst, um die qualitative und quantitative Bestimmung der RNS (wieviel µg RNS pro 1 µl Probe enthalten sind) mittels Spektralphotometer (UV Spektrometrie) ermitteln zu können.
Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm (A260). Die Messung der Absorption fand somit im Spektralbereich von 230-320 nm statt.
Daraus konnte die RNS-Konzentration folgendermaßen berechnet werden:

C [µg/ml] = A260 × Verdünnungsfaktor × Extinktionskoeffizient (62)

Außerdem wurden die Proben hinsichtlich Verunreinigung durch Proteine (Verhältnis A260/A280) und Verunreinigung durch organische Verbindungen und chaotrope Stoffe (Verhältnis A260/A230) untersucht.
Eine reine RNS-Probe zeigt einen Wert dieser Verhältnisse von jeweils ≥ 1,8.

2.3.4 DNase-Behandlung

Eine sogenannte Desoxyribonuklease (DNase)-Behandlung war notwendig, um in einem nächsten Schritt noch potenziell vorhandene genomische DNS zu zerstören.
Die DNase-Behandlung erfolgte folgendermaßen: Jeweils 2 µg RNS wurden mit 3 µl iScript Reaction Mix, 1 µl DNase und DEPC-Wasser vermengt, sodass ein Gesamtvolumen von 32 µl entstand.
Falls einige Proben keine 2 µg RNS enthielten, wurde die Behandlung mit 1 µg RNS und entsprechend der jeweiligen Hälfte der Reagenzien durchgeführt. Dafür war es somit notwendig, dass die Proben mindestens 1 µg RNS einhielten.

Die Menge der eingesetzten RNS wurde in den weiteren Schritten berücksichtigt. Anschließend erfolgte die DNase Behandlung im PCR-Block (CFX Connect Real-Time System von BioRad) mit den folgenden Temperatureinstellungen:
Schritt 1: 25 °C für 5 min
Schritt 2: 75 °C für 5min

2.3.5 Umschreiben der RNS in cDNS

Zum Synthetisieren der cDNS benötigte man ein Gesamtvolumen von 40 µl. Dieses konnte durch das Hinzugeben von 5 µl iScript Reaction Mix, 2 µl iScript Reverse Transkriptase (RT) und 1 µl DEPC-Wasser zum 2 µg Ansatz, welches aus der DNase Behandlung entstanden ist, erreicht werden.
Falls im vorherigen Schritt die Behandlung mit der Hälfte aller Reagenzien stattgefunden hat, erhielt man in diesem Schritt ebenfalls nur die Hälfte vom Gesamtvolumen (20 µl).
Das Umschreiben der RNS in cDNS wurde im PCR-Block mit dem iScript cDNA Synthese Programm durchgeführt.
Folgende Temperaturen wurden dazu benötigt: fünf Minuten bei 25 °C zum Markieren der Startsequenz (Priming), 20 Minuten bei 46 °C zur Reaktion der RT und zum Abschluss eine Minute bei 95 °C zur Inaktivierung der RT.

2.3.6 qRT-PCR SybrGreen

Zur Qualitätskontrolle wurden die Proben als Duplikate in der qRT-PCR angefertigt. Die verwendeten Primer (siehe Tabelle 5) wurden dazu in folgende Ansätze pipettiert um eine Effizienz von 90-110 % zu erreichen:

Tabelle 6: qRT-PCR-Ansätze

Gen	**Primerkonzentration [mM]**	**cDNS Konzentration [ng]**	**Primerhybridisierung Temperatur [°C]**	**Effizienz [%]**
GAPDH	300	75	48	101,9
RPLP0	250	75	48	96,4
PD-L1	300	75	48	98,4
VISTA	250	50	50,8	98,4

10 µl Universal SYBR Green Supermix wurden den Primeransätzen jeweils hinzugefügt. Mit DEPC-Wasser erfolgte die Auffüllung anschließend auf ein Gesamtvolumen von 20 µl. In jedem Synthesedurchgang waren zwei Wasserproben mit den jeweiligen spezifischen Primern beinhaltet sowie eine Probe zur internen Kalibrierung.
Der Farbstoff SYBR-Green mit seiner Fluoreszenz ermöglichte uns die Quantifizierung der durch die Synthese entstandenen Produkte.
Die Synthese erfolgte im PCR-Block mit den spezifischen Temperaturprofilen, die für die für den jeweiligen Primer nötig waren.

Das qRT-PCR Protokoll ist wie folgt:
Schritt 1: 95 °C für 3 min
Schritt 2: Denaturierung 95 °C für 5 s
Schritt 3: Paarung komplementärer einzelsträngiger DNS und Elongation 48/50,8 °C für 15 s
Messung der Fluoreszenz
Wiederholung Schritt 2-3 39-mal
Schritt 4: 95 °C 10 s
Schritt 5: 65 °C 3 s
Schmelzkurve: 65 – 95 °C, in 0,5 °C Schritten alle 5 s

Die Auswertung der qRT-PCR wurde mit der Gerätesoftware (BioRad CFX Maestro) von BioRad durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Proben, die den Primer-spezifischen Schwellenwert (Tabelle 7) nicht überschritten haben, ausgeschlossen. Sollten Wasserproben ein ablesbares Signal von 38 vor dem Schwellenwertzyklus zeigen, erfolgte auch hier der Ausschluss der Proben.
Wenn der Schwellenwertzyklusabstand zweier Proben größer als 0,5 war, fand auch hier der Ausschluss der Duplikate statt. Falls sich abweichende Schmelzkurven hinsichtlich des Verlaufs und der Schmelzpunkte ergaben, wurden auch diese Proben ausgeschlossen. Die Stabilität der Referenzgene GAPDH und RPLP0 wurde durch die Software bewertet. Die anschließende relative Quantifizierung wurde mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode durchgeführt (63).
Die Proben wurden mit einem T-Test nach Tukey statistisch ausgewertet.

Tabelle 7: Primerspezifische Schwellenschwerte

Primername	**Schwellenwert**
GAPDH	542,79
RPLP0	589,44
PD-L1	402,08
VISTA	326,3

2.3.7 Auswertung der mikroskopischen Bilder mittels FIJI ImageJ Software

Zur Immunfärbung mit einer Meerrettichperoxidase wurde DAB, wie zuvor beschrieben, genutzt.
Für die Auswertung der mikroskopischen Bilder ist es wichtig zu beachten, dass das Chromogen DAB Licht streut und sich nicht linear verhält.
Des Weiteren können die Antigen-Antikörper-Reaktionen mit den daraus entstehenden Färbungen aufgrund ihres fehlenden stöchiometrischen Verhaltens nicht eins zu eins mit der möglichen Expression eines Antigens gleichgesetzt werden.
DAB folgt nicht dem Beer-Lambert-Gesetz, welches ein lineares Verhältnis zwischen der Konzentration einer Verbindung und die Absorption der Verbindung beschreibt (64). Aus diesem Grund können bei der Auswertung nicht die Intensitäten der Färbungen, sondern lediglich die gefärbten Flächen, analysiert werden.
Für die Analyse werden folgende Schritte innerhalb der Software FIJI ImageJ getätigt:
Das gewünschte mikroskopische Bild, welches zuvor mit dem Axio vert A1 von Zeiss aufgenommen wurde, wird im Programm FIJI ImageJ geöffnet.
Alle weiteren Schritte werden zur Vereinfachung und der aus Gründen der Übersichtlichkeit mithilfe von Pfeilen, die die jeweiligen Schritte anzeigen, dargestellt.
Die Grundlage für unser Vorgehen ist ein veröffentlichtes Protokoll „Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol" (65).
Unter dem Reiter Image wird Colour gewählt → Colour deconvolution → „H DAB" auswählen.
Es öffnen sich drei Varianten des zuvor aufgerufenen mikroskopischen Bildes:
Im Farbkanal 2 (Colour 2) befindet sich das DAB-Signal des Bildes, im Farbkanal 1 (Colour 1) befindet sich das Hämatoxylin-Signal des Bildes und im Farbkanal 3 (Colour 3) wird ein Bild, vergleichbar mit einem Durchlicht-Kanal, gezeigt. Das Bild Colour 3 wird für unsere Auswertung nicht benötigt.
Um fortzufahren, wird der Farbkanal 2 aufgerufen und der Schwellenwert für DAB festgelegt (Image → Adjust → Threshold → der untere Wert sollte 0 sein, der obere wird je nach IgG-Kontrolle zwischen 55 – 155 festgelegt). Der obere Wert entscheidet sich nach den jeweiligen IgG-Kontrollen, die uns anzeigen, ab welchem Wert wir ein echtes Signal haben. Der Wert, an dem die IgG-Kontrollen negativ sind, wird dann eingestellt, um spezifische von unspezifischen Signalen unterscheiden zu können. Dieser Schritt wird mit Apply bestätigt.
Im nächsten Schritt öffnet sich automatisch ein Fenster, in dem sowohl der minimale als auch der maximale Schwellenwert bei 255 stehen, da das Bild mit diesem Schritt in ein binäres Bild umgewandelt wurde. Diese Voreinstellung wird so übernommen.

Im Folgeschritt wird unter Analyze → Set measurements folgende Auswahl getroffen: Area, Mean grey value, Display label, Area fraction und bestätigt, um festzulegen, welche Parameter bei einer Messung angezeigt werden sollen.
Um die Ergebnisse für Mean grey value und % Area zu erhalten, wird Analyze → Measure gewählt. Der Parameter des Mean grey value zeigt uns die Intensität des Grauwertes beziehungsweise die Positivität des Bildes, da es sich um ein binäres Bild (schwarz/weiß) handelt.
In einem Zwischenschritt wird die Durchschnittsgröße der Nuklei bestimmt. Hierzu wird der Farbkanal 1 aktiviert und das „gerade Linie-Werkzeug“ der FIJI ImageJ Software gewählt und die Distanz innerhalb des Nukleus gemessen, in dem eine Linie durch den jeweiligen Nukleus gezogen wird. Um die jeweiligen Ergebnisse zu erhalten, werden Analyze → Measure angewählt. Die Ergebnisse zeigen den Durchmesser des Nukleus. Um den Durchschnittswert zu erhalten, sollten diese Messungen an circa zehn Nuklei erfolgen.
Für unsere Auswertungen haben wir den niedrigsten Wert, hier 5,8, verwendet, um alle Zellkerne in die Auswertung einfließen zu lassen, aber keine Artefakte, die die entsprechende Größe unterschreiten.
Diesen Wert nutzen wir dann für den nächsten beschrieben Abschnitt.
Wir aktivieren den Farbkanal 1 und machen folgende Schritte für die Festlegung der Schwellenwerte: Image → Adjust → Threshold → Minimum: 0, Maximum: zwischen 165 – 185, je nach Blaustich des Bildes. Im nächsten Schritt öffnet sich wie zuvor das binäre Bild, in dem sowohl der minimale als auch der maximale Schwellenwert bei 255 stehen. Diese Voreinstellung wird auch jetzt so übernommen.
In einem zusätzlichen Schritt wird unter dem Reiter Process der Punkt Binary gewählt und Watershed eingefügt. Dadurch werden die Nuklei, die verbunden scheinen, voneinander getrennt und können einzeln die Auswertung einbezogen werden.
Im nächsten Schritt wird unter Analyze → Analyze particles folgende Auswahl getroffen: 5,8, Infinity, Exclude edges, Summarize und bestätigt. 5,8 bis Infinity beschreibt die durchschnittliche Zellkerngröße, die im vorherigen Schritt ermittelt wurde. Die Einstellung Summarize wird eine Zusammenfassung der Partikelanalyse erstellen und Exclude edges führt dazu, dass die Zellkerne, die am äußeren Rand des Bildes liegen, nicht mit in die Auswertung einbezogen werden.
Die resultierenden Ergebnisse können dann in die Excel-Tabelle für die weitere Auswertung eingefügt werden. Die Partikelanalyse liefert folgende Parameter: Mittlerer Grauwert (Mean grey value), Anteil positiver Kerne in Prozent und die Fläche des DAB-Signals in Prozent.
Für die Semi-Quantifikationsanalyse des Immunhistochemie-Bildes (IHC) findet mithilfe der Excel-Tabelle und den dort eingefügten Ergebnissen die weitere Auswertung statt. Für jedes Bild wird der mittlere Grauwert (Mean grey value) durch die Anzahl der Nuklei dividiert. Dieser

ermittelte Wert repräsentiert dann die Intensität der DAB-Färbung normalisiert durch die Kerne.
Mithilfe eines Morphologie-Plug-Ins (Morphology plug-in) kann Binary Reconstruct betätigt werden. Als Maske sollte der Hämatoxylin Nukleus Kanal (Colour 1) eingegeben und für Seed sollte der Kanal der DAB-Färbung (Colour 2) eingegeben werden (66).
Das daraus resultierende Ergebnis zeigt dann ein Bild aller Zellkerne, die DAB positiv sind. Von diesem Bild kann erneut der mittlere Grauwert (Mean grey value) und Fläche des Signals (% Area) berechnet werden (Analyze → Measure).
Um die DAB positiven Kerne zu analysieren, wird erneut eine Partikelanalyse durchgeführt (Analyze → Analyze particle) → Eingabe des Bereichs von „5,8 – Infinity“. Anschließend können wir die Anzahl der DAB positiven Zellkerne (Count), die Gesamtfläche der DAB positiven Zellkerne, die durchschnittliche Größe (Average size) und die Fläche der DAB positiven Zellkerne in Prozent (% Area) ermitteln.
Um eine Angabe zum Prozentteil der positiven Kerne zu erhalten, wird folgende Rechnung gemacht: a / (b/100)
a: Anzahl DAB positiver Zellkerne (Partikelanalyse Morphologie Plug-In)
b: Anzahl aller Zellkerne (Partikelanalyse des Hämatoxylin Kanals)

2.3.8 Statistische Analyse

ANOVA und t-Test nach Tukey

Zur Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit dient eine einfaktorielle Varianzanalyse (Analysis of Variance; ANOVA).
Die Nullhypothese, die überprüft wird, ist dabei folgende:
H_0: $\mu 1 = \mu 2 = \ldots = \mu_k$
Die Mittelwerte verschiedener Gruppen wurden auf Gleichheit geprüft.
Die Alternativhypothese ist folgende:
H_1: $\mu_i \neq \mu_j$
Um signifikant voneinander abweichende Mittelwerte (vorliegender p-Wert von < 0,05) zu markieren, wurden diese mit Sternchen (*) versehen. Ein Konfidenzintervall von 95 % wurde genutzt und es erfolgte der Vergleich nach Tukey.
Der t-Test nach Tukey testet anhand von Mittelwerten zweier Gruppen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorliegt. Im Kontrast dazu, wird die ANOVA für den Vergleich zwischen mehr als zwei Gruppen genutzt.

Shapiro-Wilk-Test

Um die Voraussetzungen für eine ANOVA zu testen, wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Die Anwendung einer ANOVA ist nur möglich, wenn eine Normalverteilung der Proben vorliegt. Der Shapiro-Wilk-Test kann somit als Vortest für eine nachfolgende ANOVA dienen.
Der Shapiro-Wilk-Test eignet sich für das Prüfen einer Normalverteilung insbesondere für kleinere Stichproben mit $n < 50$.

Die Nullhypothese ist dabei folgende:
H_0: $X \sim N(\mu)$
Die meisten Berechnungsprogramme geben den ermittelten Wert als sogenannten p-Wert an. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit an, eine Stichprobe zu erhalten, die zuvor gezogen wurde, mit der Annahme, dass die Probe aus einer Normalverteilung stammt. Trifft dieses zu, ist die Nullhypothese wahr und $p > \alpha$ (festgelegtes Signifikanzniveau). Das Signifikanzniveau liegt üblicherweise bei 5 %.
H_0 wird jedoch verworfen, wenn $p \leq \alpha$.

Die Auswertung erfolgte durch die Software BioRad CFX Maestro.
Ein p-Wert < 0,05 würde bedeuten, dass keine Normalverteilung vorliegt. In unseren Untersuchungen liegen alle p-Werte darüber. Somit kann in allen Zeilen eine Normalverteilung bestätigt werden (67).

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren mit anschließender Quantifizierung der DNS eignet sich die quantitative Echtzeit-PCR.
Dieser Schritt wurde wie zuvor im Methodenteil beschrieben, durchgeführt.
Die folgende Abbildung 7 zeigt uns das Ergebnis der relativen Quantifizierung in Form einer Kastengrafik (Box-and-Whisker Plot).

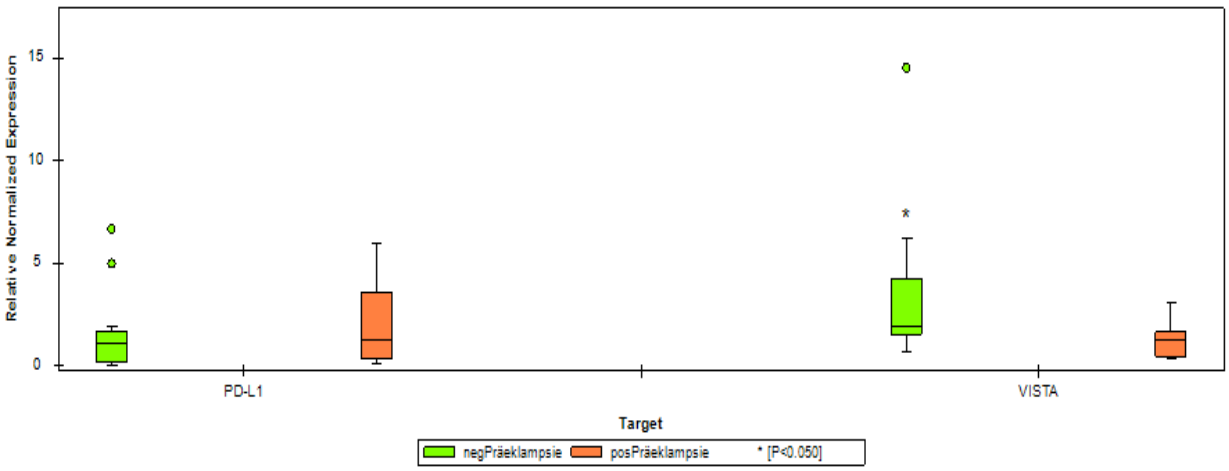

Abbildung 7: Relative Quantifizierung der PD-L1 und VISTA Expression im Plazentagewebe (Präeklampsie-negativ versus Präeklampsie-positiv) in Form eines Box-and-Whisker Plots

Auf der x-Achse befinden sich die untersuchten Zielgene PD-L1 auf der linken Seite und VISTA auf der rechten Seite.
Beide genannten Gene werden jeweils unterteilt in Kastendiagramme, die Präeklampsie-positive (posPräeklampsie, orange) und Präeklampsie-negative (negPräeklampsie, grün) Patientinnen-Kollektive beschreiben.
Die y-Achse der Abbildung 7 zeigt die relative normalisierte Expression.

Bei PD-L1 kann uns die Kastengrafik mit Hilfe der Ausdehnung der Box zeigen, dass sich die mittleren 50 % (zwischen dem ersten und dritten Quartil) der gewonnenen Daten zu PD-L1 in Präeklampsie negativen Patientinnen im Bereich zwischen 0,75 und 3,75 auf der Y-Achse befinden. Wobei die gesamte Spannweite, die den gesamten Wertebereich darstellt, mit den oberen Ausreißern bei bis zu 7 liegt. Der Median der beschriebenen Verteilung liegt bei ca. 1,75. Das obere Quartil wird durch das obere Ende der Box gebildet und liegt bei knapp 2.

Das bedeutet, dass 75 % der Werte unter diesem Bereich liegen oder diesem Wert gleich sind (68).
Die Antennen zu den Kästen werden nach der Definition von John W. Tukey auf die Länge des maximal 1,5-fachen Interquartilsabstandes beschränkt. Werte, die außerhalb dieser Grenze liegen, werden als Punkte dargestellt und beschreiben die Ausreißer. Der Median liegt hier bei ca. 1,75.
Dem Datensatz von PD-L1 der Präeklampsie negativen Patientinnen (grün) werden die Daten von PD-L1 zu den Präeklampsie positiven Patientinnen (orange) gegenübergestellt.
Die Spannweite des orangen Kastens mit PD-L1 in Präeklampsie positiven Patientinnen weist eine wesentlich größere Spannweite der mittleren 50 % im Vergleich zu den Präeklampsie negativen Patientinnen auf. Die relative normalisierte Expression, die sich anhand des Kastens zeigt, liegt zwischen ca. 1 und 6. Ausreißer gibt es im letztgenannten Diagramm keine.
Zwischen den Datensätzen von PD-L1 in Präeklampsie-positiven und -negativen Patientinnen zeigen sich keine signifikanten messbaren Unterschiede.

Die Kastenausdehnung der VISTA Datensätze zu den Präeklampsie-negativen Patientinnen (grün) befindet sich zwischen 1 und 4. Die Spannweite, der somit gesamte Wertebereich des Datensatzes, liegt mit den Ausreißern nach oben bei bis zu ca. 14. Der Median befindet sich bei ungefähr 2.
Es zeigt sich im Kastendiagramm mit den Daten von Präeklampsie-negativen Patientinnen eine sehr geringe Ausdehnung. Die mittleren 50 % der Daten liegen dabei zwischen 0,75 und 2 und es zeigt sich nur eine geringe Streuung. Ebenfalls zeigen sich keine Ausreißer.
Im VISTA-Vergleich zwischen den Präeklampsie-positiven und -negativen Patientinnen wird eine signifikant geringere Expression von VISTA in Präeklampsie-positiven Patientinnen deutlich.
Der p-Wert (mit * markiert) liegt bei $p < 0,05$ und erweist sich somit als statistisch signifikant bei einem Konfidenzintervall von 95 %.

Die nachfolgende Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der Genstudie in Form eines Streudiagramms (Dot Plot). Auch in diesem Diagramm befinden sich die untersuchten Zielgene PD-L1 und VISTA auf der x-Achse und werden jeweils unterteilt in Präeklampsie-negative (grün) und Präeklampsie positive (orange) Patientinnen. Die Datensätze der untersuchten Plazenten werden hier durch Punktwolken dargestellt.
Auf der y-Achse befindet sich die relative normalisierte Expression.
Die Muster der Punktwolken von Präeklampsie-negativen und -positiven Patientinnen bei PD-L1 zeigen auch in diesem Streudiagramm keinen relevanten messbaren Unterschied.

Wie schon im vorherigen Kastendiagramm kann aber ein messbarer Unterschied hinsichtlich VISTA in Präeklampsie-negativen und -positiven Patientinnen gezeigt werden.
Die Streuung bei PD-L1, sowohl bei Präeklampsie-Negativität als auch Präeklampsie-Positivität zeigt sich deutlich größer als bei VISTA.
Die Expression von VISTA zeigt sich in Präeklampsie-positiven Patientinnen im Vergleich zu den Präeklampsie-negativen Patientinnen statistisch signifikant erniedrigt (P-Wert < 0,05).

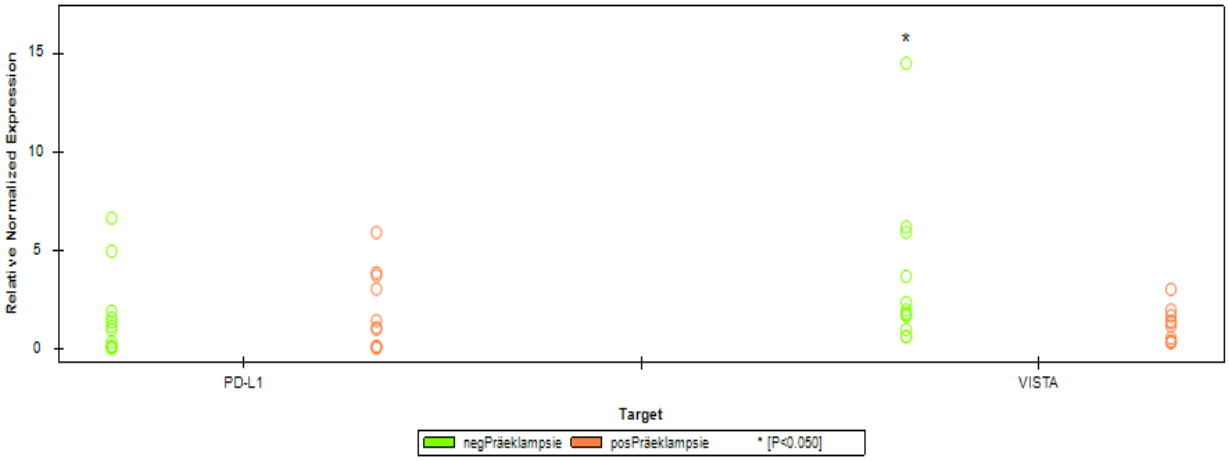

Abbildung 8: Relative Quantifizierung der PD-L1 und VISTA Expression im Plazentagewebe (Präeklampsie-negativ versus Präeklampsie-positiv) in Form eines Dot Plots

Anschließend werden die ermittelten Daten in einem Vulkandiagramm (Volcano Plot), einer Art Streudiagramm zum Beweis der statistischen Signifikanz, dargestellt (Abbildung 9).
Dazu werden folgende Einstellungen im Programm BioRad CFX Maestro getroffen:
Die biologische Kontrollgruppe wird von den Präeklampsie-negativen Patientinnen gebildet. Die Präeklampsie-positiven Patientinnen bilden die experimentelle biologische Gruppe. Als Schwellenwert wird die 4,00-fache Expressionsänderung (Fold change threshold) festgelegt. Die vertikalen Linien in Grün und Rot grenzen den angegebenen Schwellenwert ein.
Die horizontale blaue Linie markiert das 95%ige Konfidenzintervall und damit einen p-Wert von 0,05.
Der schwarze Punkt im oberen linken Bereich der Abbildung 9 steht für das Zielgen VISTA und befindet sich mit einem p-Wert von 0,032 oberhalb der blauen Linie.
Wie der Abbildung 9 zu entnehmen ist, kann mit einer 2,33-fachen Expressionsänderung im Vulkandiagramm bei VISTA von einem signifikanten Unterschied in der Expression von VISTA in Präeklampsie-negativen versus Präeklampsie-positiven Patientinnen gesprochen werden.

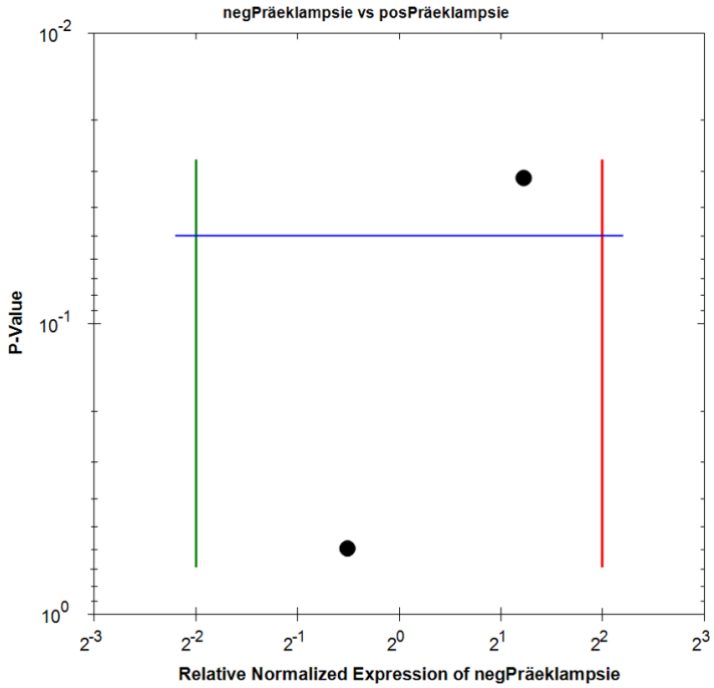

Abbildung 9: Volcano Plot zum Beweis der statistischen Signifikanz. Die biologische Kontrollgruppe wird von den Präeklampsie-negativen Patientinnen gebildet. Die Präeklampsie-positiven Patientinnen bilden die experimentelle biologische Gruppe.

Tabelle 8: Volcano Plot

Dargestellt	Ziel	Biologische Gruppe	x-fache Veränderung	P-Wert	Signifikanter P-Wert	Ziel-Regulation
Ja	PD-L1	NegPräeklampsie	-1,42	0,593	Nein	Herunterreguliert
Ja	VISTA	NegPräeklampsie	2,33	0,032	Ja	Herunterreguliert

Ein signifikantes Ergebnis zeigt sich in der beigefügten Tabelle 10 zur ANOVA.

Die Gruppen (negPräeklampsie – posPräeklampsie) hinsichtlich VISTA weisen eine statistische Signifikanz auf. Bei PD-L1 konnte kein signifikantes Ergebnis erzielt werden (69).

Tabelle 9: ANOVA Varianzanalyse

Ziel	Df	P-Wert ANOVA	P-Wert BH	Vergleich	Ratio	Untere Grenze (95 %)	Obere Grenze (95 %)	P-Wert Tukey	Signifikant
PD-L1	1	0,593	0,593						Nein
				negPräeklampsie - posPräeklampsie	0,702	0,180	2,734	0.593	Nein
VISTA	1	0,032	0,063						Nein
				negPräeklampsie - posPräeklampsie	2,334	1,086	5,012	0,032	Ja

Anhand der Tabelle 10 zum Shapiro-Wilk-Test kann eine Normalverteilung der Daten zu PD-L1 und VISTA in Präeklampsie-negativen und Präeklampsie-positiven Patientinnen aufgewiesen werden.

Tabelle 10: Shapiro-Wilk Test zum Vorweisen einer Normalverteilung

Ziel	Biologische Gruppe	Anzahl	P-Wert	Normal
PD-L1	negPräeklampsie	10	0,529	Ja
	posPräeklampsie	10	0,147	Ja
VISTA	negPräeklampsie	10	0,618	Ja
	posPräeklampsie	10	0,301	Ja

3.2 Ergebnisse der Auswertung mikroskopischer Bilder mittels FIJI ImageJ

Mithilfe der Software FIJI ImageJ konnten die nachfolgenden Ergebnisse ermittelt werden.
Die Ergebnisse erlangten wir durch die im Methodenteil beschriebenen Partikelanalysen. Diese konnten dann als Box-Plot-Diagramme mit den zugehörigen Korrelationsanalysen präsentiert werden.
Die Auswertung erfolgte in der Software nach einer ANOVA. Da in dieser Arbeit aber zwei Gruppen gegeneinander getestet wurden, handelte es sich hier um einen einfaktoriellen T-Test nach Tukey.

3.2.1 Mittlerer Grauwert

Die Abbildungen zeigen die Auswertung zum mittleren Grauwert für VISTA (Abbildung 10) und PD-L1 (Abbildung 11). Der Parameter des mittleren Grauwertes beschreibt uns die Intensität des binären Bildes (schwarz/weiß).
Die beiden Kastendiagramme stellen die genannten Gene dar. Es werden Präeklampsie-negative (grün) und Präeklampsie-positive (orange) Patientinnen-Kollektive beschrieben. In allen nachfolgenden Box-Plot-Diagrammen wird die Darstellung auf diese Art und Weise erfolgen.

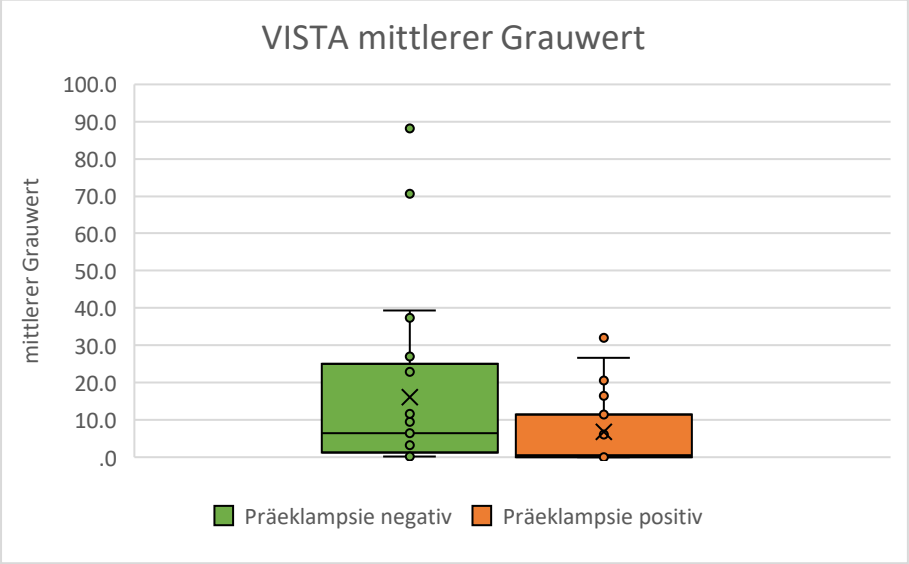

Abbildung 10: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des mittleren Grauwerts bei VISTA.

Bei den Präeklampsie-negativen Patientinnen stellt sich die Box vom unteren Quartil bei 1,49 bis zum oberen Quartil bei 23,11 dar. Das Maximum befindet sich mit Ausreißern bei bis zu knapp 90, wobei die obere Antenne sich bis zu 40 erstreckt und die untere Antenne bei nahezu 0 liegt. Der Median dieser Box liegt bei 6,49.
Im Vergleich dazu können beim Kastendiagramm des Präeklampsie-positiven Patientinnen-Kollektivs geringere Werte hinsichtlich des mittleren Grauwertes gezeigt werden. Das untere Quartil befindet sich bei 0,01 und das obere Quartil bei 9,56. Der Median liegt bei nahezu 0. Außerdem liegt das Maximum mit einem einzelnen Ausreißer bei ca. 32.
Der mittlere Grauwert bei VISTA zeigt insgesamt geringere Werte bei den Präeklampsie-positiven im Vergleich zu den Präeklampsie-negativen Proben.
Ebenfalls werden in der Abbildung 11 die Präeklampsie-negativen Patientinnen in Grün und die Präeklampsie-positiven Patientinnen in Orange dargestellt. In dieser Abbildung geht es jedoch um das Gen PD-L1.

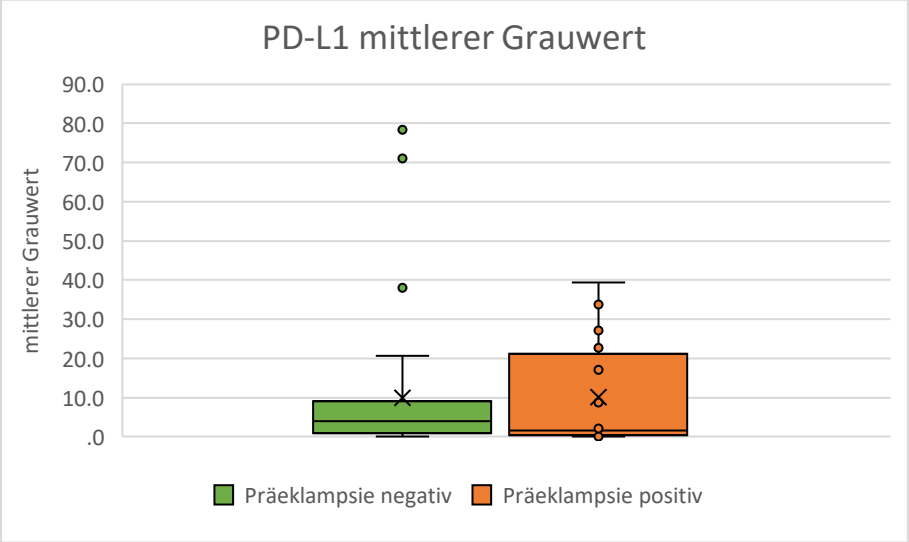

Abbildung 11: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des mittleren Grauwerts bei PD-L1.

Hier fällt eine große Streuung mit einer Standardabweichung von 17,33 im Kastendiagramm der Präeklampsie-negativen Patientinnen und mit Ausreißern bis zu 80 auf. Die obere Antenne befindet sich jedoch bei ca. 20 und das obere Quartil bei 9,1. Der Median liegt bei 4,052.
Dem gegenüber stehen die Präeklampsie-positiven Patientinnen mit einer geringeren Standardabweichung (13,44), bedingt durch deutlich weniger Ausreißer nach oben. Das obere Quartil liegt hier bei 18,41, das untere bei 0,38.
Der Median liegt bei den Präeklampsie-positiven Patientinnen bei einem geringeren Wert als beim Präeklampsie-negativen Kollektiv.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den beiden betrachteten Genen zu ermitteln, wurde der Auswertung mittels ImageJ jeweils eine Korrelationsanalyse angeschlossen.
Hier in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.

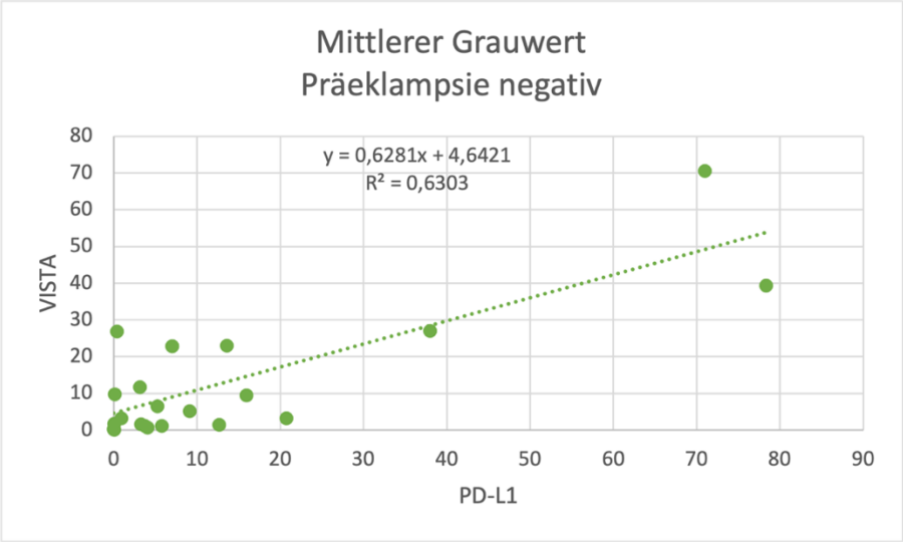

Abbildung 12: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Negativität. Dabei wurde der mittlere Grauwert betrachtet.

Bei Betrachtung des Zusammenhangs zwischen PD-L1 und VISTA im Hinblick auf den mittleren Grauwert beim Präeklampsie-negativen Patientinnen-Kollektiv, zeigt sich eine leichte positive Korrelation. Wenn man jedoch die Stärke der Korrelation (R) betrachtet, liegt diese bei ca. 0,63, was einen hohen Zusammenhang zwischen den beiden Genen beschreibt.

In der nachfolgenden Abbildung 13 wird ebenfalls der Zusammenhang zwischen den beiden Genen dargestellt. Hier geht es jedoch um den mittleren Grauwert im Präeklampsie-positivem Patientinnen-Kollektiv.
Bereits auf den ersten Blick fällt eine positive Korrelation auf und auch die Stärke des Zusammenhangs zeigt sich mit einem Wert von R = 0,85 sehr hoch.

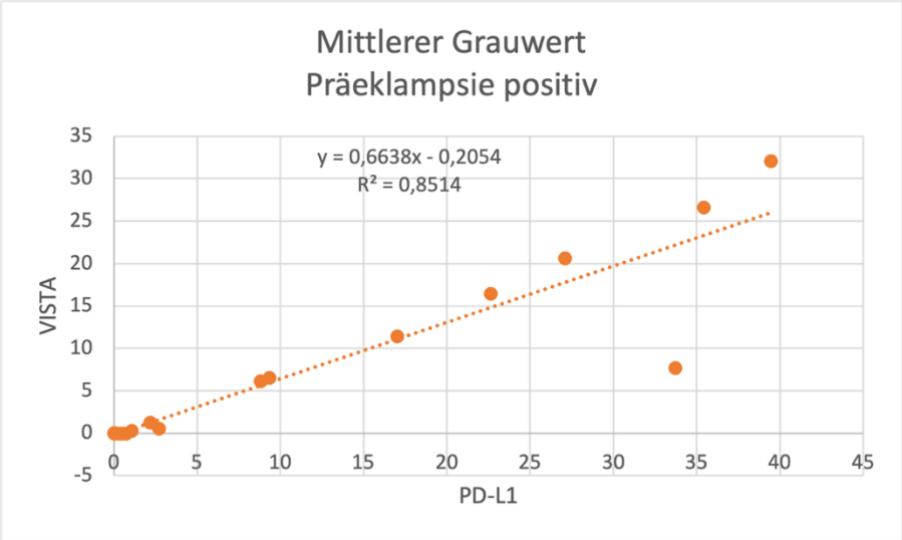

Abbildung 13: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Positivität. Dabei wurde der mittlere Grauwert betrachtet.

3.2.2 Fläche DAB-Signal

Für die Immunfärbung mit einer Meerrettichperoxidase wurde DAB wie oben beschrieben, genutzt. Der Prozentteil der Fläche, der DAB-positiv ist, wurde mittels ImageJ ermittelt und in den Abbildungen 14 (für VISTA) und 15 (für PD-L1) dargestellt.
Sowohl in der Grafik zu VISTA als auch in der Grafik zu PD-L1 zeigen sich bei den Präeklampsie-negativen Patientinnen größere Standardabweichung im Vergleich zu den Präeklampsie-positiven Patientinnen. Die Ausreißer, die bei VISTA bei ca. 35 und bei PD-L1 bei ca. 13 liegen, bilden die hohen Maxima.

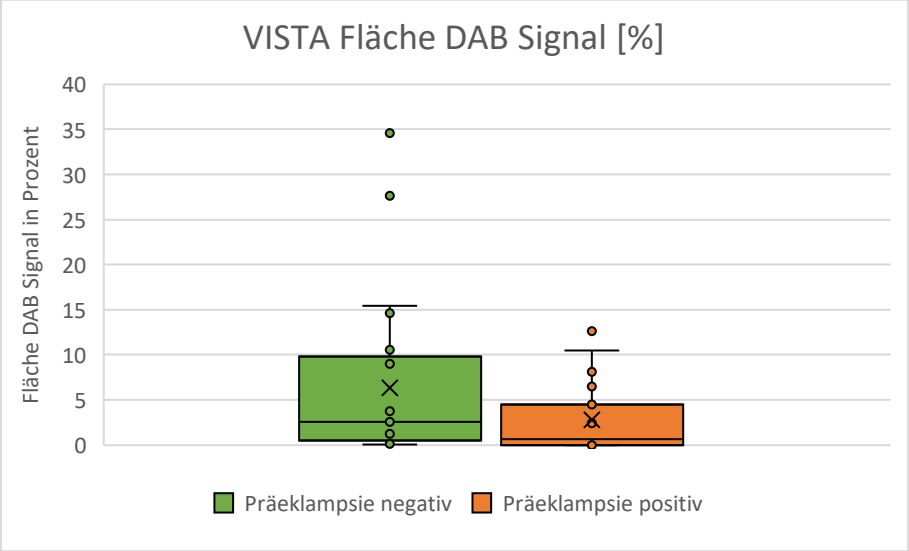

Abbildung 14: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des DAB-Signals in Prozent bei VISTA.

In Abbildung 14 liegen die oberen Quartilen des Präeklampsie-negativen Patientinnen-Kollektivs insgesamt bei einem höheren Wert (9,1) als bei den Präeklampsie-positiven Patientinnen (3,75). Die unteren Quartilen liegen bei sehr niedrigen Werten < 1.
In der Abbildung 15 hingegen, die die Diagramme zu PD-L1 und der Fläche des DAB-Signals zeigt, liegt das obere Quartil des Präeklampsie-positiven Kollektivs höher (7,22) als beim Präeklampsie-negativen Kollektiv (3,57).

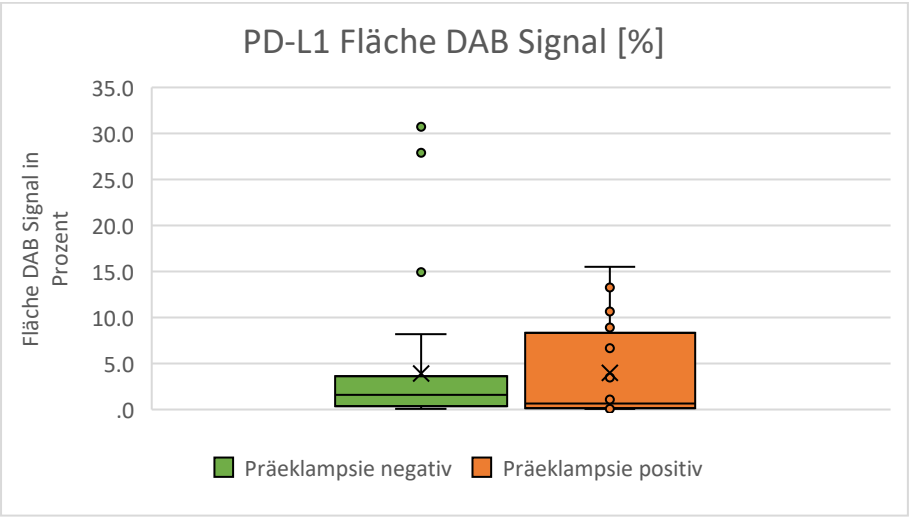

Abbildung 15: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des DAB-Signals in Prozent bei PD-L1.

Für die Fläche des DAB-Signals wurden ebenfalls Korrelationsanalysen durchgeführt. Abbildung 16 stellt dabei den Zusammenhang zwischen den beiden Genen in Präeklampsie-negativen Patientinnen dar, wohingegen die Abbildung 17 den Zusammenhang in Präeklampsie-positiven Patientinnen abbildet.

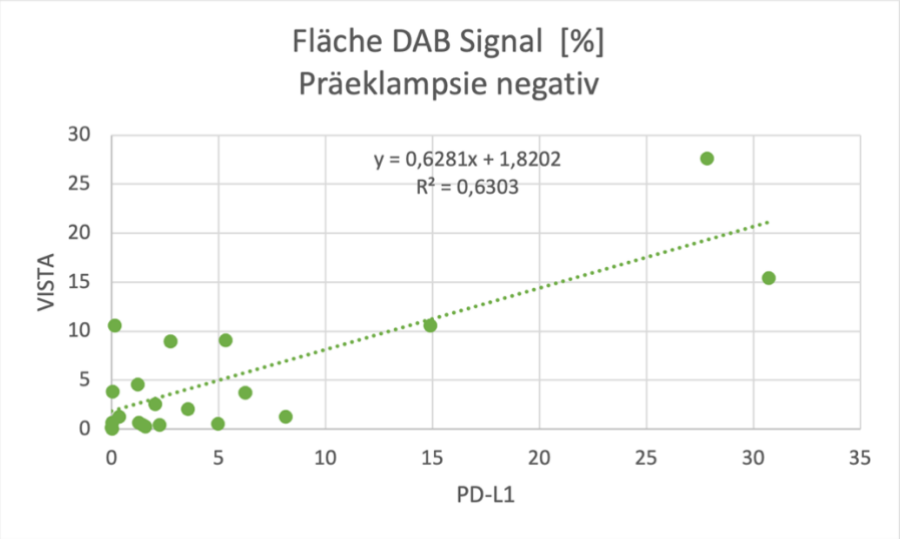

Abbildung 16: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Negativität. Dabei wurde die Fläche des DAB-Signals in Prozent betrachtet.

Vergleichbar mit der vorherigen Korrelationsanalyse zeigt sich auch hinsichtlich des DAB-Signals (in Prozent) eine positive Korrelation mit einer ebenso hohen Stärke (R = 0,63) in der Grafik zu den Präeklampsie-negativen Patientinnen.

Betrachtet man die Situation des Präeklampsie-positiven Patientinnen-Kollektivs in der nachfolgenden Abbildung 17, so erkennt man ebenfalls eine positive Korrelation zwischen PD-L1 auf der x-Achse und VISTA auf der y-Achse. Der R-Wert von 0,85 spricht außerdem für eine sehr hohe Stärke des Zusammenhangs.

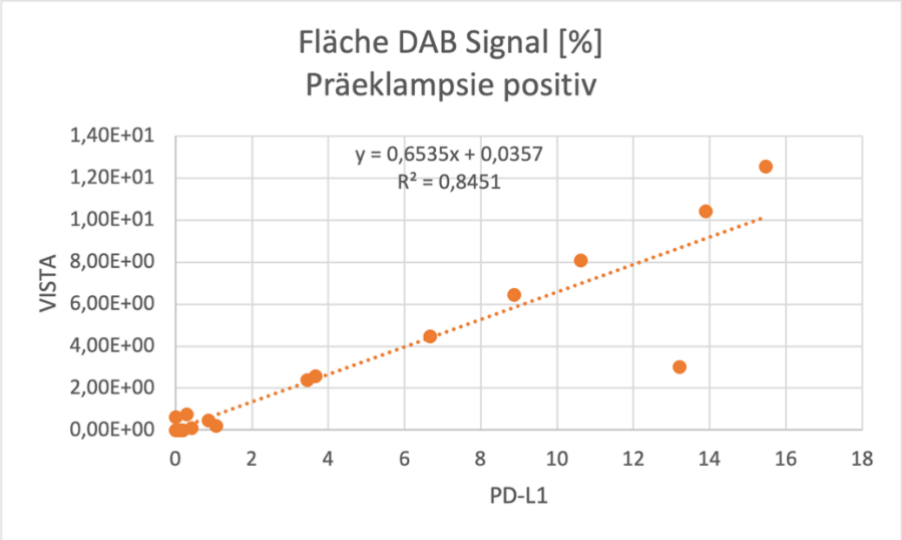

Abbildung 17: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Positivität. Dabei wurde die Fläche des DAB-Signals in Prozent betrachtet.

3.2.3 Intensität/Nukleus

Für jedes Bild wurde im Rahmen der IHC-Bildanalyse der mittlere Grauwert (Mean Grey Value) durch die Anzahl der Nuklei dividiert. Der daraus resultierende Wert repräsentiert dann die Intensität der DAB-Färbung normalisiert durch die Kerne. Hierzu zeigen die Abbildungen 18 und 19 die Ergebnisse in Form von Box-Plot-Diagrammen.

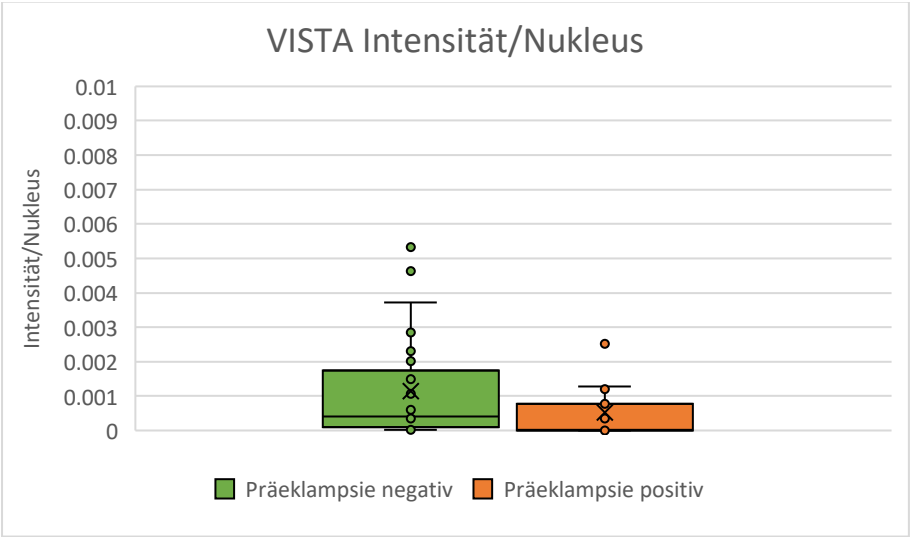

Abbildung 18: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich Intensität/Nukleus bei VISTA.

In der Grafik zu VISTA zeigt sich in der Präeklampsie-negativen Gruppe (grün) eine Box mit einem unteren Quartil von nahezu null und ein oberes Quartil bei ca. 0,001. Die Antenne erstreckt sich jedoch bis nahezu 0,004 und darüber hinaus gibt es eine relativ große Streuung mit Ausreißern mit Werten bis zu ca. 0,0055 (Standardabweichung von 0,0015). Im Vergleich dazu zeigt sich bei der Gruppe der Präeklampsie-positiven (orange) eine geringere Streuung (Standardabweichung von 0,0008). Die Ausreißer liegen bei ca. 0,0025. Insgesamt erstreckt sich die zugehörige Box ebenfalls von nahezu null im unteren Quartil und bis zu ca. 0,0007 im oberen Quartil.

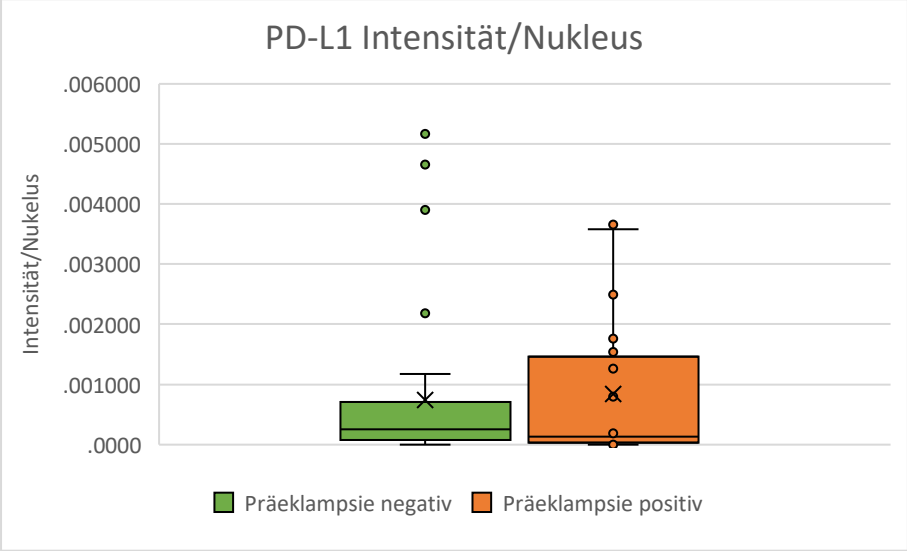

Abbildung 19: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich Intensität/Nukleus bei PD-L1.

In der Abbildung zu PD-L1 mit Intensität/Nukleus (Abbildung 19) zeigen sich zwar bei den Präeklampsie-negativen Patientinnen niedrigere Werte hinsichtlich der Erstreckung der Box als mit den Präeklampsie-positiven Patientinnen, aber insgesamt zeigen sich deutliche Werte zu den Ausreißern der Präeklampsie-negativen Gruppe (bis zu ca. 0,0052). Der höchste Ausreißer bei der orangen Box (Präeklampsie-positiv) liegt hingegen bei ca. 0,0036.
Sowohl bei der Abbildung zu VISTA als auch zu PD-L1 zeigen sich höher liegende Medianwerte bei den Präeklampsie-positiven Gruppen.
Die Intensität der DAB-Färbung normalisiert durch die Kerne zeigt sich also sowohl bei VISTA als auch bei PD-L1 insgesamt geringer in der Präeklampsie-positiven als in der Präeklampsie-negativen Gruppe.

Im Anschluss zeigen sich die dazugehörigen Korrelationsanalysen.
In Abbildung 20 wird die Korrelation zwischen PD-L1 und VISTA in der Präeklampsie-negativen Gruppe betrachtet. Es zeigt sich auch hier eine positive Korrelation mit einer hohen Stärke des Zusammenhangs (R = 0,74).
Insbesondere, wenn man die größeren Werte auf x- und y-Achse betrachtet, wird der Zusammenhang deutlich.

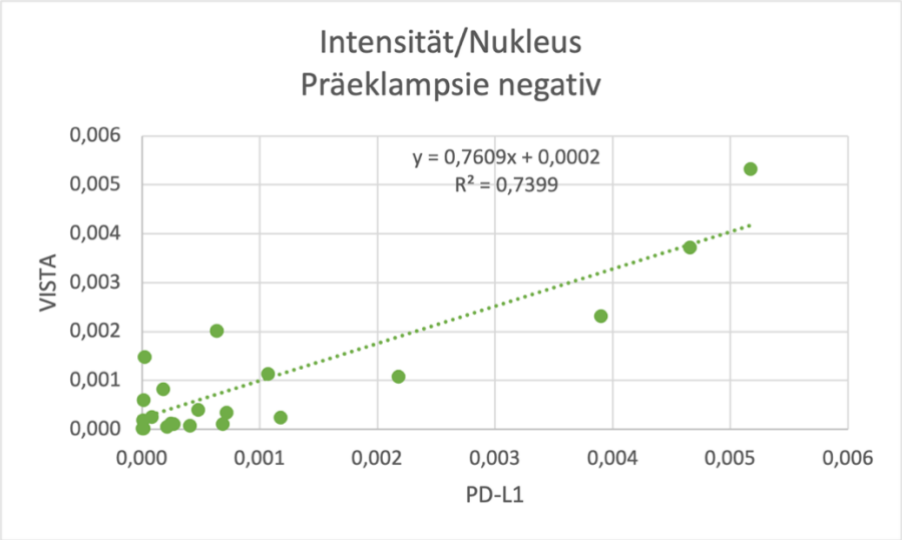

Abbildung 20: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Negativität. Dabei wurde die Intensität/Nukleus betrachtet.

In Abbildung 21 kann der Zusammenhang zwischen PD-L1 und VISTA in den Präeklampsie-positiven Patientinnen ebenfalls gezeigt werden. Es zeigt sich eine positive Korrelation mit einer hohen Zusammenhangsstärke (R = 0,65).

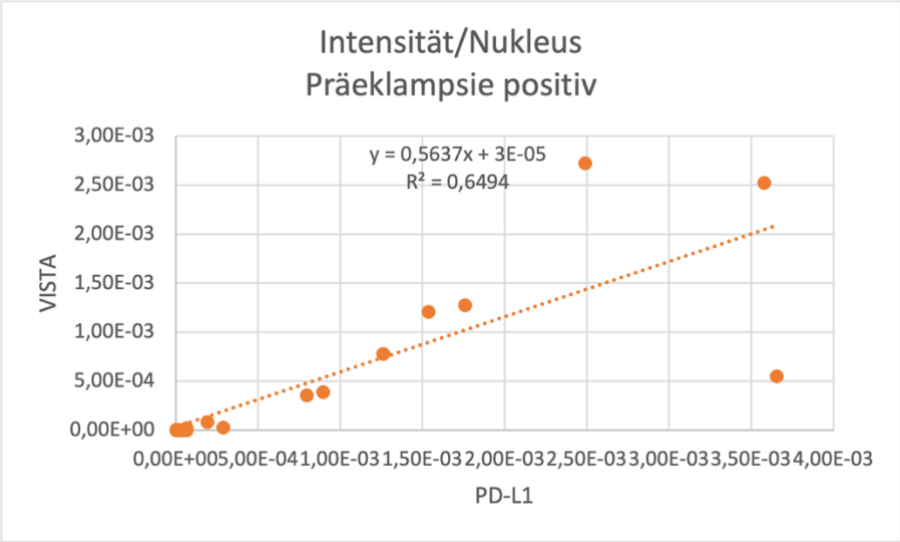

Abbildung 21: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Positivität. Dabei wurde die Intensität/Nukleus betrachtet.

3.2.4 Fläche positiver Kerne

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde der Anteil der DAB positiven Zellkerne von der Gesamtheit aller Zellkerne berechnet.
Die Abbildungen 22 und 23 geben uns Informationen zu den daraus resultierenden Ergebnissen.

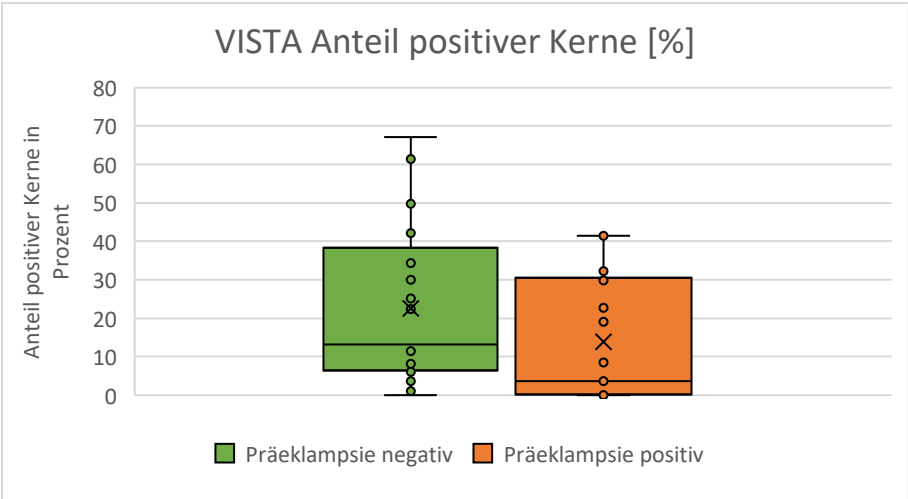

Abbildung 22: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des Anteils positiver Kerne in Prozent bei VISTA.

Abbildung 22 stellt die Ergebnisse zu VISTA dar. Die grüne Box, die wie zuvor auch die Präeklampsie-negative Gruppe repräsentiert, erstreckt sich vom unteren Quartil bei 6,94 bis zum oberen Quartil bei 34,42. Der Median liegt dabei bei 13,17. Die Antenne reicht nach oben bis zu ca. 68. Die Streuung mit einer Standardabweichung von 19,48 zeigt sich im Vergleich zu der Präeklampsie-positiven Gruppe höher (hier bei 15,97).
Die oben dargestellte Box zu den Präeklampsie-positiven Patientinnen hat einen etwas größeren Interquartilsabstand als die der Präeklampsie-negativen Gruppe. Das untere Quartil liegt bei 0,12 und das obere bei 30,14. Der Median ist im Vergleich zur Präeklampsie-negativen Gruppe geringer und liegt bei lediglich 3,58.

Wenn man in Abbildung 23 die Box zu PD-L1 in der Präeklampsie-negativen Gruppe betrachtet, fällt eine tiefer angesetzte Box als bei VISTA auf.
Das untere Quartil liegt bei 4,5, das obere Quartil bei 20,72 und der Median bei 12,9. Die Antenne liegt bei ca. 35, das Maximum jedoch bei knapp 80 mit einem Ausreißer.

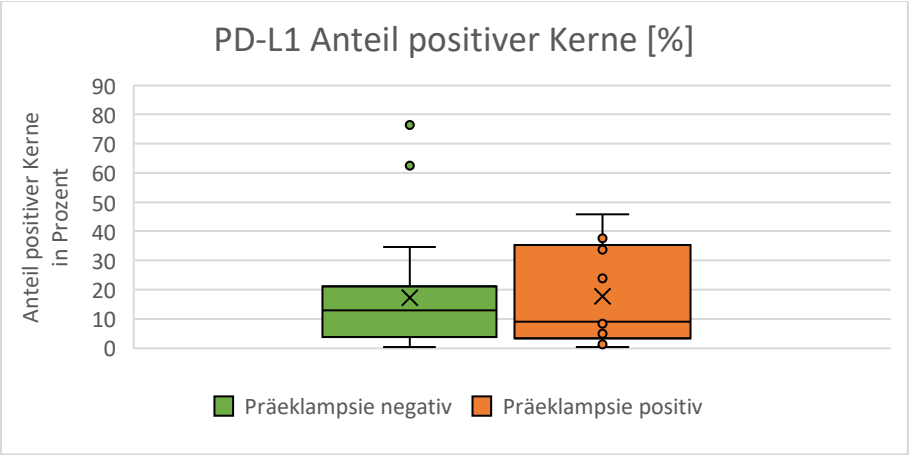

Abbildung 23: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des Anteils positiver Kerne in Prozent bei PD-L1.

Die Box der Präeklampsie-positiven Patientinnen weist einen größeren Interquartilsabstand auf, wobei das untere Quartil bei 3,44 und das obere Quartil bei 34,83 liegt. Der Median liegt jedoch im Vergleich zu der Präeklampsie-negativen Gruppe bei einem geringeren Level von 9,13. Insgesamt zeigt sich eine etwas geringere Streuung bei der Präeklampsie-positiven Gruppe im Vergleich zu der negativen Gruppe.

Wie schon in den vorherigen Analysen, können in den Abbildungen 24 und 25 ebenfalls Zusammenhänge zwischen den Genen PD-L1 und VISTA in den Präeklampsie-negativen und Präeklampsie-positiven Patientinnen-Kollektiven gezeigt werden.

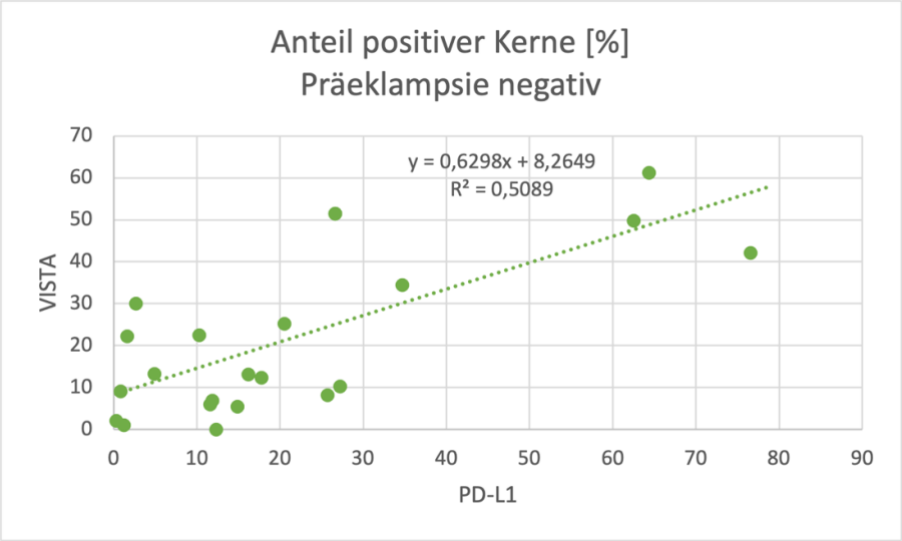

Abbildung 24: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Negativität. Dabei wurde der Anteil positiver Kerne in Prozent betrachtet.

In der Abbildung 24 zeigt sich in der Gruppe der Präeklampsie-negativen Patientinnen eine insgesamt positive Korrelation mit einer noch knapp hohen Stärke des Zusammenhangs bei einem R-Wert von 0,51.
Im Vergleich dazu, liegt uns die Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA in der Präeklampsie-positiven Gruppe in Abbildung 25 vor. Es zeigt sich eine deutlich positive Korrelation zwischen den beiden Genen mit einer sehr hohen Stärke des Zusammenhangs bei einem vorliegenden R-Wert von 0,84.

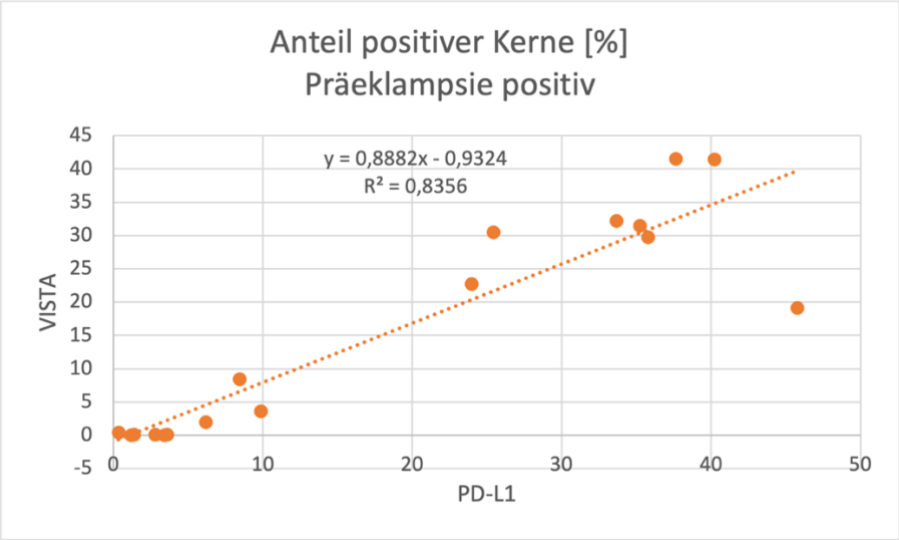

Abbildung 25: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Positivität. Dabei wurde der Anteil positiver Kerne in Prozent betrachtet.

Die Abbildung 26 zeigt uns Beispiele für die untersuchten immunhistochemisch gefärbten Bilder.

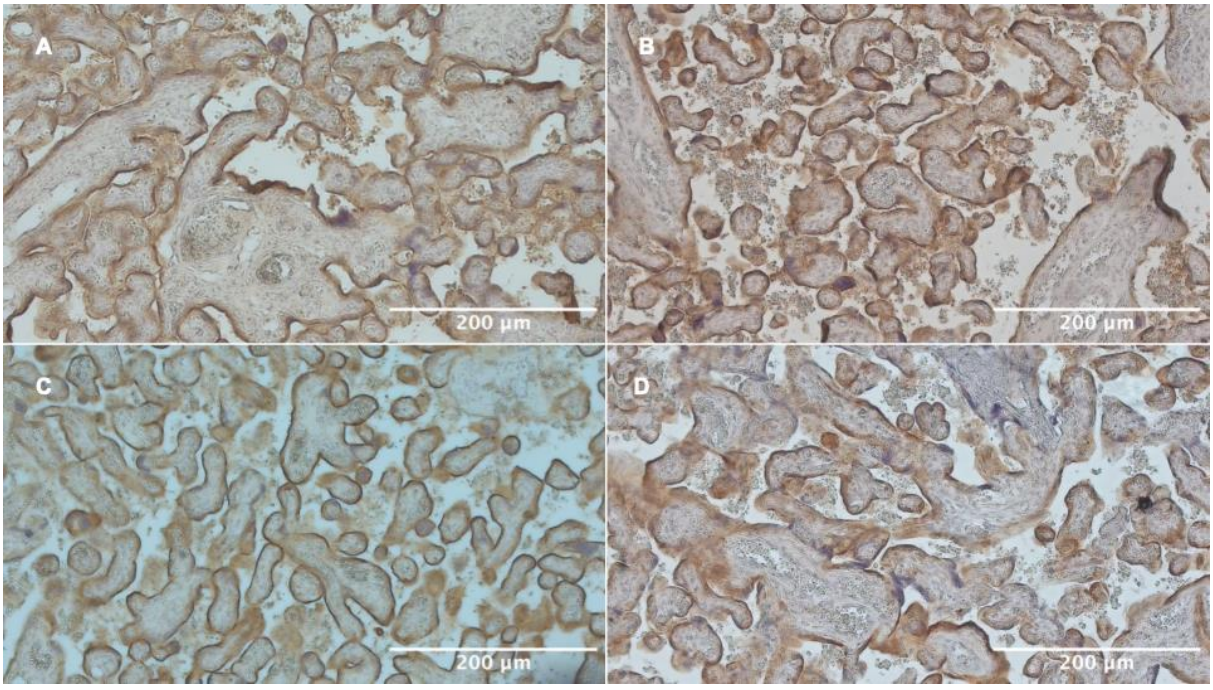

Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung von Plazentagewebe mit Hämalaun als Kernsignal sowie PD-L1/VISTA als DAB-Signal in 10-facher Vergrößerung. A: PD-L1 als DAB-Signal bei einer Präeklampsie-positiven Plazenta. B: VISTA als DAB-Signal bei einer Präeklampsie-positiven Plazenta. C: PD-L1 als DAB-Signal bei einer Präeklampsie-negativen Plazenta, B: VISTA als DAB-Signal bei einer Präeklampsie-negativer Plazenta.

4 Diskussion

Die Annahme bestand darin, dass eine erniedrigte Expression der Immuncheckpoints PD-L1 und VISTA eine essenzielle Rolle in der gestörten Immuntoleranz zwischen Fetus und Mutter spielt und somit die Grundlage für die Entwicklung einer Präeklampsie sind (7).
Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten eine erniedrigte Expression der beiden ICs VISTA und PD-L1 aufweisen. Wobei die von VISTA signifikant war.

4.1 PD-L1 in Expression in Plazenten mit und ohne Präeklampsie

In der Auswertung der immunhistologischen **Färbungen**, die anhand eines standardisierten Färbeprotokolls mittels einer Meerrettichperoxidase und DAB durchgeführt wurden, zeigte sich eine erniedrigte, jedoch nicht signifikante Expression von PD-L1 im Plazentagewebe der Präeklampsie-positiven Patientinnen. Zwar zeigte sich hier auch eine erniedrigte Tendenz, diese war jedoch aufgrund der Streuung nicht signifikant.
Generell wird bei Färbungen eine größere Streuung als bei quantitativen Auswertungsmethoden erwartet. Somit diente die immunhistologische Untersuchung als Trend, welcher in einer qRT-PCR näher betrachtet wurde.
Wie im Methodenteil beschrieben, erfolgte die Auswertung der Färbungen mittels Partikelanalysen durch die Software FIJI ImageJ und betrachtete dabei den mittleren Grauwert, die Fläche des DAB-Signals, Intensität/Nuklei (mittlerer Grauwert durch die Anzahl der Nuklei dividiert) sowie die Fläche DAB positiver Kerne. In allen Bereichen der Auswertung konnte die erniedrigte, nicht signifikante Expression von PD-L1 gezeigt werden.
Um die Ergebnisse dieser Pilotstudie vorangegangen Studien zur Expression von PD-L1 in Präeklampsie gegenüberzustellen, beziehe ich mich auf eine Studie aus dem Jahr 2017 um Zhang et al., bei der eine signifikant erniedrigte Expression von PD-L1 in präeklamptischen Plazenten beschrieben wird (61).
In der Studie wurde der Einfluss des PD-1/PD-L1-Pfades auf das Treg/Th17-Gleichgewicht in der Präeklampsie untersucht. Dabei wurden die Schlüsse gezogen, dass der PD-1/PD-L1-Pfad die Entwicklung der Treg T-Zellen fördert und die Th17-Proliferation hingegen inhibierend beeinflusst. Im Kontrast dazu, führe ein gestörte PD-1/PD-L1 Expression zu einer möglichen Präeklampsie-Entwicklung aufgrund eines Treg-/Th17 Ungleichgewichts mit Dominanz der Th17-Zellen.
Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurde in der genannten Studie aus 2017 insbesondere die fetal-maternale Schnittstelle der Plazenta untersucht (61). Da es sich bei dem Studiendesign dieser Arbeit um eine retrospektive Pilotstudie handelt, wurden bereits histologisch präparierte

und bereits archivierte Plazentaproben verwendet, bei denen es keine gezielte Entnahmestelle beziehungsweise keinen Einfluss auf die Schnittführung gab. Dieser Unterschied kann auch die Differenzen der Signifikanz der Ergebnisse erklären.

Mithilfe der **qRT-PCR** konnte eine Expressionsanalyse durchgeführt und verschiedene biologische Gruppen miteinander verglichen werden – Präeklampsie-negative mit Präeklampsie-positiven Patientinnen. Diese Schritte wurden sowohl für den IC PD-L1 als auch VISTA durchgeführt.

Die Ergebnisse zu PD-L1 im Vergleich von Präeklampsie-negativen zu Präeklampsie-positiven Patientinnen ergaben keine signifikant messbaren Unterschiede in den beiden Gruppen. Auch hier konnte in unserer Pilotstudie zwar die Tendenz der erniedrigten Expression von PD-L1 in Präeklampsie-positiven Patientinnen dargestellt werden, jedoch im Vergleich zu vorherigen Studien nicht mit entsprechender Signifikanz.

In den anderen Studien, in denen die Ergebnisse auf eine signifikant erniedrigte Expression von PD-L1 hinwiesen, wurde im Gegensatz zu dieser Arbeit insbesondere die fetal-maternale Schnittstelle untersucht (4,30,53). Wir untersuchten nicht explizit die fetal-maternale Schnittstelle.

Wie in den Veröffentlichungen von Hsu & Nanan (2014) beschrieben, befindet sich PD-1 hauptsächlich als Rezeptor auf den B- und T-Zellen und führt im Zusammenspiel mit PD-L1 immuninhibierende Funktionen aus, die zum Erhalt der peripheren Toleranz beitragen (70). Die eindeutig erniedrigte Expression von PD-L1 in vorherigen Studien kann dadurch bedingt sein, dass im Bereich der fetal-maternalen Schnittstelle eine besonders hohe Dichte an Immunzellen vorliegt und diese dann zu den entsprechenden Ergebnissen führt.

Die physiologische Schwangerschaft erfordert eine regulierte Immuntoleranz an der maternalen-plazentaren Schnittstelle im Zusammenspiel zwischen den fetalen Trophoblasten, dezidualen Stromazellen sowie mütterlichen dezidualen Immunzellen.

Die Dezidua sollte Immuntoleranz aufbringen, aber auch immunologische Protektion gegen mögliche lokale Infektionen bieten, sodass gerade in diesem Bereich ein besonders hohes Aufkommen von Immunzellen herrscht (24). Gibt es hier eine Fehlsteuerung, so kann diese zu beschriebenen immunologischen Veränderungen, die in der Präeklampsie herrschen, führen.

Auch die Studie um Jena et al. aus dem Jahr 2019 benennt ein erniedrigtes PD-L1 Level als mögliche Ursache für die Imbalance zwischen Treg T-Zellen und Th17 T-Zellen, was eine Dominanz der Th17 T-Zellen zur Folge haben kann und dann zur fehlgesteuerten Immuntoleranz führt (53).

4.2 VISTA in Expression in Plazenten mit und ohne Präeklampsie

Bisherige Studien bezogen sich bisher vor allem auf den Immuncheckpoint PD-1 und den dazugehörigen Liganden PD-L1 und beschreiben vor allem die erniedrigte Expression von diesem in Schwangerschaften mit Präeklampsie im Vergleich zu unauffälligen Schwangerschaften (30,61).

In dieser Arbeit wurden die bisherigen Untersuchungen von PD-L1 durch den Immuncheckpoint VISTA ergänzt. Dazu fand ebenfalls die Auswertung der immunhistologischen Färbungen hinsichtlich der VISTA Expression statt. In allen Bereichen der Auswertung der Färbungen (mittlerer Grauwert, Fläche des DAB-Signals, Intensität/Nuklei, Fläche DAB positiver Kerne) konnten signifikante Ergebnisse erlangt werden – eine signifikant erniedrigte Expression des ICs VISTA in präeklamptischen Plazenten.

Eine mögliche Ursache für die Ergebnisunterschiede hinsichtlich der Signifikanz zwischen den ICs könnte die unterschiedliche Expression von VISTA und PD-L1 in der Plazenta sein.

VISTA wird durch Antigen-präsentierende Zellen, T-Zellen der Dezidua und die Plazenta-Trophoblasten exprimiert und zeigt sich in den IHC-Färbungen des Projekts in nahezu allen Teilen der Plazenta (32, 70). VISTA hat eine ausgeprägte Expression auf hämatopoetischen Geweben wie Milz, Lymphknoten und Blut sowie in Geweben, die durch eine hohe Anzahl an Leukozyten geprägt sind.

Wohingegen bei PD-L1 eher im Bereich des Synzytiotrophoblasten eine Akkumulation festzustellen war. Die Immunzelldichte und die dort veränderte Expression von PD-L1 ist sicherlich ein Grund, weshalb wir die Ergebnisse nicht reproduzieren konnten.

Vorherige Studien haben bisher kaum den Einfluss von VISTA auf die Präeklampsie untersucht. In einer Studie um Zhao et al. wurde aber bereits der immunsupprimierende Einfluss des ICs VISTA auf die maternal-fetale Immuntoleranz in der Schwangerschaft beschrieben. Diese Modifikation der T-Zell-Aktivierung sowie die daraus resultierende nötige Immuntoleranz bildet eine der Grundlagen für eine physiologische Plazentaentwicklung (7). Da es sich bei der Präeklampsie um eine gestörte Immuntoleranz handelt und wir eine signifikant erniedrigte Expression von VISTA zeigen konnten, gehen die Ergebnisse mit denen der vorherigen Studien einher (41).

Auch eine Studie um Wang et. al aus dem Jahr 2014 beschreibt die supprimierende Wirkung von VISTA auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, was dann wiederum zu einer verringerten Produktion der Zytokine IL-10, TNF-alpha und IFN-γ führt (34). Besteht eine verringerte Expression von VISTA, so kann eine gesteigerte Autoimmunität beschrieben werden.

Auch für VISTA wurde eine Gene Study mittels **qRT-PCR** durchgeführt, um die Expression in präeklamptischen und nicht präeklamptischen Plazenten zu untersuchen. Hier konnten die Ergebnisse der Färbungen untermauert werden.
Mittels t-Test nach Tukey konnten die zwei Gruppen (negPräeklampsie - posPräeklampsie) verglichen werden und zeigten hinsichtlich VISTA eine statistische Signifikanz auf.
VISTA ist laut einer Studie eine wichtige Säule für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und immunologische Balance – die Voraussetzung für eine physiologische Schwangerschaft (34). Die signifikant erniedrigte Expression von VISTA in der Präeklampsie, die wir in unserer Pilotstudie zeigen konnten und durch eine gestörte Immuntoleranz hervorgerufen wird, erscheint damit plausibel und geht mit den vorangegangenen Studien einher.

4.3 Einfluss der Immuncheckpoints PD-L1 & VISTA auf präeklamptische Plazenten

Der Einfluss der ICs wurde in bisherigen Untersuchungen vor allem anhand von PD-1/PD-L1 untersucht (30,61). Es wird jedoch ein Zusammenspiel mit unter anderem VISTA beschrieben. Dieses Zusammenspiel habe einen Einfluss auf die Immunzelldifferenzierung und Toleranzentwicklung und sei auch in der Immuncheckpoint-Therapie von Tumoren aufgefallen (7).
Um den Zusammenhang der beiden ICs hinsichtlich der Präeklampsie-Entwicklung zu betrachten, haben wir in dieser Pilotstudie PD-L1 und VISTA in Kombination untersucht.
Wir führten eine Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA in Präeklampsie-positiven Plazenten durch, die aus der Auswertung der immunhistologischen Färbungen ermittelt werden konnte. Dabei zeigte sich eine deutlich positive Korrelation zwischen den beiden Genen mit einer sehr hohen Stärke des Zusammenhangs.
Beide ICs sind Moleküle, die eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zell gesteuerten Immunreaktionen und der zellulären Immunität einnehmen. Sie dienen dabei als Barriere für mögliche Überaktivierungen des Immunsystems und Eigentoleranz.
Bei heruntergeschraubter Aktivität der ICs werden vor allem Autoimmunreaktionen, Verlust der peripheren Immuntoleranz und chronische Erkrankungen beschrieben (32–34).
Besonders in der Studie um Liu et al. zeigen die Ergebnisse, dass eine Störung beider ICs VISTA und PD-L1 die Fehlsteuerung von T-Zellen und deren Überaktivierung auslöse (33).
Da VISTA Teil der B7 Familie der immunregulatorischen Proteine, zu der auch PD-L1 gehört, ist und besonders der extrazelluläre Teil dem Transmembran-Moleküls Liganden PD-L1 sehr ähnlich ist, werden hier auch funktionelle Gemeinsamkeiten erwartet und beschrieben (71).

Es konnte sowohl eine erniedrigte Expression von PD-L1 als auch von VISTA in präeklamptischen Plazenten gezeigt werden. Wobei nur die Expression von VISTA signifikant erniedrigt war.

4.4 Limitationen der Arbeit

Die größte Limitation dieser Arbeit ist die geringe Anzahl an Proben, die uns für die Auswertung der Immuncheckpoints in Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie vorlag.
Bei dieser Pilotstudie wurde insgesamt nur eine kleine Stichprobe von 20 Plazenten untersucht.
Für die vorliegende Arbeit wurden Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Plazentaproben aus der Pathologie Oldenburg genutzt. Das Einsenden der Plazenten in die Pathologie findet aufgrund von verschiedenen Indikationen wie beispielsweise Frühgeburtlichkeit, intrauteriner Wachstumsretardierung des Fetus (Fetal Intrauterine Growth Retardation/IUGR) oder diagnostizierter Präeklampsie statt. Das Einsenden von Plazenten aus komplett unauffälligen Schwangerschaften in die Pathologie ist üblicherweise nicht vorgesehen. Daher besteht unsere Kontrollgruppe nicht aus Plazenten von komplett unauffälligen Schwangerschaften, sondern in den meisten Fällen aus gesunden, jedoch frühgeburtlichen Plazenten aus Schwangerschaftswochen ≤ 36+6 SSW. Plazenten mit entzündlichen Prozessen, wie beispielsweise Chorioamnionitis, wurden ausgeschlossen, da entzündliche Prozesse die Expression von Immuncheckpoints beeinflussen können.
Hinzu kommt als weitere Limitation dieser Arbeit die Immunfärbung der Gewebeschnitte mittels Meerrettichperoxidase und 3,3-DAB. Bei DAB handelt es sich um ein Chromogen, welches Licht streut, sodass sich die Absorption nicht linear verhält. Das bedeutet, dass die Antigen-Antikörper-Reaktionen mit den daraus resultierenden Färbungen nicht eins zu eins mit der möglichen Expression eines Antigens gleichgesetzt werden können. Somit konnten bei der Auswertung der mikroskopischen Bilder nicht die Intensitäten der Färbungen, sondern nur die Flächen der angefärbten Bereiche der mikroskopischen Bilder analysiert werden. Die präferierte Methode der Fluoreszenzfärbung mit vorhandener Stöchiometrie, konnte aufgrund der Autofluoreszenz der Plazenta nicht etabliert werden.

Zusätzlich limitierend ist in dieser Arbeit die zufällige Probenentnahme innerhalb der jeweiligen Plazentaproben – zentral oder an der fetal-maternalen Schnittstelle.
In anderen Studien, in denen die Ergebnisse auf eine eindeutige erniedrigte Expression von PD-L1 hinwiesen, wurde im Gegensatz zu dieser Arbeit insbesondere die fetal-maternale Schnittstelle untersucht (4,30,53,61).

Da es sich bei dem Studiendesign dieser Arbeit um eine retrospektive Pilotstudie handelt, wurden bereits histologisch präparierte und bereits archivierte Plazentaproben verwendet, bei denen es keine gezielte Entnahmestelle beziehungsweise keinen Einfluss auf die Schnittführung gab.
Wie in den Veröffentlichungen von Hsu und Nanan (2014) beschrieben, befindet sich PD-L1 vornehmlich auf den Lymphozyten (70). Die eindeutig erniedrigte Expression von PD-L1 in vorherigen Studien kann dadurch bedingt sein, dass im Bereich der fetal-maternalen Schnittstelle eine besonders hohe Dichte an Immunzellen vorliegt und diese dann zu den dementsprechenden Ergebnissen führt. Wir untersuchten nicht explizit die fetal-maternale Schnittstelle.
Hinzu kommt, dass eine nahezu unerreichbare Verfügbarkeit von Plazenten aus Frühschwangerschaft, insbesondere die fetal-maternale Schnittstelle, herrscht. Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Plazenten handelte es sich um Plazenten von Entbindungen in lebensfähigen Schwangerschaftswochen. Diese Situation wird ebenfalls in der aus 2014 stammenden Studie von Hsu und Nanan erläutert und geht mit dieser Arbeit einher (70).
Eine darauffolgende Studie aus dem Jahr 2016 um Tian et al. betrachtet die Veränderung des PD-1/PD-L1 Signalwegs mit Erniedrigung von PD-L1 in präeklamptischen Rattenplazenten und daraus resultierender Imbalance von Treg & Th17 T-Zellen. Auch hier wird statt der ganzen Plazenta insbesondere die fetal-maternale Schnittstelle untersucht (72).

Da es sich um eine Pilotstudie handelt, konnten nicht genügend Patientinnen eingeschlossen werden, um die Gruppe der Patientinnen mit Präeklampsie weiter zu unterteilen.
Eine Unterteilung nach Schweregrad (mild – schwer), Zeitpunkt der Präeklampsie (früh – spät) sowie der Vergleich zu verwandten Syndromen, wie z.B. dem HELLP-Syndrom wäre in einer Folgestudie wünschenswert. Wir können mit den Ergebnissen somit keine Aussagen über die Expression der ICs in verschiedenen Ausprägungen der Präeklampsie machen.
In dieser Arbeit wurden ebenfalls keine Unterscheidungen zwischen Frühgeborenen (≤ 36+6 SSW), reifen Neugeborenen (≥ 37+0 SSW) oder im Allgemeinen der Schwangerschaftswoche zum Entbindungszeitpunkt gemacht.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass diese Arbeit trotz ihrer beschriebenen Limitationen die Forschungsfrage beantworten kann.
Es konnte durch die Untersuchungen an fixiertem Plazentagewebe mittels Immunfärbung und qRT-PCR der immunologische Hintergrund der Präeklampsie beleuchtet werden und eine signifikante erniedrigte Expression des Immuncheckpoints VISTA und eine erniedrigte Expression von PD-L1 in der Präeklampsie festgestellt werden.
Besonders die Ergebnisse zu VISTA geben uns neue Erkenntnisse über die erniedrigte Expression in präeklamptischen Plazenten, die bisher nicht in vorangegangen Studien zur Präeklampsie erlangt wurden.
Bei dieser durchgeführten Pilotstudie handelt es sich um eine kleine Studie, jedoch bietet sie die Möglichkeit noch weitere Studien zu etablieren.
Dabei könnten beispielsweise in weiteren Schritten die Schweregrade der Präeklampsie, auch im Vergleich mit dem HELLP-Syndrom, weiter differenziert und untersucht werden. Sinnvoll wäre es sicherlich, dazu eine deutlich größere Kohorte zu betrachten und die Expression der ICs in einer frühen (early-onset) Präeklampsie mit der einer späten (late-onset) Präeklampsie zu vergleichen.
Mit weiteren methodischen Ansätzen könnte die bessere Charakterisierung der Präeklampsie und die bessere Einschätzung über den Verlauf der Krankheit ermöglicht werden.
Hierfür sollte in weiteren Projekten bevorzugt plazentares Frischgewebe genutzt werden. Dieses bietet durch die ausbleibende Fixierung eine deutlich höhere Vergleichbarkeit zu den natürlichen Prozessen in der Plazenta als die fixierten Gewebeblöcken.
Zusätzlich ermöglicht die Nutzung von Frischgewebe weitere Methoden, wie das Anlegen von Zellkulturen und die Durchflusszytometrie.
Da Frischgewebeproben direkt in der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe entnommen werden würden, könnte dann auch die Lokalisation der Probennahme standardisiert werden. Damit wären Untersuchungen exakt an der fetal-maternalen Schnittstelle oder ein Vergleich der Schnittstelle zu zentralen Bereichen möglich.

In der Immuntherapie werden bereits Blocker des PD-1/PD-L1 Signalwegs zur Behandlung von Krebs genutzt. In einer Studie um Tian et al. aus dem Jahr 2022 wurde die lösliche Form des ICs PD-L1 im Blut als möglicher Prognosemarker untersucht, um eine Aussage über das Überleben der Patientinnen vorhersagen zu können oder mögliche unnötige Therapien zu vermeiden (72).
Die Diagnose der Präeklampsie ist oftmals mit längeren stationären Aufenthalten verbunden, die viel Zeit und Kosten in der Klinik in Anspruch nehmen und auch zu Überdiagnostik und Übertherapien führen können.

Aufgrund von mangelnden frühzeitigen diagnostischen Testmöglichkeiten zur Früherkennung beziehungswiese Prognosebestimmung einer Präeklampsie wäre es wünschenswert, dass auch die löslichen Formen von PD-L1 und VISTA im Blut zukünftige Prognosemarker bilden könnten. Da es sich jedoch um eine erniedrigte Expression in Präeklampsie-positiven Patientinnen handelt, ist dies zum aktuellen Zeitpunkt noch unrealisierbar.
Vielleicht könnten die in weiteren Studien geplanten Untersuchungen von Nabelschnurblut und Frischgewebe von präeklamptischen Patientinnen hierzu neue Erkenntnisse bringen.

In einer Studie um Tian et al. aus dem Jahr 2016 wurden bereits Therapieansätze an präeklamptischen Ratten untersucht. Auch diese Studie zeigte eine abgewandelte Aktivität des PD-1/PD-L1 Pfads und erprobte daraufhin die Therapie der Präeklampsie an Ratten mittels PD-L1-Fc (Fc-Domäne; kleiner extrazellulärer Anteil des Immunoglobulins), einem Aktivator des Signalwegs. Es kam zur deutlichen Verbesserung der Präeklampsie-Symptomatik der Ratten (72).
Als Zukunftsvision könnte dieser Therapieansatz auch für die Behandlung der Präeklampsie am Menschen dienen. Auf dem Weg dahin müssten jedoch noch diverse Hürden genommen werden, da eine möglichst lokale und nebenwirkungsfreie Therapie angestrebt werden muss. Daher wäre die Entwicklung eines lokal wirkenden Aktivators an der Plazenta erstrebenswert.

Abschließend wird deutlich, dass diese Arbeit uns eine erste Antwort auf die Frage gibt, ob Immuncheckpoints in der Präeklampsie erniedrigt sind und damit eine Rolle in der immunologischen Regulation der Präeklampsie spielen.
Außerdem bietet diese Pilotstudie die Möglichkeit der Etablierung von weiteren Forschungsprojekten, die die hier bereits erlangten Ergebnisse weiter untermauern können und die die Medizin im besten Fall zu einer frühzeitigen diagnostischen Testmöglichkeit zur Früherkennung, Prognosebestimmung oder möglichen Therapieansätzen der Präeklampsie bringen könnte.

5 Zusammenfassung

Die Präeklampsie gehört zur Gruppe der hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft und ist in ihrer klassischen Form durch Bluthochdruck (≥ 140/90 mmHg) und Proteinurie gekennzeichnet.
In der Regel handelt es sich um eine Erkrankung, die sich ab der 20. Schwangerschaftswoche entwickelt und etwa 2 % aller Schwangerschaften in Europa betrifft.
Die Plazenta spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Präeklampsie, die genaue Ätiologie ist jedoch noch nicht vollständig geklärt - eine gestörte mütterlich-fetale Immuntoleranz wird diskutiert.
Diese Pilotstudie konzentriert sich auf die immunologischen Hintergründe dieser komplexen schwangerschaftsassoziierten Erkrankung und analysiert insbesondere den Einfluss der Immuncheckpoints Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) und V-Domain Immunoglobulin-Suppressor der T-Zell-Aktivierung (VISTA) auf die Entwicklung der Schwangerschaft. Beide haben immunsuppressiven Einfluss, indem sie zytotoxische Zellen blockieren, so zu Immuntoleranz führen und Autoimmunität verhindern. Daher erwarteten wir bei Präeklampsie-Patientinnen eine verminderte Expression von PD-L1 und VISTA. Diese konnte auch bereits in anderen Studien für PD-L1 gezeigt werden.
Für die Untersuchungen wurde fixiertes Plazentagewebe von Patientinnen mit Präeklampsie und gesunde Plazenten verwendet. Die Gewebeschnitte wurden dann mit einer immunhistochemischen Färbung mit einer Meerrettichperoxidase und dem Chromogen 3,3-Diaminobenzidin (DAB) unter dem Mikroskop untersucht.
Eine Gruppe von 10 präeklamptischen und 10 gesunden Patientinnen waren Teil dieser Pilotstudie. Alle wurden im Jahr 2021 in der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Klinikums Oldenburg AöR entbunden.
Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte mit Hilfe der Software FIJI ImageJ und ermöglichte eine Trendanalyse der ersten Ergebnisse bezüglich der Expression von PD-L1 und VISTA in präeklamptischen im Vergleich zu gesunden Plazenten.
Anschließend wurde die RNS isoliert, um eine qRT-PCR (quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion) durchzuführen.
Mit Hilfe dieser qRT-PCR konnte eine Genstudie durchgeführt werden. Sie zeigte eine signifikante Abnahme der VISTA Expression bei Präeklampsie, im Vergleich zu gesunden Plazenten. Im Gegensatz dazu waren die Ergebnisse bezüglich der Abnahme der Expression von PD-L1 bei Präeklampsie nicht signifikant.
Unsere Ergebnisse konnten die Vorergebnisse einer reduzierten PD-L1 Expression nicht bestätigen. Dies ist mit technischen Faktoren zu begründen. Die Studien, die diese Reduktion

sehen, nutzten ausschließlich die maternale-fetale Übergangszone der Plazenta, während wir Stanzen aus verschiedenen Plazentabereichen nutzen mussten.
Trotz dieser nicht optimalen Proben konnten wir ein signifikantes Ergebnis für VISTA erlangen. Das spricht für eine zentrale Rolle dieses Immuncheckpoints bei der Immuntoleranz in der Schwangerschaft. Bisher gab es keinerlei Studien zu VISTA in Präeklampsie Plazenten, sodass diese Pilotstudie die Grundlage für weitere Studien über VISTA in Präeklampsie legt. Das langfristige Ziel stellt die Entwicklung von Prognosemarkern und die mögliche Behandlung der Präeklampsie hinsichtlich der immunologischen Ätiologie dar.

6 Summary

Preeclampsia belongs to the group of hypertensive disorders in pregnancy and is characterized in its classic form by hypertension (≥ 140/90 mmHg) and proteinuria.
It is usually a condition that develops from the 20th week of pregnancy and affects about 2% of all pregnancies in Europe.
The placenta plays a key role in the development of preeclampsia, but the exact etiology is not fully understood - impaired maternal-fetal immune tolerance is discussed.
This pilot study focuses on the immunological background of this complex pregnancy-associated disease, in particular analyzing the influence of the immune checkpoints programmed death ligand 1 (PD-L1) and V-domain immunoglobulin suppressor of T-cell activation (VISTA) on pregnancy development. Both have immunosuppressive effects by blocking cytotoxic cells, leading to immune tolerance and preventing autoimmunity. We therefore expected to see reduced expression of PD-L1 and VISTA in preeclampsia patients. This has been shown in other studies for PD-L1.
Fixed placental tissue from patients with positive preeclampsia and healthy placentas were used for the studies. The tissue sections were then immunohistochemically stained with a horseradish peroxidase and the chromogen 3,3-diaminobenzidine (DAB) under a microscope. A group of 10 preeclamptic and 10 healthy women were included in this pilot study. All of these patients gave birth in 2021 at the Clinic for Obstetrics and Gynecology of the Oldenburg Hospital AöR.
Histological slides were analyzed using FIJI ImageJ software, allowing trend analysis of initial results regarding the expression of PD-L1 and VISTA in preeclamptic placentas compared to healthy placentas.
RNA was then isolated for qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction).
This qRT-PCR was used to perform a gene study. It showed a significant decrease in VISTA expression in preeclampsia, compared to healthy placentas. However, the results for the decrease in PD-L1 expression in preeclampsia were not significant.
Our results could not confirm the preliminary findings of reduced PD-L1 expression. This can be explained by technical factors. The studies that found this reduction only used the maternal-fetal transition zone of the placenta, whereas we had to use samples from different areas of the placenta.
Despite these less optimal samples, we were able to obtain a significant result for VISTA.
This supports the central role for this immune checkpoint in immune tolerance during pregnancy. To date, there have been no studies of VISTA in preeclamptic placentas, so this pilot study lays the groundwork for further studies of VISTA in preeclampsia. The long-term goal is to develop prognostic markers and potential treatments of preeclampsia with respect to its immunological etiology.

7 Literaturverzeichnis

1. Uhl, Bernhard. Gynäkologie und Geburtshilfe compact - Alles für Station, Praxis und Facharztprüfung. 6. Stuttgart: Thieme; 2018.
2. Schneider H, Baumann M. Präeklampsie, Pathogenese und Vorhersage. Gynäkologe. 1. März 2013;46(3):193–8.
3. Espinoza J, Vidaeff A, Pettker CM, Simhan H. Gestational Hypertension and Preeclampsia. ACOG. 2020;135(6).
4. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. [Miscellaneous Article]. Circulation Research. März 2019;124(7):1094–112.
5. Deer E, Reeve KE, Amaral L, Vaka VR, Franks M, Campbell N, u. a. CD4+ T cells cause renal and placental mitochondrial oxidative stress as mechanisms of hypertension in response to placental ischemia. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 1. Januar 2021;320(1):F47–54.
6. Hid Cadena R, Reitsema RD, Huitema MG, van Sleen Y, van der Geest KSM, Heeringa P, u. a. Decreased Expression of Negative Immune Checkpoint VISTA by CD4+ T Cells Facilitates T Helper 1, T Helper 17, and T Follicular Helper Lineage Differentiation in GCA. Frontiers in Immunology. 2019;10:1638.
7. Zhao Y, Zheng Q, Jin L. The Role of B7 Family Molecules in Maternal–Fetal Immunity. Frontiers in Immunology. 2020;11:458.
8. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. Lancet. 1. April 2006;367(9516):1066–74.
9. Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH. Competing Risks Model in Early Screening for Preeclampsia by Biophysical and Biochemical Markers. FDT. 2013;33(1):8–15.
10. O'Gorman N, Wright D, Poon LC, Rolnik DL, Syngelaki A, Wright A, u. a. Accuracy of competing-risks model in screening for pre-eclampsia by maternal factors and biomarkers at 11–13 weeks' gestation. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 2017;49(6):751–5.
11. Carter EB, Goetzinger K, Tuuli MG, Odibo L, Cahill AG, Macones GA, u. a. Evaluating the Optimal Definition of Abnormal First-Trimester Uterine Artery Doppler Parameters to Predict Adverse Pregnancy Outcomes. Journal of Ultrasound in Medicine. 2015;34(7):1265–9.
12. Dragan I, Georgiou T, Prodan N, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for pre-eclampsia using sFlt-1/PlGF ratio cut-off of 38 at 30–37 weeks' gestation. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 2017;49(1):73–7.
13. Liu Y, Zhao Y, Yu A, Zhao B, Gao Y, Niu H. Diagnostic accuracy of the soluble Fms-

like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio for preeclampsia: a meta-analysis based on 20 studies. Arch Gynecol Obstet. 1. September 2015;292(3):507–18.

14. Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, Verlohren S, Brennecke S, Chantraine F, u. a. Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 2015;45(3):241–6.

15. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, u. a. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. N Engl J Med. 7. Januar 2016;374(1):13–22.

16. Sovio U, Gaccioli F, Cook E, Hund M, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Prediction of Preeclampsia Using the Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1 to Placental Growth Factor Ratio. Hypertension. April 2017;69(4):731–8.

17. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, u. a. Prevention of Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction With Aspirin Started in Early Pregnancy: A Meta-Analysis. Obstetrics & Gynecology. August 2010;116(2 Part 1):402–14.

18. Bujold E, Morency AM, Roberge S, Lacasse Y, Forest JC, Giguère Y. Acetylsalicylic Acid for the Prevention of Preeclampsia and Intra-uterine Growth Restriction in Women with Abnormal Uterine Artery Doppler: A Systematic Review and Meta-analysis. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada. 1. September 2009;31(9):818–26.

19. Roberge S, Giguère Y, Villa P, Nicolaides K, Vainio M, Forest JC, u. a. Early Administration of Low-Dose Aspirin for the Prevention of Severe and Mild Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. Am J Perinatol. August 2012;29(7):551–6.

20. Morris RK, Riley RD, Doug M, Deeks JJ, Kilby MD. Diagnostic accuracy of spot urinary protein and albumin to creatinine ratios for detection of significant proteinuria or adverse pregnancy outcome in patients with suspected pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. BMJ. 9. Juli 2012;345:e4342.

21. Wiwanitkit V. Periodic urinary protein creatinine ratio for predicting significant proteinuria in preeclampsia in different alternatives: time effectiveness analysis. Arch Gynecol Obstet. 1. März 2010;281(3):571–3.

22. Ochsenbein-Kölble N, Roos M, Gasser T, Zimmermann R. Cross-sectional study of weight gain and increase in BMI throughout pregnancy. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 1. Februar 2007;130(2):180–6.

23. Kehl et al. S2k-Leitlinie Geburtseinleitung. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG); 2020.

24. Bouteiller PL, Bensussan A. Up-and-down immunity of pregnancy in humans [Internet]. F1000Research; 2017 [zitiert 2. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://f1000research.com/articles/6-1216

25. Graf I, Hecher K, Arck P. Immunologie der Schwangerschaft: von lokalen und systemischen Protagonisten zum High-Content-Immunprofiling. Gynäkologie. September 2022;55(9):631–9.
26. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. Nat Rev Immunol. September 2002;2(9):656–63.
27. Burmester GR, Pezzutto A. Color Atlas of Immunology. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2003.
28. Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and Apoptotic Cell Clearance During Pregnancy. American Journal of Reproductive Immunology. 2004;51(4):275–82.
29. Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. Frontiers in Immunology [Internet]. 2019 [zitiert 2. Februar 2023];10. Verfügbar unter: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02317
30. Gu Y, Morgan J, Lewis DF, Cooper DB, McCathran CE, Wang Y. Maternal soluble PD-1 levels are significantly increased in women with preeclampsia. American Journal of Reproductive Immunology. 2020;83(1):e13193.
31. Saito S. Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. Immunology & Cell Biology. 2010;88(6):615–7.
32. Lines JL, Pantazi E, Mak J, Sempere LF, Wang L, O'Connell S, u. a. VISTA Is an Immune Checkpoint Molecule for Human T Cells. Cancer Res. 1. April 2014;74(7):1924–32.
33. Liu J, Yuan Y, Chen W, Putra J, Suriawinata AA, Schenk AD, u. a. Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses. Proc Natl Acad Sci USA. 26. Mai 2015;112(21):6682–7.
34. Wang L, Le Mercier I, Putra J, Chen W, Liu J, Schenk AD, u. a. Disruption of the immune-checkpoint VISTA gene imparts a proinflammatory phenotype with predisposition to the development of autoimmunity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 14. Oktober 2014;111(41):14846–51.
35. Torphy RJ, Schulick RD, Zhu Y. Newly Emerging Immune Checkpoints: Promises for Future Cancer Therapy. International Journal of Molecular Sciences. Dezember 2017;18(12):2642.
36. Nowak EC, Lines JL, Varn FS, Deng J, Sarde A, Mabaera R, u. a. Immunoregulatory Functions of VISTA. Immunol Rev. März 2017;276(1):66–79.
37. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, u. a. Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. Science. 12. Januar 2001;291(5502):319–22.
38. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune

responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. Nat Immunol. Dezember 2013;14(12):1212–8.
39. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. Annu Rev Immunol. 1. April 2008;26(1):677–704.
40. Deng J, Le Mercier I, Kuta A, Noelle RJ. A New VISTA on combination therapy for negative checkpoint regulator blockade. j immunotherapy cancer. Dezember 2016;4(1):86.
41. ElTanbouly MA, Zhao Y, Nowak E, Li J, Schaafsma E, Le Mercier I, u. a. VISTA is a checkpoint regulator for naïve T cell quiescence and peripheral tolerance. Science. 17. Januar 2020;367(6475):eaay0524.
42. Xu W, Hiếu T, Malarkannan S, Wang L. The structure, expression, and multifaceted role of immune-checkpoint protein VISTA as a critical regulator of anti-tumor immunity, autoimmunity, and inflammation. Cell Mol Immunol. Mai 2018;15(5):438–46.
43. Bdolah Y, Palomaki GE, Yaron Y, Bdolah-Abram T, Goldman M, Levine RJ, u. a. Circulating angiogenic proteins in trisomy 13. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1. Januar 2006;194(1):239–45.
44. Boyd HA, Tahir H, Wohlfahrt J, Melbye M. Associations of Personal and Family Preeclampsia History With the Risk of Early-, Intermediate- and Late-Onset Preeclampsia. American Journal of Epidemiology. 1. Dezember 2013;178(11):1611–9.
45. Bawah AT, Yeboah FA, Nanga S, Alidu H, Ngala RA. Serum adipocytokines and adiposity as predictive indices of preeclampsia. Clinical Hypertension. 1. Oktober 2020;26(1):19.
46. Wang Z, Wang P, Liu H, He X, Zhang J, Yan H, u. a. Maternal adiposity as an independent risk factor for pre-eclampsia: a meta-analysis of prospective cohort studies. Obesity Reviews. 2013;14(6):508–21.
47. Valencia-Ortega J, Saucedo R, Peña-Cano MI, Hernández-Valencia M, Cruz-Durán JG. Immune tolerance at the maternal-placental interface in healthy pregnancy and pre-eclampsia. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2020;46(7):1067–76.
48. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, u. a. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2004 [zitiert 25. November 2022]. Verfügbar unter: https://www.jci.org/articles/view/22991/pdf
49. Birdir C, Aktas B, Kimmig R, Köninger A. Präeklampsiescreening im ersten Trimenon. Gynäkologe. 1. Mai 2015;48(5):394–8.
50. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis. Physiology. Juni 2009;24(3):147–58.
51. Parham P, Moffett A. Variable NK cell receptors and their MHC class I ligands in immunity, reproduction and human evolution. Nat Rev Immunol. Februar 2013;13(2):133–44.

52. Moffett A, Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. J Clin Invest. 1. Mai 2014;124(5):1872–9.
53. Jena MK, Nayak N, Chen K, Nayak NR. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. Arch Immunol Ther Exp. 1. Oktober 2019;67(5):295–309.
54. Herse F, LaMarca B. Angiotensin II Type 1 Receptor Autoantibody (AT1-AA)-Mediated Pregnancy Hypertension. American Journal of Reproductive Immunology. 2013;69(4):413–8.
55. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, u. a. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT_1 receptor. J Clin Invest. 1. April 1999;103(7):945–52.
56. Xia Y, Kellems RE. Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibodies and Hypertension. Circulation Research. 21. Juni 2013;113(1):78–87.
57. Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the Pathophysiological Implications and Clinical Role of Angiogenic Factors in Pregnancy. Fetal Diagn Ther. 2015;37(2):81–92.
58. Saleh AA, Bottoms SF, Farag AM, Dombrowski MP, Welch RA, Norman G, u. a. Markers for endothelial injury, clotting and platelet activation in preeclampsia. Arch Gynecol Obstet. September 1992;251(3):105–10.
59. Kainer F. Facharztwissen Geburtsmedizin. Elsevier Health Sciences; 2021. 1032 S.
60. Jiang L, Tang C, Gong Y, Liu Y, Rao J, Chen S, u. a. PD-1/PD-L1 regulates Treg differentiation in pregnancy-induced hypertension. Braz J Med Biol Res. 2018;51(8):e7334.
61. Zhang Y, Liu Z, Tian M, Hu X, Wang L, Ji J, u. a. The altered PD-1/PD-L1 pathway delivers the ‘one-two punch’ effects to promote the Treg/Th17 imbalance in pre-eclampsia. Cell Mol Immunol. Juli 2018;15(7):710–23.
62. Hauk A. Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. Biologie in unserer Zeit. 2013;43(5):278–278.
63. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods. 1. Dezember 2001;25(4):402–8.
64. Loos CM van der. Multiple Immunoenzyme Staining: Methods and Visualizations for the Observation With Spectral Imaging. J Histochem Cytochem. 1. April 2008;56(4):313–28.
65. Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. Bio-protocol. 20. Dezember 2019;9(24):e3465–e3465.
66. Landini G. Advanced shape analysis with ImageJ. Proceedings of the Second ImageJ User and Developer Conference [Internet]. Luxembourg; 2008. p116-121 S. Verfügbar unter: http://www.mecourse.com/landinig/software/software.html
67. SHAPIRO SS, WILK MB. An analysis of variance test for normality (complete samples)†. Biometrika. 1. Dezember 1965;52(3–4):591–611.
68. Kronthaler F. Statistik angewandt, Datenanalyse ist (k)eine Kunst. Berlin, Heidelberg:

Springer Spektrum; 2016.
69. Backhaus K, Erichson B, Gensler S, Weiber R, Weiber T. Multivariante Analysemethoden - Eine anwendungsorientierte Einführung. 16. Aufl. Springer Gabler; 2021. 663 S.
70. Hsu P, Nanan RKH. Innate and Adaptive Immune Interactions at the Fetal–Maternal Interface in Healthy Human Pregnancy and Pre-Eclampsia. Front Immunol. 28. März 2014;5:125.
71. Yuan L, Tatineni J, Mahoney KM, Freeman GJ. VISTA: A Mediator of Quiescence and a Promising Target in Cancer Immunotherapy. Trends Immunol. März 2021;42(3):209–27.
72. Tian M, Zhang Y, Liu Z, Sun G, Mor G, Liao A. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in pre-eclampsia and regulates T cell responses in pre-eclamptic rats. Sci Rep. 9. Juni 2016;6(1):27683.
73. Scirocchi F, Strigari L, Di Filippo A, Napoletano C, Pace A, Rahimi H, u. a. Soluble PD-L1 as a Prognostic Factor for Immunotherapy Treatment in Solid Tumors: Systematic Review and Meta-Analysis. Int J Mol Sci. 21. November 2022;23(22):14496.

8 Anhang

8.1 Ergänzendes Material

Tabelle 11: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Eismaschine	Scotsman
Deckgläschen	Carl Roth
Mikroskop Axio vert A1	Zeiss
PCR-Block (CFX Connect Real-Time System)	Bio-Rad
PCR-Platten	Sarstedt
Pipetten Proline Plus	Sartorius
Reaktionsgefäße	Sarstedt/Laborbedarf
Rotationsmikrotom HistoCore BIOCUT	Leica
Photometer BioDrop DUO	Fisher Scientific
SuperFrost Objekträger Menzel	neolab
Vortex-Schüttler	CellMedia
Zentrifugen	Heraeus, neolab

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Fetales Kälberserum	VWR
3 %-iges H_2O_2	Carl Roth
5,5 µl β-Mercaptoethanol	Carl Roth
Chloroform	Sigma Aldrich
Citrat	Zytomed Systems
Deionisiertes Wasser	Laborbedarf
DEPC-H_2O	Carl Roth
EDTA	Zytomed Systems
Eindeckmedium	Eukitt
Ethanol	Laborbedarf
Farbstoff SYBR-Green	Bio-Rad
FC Block	Fisher Scientific
Glykogen	Merck
Hämalaun	Merck
iScript Reaction Mix	Bio-Rad
iScript Reverse Transkriptase	Bio-Rad
Isopropanol	Carl Roth
Natriumacetat (pH 5,5)	Fisher Scientific
NaCl	Laborbedarf
Proteinase K	Merck
ROTI-Aqua-Phenol (pH 7,7)	Carl Roth
Tris	Laborbedarf

Tween 20 0,05%	Bio-Rad
Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad
Waschpuffer	Zytomed Systems
Xylol	Laborbedarf

Tabelle 13: Verwendete Softwares, Programme

Weiteres (Softwares, Programme)	**Hersteller/Entwickler**
Gerätesoftware CFX Maestro	Bio-Rad
iScript cDNA Synthese Programm	Bio-Rad
Software FIJI ImageJ	Wayne Rasband

Tabelle 14: qRT-PCR Quantifizierungszyklus (Cq) Rohwerte (Mittelwerte)

Patientin	**Block-Nr.**	**Präeklampsie-Status**	**Cq Rohwerte (Mittelwerte) qRT-PCR**			
			PD-L1	**VISTA**	**GAPDH**	**RPLP0**
1.	H40084-21D	Negativ	36,055	33,61	33,585	-
2.	H40209-21D	Negativ	34,34	33,085	33,965	-
3.	H40548-21C	Negativ	34,57	33,055	34,61	-
4.	H40603-21C	Negativ	37,72	32,81	33,16	37,97
5.	H40602-21D	Negativ	34,09	33,045	32,07	-
6.	H40919-21D	Negativ	34,58	33,99	32,42	-
7.	H40007-21D	Negativ	33,68	34,82	27,49	35,04
8.	H40364-21C	Negativ	34,82	34,445	28,585	39,29
9.	H40918-21C	Negativ	37,975	33,75	35,29	-
10.	H40975-21C	Negativ	34,26	35,53	27,625	-
11.	H40037-21D	Positiv	31,303	32,52	30,23	-
12.	H42417-21D	Positiv	34,50	34,375	28,635	34,625
13.	H43169-21C	Positiv	34,25	32,39	32,535	37,73
14.	H43690-21C	Positiv	33,825	33,535	32,40	39,63
15.	H44949-21H	Positiv	32,98	34,035	31,80	38,64
16.	H45386-21H	Positiv	33,25	33,675	32,35	39,86
17.	H47430-21D	Positiv	33,955	33,55	32,05	36,485
18.	H47703-21D	Positiv	32,256	32,26	30,975	34,42
19.	H49577-21C	Positiv	30,585	32,2	25,03	31,37
20.	H50355-21E	Positiv	33,445	34,46	27,89	34,335

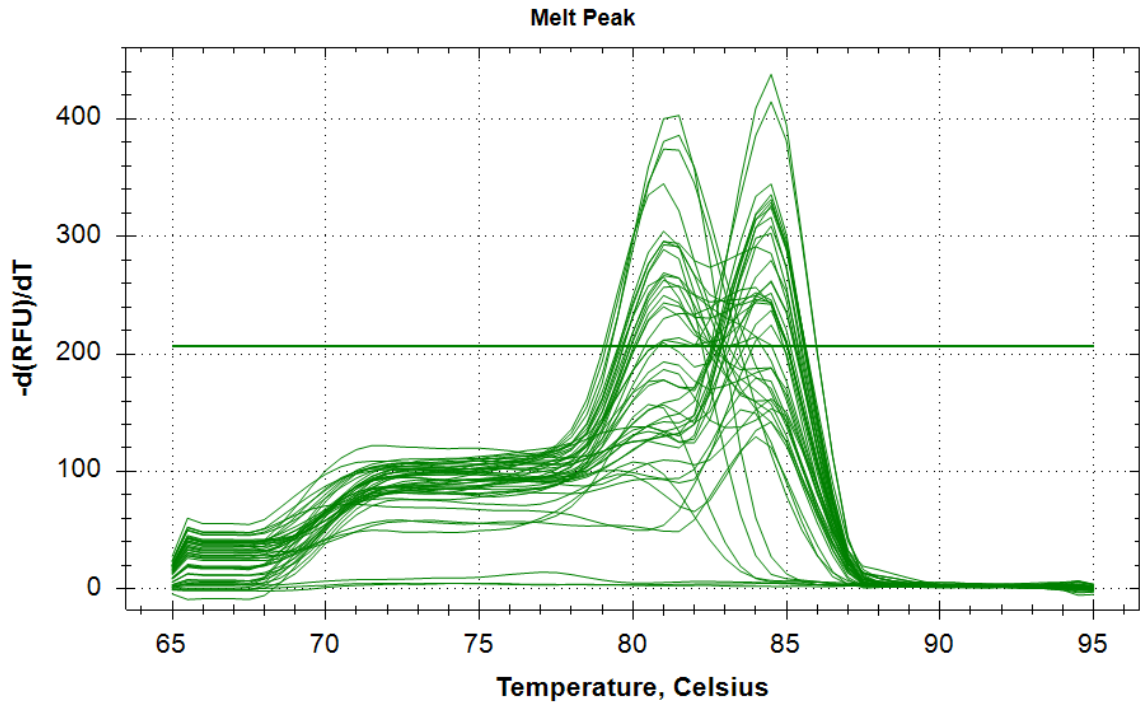

Abbildung 27: Beispiel Schmelzkurven von einer PD-L1 qRT-PCR Platte

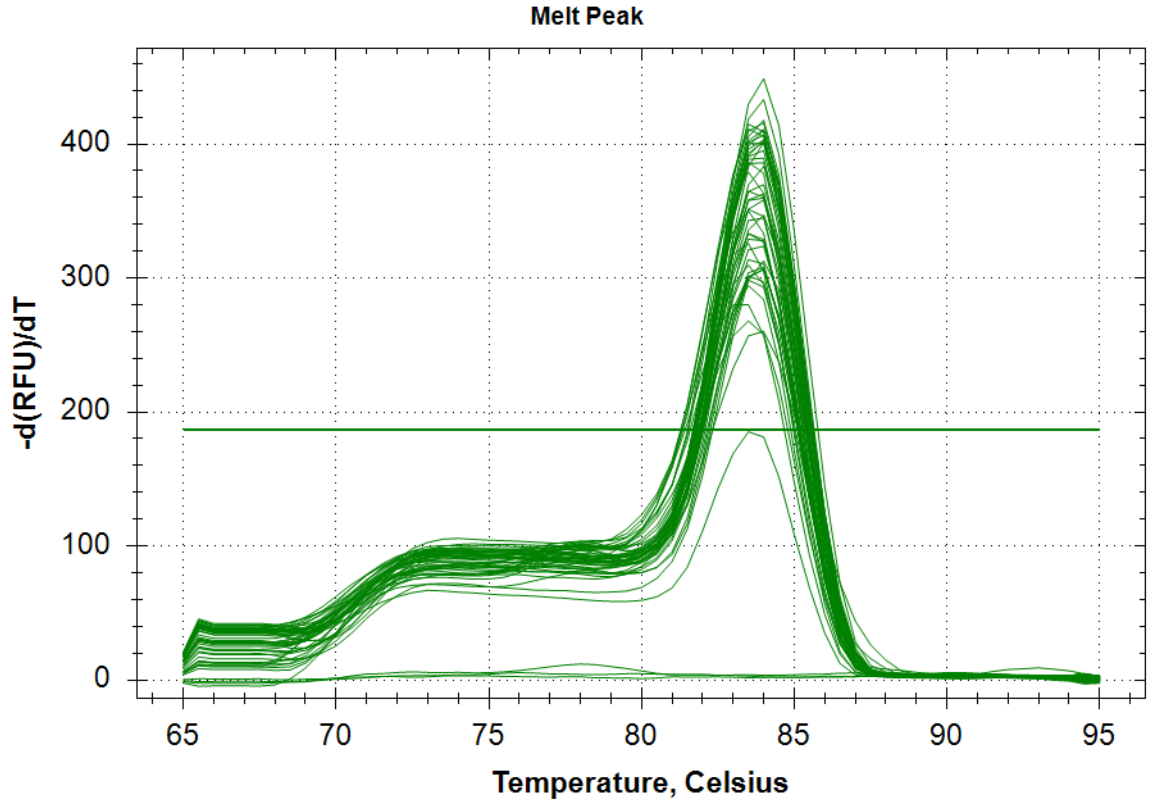

Abbildung 28: Beispiel Schmelzkurven von einer VISTA qRT-PCR Platte

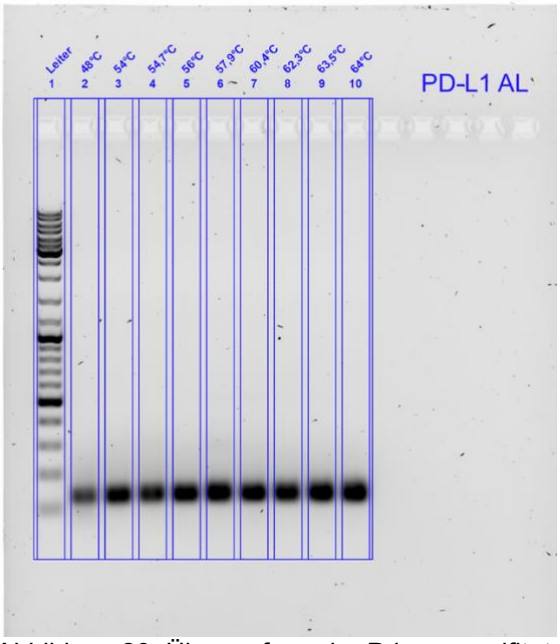

Abbildung 29: Überprüfung der Primerspezifität von PD-L1 bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen per 1,5 %igen Agarosegel

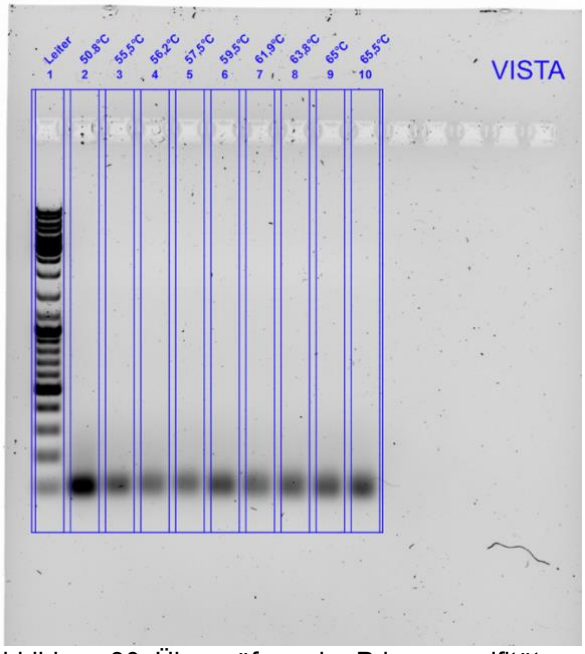

Abbildung 30: Überprüfung der Primerspezifität von VISTA bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen per 1,5 %igen Agarosegel

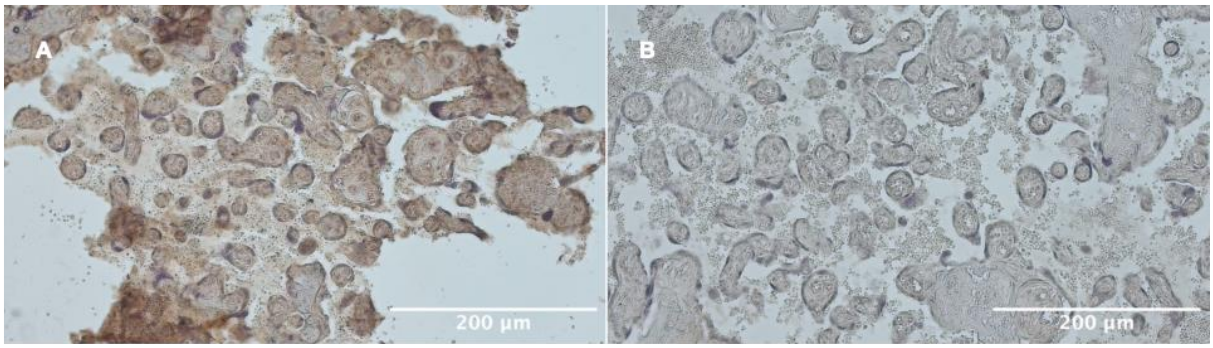

Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung von Plazentagewebe mit Hämalaun als Kernsignal sowie IgG-Kontrolle Maus (PD-L1) & IgG-Kontrolle Kaninchen (VISTA) als DAB-Signal in 10-facher Vergrößerung. A: IgG-Kontrolle Maus (PD-L1). B: IgG-Kontrolle Kaninchen (VISTA).

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Empfohlene Laborparameter bei Hypertonie in der Schwangerschaft (1) 5
Tabelle 2: Verwendetes Pufferrezept 20
Tabelle 3: Verwendete Antikörper 21
Tabelle 4: Verwendetes Kit 21
Tabelle 5: Verwendete Primer 21
Tabelle 6: qRT-PCR-Ansätze 25
Tabelle 7: Primerspezifische Schwellenschwerte 26
Tabelle 8: Volcano Plot 34
Tabelle 9: ANOVA Varianzanalyse 34
Tabelle 10: Shapiro-Wilk Test zum Vorweisen einer Normalverteilung 35
Tabelle 11: Verwendete Geräte 66
Tabelle 12: Verwendete Chemikalien 66
Tabelle 13: Verwendete Softwares, Programme 67
Tabelle 14: qRT-PCR Quantifizierungszyklus (Cq) Rohwerte (Mittelwerte) 67

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Immunzellen der angeboren und der adaptiven Immunität in der Schwangerschaft (25) 7
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Ligand-oder-Rezeptor Paradigma von VISTA hinsichtlich der Regulierung von T-Zellen (42) 11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entstehung der Präeklampsie. Genetische Faktoren, immunologische Faktoren, andere maternale Faktoren verursachen die plazentare Dysfunktion, was wiederum zur Freisetzung von antiangiogenetischen Faktoren und anderen Entzündungsmediatoren führt (4) 13
Abbildung 4: Trophoblastendifferenzierung (48) 14
Abbildung 5: Abnormale Plazentation in der Präeklampsie (50) 15
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der immunologischen Regulation der Präeklampsie (rot umrandet = Einfluss der negativen Immuncheckpoints PD-1/PD-L1; dunkelrot ausgefüllt = Hauptmerkmale der Phase 2 der Präeklampsie) (Quelle: Studienprotokoll „Eine Pilotstudie zur Erforschung der immunologischen Regulation der Präeklampsie“ von Dr. rer. nat. L. Dübbel) 16
Abbildung 7: Relative Quantifizierung der PD-L1 und VISTA Expression im Plazentagewebe (Präeklampsie-negativ versus Präeklampsie-positiv) in Form eines Box-and-Whisker Plots 31

Abbildung 8: Relative Quantifizierung der PD-L1 und VISTA Expression im Plazentagewebe (Präeklampsie-negativ versus Präeklampsie-positiv) in Form eines Dot Plots.....33
Abbildung 9: Volcano Plot zum Beweis der statistischen Signifikanz. Die biologische Kontrollgruppe wird von den Präeklampsie-negativen Patientinnen gebildet. Die Präeklampsie-positiven Patientinnen bilden die experimentelle biologische Gruppe. 34
Abbildung 10: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des mittleren Grauwerts bei VISTA.....36
Abbildung 11: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des mittleren Grauwerts bei PD-L1.....37
Abbildung 12: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Negativität. Dabei wurde der mittlere Grauwert betrachtet. 38
Abbildung 13: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Positivität. Dabei wurde der mittlere Grauwert betrachtet. 39
Abbildung 14: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des DAB-Signals in Prozent bei VISTA. 40
Abbildung 15: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des DAB-Signals in Prozent bei PD-L1. 40
Abbildung 16: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Negativität. Dabei wurde die Fläche des DAB-Signals in Prozent betrachtet. 41
Abbildung 17: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Positivität. Dabei wurde die Fläche des DAB-Signals in Prozent betrachtet. 42
Abbildung 18: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich Intensität/Nukleus bei VISTA. 42
Abbildung 19: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich Intensität/Nukleus bei PD-L1.....43
Abbildung 20: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Negativität. Dabei wurde die Intensität/Nukleus betrachtet.....44
Abbildung 21: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Positivität. Dabei wurde die Intensität/Nukleus betrachtet. 45
Abbildung 22: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des Anteils positiver Kerne in Prozent bei VISTA.....45

Abbildung 23: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder hinsichtlich des Anteils positiver Kerne in Prozent bei PD-L1.....46
Abbildung 24: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Negativität. Dabei wurde der Anteil positiver Kerne in Prozent betrachtet. 47
Abbildung 25: Auswertung der immunhistochemisch gefärbten mikroskopischen Bilder als Korrelationsanalyse zwischen PD-L1 und VISTA bei Präeklampsie-Positivität. Dabei wurde der Anteil positiver Kerne in Prozent betrachtet. 48
Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung von Plazentagewebe mit Hämalaun als Kernsignal sowie PD-L1/VISTA als DAB-Signal in 10-facher Vergrößerung. A: PD-L1 als DAB-Signal bei einer Präeklampsie-positiven Plazenta. B: VISTA als DAB-Signal bei einer Präeklampsie-positiven Plazenta. C: PD-L1 als DAB-Signal bei einer Präeklampsie-negativen Plazenta, B: VISTA als DAB-Signal bei einer Präeklampsie-negativer Plazenta. 48

9 Danksagung

Am Ende dieser Dissertation angekommen, möchte ich ein großes Dankeschön an all diejenigen aussprechen, die mich unterstützt und vor allem auch immer wieder ermutigt haben, die Arbeit an dieser Dissertation neben dem Klinikalltag fortzusetzen und durchzuziehen.

Vielen Dank, Herr Professor Malik, für den Einsatz als Erstbetreuer, die wertvollen Ratschläge sowie die Unterstützung.

Besonders hervorzuheben, bist du, liebe Lena. Als meine Zweitbetreuerin warst du einer meiner wichtigsten Ansprechpartnerinnen. Ohne deine große Hilfe und dein unermüdliches Engagement vom Beginn der Arbeit bis hin zu den finalen Schritten wäre das neben dem Klinikalltag niemals für mich möglich gewesen ohne dich. Jederzeit warst du erreichbar und ich konnte stets auf deine Unterstützung zählen. Danke, danke, Lena!

Während der Zeit im Labor habe ich sehr viel Hilfe bei der Planung und Einarbeitung in die Durchführung der Untersuchungen von dir, liebe Charis, bekommen. Mit deiner geduldigen und netten Art sowie deiner Hilfsbereitschaft hast du mir die Zeit im Labor an meinen Urlaubstagen sehr angenehm gemacht – vielen lieben Dank!

Und da das alles ohne meine Familie und meine Freunde und Freundinnen im Hintergrund gar nicht möglich gewesen wäre, gilt außerdem ein besonderes Dankeschön euch.

Ihr seid diejenigen, die mich am besten kennen, mir immer beistanden und mich ermutigen konnten, an dieser Arbeit weiterzumachen und sie schlussendlich auch fertigzustellen.

Vielen Dank an alle, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.
Ich versichere, dass diese Arbeit weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat und dass ich die Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg befolgt habe. Weiterhin versichere ich, dass im Zusammenhang mit dem Promotionsvorhaben keine kommerziellen Vermittlungs- oder Beratungsdienste (Promotionsberatung) in Anspruch genommen worden sind.

(Ort, Datum) (Kristin Wedermann)

Hiermit erkläre ich außerdem, dass keine der hier erlangten Ergebnisse in anderen Abschlussarbeiten erlangt, benutzt oder veröffentlicht wurden.

(Ort, Datum) (Kristin Wedermann)