

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der
Medizinischen Hochschule Hannover

**Vitamin D₃, Proteine der DNA-
Schadensantwort und die Regulation von
oxidativem Stress in der Präeklampsie**

Dissertation zur Erlangung des

Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von

Tim Büder

aus Dresden

Hannover 2024

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am: 13.08.2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Michael P. Manns

Betreuerin der Arbeit: Prof. Dr. med. Frauke von Versen-Höynck

Co-Betreuung: Dr. rer. nat. Bianca Schröder-Heurich

1. Referentin: Prof. Dr. med. Corinna Peter

2. Referentin: Prof. Dr. med. Isimi Staboulidou

Tag der mündlichen Prüfung: 13.08.2024

Prüfungsausschuss

Vorsitz: Prof. Dr. med. Thomas Werfel

1. Prüferin: Prof. Dr. med. Heike Bantel

2. Prüfer: Prof. Dr. med. Ralph Gaulke

Gewidmet meiner Familie

„Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.“

Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung.....	5
2.1	Präeklampsie	5
2.1.1	Epidemiologie.....	5
2.1.2	Diagnosekriterien.....	5
2.1.3	Klinische Symptomatik	6
2.1.4	Pathophysiologie	6
2.1.5	Risikofaktoren	8
2.1.6	Prävention und Therapie.....	8
2.1.7	Komplikationen	9
2.2	Endotheliale Vorläuferzellen	9
2.3	DNA-Schäden und -Reparatur	10
2.3.1	DNA-Schäden und oxidativer Stress	10
2.3.2	ATM-gesteuerte DNA-Schadensantwort.....	11
2.4	Vitamin D ₃	14
2.4.1	Biochemischer und physiologischer Hintergrund.....	14
2.4.2	Bedeutung von Vitamin D ₃ für die Präeklampsie.....	15
3	Ziele der Arbeit	16
4	Material und Methoden.....	18
4.1	Chemikalien	18
4.2	Puffer und Lösungen.....	19
4.3	Antikörper	21
4.3.1	Primäre Antikörper	21
4.3.2	Sekundäre Antikörper	22
4.3.3	Antikörperdilutents	22
4.4	Enzyme, Kits, biologische Substanzen, Reagenzien.....	22
4.4.1	Enzyme, biologische Substanzen.....	22
4.4.2	Kits.....	22
4.5	Zellkulturmedien.....	23
4.6	Geräte	23
4.7	Verbrauchsmaterialien	24
4.8	Software	25
4.9	Zellbiologische Methoden.....	25
4.9.1	Auswahl der Studienteilnehmerinnen	25

4.9.2	Zelllinie.....	26
4.9.3	Zellkultur	27
4.9.4	Passagieren und Trypsinieren der Zellen.....	27
4.9.5	Kryokonservierung der Zellen.....	27
4.9.6	Behandlung mit H ₂ O ₂ , 1 % O ₂ und Vitamin D ₃	27
4.10	Immunzytochemie.....	28
4.10.1	Immunzytochemische Färbung.....	28
4.10.2	Analyse von Foci und Mikronuklei	29
4.11	Proteinanalyse mittels Western Blot	29
4.11.1	Proteinextraktion.....	29
4.11.2	Proteinbestimmung.....	30
4.11.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
4.11.4	Immunoblot	31
4.12	Untersuchung der elektrischen Impedanz.....	32
4.13	Bestimmung der basalen intrazellulären oxidativen Stresslevel	33
4.14	Statistische Auswertung.....	33
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Teilprojekt 1: Einfluss von Vitamin D ₃ auf die DNA-Schadenssignalkaskade unter Präeklampie-ähnlichen Stressbedingungen.....	35
5.1.1	Akt-Proteinlevel und -Phosphorylierungsgrade unter dem Einfluss präeklaptischer Stressoren und Vitamin-D ₃ -Behandlung	35
5.1.2	ATM-Proteinlevel und -Phosphorylierungsgrade unter dem Einfluss präeklaptischer Stressoren und Vitamin-D ₃ -Behandlung	41
5.1.3	pCHK2-Proteinlevel unter dem Einfluss präeklaptischer Stressoren und Vitamin- D ₃ -Behandlung	46
5.1.4	pATM-Foci-Anzahl unter dem Einfluss präeklaptischer Stressoren und Vitamin- D ₃ -Behandlung	48
5.1.5	γH2AX-Foci-Anzahl unter dem Einfluss präeklaptischer Stressoren und Vitamin- D ₃ -Behandlung	51
5.1.6	Mikronuklei-Anzahl unter dem Einfluss präeklaptischer Stressoren und Vitamin- D ₃ -Behandlung	55
5.2	Teilprojekt 2: Einfluss der ATM-Inhibition auf den Zell-Index und die intrazellulären oxidativen Stresslevel	58
5.2.1	Einfluss der ATM-Inhibition auf den Zell-Index von ECFC gesunder Schwangerer im Vergleich zu ECFC von Schwangeren mit Präeklampsie	59
5.2.2	Einfluss der ATM-Inhibition auf die intrazellulären oxidativen Stresslevel in ECFC gesunder Schwangerer im Vergleich zu ECFC von Schwangeren mit Präeklampsie ..	68

6	Diskussion	75
6.1	Teilprojekt 1: Einfluss von Vitamin D ₃ auf die Proteine der ATM-basierten DNA-Schadenssignalkaskade unter dem Einfluss präeklaptischer Stressoren in ECFC	75
6.1.1	Akt	75
6.1.2	ATM	76
6.1.3	CHK2	80
6.1.4	γH2AX	81
6.1.5	Mikronuklei	84
6.1.6	Methodische Aspekte	85
6.1.7	Konklusion zu Teilprojekt 1	87
6.2	Teilprojekt 2: Einfluss der ATM-Inhibition auf den Zell-Index und den intrazellulären oxidativen Stresslevel in ECFC gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie	89
6.2.1	Einfluss der ATM-Inhibition auf den Zellindex	89
6.2.2	Einfluss der ATM-Inhibition auf den intrazellulären Stresslevel	91
6.2.3	Konklusion zu Teilprojekt 2	94
7	Zusammenfassung.....	97
8	Anhang	98
9	Abbildungsverzeichnis.....	100
10	Tabellenverzeichnis.....	103
11	Literaturverzeichnis.....	103
12	Lebenslauf.....	117
13	Erklärung nach §2 Absatz 2 Nr. 7 und 8 PromO.....	119
14	Danksagung	120

1 Abkürzungsverzeichnis

Aa.	<i>Arteriae</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BPH	<i>benign prostatic hyperplasia</i>
BRCA1	<i>breast cancer gen 1</i>
CDC25	<i>cell division cycle 25</i>
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CHK2	<i>checkpoint kinase 2</i>
CTRL	Kontrollgruppe
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBP	<i>vitamin D binding protein</i>
DCF	2', 7'- Dichlorodihydrofluoreszein
DCFH-DA	2', 7'-Dichlorodihydrofluoreszindiacetat
DDR	<i>DNA damage response</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DP	D'Agostino-Pearson-Normalverteilungstest
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EBM	<i>endothelial basal medium</i>
ECFC	<i>endothelial colony-forming cells</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM-2	<i>endothelial cell growth medium-2</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
EPC	<i>endothelial progenitor cell</i>
et al.	<i>et alii/aliae</i>
etc.	<i>et cetera</i>
EtOH	Ethanol
FHA	<i>fork head-associated</i>
FI	Fluoreszenzintensität
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
g	g-Kraft (= <i>relative centrifugal force</i>)

GA-1000	Gentamicin und Amphotericin im Verhältnis 1:1000
GTS	Puffer hergestellt aus u.a. Glycin, Tris und SDS
h	Stunde
H2AX	<i>histone family member X</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HELLP	<i>haemolysis, elevated liver enzymes, low platelets</i>
hFGF-B	<i>human fibroblast growth factor-basic recombinant</i>
HIF	Hypoxie-induzierbarer-Faktor
HMW	<i>high molecular weight</i>
HR	homologe Rekombination
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICC	<i>immunocytochemistry</i>
IOS	intrazellulärer oxidativer Stress
IUGR	<i>intrauterine growth restriction</i>
k. A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KW	Kruskal-Wallis-Test
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
M	Molar
MD	Median
MDC1	<i>mediator of DNA-damage checkpoint protein 1</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
MP	Magermilchpulver
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
MW	Mann-Whitney-U-Test
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat

NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NGS	<i>normal goat serum</i>
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
NL	Niederlande
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP	Normal-Patientin (gesunde Schwangere)
OST	<i>one sample t-test</i>
PAPP-A	<i>pregnancy associated placental protein A</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline</i> mit Tween-20®
PE	Präeklampsie
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI	Pulsationsindex
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIKKs	<i>phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases</i>
PKB	Proteinkinasen B
PlGF	<i>placental growth factor</i>
R3-IGF-1	Human rekombinantes Protein, welches dem <i>insulin-like growth factor-I</i> analog ist, jedoch an Position 3 der Aminosäuresequenz Arginin statt Glutaminsäure und am N-Terminus 13 zusätzliche Aminosäuren besitzt
RFU	<i>relative fluorescence unit</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RTCA	<i>real-time cell analyzer</i>
SA-β-gal	<i>senescence-associated β-galactosidase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
s-Eng	<i>soluble endoglin</i>
sFlt-1	<i>soluble Fms-like tyrosine kinase 1</i>
SIPS	<i>stress-induced premature senescence</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
sVEGF-1	<i>soluble vascular endothelial growth factor 1</i>
SW	Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>

TP53	Tumorsuppressorprotein 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.U.	unter Umständen
UK	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UT	ungepaarter t-Test
V	Volt
VD	Vitamin D ₃
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
WB	<i>western blot</i>
WR	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach
53BP1	p53-binding protein

2 Einleitung

2.1 Präeklampsie

2.1.1 Epidemiologie

Zu den hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft werden die chronische Hypertonie, die Gestationshypertonie, die Gestationsproteinurie, die Präeklampsie (PE), das HELLP-Syndrom (engl. für *haemolysis, elevated liver enzymes, low platelets*) und die Eklampsie gezählt (1). Sie betreffen ca. 6–8 % aller Schwangerschaften und werden für 20–25 % der perinatalen Mortalität verantwortlich gemacht (1). Eine besonders große Bedeutung wird dabei der PE und der Eklampsie zugeschrieben, welche mit 10-15 % aller maternalen Todesfälle in Zusammenhang gebracht wird (1). Schätzungsweise sterben weltweit jährlich 76.000 Schwangere und 500.000 Kinder an der Erkrankung (2). Die Inzidenz der PE wird für Europa mit ca. 2 % angegeben (1).

2.1.2 Diagnosekriterien

In der aktuellen S2k-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) wird die PE einerseits durch die Höhe des mütterlichen arteriellen Blutdrucks sowie andererseits durch das Auftreten von mindestens einem spezifischen klinischen Untersuchungsbefund, der auf eine Organmanifestation der Erkrankung hinweist und für dessen Auftreten keine andere Ursache in Frage kommt, definiert (1).

Erstmalig oder vorbekannt erhöhte Blutdruckwerte $\geq 140/90$ mm Hg während der Schwangerschaft definieren das erste Kriterium des Vorliegens einer PE.

Das zweite Kriterium beinhaltet mögliche klinische oder laborchemische Befunde, die auf eine Organmanifestation der PE im Sinne einer Multisystemerkrankung hindeuten. Dazu zählen u.a.:

- Proteinurie ≥ 300 mg/Tag oder Protein/Kreatinin-Quotient ≥ 30 mg/mmol
- neue Funktionsbeeinträchtigung oder pathologische Befunde
 - der Nieren (z.B. Kreatininanstieg; ausgeprägte, rasch zunehmende Ödeme mit konsekutiver Zunahme des Körpergewichts (KG)),
 - der Leber (z.B. Anstieg der Transaminasen),
 - des respiratorischen Systems,
 - des hämatologischen Systems (z.B. Thrombozytopenie),
 - der Plazenta (z.B. intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR), Fötusgewicht $< 10.$ Perzentile) oder/und
 - des zentralen Nervensystems (z.B. abnormaler Reflexstatus).

Auch wenn die Anzeichen einer Organmanifestation fehlen, kann bei diagnostizierter Hypertonie und gleichzeitig erhöhten PE-Markern im maternalen Serum (z.B. sFlt-1/PlGF-Quotient > 85) die Diagnosestellung erfolgen (1).

2.1.3 Klinische Symptomatik

Neben den oben genannten Symptomen kann die PE auch durch weitere, oftmals zunächst unspezifische klinische Auffälligkeiten apparent werden. Dazu zählen u.a. das Lungenödem, Gesichtsfeldausfälle, Schmerzen im rechten Oberbauch und Kopfschmerzen (3). Klinisch eng assoziiert mit der PE sind das HELLP-Syndrom und die Eklampsie. Vom HELLP-Syndrom spricht man, wenn sich laborchemisch eine Hämolyse, erhöhte Transaminasen sowie eine Thrombozytopenie zeigt (4). Das Syndrom kann losgelöst oder aber in Kombination mit bzw. als schwere Komplikation einer PE auftreten. Gleiches gilt für das Krankheitsbild der Eklampsie, welches das Auftreten tonisch-klonischer Krampfanfälle während der Schwangerschaft beschreibt, für das keine andere Ursache gefunden werden kann (5).

Abhängig vom Zeitpunkt der klinischen Erstmanifestation wird die frühe PE (*early-onset-PE*, Auftreten vor der 34. Schwangerschaftswoche (SSW)) und die späte PE (*late-onset-PE*, Auftreten nach der 34. SSW) unterschieden (6, 7). Im Vergleich der beiden Formen tritt die *early-onset-PE* seltener auf, ist jedoch mit einem höheren Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko für Mutter und Kind assoziiert (6).

2.1.4 Pathophysiologie

Trotz intensiver Forschung ist die genaue Pathogenese der PE weiterhin nicht vollständig verstanden, sodass sie ihrem Beinamen „Erkrankung der Theorien“ weiterhin gerecht wird (8, 9). Eine Krankheitsentstehung in zwei Phasen wird diskutiert (10). Als grundlegende Ursache der Erkrankung wird eine gestörte Entwicklung des plazentaren Gefäßsystems, insbesondere der Spiralarterien, angenommen (Phase 1: mangelhafte Plazentation) (10). Dadurch kommt es zur Ischämie und einhergehender Hypoxie der Plazenta, welche durch die resultierende plazentare Dysfunktion schließlich zur systemischen, klinischen Manifestation der Erkrankung führt (Phase 2: mütterliche Multisystemerkrankung) (6, 10).

Als mögliche Auslöser der pathologischen Veränderungen während der Plazentation werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Dazu zählen u.a. immunologische und genetische Faktoren sowie bestimmte mütterliche Vorerkrankungen. (6, 10).

Bereits während der Plazentation kommt es bei der Invasion der Trophoblasten in das mütterliche Gefäßsystem zu ersten pathologischen Abweichungen. Die Trophoblasteninvasion endet vorzeitig und fällt zu flach aus, sodass die tieferen Gefäßgebiete nicht mit erreicht werden (6). Dadurch kommt es außerdem zu einem unvollständigen Umbau der Spiralarterien, welche physiologischerweise die adäquate Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des intervillösen Raumes (Treffpunkt zwischen maternaler und embryonaler Blutversorgung innerhalb der Plazenta) sicherstellen (11). Die endotheliale Auskleidung der Spiralarterien durch Trophoblastenzellen sowie der Rückbau der muskulären Tunica media und somit auch der damit einhergehenden Lumenerweiterung dieser Gefäße verbleiben unvollständig (3, 11). Der uteroplazentare Gefäßwiderstand steigt in der Folge an und ist als Inzisierung („*notch*“) bei der Doppler-Sonografie der *Aa. uterinae* nachweisbar (2, 12) (Abb. 1).

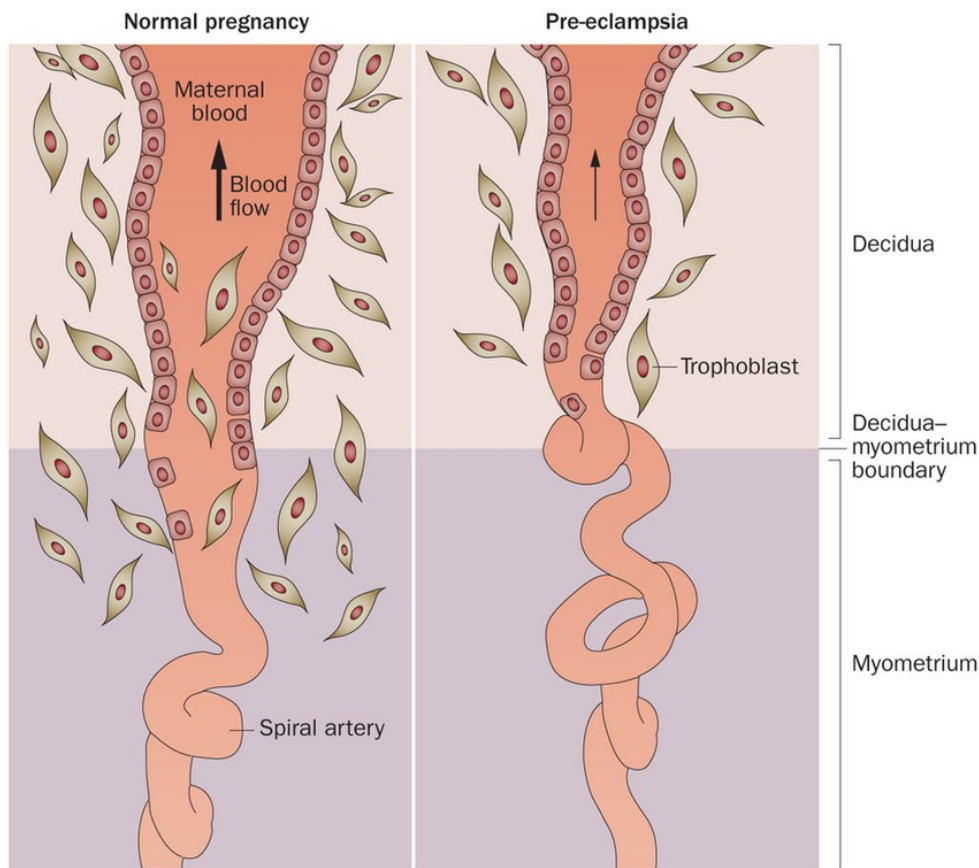


Abb. 1: Unvollständiger Umbau der Spiralarterien bei Präeklampsie.

Links: physiologische Entwicklung der Spiralarterien mit suffizientem, dilatiertem Arterien Durchmesser und Blutstrom (dicker Pfeil). Rechts: Zustand bei Präeklampsie mit insuffizientem Arterien Durchmesser und vermindertem Blutstrom (schmäler Pfeil). Entnommen aus: (6); Nachdruck mit Genehmigung von Springer Nature.

Aus dem verminderten Blutfluss resultieren eine plazentare Ischämie und Hypoxie und ein Zustand erhöhten oxidativen Stresses durch das vermehrte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (10, 13). Damit einhergehend ist ein Anstieg der löslichen Form der *Fms-like Tyrosine Kinase-1* (sFlt-1) und des löslichen Endoglin (s-Eng) zu beobachten, welche beide antiangiogene Effekte haben (14, 15).

Die sFlt-1 fungiert als löslicher *vascular endothelial growth factor 1 receptor* (sVEGF-1-Rezeptor) und liegt bei PE im Überschuss vor. sFlt-1 entfaltet ihre antiangiogene Wirkung, indem sie die bei Ischämie normalerweise notwendigen proangiogenen Faktoren VEGF und *placental growth factor* (PlGF) bindet und somit ihre freie systemische Verfügbarkeit vermindert (13, 16).

Ähnliches wurde für s-Eng beobachtet, ein Zelloberflächen-Co-Rezeptor, der *transforming growth factor* (TGF- β) bindet. TGF- β kann somit seiner regulären Funktion – der Auslösung der Migration und Proliferation von Endothelzellen – nicht mehr nachkommen (17). Es kommt insgesamt zu einer Dysbalance zwischen antiangiogenen (sFlt-1, s-Eng) und proangiogenen (VEGF, PlGF) Faktoren zugunsten eines systemischen antiangiogenen Gesamtzustandes des maternalen Gefäßsystems. (6).

Es wird des Weiteren davon ausgegangen, dass die plazentare Ischämie und Hypoxie in Verbindung mit der Freisetzung synzytiotrophoblastärer Mikro- und Nanopartikel, dem Anstieg proinflammatorischer Zytokine sowie dem vermehrten Auftreten von Hypoxie-induzierbarem-Faktor-1 α und -2 α (HIF-1 α /2 α) und Auto-Antikörpern gegen Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptoren stehen, welche in den maternalen Kreislauf eingeschwemmt werden (6, 10).

Die resultierenden gemeinsamen systemischen Auswirkungen aller genannten Faktoren auf den maternalen Organismus umfassen eine generalisierte Endothelfunktionsstörung, die im Verlauf – je nach Schweregrad und betroffenem Organsystem – zur klinischen Manifestation der PE führen kann (3).

2.1.5 Risikofaktoren

Es sind inzwischen zahlreiche mit der Entwicklung der PE assoziierte Risikofaktoren bekannt. Zu den allgemeinen Risikofaktoren zählen z. B. das Antiphospholipidsyndrom (18-20), BMI > 30 (18, 19), vorbestehender Diabetes mellitus (18-20), chronische arterielle Hypertonie (18-20), familiäre Vorbelastung (2, 10, 20), Nierenerkrankungen (18-20) und mütterliches Alter ≥ 35 Jahre (18, 19). Die schwangerschaftsassozierten Risikofaktoren umfassen unter anderem Z. n. PE (18-20), Gestationsdiabetes (2, 18), Anwendung reproduktionsmedizinischer Techniken (18, 19), Erstparität (18-20), Z. n. Totgeburt (19), Mehrlingsschwangerschaft (18-20) und Autoimmunerkrankungen (18-20).

2.1.6 Prävention und Therapie

Da für die PE weiterhin keine kausale Therapie außer der vorzeitigen Beendigung der Schwangerschaft durch Entbindung verfügbar ist, stehen insbesondere Maßnahmen der Früherkennung und Prävention im Vordergrund, um die fetale und maternale Prognose durch frühzeitige Einleitung prophylaktischer Maßnahmen zu verbessern.

In Deutschland erfolgt die Früherkennung im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchungen. Während des ersten Trimenon hat sich dabei eine Kombination aus klinisch-anamnestischen (u. a. Angaben im Mutterpass, Risikofaktoren der PE, mittlerer arterieller mütterlicher Blutdruck), laborchemischen (Bestimmung des *pregnancy associated placental protein A* [PAPP-A] und PlGF) und Doppler-sonografischen (Pulsationsindex [PI] der *Aa. uterinae*) Parametern etabliert. Die Kombination dieser Parameter ermöglicht es, Schwangere zu identifizieren, die zukünftig eine *early-onset-PE* entwickeln werden (7, 21). Während des Screenings im zweiten und dritten Trimenon stehen insbesondere der Ausschluss einer arteriellen Hypertonie und einer Proteinurie im Vordergrund (1). Im Falle des Verdachtes auf eine schwangerschaftsinduzierte Hypertonieerkrankung kann die Untersuchung um eine Doppler-Sonografie der *Aa. uterinae* und die Bestimmung des sFlt-1/PlGF-Quotienten ergänzt werden, wobei ein erhöhter PI oder Resistance Index sowie ein Notching (postsystolische Inzisur) in der Sonografie bzw. ein sFlt-1/PlGF-Quotient > 38 den Verdacht auf eine PE erhärten (1, 22, 23).

Bei Schwangeren mit auffälligen Ergebnissen des Ersttrimesterscreenings oder einem anamnestisch stark erhöhten Risiko für die Entwicklung einer PE konnte für die orale Einnahme niedrig dosierter Acetylsalicylsäure (ASS) eine Reduktion des Präeklampsierisikos nachgewiesen werden (24, 25). Entsprechend der aktuellen Leitlinienempfehlung sollte die Einnahme von ASS (150 mg/Tag) vor der 16. SSW begonnen und bis zur 34.–36. SSW fortgeführt werden (1). Mittel der Wahl zur medikamentösen antihypertensiven Therapie im Verlauf einer PE ist in erster Linie α -Methyldopa (1).

Als Zweitlinientherapie kann auch Nifedipin oder Metoprolol zum Einsatz kommen (1). Die therapeutische und prophylaktische Behandlung eklamptischer Anfälle kann mit Magnesiumsulfat erfolgen (26).

2.1.7 Komplikationen

Von den möglichen Folgen einer präeklampsischen Schwangerschaft können sowohl das Kind als auch die Mutter betroffen sein. Maternale Spätkomplikationen umfassen insbesondere ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. koronare Herzerkrankung, arterielle Hypertonie, Schlaganfall, Herzinsuffizienz), Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus und das metabolische Syndrom (27-31). Es gibt Hinweise darauf, dass das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im späteren Leben umso mehr steigt, je höher der Schweregrad der durchgemachten PE war und je früher diese begann (10, 18).

Auch die Folgen der PE für das Kind sind sehr vielfältig. Da die (vorzeitige) Entbindung die einzige kausale Therapieoption darstellt („iatrogene Frühgeburt“), kann bereits dieser Umstand im Vergleich zum reifen Neugeborenen eine erhöhte Mortalität und Morbidität bedingen (2). Weitere den Fetus betreffende Komplikationen umfassen z.B. eine IUGR, ein Oligohydramnion, die bronchopulmonale Dysplasie und die Gefahr der Totgeburt (2, 10, 18). Auch langfristig ist das Erkrankungsrisiko des in Zusammenhang mit einer PE geborenen Kindes für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus und das metabolische Syndrom sowie zentralneurologische Defizite erhöht (2, 10).

2.2 Endotheliale Vorläuferzellen

Bereits 1997 wurden endotheliale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells* [EPC]) isoliert und beschrieben (32). Sie entstammen dem Knochenmark und wandern in das Blut aus, wo sie zu reifen Endothelzellen differenzieren (33). Über Zytokine werden im Blut zirkulierende EPC in Gefäßabschnitte mit Endothelschäden geleitet, wo sie endotheliale Reparaturvorgänge initiieren und an den Vorgängen der Neovaskularisation beteiligt sind. Damit leisten sie einen wichtigen Beitrag zur vaskulären Homöostase (34-36).

Die Isolation von EPC kann aus peripherem Blut, dem Knochenmark und Nabelschnurblut erfolgen (37). Besonders hohe EPC-Konzentrationen finden sich im Nabelschnurblut (38).

Bei verschiedenen Krankheiten konnten verminderte EPC-Level im Blut festgestellt werden, u.a. bei kardiovaskulären Erkrankungen (z.B. Herzinsuffizienz, arterielle Hypertonie), Diabetes mellitus Typ II und PE (39-43). EPC werden als Biomarker zur Beurteilung einer Endotheldysfunktion und des kardiovaskulären Risikos (44-46) angesehen.

Koloniebildende Endothelzellen (*endothelial colony-forming cells* [ECFC]) sind eine Untergruppe von EPC (47). Sie werden u.a. durch den durchflusszytometrischen Nachweis der Zelloberflächenproteine CD31, CD105 und CD146 sowie der Abwesenheit von CD45 und CD14 immunophänotypisch charakterisiert (47).

ECFC werden ein hohes Proliferationspotenzial (48), proangiogene Eigenschaften (49, 50), endothelbildende und -erhaltende Funktionen (36, 51) und die Beteiligung an endothelialen Reparatur-

und Regenerationsprozessen zugeschrieben, wodurch sie eine wichtige Rolle bei der Angio- und Vaskulogenese spielen (50, 52, 53). In der Zellkultur zeigen ECFC eine charakteristische Pflasterstein-Morphologie, Wachstum in kolonieartigen Gruppierungen und die Fähigkeit zur Tubuli-Formierung (51).

Die generalisierte endotheliale Dysfunktion kann als eine der Hauptkomponenten in der Pathogenese der PE angesehen werden (54). Es konnte gezeigt werden, dass bei PE die Funktionsfähigkeit und Anzahl von maternalen und neonatalen ECFC vermindert ist und dies mit einer eingeschränkten endothelialen Regenerationsfähigkeit einhergehen könnte (55-57). Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass PE-ECFC und unter PE-ähnlichen Bedingungen inkubierte ECFC eingeschränkte Eigenschaften bezüglich Angiogenese-, Invasions- und Migrationsfähigkeit, Koloniausbildung und Proliferation besitzen. Diese Funktionseinschränkungen waren unter Gabe von Vitamin D₃ abgemildert (55, 58, 59).

2.3 DNA-Schäden und -Reparatur

2.3.1 DNA-Schäden und oxidativer Stress

Spontane DNA-Schädigungen humaner Zellen treten täglich schätzungsweise bis zu 100.000 Mal auf (60). Sie werden durch verschiedene endogene und exogene Einflüsse verursacht. Zu den exogenen Einflussfaktoren gehören physikalische, chemische und biologische Noxen aus der Umwelt, wie die Einwirkung von UV-Licht, ionisierender Strahlung, Aflatoxinen, aromatischer Amine, polyzyklischer Kohlenwasserstoffe und Chemotherapeutika (61, 62). Endogene DNA-schädigende Prozesse umfassen die Depurinierung, die Desaminierung, die Alkylierung sowie die Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), die als Stoffwechselprodukte im normalen Zellmetabolismus anfallen und vorübergehend zu vermehrtem oxidativen Stress führen können (63).

Oxidativer Stress bezeichnet das Ungleichgewicht zwischen einem übermäßigen Vorliegen von intrazellulären ROS (z.B. Wasserstoffperoxid, Hyperoxid-Anionen und Hydroxyl-Radikalen) und verminderten antioxidativen Mechanismen mit negativen Folgen für das Überleben der Zelle aufgrund zytotoxischer und genotoxischer Effekte (64). ROS führt an der DNA insbesondere zu Einzelbasenläsionen und Einzelstrangbrüchen, die sich zu Doppelstrangbrüchen (DSB) ausweiten können (62, 65).

Darüber hinaus kann erhöhter oxidativer Stress auch zur vermehrten Formierung von Mikronuklei (MN) beitragen (66). Als MN werden geschädigte Chromosomen oder Chromosomenfragmente bezeichnet, die sich separat vom Zellkern als extranukleäre DNA-Aggregate in Zellkernnähe zusammenlagern (67). Da sie DNA-Bestandteile enthalten, können sie auch mit DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen wie 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) nachgewiesen werden. Sie können in Folge von DNA-Schäden entstehen und werden als zuverlässiges Zeichen für geschädigte DNA angesehen (68).

Bekannte Ursachen für erhöhten oxidativen Stress sind Hypoxie, körperliche Belastung und energiereiche Strahlung (69). Die Pathogenese einiger Erkrankungen konnten mit dem vermehrten

Auftreten von oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen neben der PE auch Krebserkrankungen, Morbus Alzheimer, das Parkinson-Syndrom, Diabetes mellitus und die Herzinsuffizienz (10, 62).

2.3.2 ATM-gesteuerte DNA-Schadensantwort

DNA-Schäden aktivieren eine intrazelluläre Signalkaskade verschiedener Proteine, die im Rahmen der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response [DDR]*) netzwerkartig interagieren, um die genomische Integrität und die zelluläre Homöostase zu sichern oder wiederherzustellen (70).

Im Vordergrund steht zunächst die DNA-Schadensdetektion, bei der zwei Hauptsignalwege unterschieden werden, abhängig davon, über welche apikale Serin/Threonin-Kinase die Koordination des nachgeschalteten Signalweges erfolgt. Als apikale Kinasen der DDR stehen ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein*) zur Verfügung, wobei ATM insbesondere bei der Reparatur von DNA-DSB eine zentrale Rolle einnimmt (71). Diese apikalen Kinasen stehen am Anfang des komplexen Zusammenspiels der Sensoren, Mediatoren und Effektoren der DDR und werden durch einen DNA-Schadenssensor an den Läsionsort rekrutiert (70). Bei ATM erfolgt dies durch den MRN-Komplex, ein DNA-Schadenssensor, der aus den Proteinen MRE11, RAD50 und NBS1 besteht und den beschädigten DNA-Abschnitt detektiert und bindet (71). ATM markiert daraufhin die beschädigte DNA-Stelle durch Phosphorylierung des Histons H2AX (*histone family member X*) an Serin 139 zu γ H2AX (72). Dies führt zur Rekrutierung von DNA-Schadensmediatoren wie z.B. 53BP1 (*p53-binding protein*) und MDC1 (*mediator of DNA-damage checkpoint protein 1*), was sich im Rahmen von positiven Feedback-Mechanismen signalverstärkend auswirkt (70).

Darüber hinaus ist ATM an der Regulation und Phosphorylierung zahlreicher weiterer, in die DDR involvierte Proteine beteiligt (71). Im weiteren Kaskadenverlauf phosphoryliert ATM die Checkpoint Kinase 2 (CHK2) (73). Durch Interaktion mit den Effektoren p53 und Phosphatase CDC25 (*cell division cycle 25*) ist die DDR mit der Zellzyklusregulation verbunden, wodurch die Einleitung des Zellzyklusarrestes, der Apoptose, von Seneszenz oder von DNA-Reparaturmechanismen erfolgen kann. Damit wird die Weitergabe des beschädigten genetischen Materials verhindert (63) (Abb. 2).

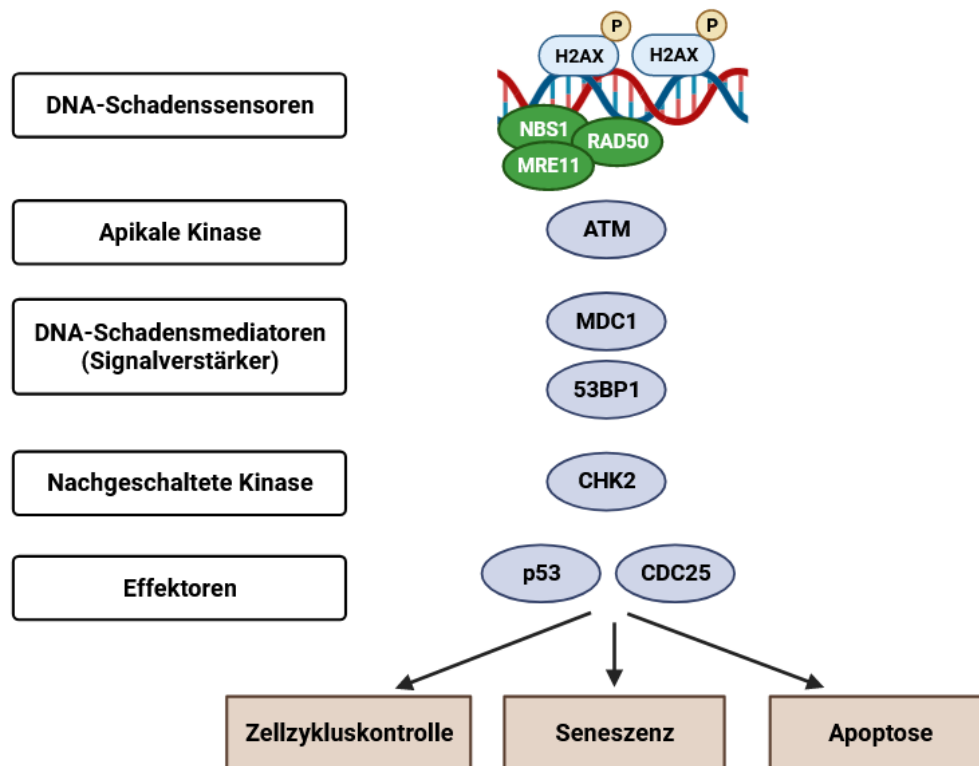


Abb. 2: Schematische Übersichtsdarstellung der ATM-basierten DNA-Schadensantwort.

Die Detektion einer DNA-Schädigung erfolgt über den MRN-Komplex (MRE11, RAD50, NBS1), der dabei als Schadenssensor fungiert und die DNA-Schadensantwort einleitet. Zunächst wird dabei ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) aktiviert und an die Schadensstelle rekrutiert. ATM wiederum phosphoryliert und aktiviert das Histon H2AX (*histone family member X*) und markiert damit den beschädigten DNA-Abschnitt. Anschließend kommt es zur Rekrutierung der DNA-Schadensmediatoren 53BP1 (*p53-binding protein*) und MDC1 (*mediator of DNA-damage checkpoint protein 1*), die signalverstärkende Funktionen einnehmen. Im nachgeschalteten Signalkaskadenverlauf wird CHK2 (*checkpoint kinase 2*) durch ATM phosphoryliert. Damit besteht über die Effektoren CDC25 (*cell division cycle 25*) und p53 Anschluss an die nachgeschalteten Signalwege der Apoptose, Seneszenz oder Zellzykluskontrolle mit der Möglichkeit zur Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen. (Erstellt mit BioRender.com; modifiziert nach (70)).

2.3.2.1 ATM

ATM ist eine 350 kDa schwere Serin-Threonin-Kinase aus der Familie der PIKKs (*phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*) und kann über verschiedene Autophosphorylierungsstellen aktiviert werden. Insbesondere der Nachweis der Autophosphorylierung am Serin-1981-Rest wird als Marker der ATM-Aktivierung angesehen (74, 75).

Nach Detektion eines DSB durch den MRN-Komplex wird ATM über die NBS1-Untereinheit des MRN-Komplexes zur DNA-Doppelstrangbruchstelle rekrutiert und durch Autophosphorylierung am S1981-Rest aktiviert (74). Als Bindeglied zwischen der initialen DNA-Schadenserkenung durch den MRN-Komplex einerseits und der Aktivierung der nachgeschalteten Effektoren der DDR (BRCA1, CHK2, H2AX, p53, etc.) andererseits, übernimmt ATM eine zentrale regulatorisch-vermittelnde Funktion im Verlauf der DDR, wodurch es auch direkt in die Zellzykluskontrolle und DNA-Schadensreparatur eingebunden ist (75).

Darüber hinaus kommt ATM eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung und Verstärkung der DDR zu. Durch die Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX setzt ATM einen selbstverstärkenden Aktivierungsmechanismus in Gang, der unter Beteiligung von MDC1 und MRN zu einer vermehrten ATM-Aktivität führt (76). Neben seiner Beteiligung an der DDR übernimmt ATM weitere wichtige

Funktionen bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, z.B. im Rahmen der DNA-Schadensreparatur, der Zellzyklusregulation, der Genexpression und Proteinbiosynthese sowie bei der Regulation von oxidativem Stress (75).

Eine ATM-Defizienz scheint mit einem erhöhten Maß an oxidativem Stress einherzugehen, was darauf hindeutet, dass ATM auch an der zellulären Redox-Homöostase beteiligt ist (75). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ATM außerdem unabhängig von der DSB-bezogenen Aktivierung über MRN auch direkt durch ROS aktiviert werden kann (76, 77).

Der Einsatz von ATM-Inhibitoren (ATMi) ist in der molekularbiologischen Forschung weit verbreitet und etabliert. Der in dieser Studie angewandte ATMi KU-55933 ist der am längsten bekannte und häufigsten angewendete ATMi. Seine Selektivität für ATM ist 100-fach höher als für ATR. Durch Blockade von ATM als DDR-Schlüsselkinase zeigen sich ATMi-behandelte Zellen gegenüber zytotoxischen Noxen anfälliger für DNA-Schäden und weisen eine verminderte Aktivität von ATM-nachgeschalteten Kinasen (H2AX, p53, NBS1) der DDR auf (78-80).

2.3.2.2 H2AX

H2AX ist ein Histon der Histonfamilie H2A und dient vorwiegend der Markierung von DSB. Es wird von ATM durch Phosphorylierung am Serin-139-Rest aktiviert und dann als γ H2AX bezeichnet (81, 82). Es kommt zur fokalen Aktivierung zahlreicher H2AX-Proteine in direkter Umgebung des DSB, welche als γ H2AX-Foci immunzytochemisch markiert und mikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Die Phosphorylierung zu γ H2AX wird durch den DDR-Mediator MDC1 erkannt und führt zu seiner Rekrutierung an den Läsionsort. Unter Beteiligung von 53BP1 wird dadurch ein Mechanismus der selbstverstärkenden Rückkopplung in Gang gesetzt, der in der Folge zur verstärkten Ansammlung von weiteren MRN-Komplexen und somit auch erhöhter Aktivität von ATM an der DNA-Bruchstelle führt. γ H2AX kommt somit eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der DDR zu, indem es die verschiedenen beteiligten Proteine in der Nähe des DSB versammelt hält (70, 83). Die Aktivierung von γ H2AX und ATM wird darüber hinaus als Indikator für oxidativ verursachte DNA-Schäden angesehen (84, 85).

2.3.2.3 CHK2

CHK2 ist eine 65 kDa schwere Serin/Threonin-Protein-Kinase, die von ATM durch Phosphorylierung am Threonin-68-Rest aktiviert wird. CHK2 interagiert mit zahlreichen anderen Proteinen in nachgeschalteten Signaltransduktions- und Aktivierungsschritten der DDR und nimmt somit eine bedeutsame Rolle als Mediator der DNA-Schadensantwort ein. Dazu zählt auch die Überleitung zu anschließenden Signalkaskaden zur Einleitung der Zellzykluskontrolle, Apoptose und der DNA-Reparatur nach DNA-Schädigung (86-89).

2.3.2.4 Akt

Akt ist ein 57 kDa schweres Enzym aus der Klasse der Proteinkinasen B (PKB), die zur Gruppe der Serin-Threonin-Proteinkinasen gehören (90). Seine Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung am Serin-473-Rest. Diese kann zytosolisch durch mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) erfolgen, worüber Akt an den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg angeschlossen ist und seine Hauptwirkung entfaltet: ein sehr facettenreiches Wirkspektrum mit Beteiligung an zahlreichen wichtigen zellulären Regulationsprozessen die z.B. die Zellzyklusregulation, die Zellproliferation, Seneszenz- und Apoptosevorgänge und die Proteinbiosynthese steuern. Die Phosphorylierung an S473 kann jedoch im Fall von DNA-Schäden auch im Zellkern durch DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*), ATM oder ATR erfolgen (91). Im Zellkern ist Akt an der Reparatur von DSB beteiligt (92). Durch die Interaktion mit verschiedenen nachgeschalteten Substraten sowie durch die Regulation der posttranslationalen Modifikation von Proteinen der DNA-Schadensantwort und -reparatur (z.B. Histonacetylierung) nimmt Akt eine wichtige Rolle innerhalb der DDR und DNA-Schadensreparatur ein (91, 92).

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass Akt außerdem an der Regulation zellulärer antioxidativer Prozesse beteiligt ist (91). Auch verschiedene Erkrankungen des Gefäßsystems werden in Verbindung mit einer pathologischen Veränderung der Akt-Funktion gebracht, da Akt in Endothelzellen normalerweise zur Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen und somit zur normalen Endothelfunktion beizutragen scheint (90).

2.4 Vitamin D₃

2.4.1 Biochemischer und physiologischer Hintergrund

Vitamin D₃ (VD) ist ein fettlösliches Secosteroid, das durch den Verzehr von Fisch, Eiern, Milchprodukten und Fetten über die Nahrung aufgenommen, im Gegensatz zu anderen Vitaminen jedoch auch endogen synthetisiert werden kann (93, 94). Für die körpereigene Produktion ist UV-B-Sonnenlichtstrahlung notwendig. Sie ermöglicht die kutane Umwandlung von Pro-Vitamin D₃ (7-Hydrocholesterol) in Prä-Vitamin D₃ (7-Dehydrocholesterol), welches aufgrund seiner Thermolabilität innerhalb weniger Stunden zu Vitamin D₃ (Cholecalciferol) isomerisiert (95).

Gebunden an das Vitamin D-bindende Protein (*vitamin D binding protein*, DBP) erfolgt über das Blut der Transport zur Leber. Durch die 25-Hydroxylase findet dort eine Hydroxylierung zu 25(OH)-Vitamin D (Calcidiol) statt, das als Speicherform und klinischer Laborparameter zur Bestimmung des VD-Status bedeutsam ist (96). Biologisch aktives 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (Calcitriol) entsteht erst durch eine von der 1 α -Hydroxylase katalysierten Umwandlung, die sich meist in der Niere vollzieht, jedoch auch in anderen Geweben möglich ist (95). Der renale Syntheseprozess wird maßgeblich durch den Kalzium- und Phosphatstoffwechsel sowie das Parathormon reguliert (97).

Hauptfunktion von VD ist die Regulation der Kalzium- und Phosphathomöostase durch die Förderung der enteralen und renalen Kalzium- und Phosphatresorption sowie der ossären Mobilisation von

Kalzium und Phosphat (95). Ein weitere wichtige Funktion betrifft den Knochenstoffwechsel, wo VD die Mineralisierung und ossäre Auf- und Umbauprozesse beeinflusst (95). Eine bedeutsame Rolle spielt VD außerdem für die Gesundheit des Herz-Kreislauf-Systems, bei der Prävention der Karzinogenese und der Aufrechterhaltung der Funktionen des Immunsystems sowie für den Glukose- und Fettstoffwechsel (98-104). Störungen durch einen VD-Mangel in diesen Bereichen werden im Zusammenhang mit verschiedenen Folgeerkrankungen wie z.B. Osteomalazie und Osteoporose, Diabetes mellitus, neurodegenerative Erkrankungen, Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und kardiovaskuläre Erkrankungen gesehen (105, 106).

Mit Blick auf die Gesundheit des Gefäßsystems konnten für VD vasoprotektive, antioxidative, antiinflammatorische und endothelstabilisierende Eigenschaften nachgewiesen werden (107-109). Insuffiziente VD-Level werden hingegen mit erhöhten Biomarkern für oxidativen Stress und für Vorstufen endothelialer Dysfunktion in Verbindung gebracht (110). Im Tiermodell und Studien mit verschiedenen humanen Gewebetypen konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass VD protektive Effekte vor oxidativem Stress und ROS-induzierten DNA-Schäden besitzt (111-114). Die Kausalität im Zusammenhang zwischen VD und seinen protektiven Wirkungen ist nicht vollständig geklärt und kann als Ansatzpunkt zukünftiger Forschung angesehen werden (104, 115).

2.4.2 Bedeutung von Vitamin D₃ für die Präeklampsie

Das Risiko für das Auftreten einer PE wird ebenfalls mit verminderten VD-Blutspiegeln in Verbindung gebracht, sodass ein VD-Mangel als Risikofaktor für die PE diskutiert wird (116-119). Es gibt Hinweise dafür, dass die VD-Substitution während der Schwangerschaft zur Senkung des Präeklampsierisikos beiträgt (120, 121).

Auch bei Untersuchungen an ECFC präeklampsischer Schwangerer *in vitro* zeigte sich, dass eine Behandlung mit VD den bei PE verminderten Fähigkeiten der ECFC zur Proliferation, Gewebeinvasion, Tubulifformation und Migration entgegenwirkt und diese verbessert. Unsere Arbeitsgruppe konnte in mehreren Vorarbeiten im ECFC-Modell *in vitro* Hinweise auf die PE-assoziierte Dysfunktionalität von endothelialen Vorläuferzellen sowie Möglichkeiten zu deren positiven Beeinflussung durch VD finden. PE-ECFC und ECFC, die unter PE-ähnlichen Bedingungen (Hypoxie 2 % O₂, fetales Nabelschnurserum aus PE-Schwangerschaften) inkubiert wurden, zeigten dabei gegenüber ECFC von gesunden Schwangeren (NP-ECFC), bzw. unter Normbedingungen inkubierten ECFC, verminderte Fähigkeiten zur Angiogenese, Migration, Koloniausbildung und Proliferation. Diese Funktionseinschränkungen der präeklampsischen ECFC konnten unter Gabe von VD abgemildert und verbessert werden (55, 58, 59).

Die zugrundliegenden Mechanismen der anscheinend protektiven Wirkung von VD blieben jedoch weiterhin unzureichend geklärt, obwohl sie vor dem Hintergrund einer bisher außer für Risikopatientinnen (ASS-Therapie) nicht etablierten, breiten, effektiven klinischen PE-Prävention, als Ansatzpunkt weiterer Forschung von höchster Relevanz erscheinen.

3 Ziele der Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit bestand in der Erweiterung des pathophysiologischen Verständnisses über die PE. Da als Krankheitsursache der PE eine vaskulär insuffiziente Plazentation angenommen wird, die zu einer plazentaren Ischämie führt, stehen Hypoxie und erhöhter intrazellulärer oxidativer Stress (IOS) im Zentrum des aktuell diskutierten multifaktoriellen pathophysiologischen Verständnismodells. Kennzeichen der in Folge ausgeprägten maternalen Multisystemerkrankung ist insbesondere eine generalisierte vaskulär-endotheliale Dysfunktion (6, 10). Hypoxie und das vermehrte Auftreten von ROS (Zeichen von erhöhtem IOS) können sowohl direkt als auch durch die Verursachung von DNA-Schäden zur Initiierung der DDR – insbesondere deren Schlüsselkinase ATM – führen (62, 69, 76). Ob ATM einen Einfluss auf die Vermittlung der endothelialen Dysfunktion bei PE besitzt und somit im Zusammenhang mit den an PE-ECFC beobachteten funktionellen Einschränkungen stehen könnte, ist bisher nicht geklärt. *In vitro* und *in vivo* konnten für VD Hinweise auf endothelstabilisierende, proangiogene und das PE-Erkrankungsrisiko-senkende Eigenschaften gefunden werden (55, 58, 59, 109, 120, 121). Wie es zu deren Vermittlung kommt und welcher Wirkmechanismus zugrunde liegt, ist bisher jedoch nur unzureichend erforscht. Diese Arbeit greift Hypoxie und erhöhten IOS als eine der zentralen pathogenetischen Veränderungen bei PE auf. Unter Annahme von konsekutiv entstehenden DNA-Schäden wird beleuchtet, inwieweit sich Modulationen der ATM-basierten DNA-Schadenssignalkaskade auf Zellmodellebene wiederfinden lassen. Ferner wird evaluiert, inwieweit VD durch Beeinflussung der ATM-basierten DNA-Schadenssignalkaskade protektive Effekte entfalten kann.

Im Wesentlichen sollten hierzu mittels eines ECFC-Zellkulturmodells *in vitro* folgende Fragen in zwei Teilprojekten (Abb. 3) untersucht werden:

Teilprojekt 1: Einfluss von VD auf den Aktivierungsstatus der DDR bei PE

Wie beeinflusst eine Behandlung mit VD die Proteinlevel und den Phosphorylierungsgrad der Proteine der ATM-basierten DNA-Schadenssignalkaskade in ECFC unter Simulation PE-ähnlicher Stressbedingungen mit erhöhtem oxidativem Stress oder Hypoxie?

Dazu wurden ECFC gesunder Schwangerer (Normal-Patientin, NP) mit 0,1 nM oder 10 nM 1,25(OH)₂ VD vorbehandelt und anschließend zur Simulation eines präeklampsischen Milieus unter H₂O₂ (25 µM oder 100 µM) oder Hypoxie (1 % O₂) inkubiert. Die Analyse der ATM-, Akt-, CHK2- und γH2AX-Proteinexpression erfolgt mittels immunzytochemischer und Immunoblot-basierter Nachweisverfahren.

Teilprojekt 2: Einfluss von ATM bei der Vermittlung der ROS-induzierten endothelialen Dysfunktion bei PE

Welchen Einfluss hat die Inhibition von ATM auf die Ausbildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies sowie auf den Zell-Index von NP-ECFC im Vergleich zu PE-ECFC?

Dazu wurden ECFC gesunder und präeklaptischer Schwangerer mit einem ATM-Inhibitor behandelt und eine fluoreszenzbasierte, intrazelluläre Bestimmung der ROS-Level sowie eine Impedanz-basierte Langzeitanalyse des Zell-Index – einem Messindikator für die Veränderungen zellulärer Proliferation, Adhäsion und Morphologie – vorgenommen.

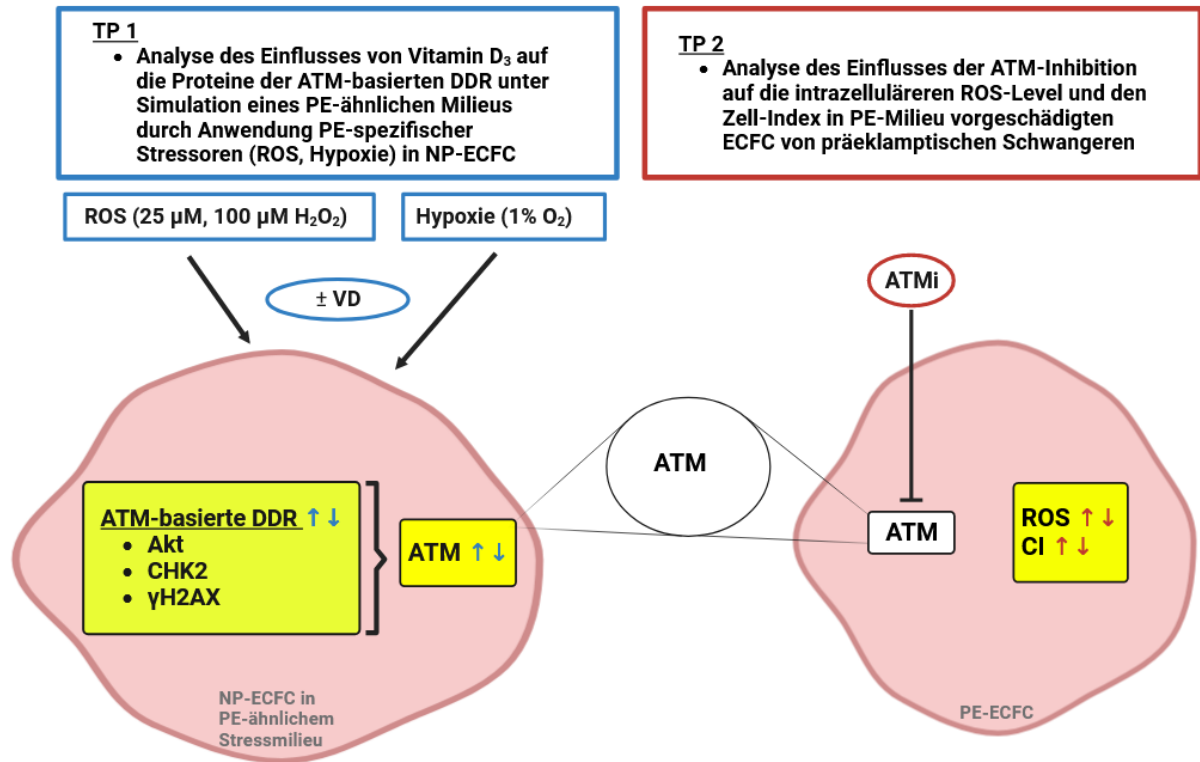


Abb. 3: Schematisch vereinfachte Übersichtsdarstellung der Teilprojekte (TP) der vorliegenden Arbeit.

TP 1 (dunkelblaue Rahmung) beschäftigt sich mit dem Einfluss von Vitamin D₃ (VD) auf den Aktivierungsstatus der Proteine der ATM-basierten DDR unter präeklaptischen Stressbedingungen und simuliert dieses in NP-ECFC durch die Anwendung reaktiver oxidativer Sauerstoffspezies (ROS) und Hypoxie. TP 2 (dunkelrote Rahmung) untersucht den Einfluss der Anwendung eines ATM-Inhibitors (ATMi) auf die Ausbildung intrazellulären ROS-Level sowie den Zell-Index (CI) von PE-ECFC im Vergleich zu NP-ECFC (nicht dargestellt). Roter Hintergrund: ECFC mit PE-charakteristischer Veränderung (unter Einwirkung PE-spezifischer Stressoren zur Simulation eines PE-ähnlichen Milieus (TP 1) oder PE-ECFC mit entsprechender funktionaler Prädisposition entstammend aus einer PE-Schwangeren (TP 2)); NP-ECFC (*endothelial colony-forming cells* von gesunden Schwangeren); PE-ECFC (*endothelial colony-forming cells* von Schwangeren mit Präeklampsie). ATM (Ataxia Telangiectasia mutated); ↑ ↓: untersuchte Veränderung der Zielparame-ter (gelber Hintergrund) entsprechend des TP. (Erstellt mit BioRender.com).

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
0,5 % Trypsinlösung/EDTA	Life Technologies Limited, Paisley, UK
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Life Technologies Limited, Paisley, UK
Acrylamid, 40 %	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
APS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
ATM-Inhibitor (KU-55933)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
BioRad Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad, Laboratories GmbH, München, DE
Bis-Acrylamid, 2 %	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Bovine Serum Albumin Standard (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Butan	Camping Gaz, Hungen-Inheiden, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
D-Sucrose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethanol, für die Spektroskopie (Uvasol)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol, vergällt (99 %)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, DE
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
IGEPAL® CA-630 (NP-40)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Leupeptin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Magermilchpulver (MP)	Premier Foods Group Ltd, London, UK
Methanol	Avantor Performance Materials B.V., Deventer, NL
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Avantor Performance Materials B.V., Deventer, NL
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
PBS (ohne Calcium und Magnesium)	Lonza Inc., Walkersville, USA
Penicillin / Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Phenylmethansulphonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
ProLong™ Gold antifade reagent	Life Technologies Corporation, Eugene, USA
Röntgenfilmentwicklungslösung (X-OMAT EX II)	Carestream Health, Rochester, USA
Röntgenfilmfixierlösung (RP X-OMAT LO)	Carestream Health, Rochester, USA
Roti®-Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Bezeichnung	Hersteller
Sauerstoff (O ₂) 99,5 %	Linde AG, Pullach, DE
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Stickstoff (N ₂) 99,8 %	Linde AG, Pullach, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
TritonX-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck, Darmstadt, DE

4.2 Puffer und Lösungen

10x PBS

1,4 M NaCl
 27 mM KCl
 90 mM Na₂HPO₄
 15 mM KH₂PO₄
 1 l Aqua bidest

1x PBS

100 ml 10x PBS
 900 ml Aqua bidest

PBS-T (Waschpuffer)

1x PBS
 0,05 % Tween® 20

10x GTS

1,9 M Glycin
 0,25 M Tris
 1 % SDS
 1 l Aqua bidest

10x Carbonatpuffer

0,1 M NaHCO₃
 30 mM Na₂CO₃
 1 l Aqua bidest

1x Carbonatpuffer (Transferpuffer)

100 ml 10x Carbonatpuffer
 200 ml MeOH
 1,8 ml 20 % SDS
 700 ml Aqua bidest

10x <i>high molecular weight</i> (HMW)-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 1 l Aqua bidest
1x HMW-Puffer	100 ml 10x HMW-Puffer 200 ml MeOH 1,8 ml 20 % SDS 700 ml Aqua bidest
Blockpuffer (5 % MP-PBST)	50 ml PBS-T 2,5 g Marvel Milchpulver
Permeabilisierungslösung (0,2 % TritonX)	1x PBS 200 µl TritonX-100
Fixierlösung	1x PBS 3 % PFA 2 % D-Sucrose
Einfriermedium für ECFC	1x FKS 8 % DMSO
Proteinlysepuffer	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EGTA 2 mM EDTA 25 mM NaF 0,1 mM Na ₃ VO ₄ 0,1 mM PMSF 2 mg/ml Leupeptin 2 mg/ml Aprotinin 0,2 % Triton X-100 0,3 % NP-40
Trenngelpuffer	1 M Tris-Cl ad 1 l Aqua bidest pH mit HCl auf 8,7 einstellen

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-Cl
ad 1 l Aqua bidest
pH mit HCl auf 6,8 einstellen

20 % SDS

200 g SDS
1 l Aqua bidest

10 % APS

100 g APS
1 l Aqua bidest

SDS-Beschwerungspuffer (5x)

1 M Tris HCl pH 6,8
14,25 % SDS
47,5 % Glycin
14,25% β -Glycerophosphat
1,4 % Bromphenolblau

4.3 Antikörper

4.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2: Primäre Antikörper.

Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung		Masse des Antigens (kDa)	Hersteller, Produktnummer
		Western Blot	ICC		
Akt	Kaninchen	1:1000	-	60	Cell Signaling, 9272
Akt pS473	Kaninchen	1:1000	-	60	Cell Signaling, 9271
ATM (2C1)	Maus	1:500	-	370	GeneTex, GTX70103
ATM pS1981	Maus	1:1000	-	370	Millipore, 05-740
ATM pS1981	Kaninchen	-	1:50 – 1:200	351	GeneTex, GTX132146
beta-Aktin	Maus	1:3000	-	42	Sigma-Aldrich, A5441
CHK2 pThr68	Kaninchen	1:1000	-	62	Cell Signaling, 2661
DNA-PK	Maus	1:500	-	460	Millipore, NA57
H2AX pS139	Maus	-	1:200	17	Millipore, 05-636

4.5 Zellkulturmedien

Tabelle 6: Proliferationsmedium für ECFC.

Zusatz	Menge
EBM®-2 PRF (<i>phenol-red-free</i>) (Lonza Walkersville Inc., USA)	445 ml
EGM™-2 SingleQuots (Lonza Walkersville Inc., USA)	
Hydrokortison	0,2 ml
hFGF-B	2,0 ml
VEGF	0,5 ml
R3-IGF-1	0,5 ml
Ascorbinsäure	0,5 ml
hEGF	0,5 ml
GA-1000	0,5 ml
FKS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

Tabelle 7: Behandlungsmedium.

Zusatz	Menge
EBM®-2 (Lonza Walkersville Inc., USA)	445 ml
EGM™-2 SingleQuots (Lonza Walkersville Inc., USA)	
Hydrokortison	0,2 ml
hFGF-B	2,0 ml
VEGF	0,5 ml
R3-IGF-1	0,5 ml
Ascorbinsäure	0,5 ml
hEGF	0,5 ml
GA-1000	0,5 ml
FKS	12,5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

4.6 Geräte

Tabelle 8: Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Accu-jet pro Pipettierhilfe	Brand GmbH + Co.KG, Wertheim, DE
Autoklaviergerät HST 6-6-6	Zirbus Technology, Bad Grund, DE
Autoradiographiekassette	Spectronics Corporation, Westbury, USA
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Brutschrank MCO-20AIC	Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Japan
Einschweißgerät	Serverin Folio, Sundern, DE
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, DE
Elektrophoresekammern TwinEx ws Mini Protean II®	Peqlab, Erlangen, DE Bio-Rad, München, DE
Fluoroskan Ascent FL	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Bezeichnung	Hersteller
Gasbrenner	WLD-TEC GmbH, Göttingen, DE
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Osaka, Japan
Inkubationssystem Xvivo G300C	Biospherix Ltd, Lacona, USA
Magnetrührer RH basic 2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Mikroskope: Lichtmikroskop Olympus CKX53 Fluoreszenzmikroskop DMI 6000 B	Olympus, Tokio, Japan Leica, Heidelberg, DE
Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1 °C Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Optimax Röntgenfilamentwicklungsmaschine	Protec GmbH & Co. KG, Oberstenfeld, DE
Pipetten, verschiedene Größen (2,5 µl – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
RTCA SP Instrument	ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA
Scanner bizhub C224e	Konica Minolta, Langenhagen, DE
Schütteltisch Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, DE
Sterilwerkbank HeraSafe 300	Kendro Laboratory Products, Hanau, DE
Stromnetzgeräte EPS 2A200 peqPOWER 300 PowerPac 200	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE Bio-Rad, München, DE
Thermomixer Comfort Heizblock	Eppendorf, Hamburg, DE
Transfereinheit Hoefer TE62 Mini Protean II®	Amersham, Buckinghamshire, UK Bio-Rad, München, DE
Vortexer Reax Control	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Waage	Sartorius, Göttingen, DE
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Zählkammer nach Neubauer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, DE
Zentrifugen 5415D, 5415C Rotina 300R	Eppendorf, Hamburg, DE Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Mikropräparierpinzette HWC 110-10	Hammacher Instrumente, Solingen, DE

4.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Uvette 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg, DE
Whatman Papier (3 mm)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Labortücher (weiß)	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Reaktionsgefäße (50 ml, 15 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, DE
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, DE
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, DE
Einmalhandschuhe	Braun, Melsungen, DE

Bezeichnung	Hersteller
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Nitrocellulose-Membran	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Objektträger	Menzel, Braunschweig, DE
Pipettenspitzen (2,5 µl – 1000 µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, DE
Parafilm	Bemis, Wisconsin, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, DE Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
6-Well-Platten	Starlab, Hamburg, DE
Zellkulturflaschen (T75 cm ²)	Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Rockford, USA
E-Plate VIEW (96-Well)	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Zellkulturschalen 2 ml 10 ml	Starlab, Hamburg, DE Sarstedt AG, Nümbrecht, DE
96-Well-Platten (mit schwarzem Boden)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE

4.8 Software

Tabelle 10: Software.

Bezeichnung	Hersteller
RTCA Software 1.2.1	ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA
GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Leica Application Suite 1.9.0	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
ImageJ 1.50b	National Institutes of Health, Bethesda, USA

4.9 Zellbiologische Methoden

4.9.1 Auswahl der Studienteilnehmerinnen

Vor Beteiligung an dieser Studie wurden alle Teilnehmerinnen über den Studienablauf und das Ziel der Studie aufgeklärt. Die Einwilligung zur Studienteilnahme wurde schriftlich dokumentiert. Alle erhobenen Daten wurden pseudonymisiert weiterverarbeitet. Vor Studienbeginn wurde ein positives Votum bei der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover (Kennnummer 3254) zur Durchführung der Studie eingeholt.

In dieser Studie wurden Schwangere mit PE und gesunde Schwangere miteinander verglichen. PE wurde dabei entsprechend der S2k-Leitlinie der AWMF mit Blutdruckwerten $\geq 140/90$ mm Hg sowie mindestens einer neu aufgetretenen Organmanifestation, für welche keine andere Diagnose ursächlich war, definiert (1).

Folgende Daten wurden von allen Schwangeren erhoben: Alter, BMI, Blutdruck, Gestationsalter bei Entbindung, Protein im Urin, Ergebnisse der laborchemischen Blutuntersuchung (Thrombozytenzahl,

Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Kreatinin) sowie Geburtsgewicht und Geburtsgewichtpercentile des Neugeborenen.

Als Ausschlusskriterien zur Teilnahme an dieser Studie wurden folgende Bedingungen formuliert: regelmäßige Medikamenteneinnahme, bekannte akute und chronische Erkrankungen, aktuelle oder durchlaufene Chemotherapie, Vorerkrankungen oder Medikamenteneinnahme mit vaskulärer Auswirkung (z.B. chronisch entzündliche Autoimmunerkrankungen, Therapie mit ASS oder Heparin), vorbestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren (z.B. Diabetes mellitus, Gestationsdiabetes, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus), Mehrlingsschwangerschaften sowie kindliche Fehlbildungen.

Tabelle 11: Demografische und klinische Daten der Schwangeren.

Angabe von Mittelwert $\pm$ Standardabweichung und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Mann-Whitney-U-Test (MW) oder ungepaartem t-Test (UT). Statistisch signifikante Ergebnisse sind durch eine graue Hintergrundfarbe hervorgehoben.

Variable	gesunde Schwangere (n=5)	Schwangere mit Präeklampsie (n=5)	Signifikanz (p)
Alter (Jahre)	30,6 $\pm$ 3,98	30,8 $\pm$ 6,42	0,95 (UT)
Gestationsalter bei Entbindung (Wochen)	38,11 $\pm$ 0,66	36,51 $\pm$ 1,56	0,07 (UT)
BMI (kg/m ²)	24,22 $\pm$ 4,38	31,5 $\pm$ 14,65	0,34 (UT)
systolischer Blutdruck vor Entbindung (mmHg)	117,2 $\pm$ 12,4	150 $\pm$ 16,84	0,008 (UT)
diastolischer Blutdruck vor Entbindung	67,5 $\pm$ 6,63	82,5 $\pm$ 12,61	0,03 (MW)
systolischer Blutdruck im ersten Trimenon (mmHg)	119,8 $\pm$ 17,21	134,4 $\pm$ 23,29	0,29 (UT)
diastolischer Blutdruck im ersten Trimenon (mmHg)	77 $\pm$ 9,75	79,8 $\pm$ 10,06	0,68 (MW)
Geburtsgewicht (g)	3305 $\pm$ 383,20	2636 $\pm$ 773,1	0,12 (UT)
Geburtsgewichtpercentile	48,2 $\pm$ 24,01	34,6 $\pm$ 39,63	0,53 (UT)

Nach Überprüfung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Normalverteilungstest erfolgte die statistische Analyse der Daten mit dem ungepaarten t-Test oder Mann-Whitney-Test. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. Definitionsgemäß besaßen Schwangere mit PE einen signifikant höheren systolischen und diastolischen Blutdruck vor der Entbindung als gesunde Schwangere. Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert (Tabelle 11).

4.9.2 Zelllinie

In dieser Arbeit wurden ausschließlich ECFC benutzt, welche aus fetalem Nabelschnurblut isoliert wurden. Die Isolation der Zellen wurde im Forschungslabor der Frauenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Frauke von Versen-Höyneck durchgeführt.

4.9.3 Zellkultur

Die Zellkultivierung erfolgte in T-75-Zellkulturflaschen im Inkubationsschrank bei 37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90–100 % (Standardbedingungen). Alle 3 Tage erfolgte der Wechsel des Proliferationsmediums. Sobald eine Zellkonfluenz von 80–90 % erreicht war, wurden die Zellen passagiert.

4.9.4 Passagieren und Trypsinieren der Zellen

Nach Abpipettieren des verbrauchten Mediums wurden die Zellen zweifach mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 3 min mit Trypsin/EDTA im Inkubationsschrank belassen. Mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops wurde das vollständige Ablösen der Zellen optisch überprüft. Nach Abstoppen der Trypsinwirkung mit frischem Proliferationsmedium im gleichen Volumenanteil wie Trypsin/EDTA wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 2 ml FKS behutsam resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt. 10 µl dieser gefärbten Zellsuspension wurden auf eine Zählkammer nach Neubauer gegeben, sodass lichtmikroskopisch die lebendigen Zellen ausgezählt werden konnten. Die Neuaussaat der Zellen erfolgte je nach gewünschter Zellzahl in Zellkulturflaschen, -schalen, oder -platten.

4.9.5 Kryokonservierung der Zellen

Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196 °C). Um Zellschäden bei dieser Form der Kryokonservierung zu vermeiden, wurde ein spezielles Einfriermedium bestehend aus 92 % FKS + 8 % DMSO genutzt. Nach Ablösen und Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurde das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhren überführt. Diese wurden initial für 24–36 h bei -80 °C in einem Mr. Frosty®-Isopropanoleinfrierbehälter gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Zur Wiederverwendung kryokonservierter Zellen wurde diese zunächst im Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Nach vollständiger Verflüssigung wurde der Inhalt des Kryoröhrchens mit 5 ml Proliferationsmedium aufgenommen und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Proliferationsmedium resuspendiert und auf das gewünschte Zellkulturgefäß verteilt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

4.9.6 Behandlung mit H₂O₂, 1 % O₂ und Vitamin D₃

Vorbereitung

Für die Versuche unter Nutzung der Immunzytochemie (ICC) (vgl. Abschnitt 4.10) und der Proteinanalyse mittels Western Blot (WB) (vgl. Abschnitt 4.11) erfolgte die Kultivierung der ECFC mit Proliferationsmedium abhängig vom Versuchsaufbau entweder in 6-Well-Zellkulturplatten bzw. 2-ml-Zellkulturschalen auf hitzesterilisierten Deckgläsern (ICC) oder in 10 ml-Zellkulturschalen (WB).

Alle drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Nach Erreichen einer einheitlichen Zellkonfluenz von 80–90 % wurde das Proliferationsmedium abgesaugt und nach einmaliger Waschung der Zellen mit 1x PBS durch Behandlungsmedium ersetzt. Dem Behandlungsmedium wurden 0,1 nM oder 10 nM 1,25(OH)₂ VD bzw. EtOH zugesetzt. Diese Konzentrationen gelten als näherungsweise physiologische VD-Konzentration während der Schwangerschaft und fanden bereits weitläufige Anwendung bei der Untersuchung des Einflusses von VD auf zelluläre Eigenschaften von ECFC (55, 58, 59, 109, 122-125). Da 1,25(OH)₂ VD eine lipophile Substanz ist und nur als Lösung in EtOH verwendet wurde, diente eine konzentrationsäquivalente EtOH-Kontrolle zum Ausschluss eines Lösungsmittelleffektes. Danach wurden die Zellen der Behandlungsgruppe mit H₂O₂ oder 1 % O₂ versetzt. Die entsprechenden Kontrollgruppen verblieben unbehandelt.

Behandlung mit H₂O₂

Nach einer Inkubationszeit von 24 h erfolgte ein Wechsel des Behandlungsmediums und die Zugabe der entsprechenden Konzentrationen von H₂O₂ (25 µM, 100 µM). Anschließend wurden alle Proben gemeinsam für 15 min (ICC) bzw. 30 min (WB) im Inkubationsschrank unter Standardbedingungen inkubiert.

Behandlung unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂)

Die vorbereiteten Zellen wurden für 24 h unter 1 % O₂ (Behandlungsgruppe) oder 21 % O₂ (Kontrollgruppe) im Xvivo-Inkubationssystem inkubiert.

4.10 Immunzytochemie

Dieser Versuch wurde mit ECFC fünf verschiedener NP (n = 5) vorgenommen. Es erfolgte entsprechend Abschnitt 4.9.6 eine Vorbehandlung der Zellen mit H₂O₂, 1 % O₂ und VD.

4.10.1 Immunzytochemische Färbung

Nach Ende der Inkubationszeit unter H₂O₂ oder 1 % O₂ wurden die Zellen sofort für 10 min mit einer Fixierlösung behandelt. Nach dreimaliger Waschung mit 1x PBS wurden die Zellen für 3 min mit der Permeabilisierungslösung inkubiert. Vor Beginn der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden jeweils in der entsprechenden Konzentration im Antikörperdiluent gelöst und auf die Zellen gegeben. Folgende Inkubationszeiten wurden eingehalten: Primärantikörper: 2 h, Sekundärantikörper: 1,5 h (vgl. Abschnitt 4.3). Die Inkubation erfolgte in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Nach Ende jeder Antikörperinkubation erfolgte eine dreimalige Spülung mit 1x PBS. Abschließend wurden die Zellen für 10 min mit einer DAPI-Lösung (1:10.000 in 1x PBS) inkubiert und danach dreimal mit 1x PBS gewaschen. Zur Einbettung der Zellen wurde ein Tropfen ProLongTM Gold Reagenz verwendet.

4.10.2 Analyse von Foci und Mikronuklei

Durch die Quantifizierung von charakteristischen Proteinen der DDR (ATM, H2AX) sowie von MN kann eine Aussage über das Ausmaß von DNA-Schäden und damit über die Sensibilität von Zellen gegenüber milieubedingten, genotoxischen Stressfaktoren ermittelt werden.

Nach der immunzytochemischen Färbung der Zellen mit einem γ H2AX- und pATM-Antikörper wurden diese unter Nutzung eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DMI 6000 B) analysiert. Hierfür wurden die Zellen einer individuellen Gesamtzellpopulation zunächst unter Anregung der DAPI-Chromatinfärbung bei 63-facher Vergrößerung ausgewählt und anschließend die Anzahl der pATM- und γ H2AX-Foci von mindestens 30 verschiedenen Zellen gezählt. Für die Analyse des Auftretens von MN wurden mindestens 100 verschiedene Zellen in DAPI-Färbung gesichtet und die Anzahl der detektierten MN dokumentiert. Die Aufnahme von Beispielbildern erfolgte mit dem Programm Leica Application Suite 1.9.0. Die Berechnung der Anzahl der Foci und MN pro Zelle erfolgte für jede Gesamtzellpopulation mit folgenden Formeln:

$$\text{Anzahl der } \gamma\text{H2AX – Foci pro Zelle} = \frac{\text{Anzahl der } \gamma\text{H2AX-Foci}}{\text{Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen } (\geq 30)}$$

$$\text{Anzahl der pATM – Foci pro Zelle} = \frac{\text{Anzahl der pATM-Foci}}{\text{Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen } (\geq 30)}$$

$$\text{Anzahl der Mikronuklei pro Zelle} = \frac{\text{Anzahl der MN}}{\text{Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen } (\geq 100)}$$

4.11 Proteinanalyse mittels Western Blot

Für diesen Versuch wurden ECFC von insgesamt fünf verschiedenen NP (n = 5) verwendet. Es erfolgte entsprechend Abschnitt 4.9.6 eine Vorbehandlung der Zellen mit H₂O₂, 1 % O₂ und VD.

4.11.1 Proteinextraktion

Mit der Proteinextraktion wurde sofort nach Ende der Inkubation mit H₂O₂ bzw. 1 % O₂ begonnen. Während des gesamten Vorgangs wurden alle Reaktionsgefäße und das 1x PBS auf Eis gelagert. Zentrifugationen fanden bei 4 °C statt. Dies diente dem Ziel, einer beschleunigten Proteindenaturierung entgegenzuwirken.

Das Ablösen der Zellen und ihre Überführung in ein Zellpellet erfolgte in Anlehnung an den im Abschnitt 4.9.4 beschriebenen Ablauf. Nach Erhalt des Zellpellets wurde der Überstand verworfen und 5 ml 1x PBS zugegeben. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 400 g für 5 min. Jetzt wurde das Zellsediment in 1 ml 1x PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 800 g für 7,5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in Proteinlysepuffer resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension bei 16.200 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der proteinreiche Überstand (Proteinlysat) in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Langzeitlagerung von Proteinlysaten erfolgte bei -80 °C.

4.11.2 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proteinlysaten wurde die Bradford-Methode angewandt. Diese Form der photometrischen Quantifizierung von Proteinen beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 365 nm zu 595 nm des Coomassie-Brilliant-Blau-G250-Farbstoffs sobald dieser an Proteine bindet (126). Ein Reaktionsansatz bestand jeweils aus 800 µl Aqua bidest, 200 µl Bradford-Reagenz und 1 µl Proteinlysat. Dieser wurde für 5 min bei Raumtemperatur in einem Reaktionsgefäß inkubiert und anschließend in eine Uvette überführt. Zur Bestimmung des Leerwertes (Kontrolle) wurde 1 µl Proteinlysepuffer verwendet. Die Messung der optischen Dichte im Bio-Photometer erfolgte bei 595 nm. BSA diente zur Kalibrierung der Standardkurve im Messbereich von 2 bis 10 mg/ml.

4.11.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem Natriumdodecylsulfat-haltigen Polyacrylamid-Gel (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) ermöglicht die massenspezifische Auftrennung von proteinreichen Lösungen (127). Die individuelle Laufgeschwindigkeit der Proteine wird durch eine Kombination aus zwei Gelen unterschiedlicher pH-Werte und Porengröße determiniert. Dabei dient das Sammelgel der Fokussierung der Proteine in ihrer jeweiligen Laufbande und führt somit zum einheitlichen Übertritt in das darunterliegende Trenngel, in welchem die Proteine anschließend nach ihrer Masse aufgetrennt werden.

Zuerst erfolgte der Guss des Trenngels (4,2 % oder 10 %), welches für die Zeit der vollständigen Auspolymerisation mit 70 % Ethanol überschichtet wurde. Nach Entfernung der Ethanolschicht wurde das Sammelgel (5 %) auf das Trenngel gegossen. Durch das Einführen eines 10- bzw. 20-zinkigen, 0,8 mm dicken Kamms in das noch flüssige Sammelgel wurden die Probentaschen angelegt. Vor Überführung in die Probentasche wurde jede Probe mit 5 µl 1x SDS-Beschwerungspuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. In jede Geltasche wurde 40–60 µg Protein aufgetragen. Als Laufkontrolle wurde eine Tasche je Gel mit 7 µl Proteinmarker (Precision Plus Protein™ All Blue Standards) beladen. Zur Gelelektrophorese wurden die Gelelektrophoresekammern „TwinEx ws“ oder „Mini Protean II®“ benutzt. Als Laufpuffer wurde 1 x GTS benutzt. Für das Sammelgel betrug die Spannung konstant 70 V; für das Trenngel 120 V. Die Gelelektrophorese wurde, sobald die Laufmittelfront das Trenngelende erreicht hatte, beendet.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Sammelgele für die SDS-PAGE.

Sammelgel (Material für 2 Gele)	5 %	
	Mini Protean II®	TwinEx ws
ddH ₂ O [ml]	2,75	5,5
40 % Acrylamid [ml]	0,64	1,28
2 % Bis-Acrylamid [ml]	0,35	0,7
Sammelgelpuffer pH 6,8 [ml]	1,23	2,46
20 % SDS [µl]	25	50
TEMED [µl]	20	40
10 % APS [µl]	40	80

Tabelle 13: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE.

Trenngel (Material für 2 Gele)	4,2 %		10 %	
	Mini Protean II®	TwinEx ws	Mini Protean II®	TwinEx ws
ddH ₂ O [ml]	4,79	9,58	3,06	6,12
Trenngelpuffer (pH 8,8) [ml]	3,76	7,52	3,76	7,52
40 % Acrylamid [ml]	1,13	2,26	2,5	5
2 % Bis-Acrylamid [ml]	0,21	0,42	0,66	1,32
20 % SDS [µl]	50	100	50	100
TEMED [µl]	10	20	10	20
10 % APS [µl]	50	100	50	100

4.11.4 Immunoblot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mittels der *wet-tank-blot*-Methode aus dem Acrylamid-Gel auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert. Die Blot-Kassetten der Transfereinheiten „Hoefer TE62“ oder „Mini Protean II®“ wurden von unten nach oben in folgender Reihenfolge bestückt: schwarze Kathoden-Seite der Kassette, Schwamm, zwei Lagen Whatman Papier, Sammelgel mit Proteinen, Nitrocellulose-Membran, zwei Lagen Whatman Papier, Schwamm, rote Anoden-Seite der Kassette. Anschließend wurden die bestückten Kassetten in den mit Transferpuffer befüllten Blot-Tank eingespannt. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte bei einer Spannung von 35 V für 3 h (Zielprotein: pAKT, CHK2) bzw. bei 100 V für 30 min (Zielprotein: pATM) und 4 °C.

Alle folgenden Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf einem Schütteltisch. Um unspezifische, freie Bindungsstellen an den Proteinen auf der Membran zu blockieren, wurde diese für 60 min in Blockpuffer oder Roti®-Block-Arbeitslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem Primärantikörper. Danach wurde die Membran dreimal für 15 min mit 1x PBS-T gewaschen bevor sie für 2 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde. Nach einer dreimaligen Waschung der Membran mit PBS-T für 15 min erfolgte zur Entwicklung der Membran die Inkubation mit dem Western Bright™ Quantum Chemiluminescent HRP Substrat für 2 min bei Raumtemperatur. Auf die luftblasenfrei in eine Plastikfolie einlamierte Membran wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm gelegt. In Abhängigkeit von der Chemilumineszenzintensität des sekundären Antikörpers betrug die Expositionsdauer zwischen einer Sekunde und 60 min. Zur

Entwicklung der Röntgenfilme wurde eine Optimax Röntgenfilmentwicklungsmaschine genutzt. Die Digitalisierung der entwickelten Röntgenfilme erfolgte durch das Abfotografieren während Lagerung auf einem Leuchttisch oder durch Einscannen. Zur densitometrischen Auswertung wurde die Software ImageJ 1.50b benutzt. Die Berechnung der Protein-Phosphorylierungsgrade erfolgte durch verhältnismäßige Bestimmung des Anteils der phosphorylierten Proteinvariante am densitometrischen Messergebnis des Gesamtproteins ($p[\text{Protein}] / [\text{Gesamtprotein}] - \text{Ratio}$).

4.12 Untersuchung der elektrischen Impedanz

ECFC bilden bei der Kultivierung *in vitro* durch die voranschreitende Zellteilung charakteristischerweise zunächst umschriebene Zellkolonien aus, die sich anschließend zu einem kontinuierlichen, adhärennten Zellrasen weiterentwickeln. Dieser Proliferationsprozess geht dabei mit einem Anstieg der Zellzahl und -adhärenz sowie Veränderungen der Zellmorphologie einher.

Die Veränderung dieser für die Zellproliferation typischen Parameter können technisch mittels eines RTCA-Geräts (*Real-Time Cell Analyzer*) in Echtzeit quantifiziert werden (128). Die im RTCA-Gerät verwendeten Zellkulturplatten enthalten in jedem Well eine negative und eine positive goldbeschichtete Mikroelektrode, zwischen welchen bei Zugabe von Zellmedium ein messbarer elektrischer Strom fließt. Dieser Elektronenfluss wird mit steigender Zelladhärenz behindert, vom RTCA-Gerät als Impedanzveränderung detektiert und von der xCELLigence RTCA Software in die einheitslose Kenngröße Zell-Index (CI) konvertiert (129). Der aus der elektrischen Impedanzveränderung abgeleitete CI gilt daher als proportionaler Messindikator für die Veränderung verschiedener Parameter zellulärer Proliferation, u.a. der Zellzahl, -adhärenz und -morphologie (129, 130).

In dieser Arbeit wurde mithilfe des RTCA-Systems die unterschiedliche Reaktion von PE- und NP-ECFC auf die Gabe eines ATM-Inhibitors (ATMi) untersucht. Die Aussaat und Kultivierung der Zellen erfolgte in Quadruplikaten zu mindestens 2000–2500 Zellen pro Well in einer goldbeschichteten, elektronisch auslesbaren 96-Well-Platte (E-Platte) 24 h vor Zugabe des ATM-Inhibitors. Dafür wurde zur initialen Äquilibration der E-Platte zunächst 100 µl Medium pro Well zugegeben. Danach erfolgte die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der Äquilibration wurde für jedes Well die Hintergrund-Impedanz („Impedanz-Baseline“) gemessen. Nun erfolgte die Zugabe der Zellen in 200 µl Behandlungsmedium und eine erneute Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur, welche dem Absetzen der Zellen am Wellboden diente. Anschließend wurde die mit Zellen bestückte E-Platte in der RTCA-Station platziert und die automatische Impedanzmessung in 15 min Intervallen gestartet. Nach 24 h erfolgte die zweifache Waschung mit 1x PBS, ein Mediumwechsel und die Behandlung mit 10 µM ATMi oder 10 µM DMSO (Kontrolle). Danach wurde die automatisierte Impedanzmessung im RTCA-Gerät alle 15 min für insgesamt 65 h fortgesetzt. Während des Versuchs wurde die RTCA-Messeinheit bei konstanten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) im Inkubationsschrank gelagert. Die Aufzeichnung und Analyse der erhobenen Messwerte erfolgte mit der RTCA WellSoftware 1.2.1. Zur Auswertung wurden die auf den Zugabezeitpunkt des ATMi normalisierten CI-Werte ($CI_{(t=\text{Zugabe})} = 1$)

verwendet. Dieser Versuch wurde mit ECFC fünf verschiedener NP und fünf verschiedener PE-Patientinnen durchgeführt (n = 5).

4.13 Bestimmung der basalen intrazellulären oxidativen

Stresslevel

Zur Bestimmung der intrazellulären oxidativen Stresslevel (IOS-Level) wurde das kommerziell erhältliche OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit der Firma Cell Biolabs entsprechend des Herstellerprotokolls angewendet. Bei dieser Nachweismethode wird 2', 7'-Dichlorodihydrofluoreszindiacetat (DCFH-DA) nach intrazellulärem Kontakt mit freien Sauerstoffspezies zu stark fluoreszierendem 2', 7'-Dichlorodihydrofluoreszein (DCF) umgewandelt. Die Fluoreszenzintensität (FI) von DCF ist dabei proportional zum Mengenanteil der detektierten intrazellulären ROS-Intermediate (131-133). Als Maß der Fluoreszenzintensität wurden relative Fluoreszenzeinheiten (RFU, *relative fluorescence unit*) genutzt.

Die Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn in einer 96-Well-Platte mit schwarzem Boden in Triplikaten ausgesät. Zu Beginn des Versuchs wurde das Proliferationsmedium abgesaugt, die Zellen zweifach mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 45 min mit 2', 7'-Dichlorodihydrofluoreszindiacetat (DCFH-DA) inkubiert. Nach einer zweimaligen Spülung der Zellen mit 1x PBS wurden die Zellen mit 10 µM ATMi in Behandlungsmedium versetzt. Es wurde zu jeder Probe eine entsprechende Kontrolle mit 10 µM DMSO mitgeführt, welches als Lösungsmittel für ATMi diente. Unmittelbar danach wurde mit der Fluoreszenzanalyse mit dem Fluoreszenzlesegerät Fluoroskan Ascent FL begonnen und diese für 28 h fortgesetzt. Die Messung erfolgte bei 480 nm und 530 nm.

Der Versuch wurde mit ECFC fünf verschiedener NP und fünf verschiedener PE-Patientinnen durchgeführt, wobei jeweils eine der fünf Zelllinien jeder Versuchsgruppe in doppelten Triplikaten untersucht wurde (ein technisches Replikat je Versuchsgruppe, n = 6).

4.14 Statistische Auswertung

Die statistische Berechnung und grafische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 7 nach Bereinigung der experimentell erhobenen Daten mit einem Ausreißertest (ROUT-Methode, Falscherkennungsrate $Q = 1$). Anschließend wurde die Normalverteilung (NV) mit dem Normalverteilungstest nach Shapiro-Wilk (SW) oder D'Agostino-Pearson (DP) vorgenommen. Lagen normalverteilte Daten vor, wurde die Testung auf Signifikanz mit dem ungepaarten t-Test (UT) oder Einstichproben-t-Test (*one sample t-test*, OST) durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test (MW), Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (WR) oder Kruskal-Wallis-Test (KW) verwendet. Als signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), $< 0,001$ (***) und $< 0,0001$ (****) gewertet.

In den Abbildungen der folgenden Abschnitte sind die Daten grafisch als Box-Whisker-Blots dargestellt, wobei die senkrechten, vom oberen und unteren Boxende ausgehenden Antennen den Minimal- und Maximalwert angeben und die durchgezogene, waagerechte Linie in der Box den Median (MD)

kennzeichnet. Das obere Ende der Box markiert die 75. Perzentile und das untere Ende der Box die 25. Perzentile. Fehlende Darstellung der Antennen oder Mediane kommen aufgrund von ≤ 2 ungleichen Messwerten in der jeweiligen Versuchsgruppe zustande. Die numerische Angabe der Mediane erfolgte unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit der gemessenen Parameter mit Rundung auf bis zu vier Nachkommastellen sowie unter Verwendung eines Punktes (.) als Tausendertrennzeichen bei Zahlwerten ≥ 1.000 . Bei der Darstellung relativer Ergebnisse wurden die Daten in ihrer Relation zur Kontrollgruppe (z.B. Lösungsmittel der Behandlungssubstanz, unbehandelte Probe, gesunde Schwangere) beschrieben. Die Kontrolle (CTRL) entspricht jeweils 1. Im Kontext der Statistik beschreibt der Buchstabe „n“ die Anzahl aller Einzelmesswerte und „N“ die Zahl Experimentwiederholungen. Zusätzliche Angaben zur statistischen Berechnung sind in den entsprechenden Abbildungsunterschriften zu finden.

5 Ergebnisse

5.1 Teilprojekt 1: Einfluss von Vitamin D₃ auf die DNA-Schadenssignalkaskade unter Präeklampsie-ähnlichen Stressbedingungen

Dieses Teilprojekt wurde mit ECFC gesunder Schwangerer durchgeführt, welche nach Applikation von H₂O₂ oder Hypoxie einem PE-ähnlichem Stress-Milieu ausgesetzt waren (vgl. Abschnitt 2.1.4). Ziel war es, den Einfluss von VD auf den Phosphorylierungsstatus und die Proteinlevel von Akt, ATM und CHK2 zu untersuchen sowie die Anzahl von γ H2AX- und pATM-Foci und von MN zu bestimmen. Diese Messgrößen gelten als Indikatoren für das Auftreten von DNA-Schäden und die anschließende Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade unter oxidativem Stress (vgl. Abschnitt 2.3).

Die Immunoblot-basierte Analyse des Phosphorylierungsstatus und der Proteinlevel von Akt, ATM und CHK2 wurden wie in Abschnitt 4.11 beschrieben durchgeführt. Die immunzytochemischen Analysen des Auftretens von γ H2AX- und pATM-Foci sowie von MN erfolgten wie in Abschnitt 4.10 dargelegt. Im Folgenden wurden zwei verschiedene Weisen der Ergebnisdarstellung genutzt:

- „Absolute“ Messwerte auf Grundlage der reinen Rohdaten (ausgezählte Anzahl der Foci oder MN pro Zelle) wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (UNT) dargestellt, um den Einfluss einer H₂O₂- bzw. Hypoxie-Behandlung auf die Foci- oder MN-Anzahl zu ermitteln.
- „Relative“ Werte ergaben sich nach Normalisierung der Rohdaten auf die entsprechende Kontrollgruppe (CTRL) und zeigen das Verhältnis des Messwerts in Relation zur CTRL, um so zusätzlich den Einfluss einer VD-Behandlung beurteilen und einen Lösungsmittelleffekt durch EtOH ausschließen zu können. Die CTRL entspricht je nach Behandlungsgruppe entweder einer unbehandelten Probe oder der mit EtOH behandelten Lösungsmittelkontrollgruppe und ist in der grafischen Darstellung mit dem Zahlenwert „1“ und einer gestrichelten grauen Linie gekennzeichnet.

5.1.1 Akt-Proteinlevel und -Phosphorylierungsgrade unter dem Einfluss prägeklamptischer Stressoren und Vitamin-D₃-Behandlung

Ziel der folgenden Untersuchung war die Analyse des Einflusses von VD auf die Akt- und pAkt-Proteinlevel sowie die Akt-Phosphorylierungsgrade unter Simulation prägeklamptischer Stressbedingungen mit H₂O₂ oder Hypoxie in ECFC gesunder Schwangerer. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der unter Abschnitt 4.11 dargestellten Methodik mittels Immunoblotverfahren.

5.1.1.1 Akt-Proteinlevel und Akt-Phosphorylierungsgrade unter H₂O₂-Behandlung und Vitamin D₃

Nach Behandlung von ECFC mit H₂O₂ (Abb. 4) konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine nicht signifikante Reduktion der pAkt-Proteinlevel (25 µM H₂O₂ [MD = 0,45; p = 0,17; OST], 100 µM H₂O₂ [MD = 0,46; p = 0,12; OST], Akt-Proteinlevel (25 µM H₂O₂ [MD = 0,79; p = 0,16; OST], 100 µM H₂O₂ [MD = 0,83; p = 0,39; OST]) sowie Akt-Phosphorylierungsgrade (25 µM H₂O₂ [MD = 0,57; p = 0,21; OST], 100 µM H₂O₂: [MD = 0,55; p = 0,09; OST) festgestellt werden. (Abb. 4).

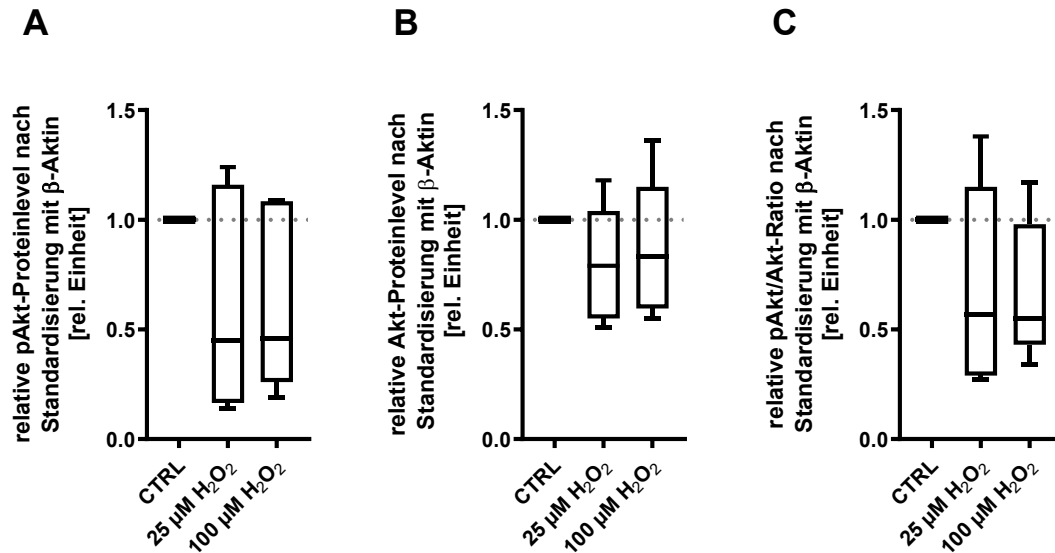


Abb. 4: (A) pAkt- und (B) Akt-Proteinlevel und (C) Akt-Phosphorylierungsgrade (pAkt/Akt-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H₂O₂.

Immunoblot-basierte Analyse der pAkt- und Akt-Proteinlevel nach Behandlung mit 25 µM oder 100 µM H₂O₂ für 30 min und anschließende densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. β-Aktin diente als Ladekontrolle und zur Standardisierung. Normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (CTRL: y = 1). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 5.

Um zu ermitteln, welchen Einfluss VD auf die oben beschriebene Veränderung der pAkt- und Akt-Proteinlevel sowie die Akt-Phosphorylierungsgrade unter H₂O₂-Behandlung besitzt, wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt.

Bei alleiniger Behandlung der ECFC mit 0,1 nM oder 10 nM VD konnte eine Reduktion der pAkt-Proteinlevel (0,1 nM VD [MD = 0,94; p = 0,63, WR], 10 nM VD [MD = 0,88; p > 0,99; WR]) und Akt-Proteinlevel (0,1 nM VD [MD = 0,90; p = 0,10; OST], 10 nM VD: MD = 0,87; p = 0,008; OST) im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden (Abb. 5A, B). Der Abfall der Akt-Proteinlevel unter Behandlung mit 10 nM VD zeigte sich dabei im Vergleich zu den anderen Messergebnissen als einziger Messwert signifikant (MD = 0,87; p = 0,008, OST) (Abb. 5B). Die Akt-Phosphorylierungsgrade zeigten sich nach Behandlung von ECFC mit 0,1 nM oder 10 nM VD im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant erhöht (0,1 nM VD [MD = 1,07; p > 0,99; WR; 10 nM VD [MD = 1,11; p = 0,31; WR) (Abb. 5C).

In den Versuchsgruppen mit VD-Applikation und gleichzeitiger Behandlung mit H₂O₂ wurde in ECFC eine nicht signifikante Verminderung des mit 25 µM und 100 µM H₂O₂ assoziierten Abfalls der pAkt-

Proteinlevel (25 μM H_2O_2 [MD = 0,45; p = 0,31; WR], 25 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,76; p = 0,13; WR], 25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,04; p = 0,81; WR], 100 μM H_2O_2 [MD = 0,46; p = 0,31; WR], 100 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,82; p = 0,13; WR], 100 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 0,74; p = 0,81; WR]) sichtbar (Abb. 5A).

Ein ebensolcher Effekt konnte auch bei der Untersuchung der Akt-Proteinlevel in ECFC gezeigt werden (25 μM H_2O_2 [MD = 0,79; p = 0,16; OST], 25 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,94; p = 0,29; OST], 25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,14; p = 0,09; OST], 100 μM H_2O_2 [MD = 0,83; p = 0,39; OST], 100 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 1,00; p = 0,37; OST], 100 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,14; p = 0,40; OST]). Dabei zeigte sich keines der Resultate signifikant (Abb. 5B).

Bei Anwendung von 10 nM VD auf H_2O_2 -vorbehandelte ECFC konnte teilweise eine nicht signifikante Erhöhung der relativen pAkt-Proteinlevel (25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,04; p = 0,81; WR]) bzw. der Akt-Proteinlevel (25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,14; p = 0,09; OST], 100 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,14; p = 0,40; OST]) im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 5A, B).

Auch bezüglich der Akt-Phosphorylierungsgrade konnte ermittelt werden, dass die VD-Applikation mit einer Verminderung des mit 25 μM H_2O_2 (25 μM H_2O_2 [MD = 0,57; p = 0,19; WR], 25 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,83; p = 0,13; WR], 25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 0,79; p > 0,99; WR]) und 100 μM H_2O_2 (100 μM H_2O_2 [MD = 0,55; p = 0,13; WR], 100 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,93; p = 0,63; WR], 100 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 0,58; p = 0,81]) assoziierten nicht signifikanten Abfalls der Akt-Phosphorylierungsgrade in ECFC einherging (Abb. 5C).

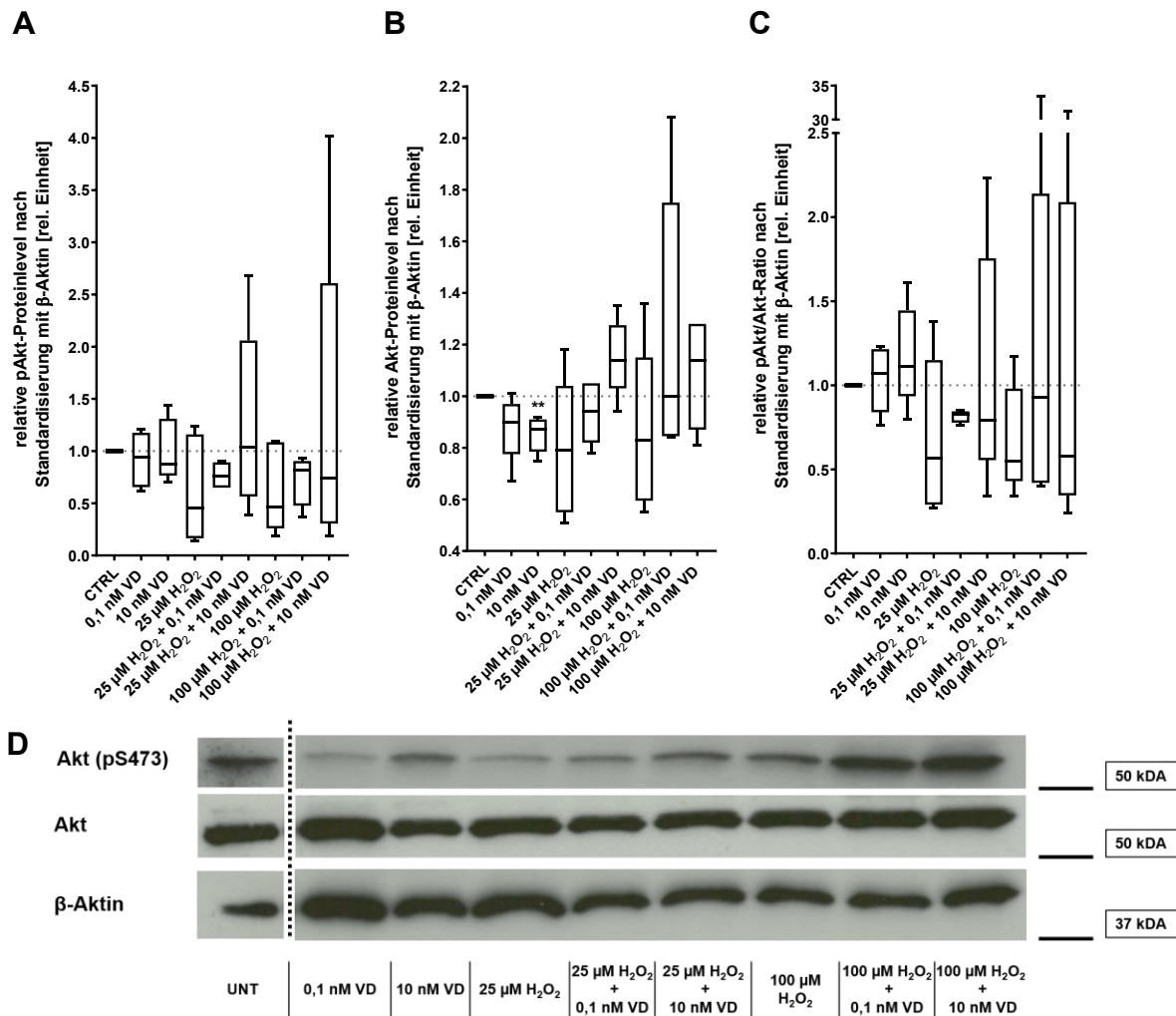


Abb. 5: (A) pAkt- und (B) Akt-Proteinlevel und (C) Akt-Phosphorylierungsgrade (pAkt/Akt-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H₂O₂ $\pm$ Vitamin D₃ sowie (D) exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.

Immunoblot-basierte Analyse der pAkt- und Akt-Proteinlevel nach Behandlung mit 25 μ M oder 100 μ M H₂O₂ für 30 min $\pm$ 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. β -Aktin diente als Ladekontrolle und zur Standardisierung. Normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: y = 1). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Statistische Berechnung: Einstichproben-t-Test, **: p < 0,01. n = 5. VD: Vitamin D₃; UNT: unbehandelte Kontrolle.

5.1.1.2 Akt-Proteinlevel und Akt-Phosphorylierungsgrade unter Hypoxie-Behandlung und Vitamin D₃

Nach Behandlung von ECFC mit Hypoxie konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe allgemein reduzierte pAkt-Proteinlevel (1% O₂ [MD = 0,86; p = 0,01; OST]), Akt-Proteinlevel (1 % O₂ [MD = 0,90; p = 0,63; WR]) sowie Akt-Phosphorylierungsgrade (1 % O₂ [MD = 0,96; p = 0,64; OST]) festgestellt werden (Abb. 6). Dabei war unter Behandlung mit Hypoxie nur die Reduktion der pAKT-Proteinlevel in ECFC signifikant (MD = 0,86; p = 0,01; OST) (Abb. 6A).

Anschließend wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt. Unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) konnte bei Behandlung der ECFC mit 0,1 nM VD eine Verstärkung der Hypoxie-assoziierten Abnahme der pAkt- Proteinlevel (1 % O₂: [MD = 0,86; p = 0,01; OST]; 1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,59; p = 0,33; OST]), Akt-Proteinlevel (1 % O₂ [MD = 0,90; p = 0,63; WR], 1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,85; p = 0,13; WR]) und der Akt-Phosphorylierungsgrade (1 % O₂ [MD = 0,96; p = 0,64; OST],

1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,82; p = 0,77; OST]) festgestellt werden. Diese Ergebnisse waren im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant (Abb. 6).

Dagegen wurde bei Behandlung mit 10 nM VD unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) eine Abschwächung der nicht signifikanten Hypoxie-assoziierten Abnahme der pAkt-Proteinlevel, Akt-Proteinlevel und der Akt-Phosphorylierungsgrade ermittelt. Es zeigten sich stattdessen eine relative Zunahme der pAkt-Proteinlevel (1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 1,08; p = 0,45; OST]) und Akt-Proteinlevel (1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 1,07; p = 0,63; WR]) sowie konstante Akt-Phosphorylierungsgrade (1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 1,00; p = 0,50; OST]) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant (Abb. 6).

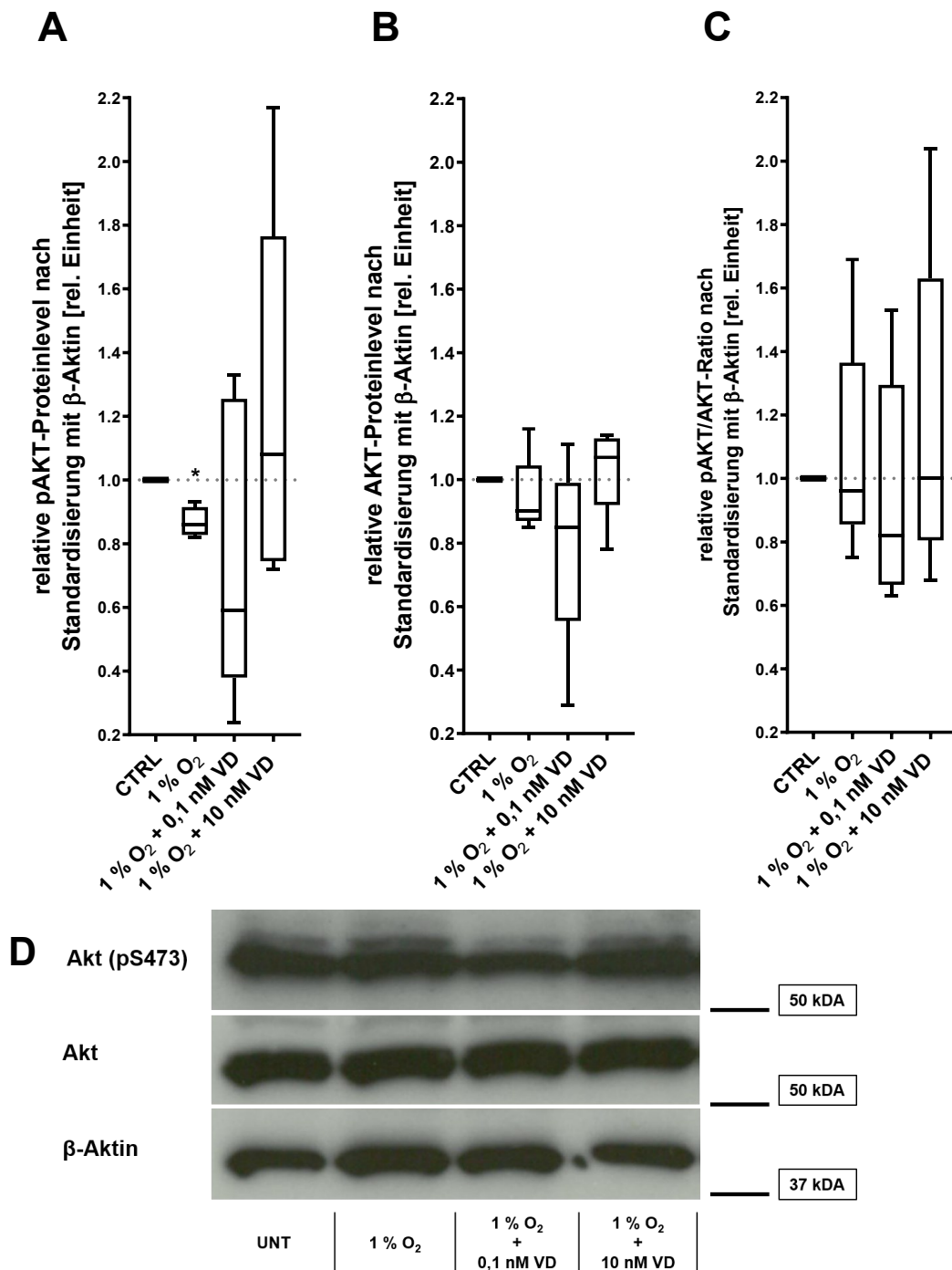


Abb. 6: (A) pAkt- und (B) Akt-Proteinlevel und (C) Akt-Phosphorylierungsgrade (pAkt/Akt-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie $\pm$ Vitamin D₃ sowie (D) exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.

Immunoblot-basierte Analyse der pAkt- und Akt-Proteinlevel nach Behandlung mit 1 % O₂ für 24 h $\pm$ 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. β -Aktin diente als Ladekontrolle und zur Standardisierung. Normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: $y = 1$). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Statistische Berechnung: Einstichproben-t-Test, *: $p < 0,05$. $n = 5$. VD: Vitamin D₃; UNT: unbehandelte Kontrolle.

5.1.2 ATM-Proteinlevel und -Phosphorylierungsgrade unter dem Einfluss preklamptischer Stressoren und Vitamin-D₃-Behandlung

Auf Grundlage der obigen Ergebnisse zu Akt wurde im Folgenden auch überprüft, wie sich die Proteinexpression von ATM, dem Schlüsselenzym der DNA-Schadensreparatur (vgl. Abschnitt 2.3.2.1), unter dem Einfluss preklamptischer Stressoren und VD in ECFC verändert. Dazu wurden mit H₂O₂ oder Hypoxie preklamptische Stressbedingungen in ECFC gesunder Schwangerer simuliert und der Einfluss von VD auf die ATM- und pATM-Proteinlevel sowie die ATM-Phosphorylierungsgrade untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der unter Abschnitt 4.1.1 dargestellten Methodik mittels Immunoblotverfahren.

5.1.2.1 ATM-Proteinlevel und ATM-Phosphorylierungsgrade unter H₂O₂-Behandlung und Vitamin D₃

Nach Behandlung von ECFC mit 25 μ M H₂O₂ zeigte sich eine nicht signifikante relative Abnahme der pATM-Proteinlevel (25 μ M H₂O₂ [MD = 0,91; p = 0,81; WR]), der ATM-Proteinlevel (25 μ M H₂O₂ [MD = 0,84; p = 0,98; OST]) und der ATM-Phosphorylierungsgrade (25 μ M H₂O₂: [MD = 0,90; p = 0,61; OST]). In den Versuchsgruppen mit 100 μ M H₂O₂ Behandlung war dieser nicht signifikante Trend nur in Bezug auf die pATM-Proteinlevel (100 μ M H₂O₂ [MD = 0,86; p = 0,75; WR]) erkennbar, wohingegen sich die ATM-Proteinlevel (100 μ M H₂O₂: [MD = 1,02; p = 0,57; OST]) und ATM-Phosphorylierungsgrade (100 μ M H₂O₂: [MD = 1,02; p = 0,64; OST]) nahezu unverändert zeigten (Abb. 7).

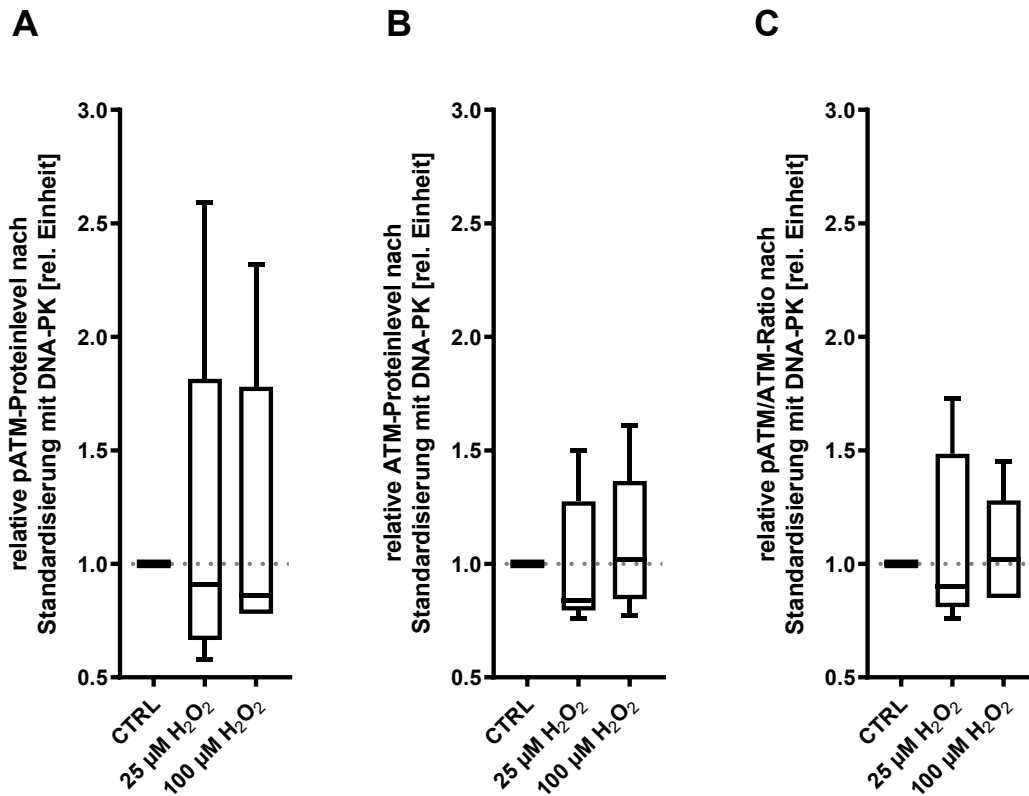


Abb. 7: (A) pATM- und (B) ATM-Proteinlevel und (C) ATM-Phosphorylierungsgrade (pATM/ATM-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H₂O₂.

Immunoblot-basierte Analyse der pATM- und ATM-Proteinlevel nach Behandlung mit 25 µM oder 100 µM H₂O₂ für 30 min und anschließende densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. DNA-PK diente als Ladekontrolle und zur Standardisierung. Normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (CTRL: $y = 1$). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. $n = 5$.

Um zu ermitteln, welchen Einfluss VD auf die oben beschriebene Veränderung der pATM- und ATM-Proteinlevel sowie der ATM-Phosphorylierungsgrade unter H₂O₂-Behandlung besitzt, wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt.

Bei der alleinigen Behandlung von ECFC mit 0,1 nM oder 10 nM VD zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell leicht verminderte pATM-Proteinlevel (0,1 nM VD: [MD = 0,97; $p > 0,99$; WR], 10 nM VD [MD = 0,98; $p > 0,99$; WR]) (Abb. 8A) und ATM-Proteinlevel (0,1 nM VD [MD = 0,97; $p = 0,54$, OST], 10 nM VD [MD = 0,85; $p = 0,09$; OST]) (Abb. 8B) sowie leicht erhöhte ATM-Phosphorylierungsgrade (0,1 nM VD [MD = 1,04; $p = 0,18$; OST], 10 nM VD [MD = 1,08, $p = 0,41$; OST]). Der Trend dieser Ergebnisse war statistisch nicht signifikant (Abb. 8C).

In der ECFC-Versuchsgruppe mit H₂O₂-Behandlung und gleichzeitiger Behandlung mit 0,1 nM oder 10 nM VD konnte eine Abschwächung der H₂O₂-assoziierten nicht signifikanten pATM-Proteinlevel-Verminderung bzw. eine teilweise Umkehr hin zu einem relativen Anstieg der pATM-Proteinlevel festgestellt werden (25 µM H₂O₂: [MD = 0,91; $p = 0,81$; WR], 25 µM H₂O₂ + 0,1 nM VD [MD = 1,26; $p = 0,31$; WR], 25 µM H₂O₂ + 10 nM VD [MD = 1,20; $p = 0,63$, WR], 100 µM H₂O₂ [MD = 0,86; $p = 0,75$; WR], 100 µM H₂O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,92; $p = 0,75$; WR], 100 µM H₂O₂ + 10 nM VD

[MD = 1,51, $p = 0,06$; WR]). Dabei konnte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 8A).

Bezogen auf die ATM-Proteinlevel fiel dieser Effekt weniger eindeutig aus und wurde insbesondere in den ECFC-Versuchsgruppen mit 25 μM H_2O_2 sichtbar (25 μM H_2O_2 [MD = 0,84; $p = 0,98$; OST]; 25 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 1,10; $p = 0,36$; OST], 25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,18; $p = 0,10$; OST]). Unter Behandlung von ECFC mit 100 μM H_2O_2 zeigten sich hingegen keine eindeutigen Zusammenhänge (100 μM H_2O_2 [MD = 1,02; $p = 0,57$; OST], 100 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,96; $p = 0,85$; OST], 100 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,47; $p = 0,14$; OST]). Im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen ergab sich dabei kein statistisch signifikanter Unterschied. (Abb. 8B).

In mit 0,1 nM und 10 nM VD vorbehandelten ECFC konnten nach Applikation von H_2O_2 höhere ATM-Phosphorylierungsgrade festgestellt werden als in den nicht mit VD vorbehandelten Versuchsgruppen. In den mit 25 μM H_2O_2 behandelten ECFC-Versuchsgruppen wurde dies als Verminderung der H_2O_2 -assoziierten Abnahme der ATM-Phosphorylierungsgrade sichtbar (25 μM H_2O_2 [MD = 0,90; $p = 0,61$; OST], 25 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 1,04; $p = 0,14$; OST], 25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 0,92; $p = 0,75$; OST]). In den mit 100 μM H_2O_2 behandelten ECFC-Versuchsgruppen zeigte sich hingegen eine Verstärkung der dezenten H_2O_2 -assoziierten Zunahme der relativen ATM-Phosphorylierungsgrade (100 μM H_2O_2 [MD = 1,02; $p = 0,64$; OST], 100 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 1,24; $p = 0,09$; OST], 100 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,13; $p = 0,22$; OST]). Diese Veränderungen zeigten in der statistischen Analyse keinen signifikanten Unterschied. (Abb. 8C).

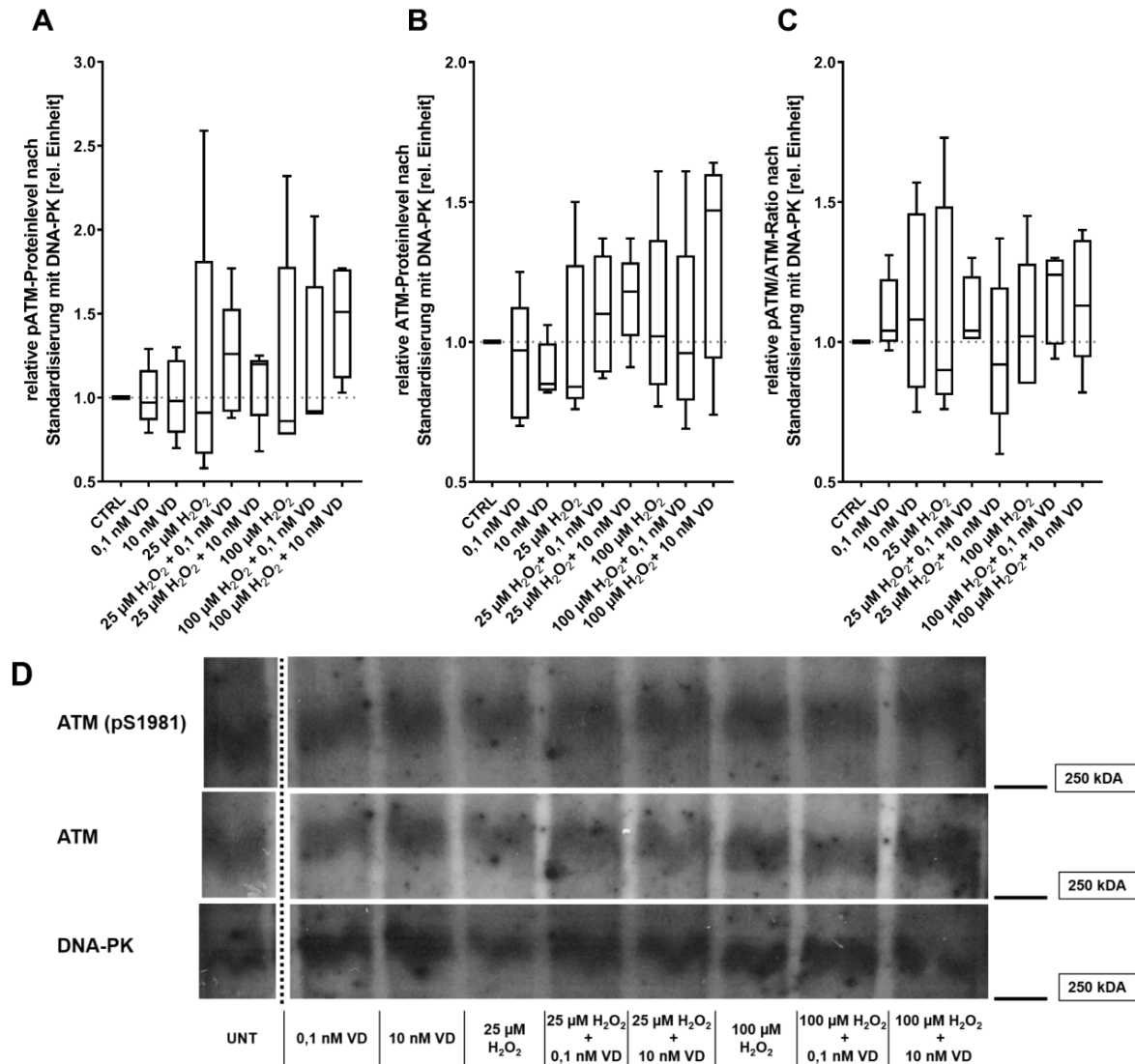


Abb. 8: (A) pATM- und (B) ATM-Proteinlevel und (C) ATM-Phosphorylierungsgrade (pATM/ATM-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H₂O₂ ± Vitamin D₃ sowie (D) exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.

Immunoblot-basierte Analyse der pATM- und ATM-Proteinlevel nach Behandlung mit 25 μ M oder 100 μ M H₂O₂ für 30 min ± 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. DNA-PK diente als Ladekontrolle und zur Standardisierung. Normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: y = 1). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 5. VD: Vitamin D₃; UNT: unbehandelte Kontrolle.

5.1.2.2 ATM-Proteinlevel und ATM-Phosphorylierungsgrade unter Hypoxie-Behandlung und Vitamin D₃

Unter Hypoxie-Behandlung (1 % O₂) zeigten sich in ECFC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht signifikant erhöhte pATM-Proteinlevel (1 % O₂ [MD = 1,29; p = 0,37; OST]) und ATM-Proteinlevel (1 % O₂ [MD = 1,09; p = 0,26; OST]) sowie signifikant erniedrigte ATM-Phosphorylierungsgrade (1 % O₂ [MD = 0,91; p = 0,003; OST]) (Abb. 9).

Anschließend wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt. Unter Behandlung von ECFC mit VD zeigte sich die Hypoxie-assoziierte nicht signifikante Zunahme der pATM-Proteinlevel (1 % O₂ [MD = 1,29; p = 0,37; OST]) und ATM-Proteinlevel (1 % O₂ [MD = 1,09; p = 0,26; OST]) rückläufig und es wurde

stattdessen eine Umkehr hin zu verminderten pATM-Proteinleveln (1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,82; p = 0,009; OST], 1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 0,88; p = 0,09; OST] und ATM-Proteinleveln (1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,85; p = 0,007; OST], 1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 0,96; p = 0,32; OST]) im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Dabei zeigten nur die Versuchsgruppen mit 0,1 nM VD-Behandlung statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 9A, B).

Die Hypoxie-assoziierte signifikante Verminderung der ATM-Phosphorylierungsgrade im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich auch bei gleichzeitiger Behandlung mit 0,1 nM und 10 nM VD. Im Gegensatz zur reinen Behandlung von ECFC mit 1 % O₂ (1 % O₂ [MD = 0,91; p = 0,003; OST]) war der Unterschied der verminderten ATM-Phosphorylierungsgrade bei zusätzlicher Applikation von 0,1 nM oder 10 nM VD (1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,91; p = 0,16; OST], 1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 0,91; p = 0,15; OST]) jedoch nicht signifikant (Abb. 9C).

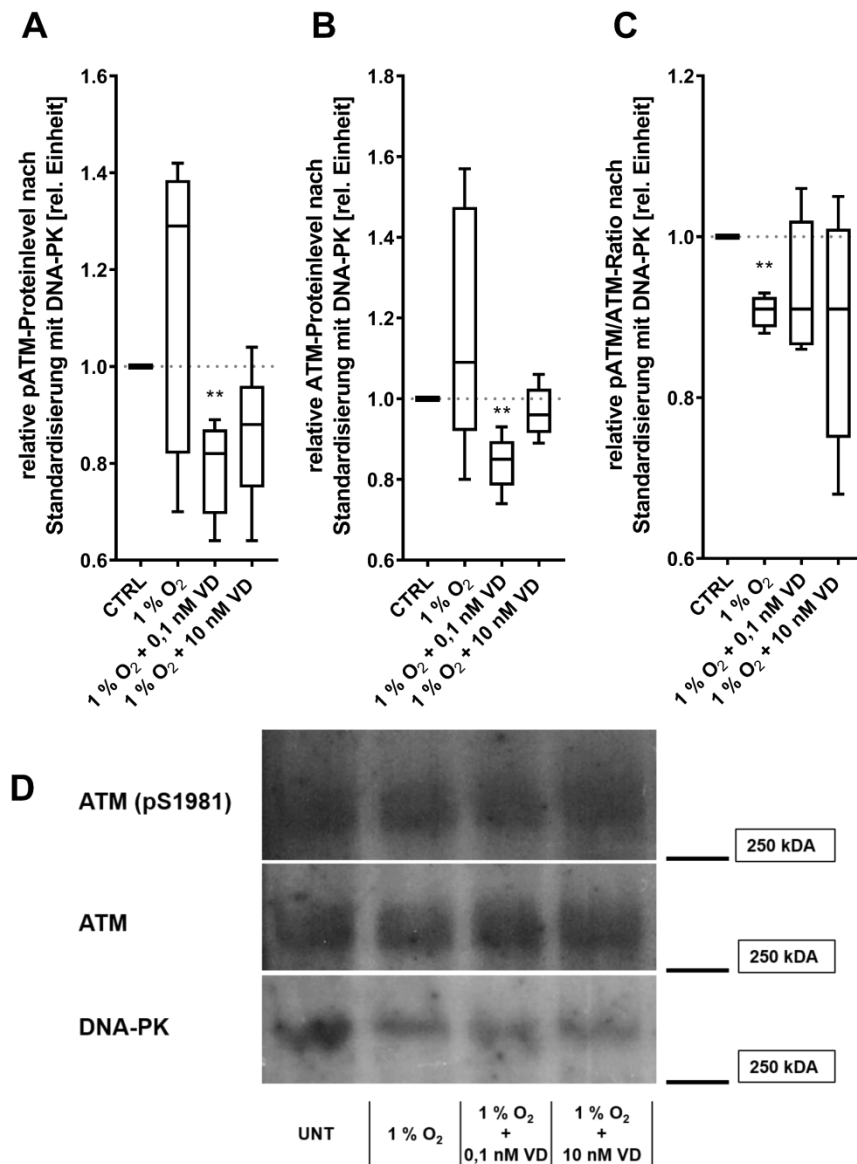


Abb. 9: (A) pATM- und (B) ATM-Proteinlevel und (C) ATM-Phosphorylierungsgrade (pATM/ATM-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie $\pm$ Vitamin D₃ sowie (D) exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.

Immunoblot-basierte Analyse der pATM- und ATM-Proteinlevel nach Behandlung mit 1 % O₂ für 24 h $\pm$ 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. DNA-PK diente als Ladekontrolle und zur Standardisierung. Normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: $y = 1$). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagrechte in der Box). Statistische Berechnung: Einstichproben-t-Test, **: $p < 0,01$. $n = 5$. VD: Vitamin D₃; UNT: unbehandelte Kontrolle.

5.1.3 pCHK2-Proteinlevel unter dem Einfluss präeklampscher Stressoren und Vitamin-D₃-Behandlung

ATM als Schlüsselenzym der DDR interagiert mit zahlreichen nachgeschalteten Effektor-Proteinen, u.a. auch mit CHK2 (vgl. Abschnitt 2.3.2). Ziel der folgenden Untersuchung war es daher, den Einfluss von VD auf die pCHK2-Proteinlevel unter Simulation präeklampscher Stressbedingungen mit H₂O₂ oder Hypoxie in ECFC gesunder Schwangerer zu untersuchen. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der unter Abschnitt 4.11 dargestellten Methodik mittels Immunoblotverfahren.

5.1.3.1 pCHK2-Proteinlevel unter H₂O₂-Behandlung und Vitamin D₃

Unter der Behandlung von ECFC mit 25 µM und 100 µM H₂O₂ zeigten sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erhöhte pCHK2-Proteinlevel (25 µM H₂O₂ [MD = 1,27; p = 0,33; OST]; 100 µM H₂O₂ [MD = 1,46; p = 0,21; OST]). Eine statistische Signifikanz konnte dabei nicht nachgewiesen werden (Abb. 10A).

Um zu ermitteln, welchen Einfluss VD auf die oben beschriebenen Veränderungen der pCHK2-Proteinlevel unter H₂O₂-Behandlung besitzt, wurden ECFC zusätzlich mit VD vorbehandelt.

Nach alleiniger Behandlung von ECFC mit 0,1 nM VD zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle dezent erhöhte pCHK-Proteinlevel (0,1 nM VD [MD = 1,07; p = 0,24; OST]), wohingegen nach Behandlung mit 10 nM VD keine Veränderung der pCHK-Proteinlevel detektiert wurde (10 nM VD [MD = 1,00; p = 0,93; OST]). Diese Veränderungen zeigten in der statistischen Analyse keinen signifikanten Unterschied. (Abb. 10B).

In den mit 25 µM H₂O₂ (25 µM H₂O₂: [MD = 1,27; p = 0,33; OST], 25 µM H₂O₂ + 0,1 nM VD [MD = 1,24; p = 0,16; OST], 25 µM H₂O₂ + 10 nM VD [MD = 1,11; p = 0,20; OST]) und 100 µM H₂O₂ (100 µM H₂O₂ [MD = 1,46; p = 0,21; OST], 100 µM H₂O₂ + 0,1 nM VD [MD = 1,2; p = 0,34; OST], 100 µM H₂O₂ + 10 nM VD [MD = 0,89; p = 0,74; OST]) behandelten ECFC-Versuchsgruppen wurde bei gleichzeitiger Applikation mit 0,1 nM oder 10 nM VD eine Abschwächung der H₂O₂-assoziierten relativen, nicht signifikanten Zunahme der pCHK2-Proteinlevel erkennbar. Im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen ergab sich dabei kein statistisch signifikanter Unterschied. (Abb. 10B).

5.1.3.2 pCHK2-Proteinlevel unter Hypoxie-Behandlung und Vitamin D₃

Unter der Behandlung von ECFC mit Hypoxie (1 % O₂) zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine leichte, nicht signifikante Tendenz hin zu geringfügig verminderten pCHK2-Proteinleveln (1 % O₂ [MD = 0,98; p = 0,92; OST]) (Abb. 10C).

Anschließend wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt. Unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) zeigte sich in ECFC, welche mit 0,1 nM oder 10 nM VD behandelt wurden, eine dezent Verstärkung der Hypoxie-assoziierten nicht signifikanten Abnahme der relativen pCHK2-Proteinlevel (1 % O₂: [MD = 0,98; p = 0,92; OST; 1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,975; p = 0,55; OST], 1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 0,87; p = 0,68; OST]). (Abb. 10C).

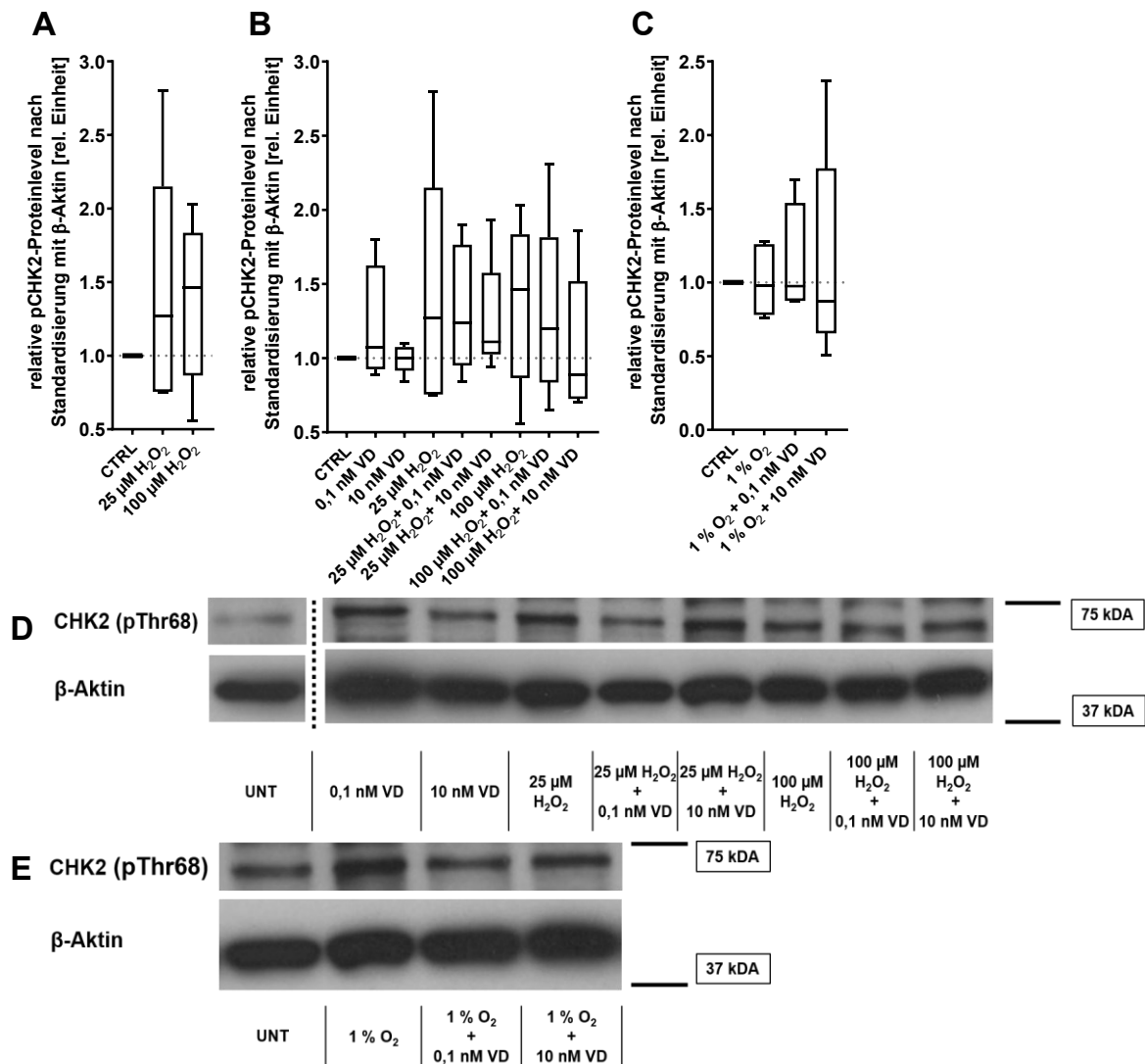


Abb. 10: pCHK2-Proteinlevel in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit (A) H_2O_2 , (B) $H_2O_2 \pm$ Vitamin D_3 oder (C) Hypoxie $\pm$ Vitamin D_3 sowie (D, E) jeweils die exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.

Immunoblot-basierte Analyse der pCHK2-Proteinlevel nach (A, B) Behandlung mit 25 μ M oder 100 μ M H_2O_2 für 30 min $\pm$ 0,1 nM oder 10 nM VD oder (C) Behandlung mit 1 % O_2 für 24 h $\pm$ 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. β -Aktin diente als Ladekontrolle und zur Standardisierung. Normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: $y = 1$). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. $n = 5$. VD: Vitamin D_3 ; UNT: unbehandelte Kontrolle.

5.1.4 pATM-Foci-Anzahl unter dem Einfluss präeklampscher Stressoren und Vitamin- D_3 -Behandlung

Die Immunoblot-basierte Analyse der DDR-Aktivität im Milieu präeklampscher Stressoren wurde zusätzlich durch ein immunzytochemisches Nachweisverfahren ergänzt. Ziel der folgenden Untersuchung war daher die Analyse des Einflusses von VD auf die Ausbildung von pATM-Foci unter Simulation präeklampscher Stressbedingungen mit H_2O_2 oder Hypoxie in ECFC gesunder Schwangerer. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der unter Abschnitt 4.10 dargestellten Methodik mittels ICC-Verfahren. Abb. 11 stellt beispielhaft die immunzytochemische Anfärbung dar.

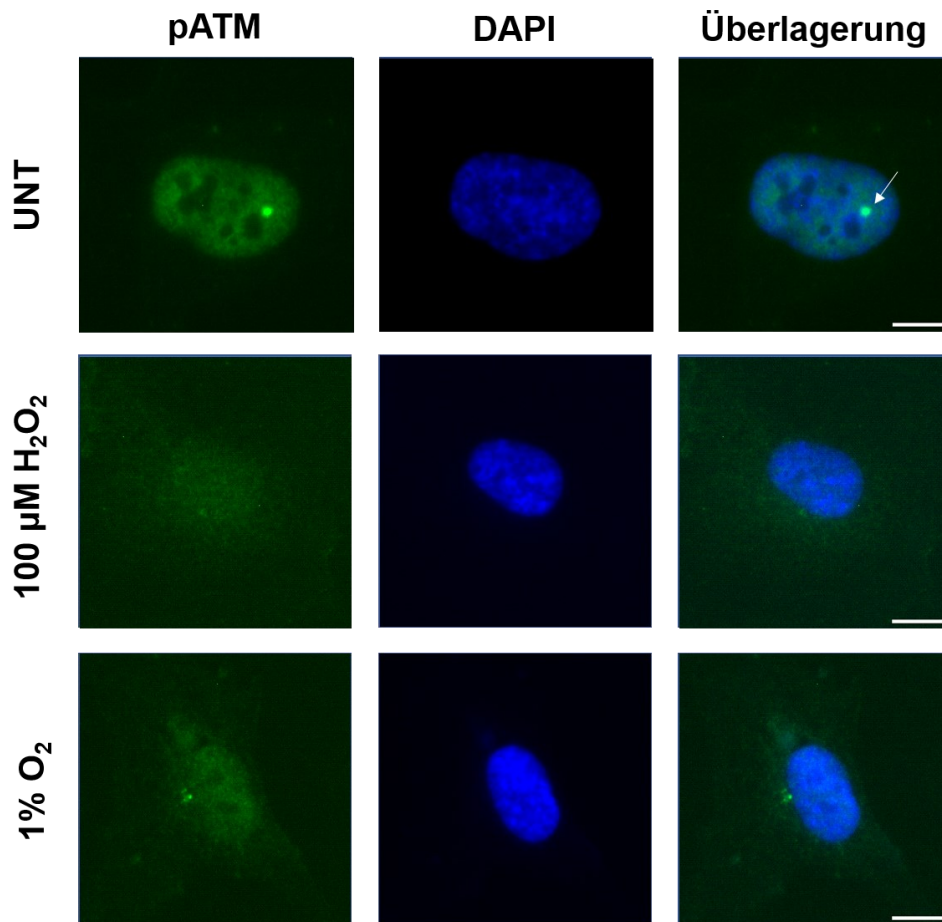


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der immunzytochemischen Anfärbung mit einem anti-pATM-Antikörper von ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit 100 µM H₂O₂ oder 1 % O₂.

Immunzytochemische Markierung von pATM (grün) nach Behandlung mit 100 µM H₂O₂ für 15 min oder 1 % O₂ für 24 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UNT). Anschließend fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der pATM-Foci (weißer Pfeil) innerhalb der mit DAPI markierten DNA (blau). Messbalken = 10 µm.

5.1.4.1 pATM-Foci-Anzahl unter H₂O₂-Behandlung und Vitamin D₃

Nach Behandlung von ECFC mit 25 µM H₂O₂ konnte eine signifikante absolute (UNT [MD = 0,04], 25 µM H₂O₂ [MD = 0,00; p = 0,048; MW]) (Abb. 12A) und nicht signifikante relative (25 µM H₂O₂: MD = 0,00; p = 0,06; WR]) (Abb. 12B) Verminderung der Anzahl von pATM-Foci pro Zelle im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. Ähnlich dazu zeigte sich auch nach Behandlung mit 100 µM H₂O₂ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine sowohl absolut (UNT [MD = 0,04]; 100 µM H₂O₂ [MD = 0,00; p = 0,30; MW]) (Abb. 12A) als auch relativ (100 µM H₂O₂: [MD = 0,00; p = 0,13; WR]) verminderte Anzahl von pATM-Foci pro Zelle. Die Veränderungen nach Behandlung mit 100 µM H₂O₂ zeigten sich dabei statistisch nicht signifikant (Abb. 12B).

Um zu ermitteln, welchen Einfluss VD auf die oben beschriebenen Veränderungen der pATM-Foci-Anzahl unter H₂O₂-Behandlung besitzt, wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde in ECFC unter alleiniger Behandlung mit 0,1 nM und 10 nM VD eine nicht signifikant verminderte Anzahl von pATM-Foci pro Zelle detektiert (0,1 nM VD [MD = 0,00; p = 0,19; WR], 10 nM VD [MD = 0,00; p = 0,13; WR]) (Abb. 12B).

Die unter 25 μM und 100 μM H_2O_2 -Behandlung im Vergleich zur Kontrolle beobachtete tendenziell verminderte Anzahl von pATM-Foci (25 μM H_2O_2 [MD = 0,00; $p = 0,06$; WR], 100 μM H_2O_2 [MD = 0,00; $p = 0,13$; WR]) konnte auch bei Vorbehandlung der ECFC mit 0,1 nM VD (25 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,35; $p = 0,75$; WR], 100 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,00; $p = 0,19$; WR]) und 10 nM VD (25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 0,00; $p = 0,13$; WR], 100 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 0,00; $p = 0,56$; WR]) detektiert werden. Eine statistische Signifikanz konnte dabei nicht nachgewiesen werden (Abb. 12B).

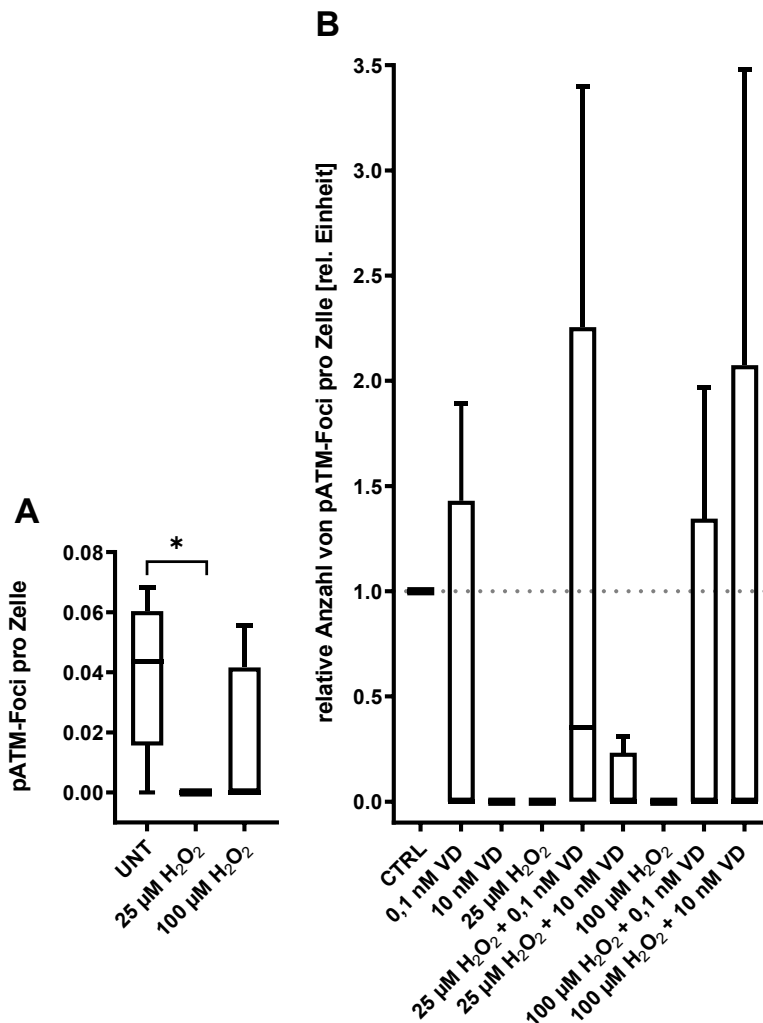


Abb. 12: (A) Absolute und (B) relative Anzahl der pATM-Foci pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit $\text{H}_2\text{O}_2 \pm$ Vitamin D_3 .

Quantitative Bestimmung der pATM-Foci-Anzahl pro Zelle nach Behandlung mit 25 μM oder 100 μM H_2O_2 für 15 min $\pm$ 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende immunzytochemische Anfärbung. (A): absolute pATM-Foci-Anzahl pro Zelle im Vergleich zu unbehandelten ECFC (UNT). (B): pATM-Foci-Anzahl pro Zelle normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: $y = 1$). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Statistische Berechnung: Mann-Whitney-U-Test, *: $p < 0,05$. $n = 5$. VD: Vitamin D_3 .

5.1.4.2 pATM-Foci-Anzahl unter Hypoxie-Behandlung und Vitamin D_3

Nach Kultivierung von ECFC unter hypoxischen Bedingungen (1 % O_2) konnten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine absolut (21 % O_2 [MD = 0,28]), 1 % O_2 [MD = 0,18; $p = 0,40$; UT]) (Abb. 13A) und relativ (1 % O_2 [MD = 0,46; $p = 0,30$; OST]) (Abb. 13B) verminderte Anzahl von pATM-

Foci pro Zelle beobachtet werden. Eine statistische Signifikanz konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

Anschließend wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt. Unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) zeigte sich bei Vorbehandlung der ECFC mit 0,1 nM oder 10 nM VD eine Abschwächung der der nicht signifikanten Hypoxie-assoziierten Abnahme der relativen pATM-Foci-Anzahl (1 % O₂ [MD = 0,46; p = 0,30; OST], 1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,59; p = 0,58; OST], 1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 0,65; p = 0,58; OST]). Diese Veränderungen zeigten in der statistischen Analyse keinen signifikanten Unterschied. (Abb. 13B).

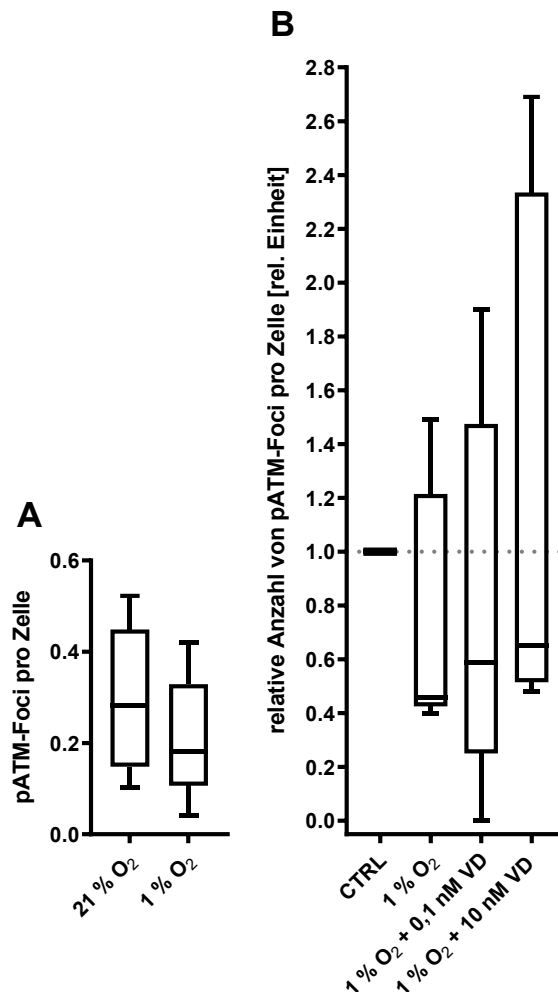


Abb. 13: (A) Absolute und (B) relative Anzahl der pATM-Foci pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie ± Vitamin D₃.

Quantitative Bestimmung der pATM-Foci-Anzahl pro Zelle nach Behandlung mit 1 % O₂ für 24 h ± 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende immunzytochemische Anfärbung. (A): absolute pATM-Foci-Anzahl pro Zelle im Vergleich zu bei 21 % O₂ inkubierten ECFC (UNT). (B): pATM-Foci-Anzahl pro Zelle normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: y = 1). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 5. VD: Vitamin D₃.

5.1.5 γ H2AX-Foci-Anzahl unter dem Einfluss präeklaptischer Stressoren und Vitamin-D₃-Behandlung

H2AX ist ein mit ATM eng interagierendes Protein bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der DDR (vgl. Abschnitt 2.3.2). Seine Aktivität gilt als Indikator für z.B. oxidativ verursachte DNA-Schäden.

Daher sollte zusätzlich zur ATM-Proteinexpression auch die immunzytochemische Ausbildung von γ H2AX-Foci unter oxidativem Stress in ECFC bestimmt werden, um einen genaueren Eindruck über das Ausmaß der DNA-Schädigung in diesem Milieu zu erlangen.

Erneut wurden preklamptische Stressbedingungen mit H_2O_2 oder Hypoxie in ECFC gesunder Schwangerer simuliert und auch der Einfluss von VD auf die Ausbildung von γ H2AX-Foci untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der unter Abschnitt 4.10 dargestellten Methodik mittels ICC-Verfahren. Abb. 14 stellt exemplarisch die immunzytochemische Anfärbung dar.

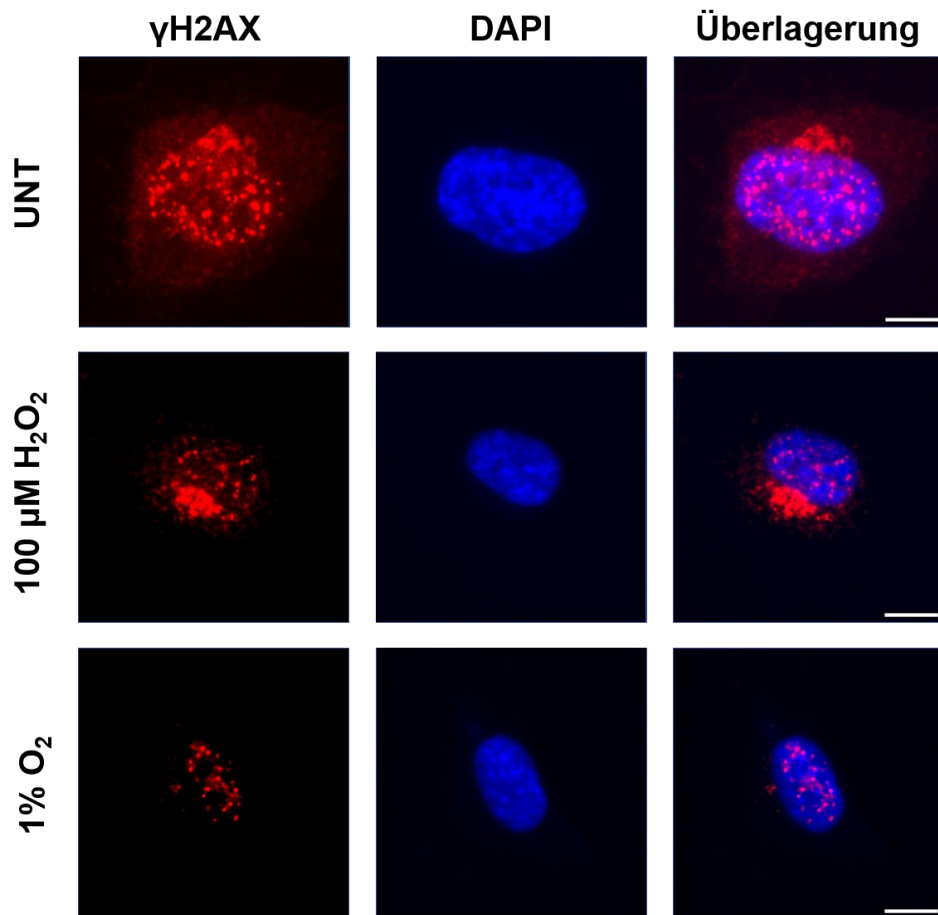


Abb. 14: Exemplarische Darstellung der immunzytochemischen Anfärbung mit einem anti- γ H2AX-Antikörper von ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit 100 μM H_2O_2 oder 1 % O_2 .

Immunzytochemische Markierung von γ H2AX (rot) nach Behandlung mit 100 μM H_2O_2 für 15 min oder 1 % O_2 für 24 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UNT). Anschließend fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der γ H2AX-Foci innerhalb der mit DAPI markierten DNA (blau). Messbalken = 10 μm .

5.1.5.1 γ H2AX-Foci-Anzahl unter H_2O_2 - Behandlung und Vitamin D_3

Nach Behandlung von ECFC mit 25 μM H_2O_2 konnte eine sowohl absolut (UNT [MD = 1,84], 25 μM H_2O_2 : [MD = 1,68; $p = 0,52$; UT) (Abb. 15A) als auch relativ (25 μM H_2O_2 : [MD = 0,60; $p = 0,81$; WR]) (Abb. 15B) verminderte Anzahl von γ H2AX-Foci pro Zelle im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in ECFC nach Behandlung mit 100 μM H_2O_2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine sowohl absolut (UNT [MD = 1,84], 100 μM H_2O_2 [MD = 3,68; $p = 0,96$; UT) (Abb. 15A) als auch relativ (100 μM H_2O_2 [MD = 1,09;

$p = 0,31$; WR]) (Abb. 15B) erhöhte Anzahl von γ H2AX-Foci pro Zelle. Dabei konnte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Um zu ermitteln, welchen Einfluss VD auf die oben beschriebenen Veränderungen der γ H2AX-Foci-Anzahl unter H_2O_2 -Behandlung besitzt, wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde unter alleiniger Behandlung von ECFC mit 0,1 nM VD eine verminderte (0,1 nM VD [MD = 0,64; $p = 0,81$; WR]), hingegen unter alleiniger Behandlung mit 10 nM VD eine erhöhte (10 nM VD [MD = 1,14; $p > 0,99$; WR]) relative Anzahl von γ H2AX-Foci pro Zelle detektiert (Abb. 15B). Diese Veränderungen zeigten in der statistischen Analyse keinen signifikanten Unterschied.

In den mit 0,1 nM und 10 nM VD behandelten ECFC zeigte sich die 25 μM H_2O_2 -assoziierte relative Verminderung der γ H2AX-Foci-Anzahl rückläufig (25 μM H_2O_2 [MD = 0,60; $p = 0,81$; WR], 25 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,98; $p = 0,81$; WR], 25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,05; $p > 0,99$; WR]). Auch in den mit 100 μM H_2O_2 sowie 0,1 nM oder 10 nM VD behandelten ECFC zeigte sich die 100 μM H_2O_2 -assoziierte relative Zunahme der γ H2AX-Foci-Anzahl rückläufig (100 μM H_2O_2 [MD = 1,09; $p = 0,31$; WR], 100 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 0,88; $p = 0,44$; WR], 100 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,06; $p > 0,99$; WR]). Eine statistische Signifikanz konnte dabei nicht nachgewiesen werden (Abb. 15B).

Zusammenfassend ließ sich in den Versuchsgruppen, die zunächst mit 0,1 nM oder 10 nM VD vorbehandelt und anschließend einer H_2O_2 -Behandlung ausgesetzt wurden, eine Reduktion der unter 25 μM - bzw. 100 μM H_2O_2 -Applikation beobachteten nicht signifikanten Abnahme (25 μM H_2O_2) bzw. nicht signifikanten Zunahme (100 μM H_2O_2) der relativen Anzahl von γ H2AX-Foci detektieren (Abb. 15B).

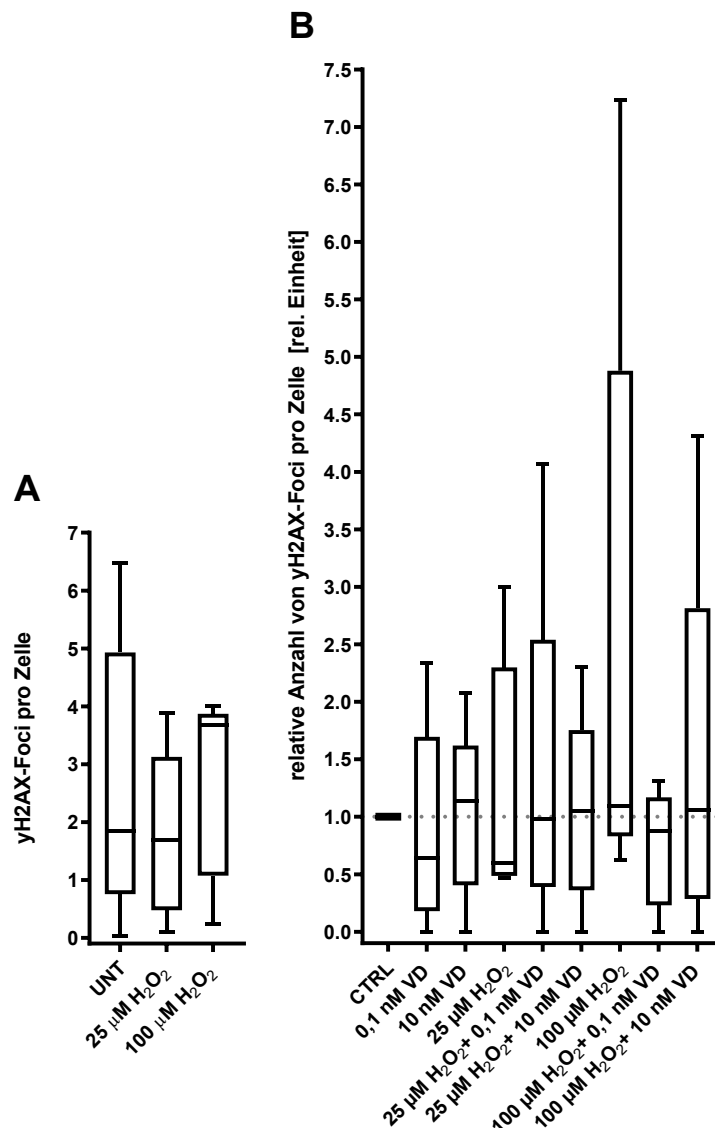


Abb. 15: (A) Absolute und (B) relative Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H₂O₂ $\pm$ Vitamin D₃.

Quantitative Bestimmung der γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle nach Behandlung mit 25 μ M oder 100 μ M H₂O₂ für 15 min $\pm$ 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende immunzytochemische Anfärbung. (A): absolute γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle im Vergleich zu unbehandelten ECFC (UNT). (B): γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: $y = 1$). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. $n = 5$. VD: Vitamin D₃.

5.1.5.2 γ H2AX-Foci-Anzahl unter Hypoxie-Behandlung und Vitamin D₃

Nach Kultivierung von ECFC unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) konnten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine absolut (21 % O₂: [MD = 2,55], 1 % O₂: [MD = 3,47; $p = 0,40$; UT]) (Abb. 16A) und relativ (1 % O₂ [MD = 1,16; $p = 0,24$; OST]) (Abb. 16B) erhöhte Anzahl von γ H2AX-Foci pro Zelle beobachtet werden. Eine statistische Signifikanz konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

Anschließend wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt. Unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) zeigte sich bei Vorbehandlung der ECFC mit 0,1 nM VD eine Verstärkung der Hypoxie-assoziierten nicht signifikanten Zunahme der relativen γ H2AX-Foci-Anzahl. Dagegen wurde bei mit 10 nM VD vorbehandelten ECFC unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) eine Umkehr der Hypoxie-assoziierten

Zunahme der relativen γ H2AX-Foci-Anzahl hin zu einer nicht signifikant relativ verminderten γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle beobachtet (1 % O₂ [MD = 1,16; p = 0,24; OST], 1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 1,26; p = 0,15; OST], 1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 0,92; p = 0,90; OST] (Abb. 16B).

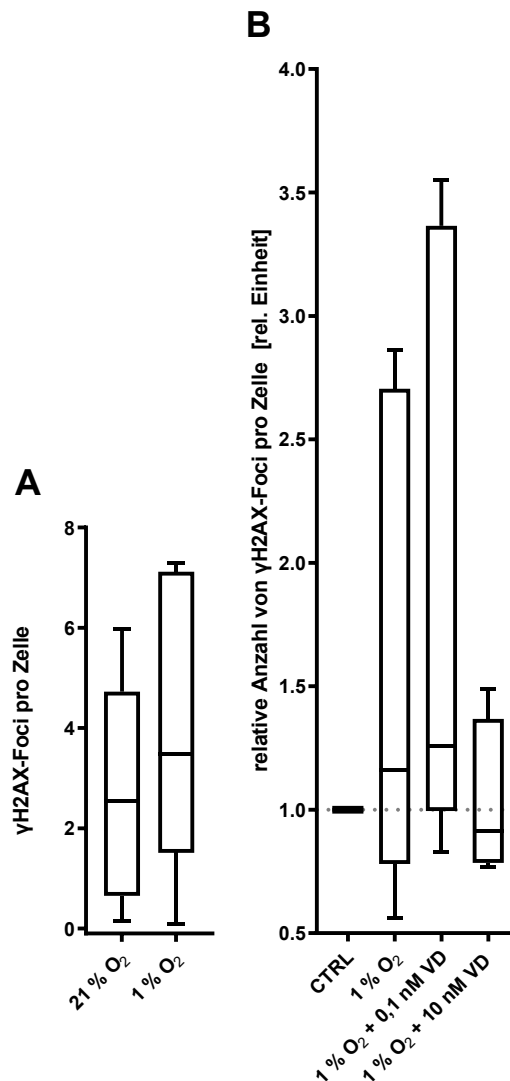


Abb. 16: (A) Absolute und (B) relative Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie $\pm$ Vitamin D₃.

Quantitative Bestimmung der γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle nach Behandlung mit 1 % O₂ für 24 h $\pm$ 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende immunzytochemische Anfärbung. (A): absolute γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle im Vergleich zu bei 21 % O₂ inkubierten ECFC (UNT). (B): γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: y = 1). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 5. VD: Vitamin D₃.

5.1.6 Mikronuklei-Anzahl unter dem Einfluss präeklampsischer Stressoren und Vitamin-D₃-Behandlung

Neben der gesteigerten γ H2AX-Proteinexpression gilt auch der Nachweis von MN als ein Marker von DNA-Schäden (vgl. Abschnitt 2.3.1). Unter Simulation präeklampsischer Stressbedingungen mit H₂O₂ oder Hypoxie und Zugabe von VD wurde daher die Ausprägung von MN in ECFC gesunder Schwangerer analysiert. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der unter Abschnitt 4.10 dargestellten Methodik mittels ICC-Verfahren. Abb. 17 stellt beispielhaft die immunzytochemischen Anfärbung dar.

DAPI

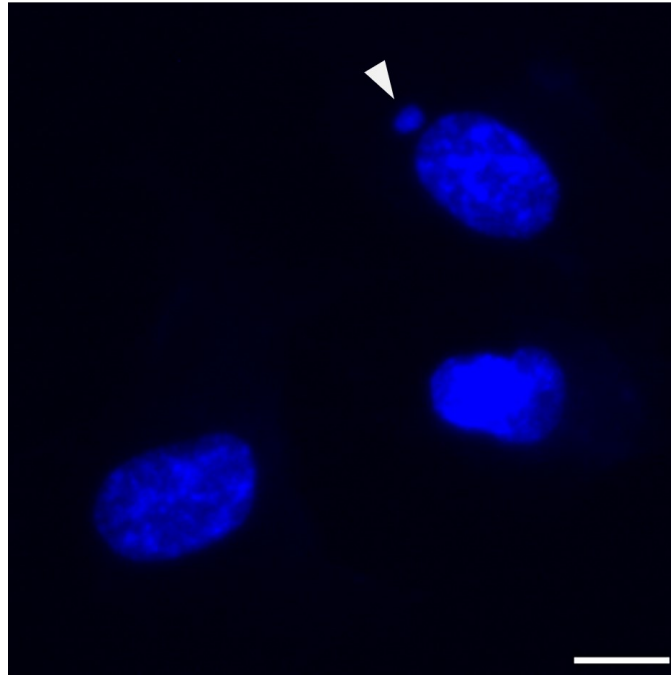


Abb. 17: Exemplarische Darstellung einer ECFC mit Mikronukleus.

Immunzytochemische Markierung der DNA mittels DAPI (blau). Anschließend fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der Mikronuklei (weißer Pfeil). Messbalken = 10 μm .

5.1.6.1 Mikronuklei-Anzahl nach H_2O_2 - Behandlung und Vitamin D_3

Nach Behandlung von ECFC mit 25 μM H_2O_2 konnte sowohl eine absolut (UNT [MD = 0,03], 25 μM H_2O_2 [MD = 0,02; $p = 0,24$; UT]) (Abb. 18A) und als auch relativ (25 μM H_2O_2 [MD = 0,69; $p = 0,81$; OST]) (Abb. 18B) verminderte Anzahl von MN pro Zelle im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. Ähnlich dazu zeigte sich auch nach Behandlung mit 100 μM H_2O_2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine sowohl absolut (UNT [MD = 0,028]; 100 μM H_2O_2 [MD = 0,01; $p = 0,48$; UT]) (Abb. 18A) als auch relativ (100 μM H_2O_2 [MD = 0,95; $p = 0,45$; OST]) (Abb. 18B) verminderte Anzahl von MN pro Zelle. Für diese Veränderungen konnte in der statistischen Analyse kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Um zu ermitteln, welchen Einfluss VD auf die oben beschriebenen Veränderungen der MN-Anzahl unter H_2O_2 -Behandlung besitzt, wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt. Bei der alleinigen Behandlung von ECFC mit VD wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe unter 0,1 nM VD eine leicht erhöhte und unter 10 nM VD eine verminderte Anzahl von MN pro Zelle detektiert (0,1 nM VD [MD = 1,08; $p = 0,91$ OST], 10 nM VD [MD = 0,49; $p = 0,08$; OST]). Dabei konnte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. (Abb. 18B).

In den mit 0,1 nM und 10 nM VD behandelten ECFC zeigte sich die 25 μM H_2O_2 -assoziierte relative Verminderung der MN-Anzahl rückläufig (25 μM H_2O_2 [MD = 0,69; $p = 0,81$; OST], 25 μM H_2O_2 + 0,1 nM VD [MD = 1,64; $p = 0,67$; OST], 25 μM H_2O_2 + 10 nM VD [MD = 1,00; $p = 0,63$; OST]). In den mit 100 μM H_2O_2 sowie 0,1 nM oder 10 nM VD behandelten ECFC zeigte sich die mit 100 μM

H₂O₂-assoziierte relative Abnahme der MN-Anzahl hingegen verstärkt (100 µM H₂O₂ [MD = 0,95; p = 0,45; OST], 100 µM H₂O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,74; p = 0,49; OST], 100 µM H₂O₂ + 10 nM VD [MD = 0,26; p = 0,35; OST]). Eine statistische Signifikanz konnte dabei nicht festgestellt werden (Abb. 18B).

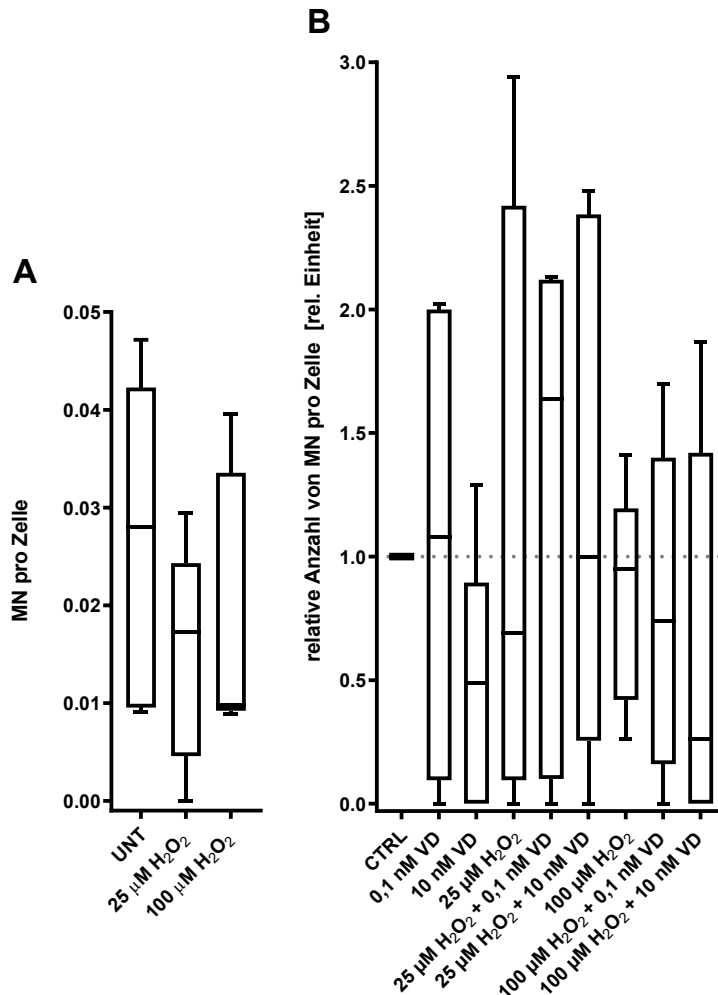


Abb. 18: (A) Absolute und (B) relative Anzahl der Mikronuklei pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H₂O₂ ± Vitamin D₃.

Quantitative Bestimmung der MN-Anzahl pro Zelle nach Behandlung mit 25 µM oder 100 µM H₂O₂ für 15 min ± 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende immunzytochemische Anfärbung. (A): absolute MN-Anzahl pro Zelle im Vergleich zu unbehandelten ECFC (UNT). (B): MN-Anzahl pro Zelle normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: y = 1). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 5. MN: Mikronuklei; VD: Vitamin D₃.

5.1.6.2 Mikronuklei-Anzahl nach Hypoxie-Behandlung und Vitamin D₃

Als nächstes wurde auch die Veränderung der MN-Anzahl nach Behandlung mit 1 % O₂ untersucht.

Nach Kultivierung von ECFC unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weder eine relevante absolute (21 % O₂ [MD = 0,01], 1 % O₂ [MD = 0,01; p = 0,89; UT]) (Abb. 19A) noch relative (1 % O₂ [MD = 0,95; p = 0,88; WSR]) (Abb. 19B) Veränderung der Anzahl von MN pro Zelle beobachtet werden.

Anschließend wurden ECFC zusätzlich mit VD behandelt. Unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) zeigte sich bei Vorbehandlung der ECFC mit 0,1 nM VD eine Verstärkung der Hypoxie-assoziierten

nicht signifikanten Abnahme der relativen MN-Anzahl. Dagegen wurde bei mit 10 nM VD vorbehandelten ECFC unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) eine Umkehr der Hypoxie-assoziierten, nicht signifikanten Abnahme der relativen MN-Anzahl hin zu einer relativ erhöhten MN-Anzahl pro Zelle beobachtet (1 % O₂ [MD = 0,95; p = 0,88; WSR], 1 % O₂ + 0,1 nM VD [MD = 0,41; p = 0,06; WSR], 1 % O₂ + 10 nM VD [MD = 1,96; p = 0,44; WSR]). Der Trend dieser Resultate war statistisch nicht signifikant (Abb. 19B).

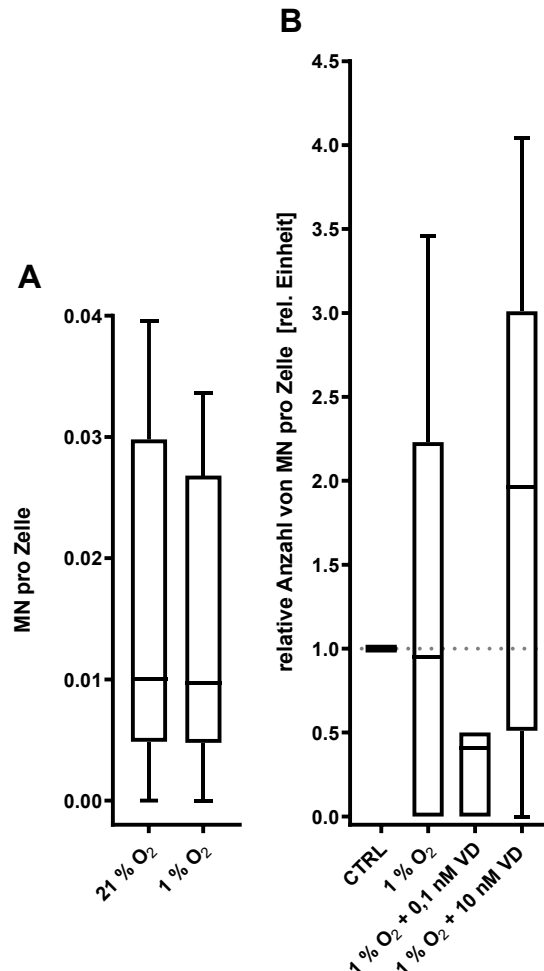


Abb. 19: (A) Absolute und (B) relative Anzahl der Mikronuklei pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie ± Vitamin D₃.

Quantitative Bestimmung der MN-Anzahl pro Zelle nach Behandlung mit 1 % O₂ für 24 h ± 0,1 nM oder 10 nM VD und anschließende immunzytochemische Anfärbung. (A): absolute MN-Anzahl pro Zelle im Vergleich zu bei 21 % O₂ inkubierten ECFC (UNT). (B): MN-Anzahl pro Zelle normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: y = 1). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 5. MN: Mikronuklei; VD: Vitamin D₃.

5.2 Teilprojekt 2: Einfluss der ATM-Inhibition auf den Zell-Index und die intrazellulären oxidativen Stresslevel

Im Teilprojekt 1 stand die Analyse der Auswirkungen präeklaptischer Stressoren auf die Proteinexpression der Proteine der ATM-gesteuerten DDR im Vordergrund. Ihre Beeinflussung durch VD wurde näher eruiert. Im anschließenden Teilprojekt 2 lag der Fokus auf der genaueren Untersuchung der Rolle von ATM. Als Schlüsselkinase der DNA-Schadenssignalkaskade nimmt ATM eine zentrale

Rolle bei der DNA-Reparatur und somit auch bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase sowie der Regulation von oxidativem Stress ein. Durch Inhibition von ATM sollte im Teilprojekt 2 genauer untersucht werden, inwiefern ATM die Ausbildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies sowie den CI von ECFC regulativ beeinflusst sowie welche Rolle dabei die präeklampsische Vorprägung von ECFC spielt.

5.2.1 Einfluss der ATM-Inhibition auf den Zell-Index von ECFC gesunder Schwangerer im Vergleich zu ECFC von Schwangeren mit Präeklampsie

In diesem Versuch wurde der Einfluss der ATM-Inhibition auf den CI von ECFC gesunder und präeklampsischer Schwangerer getestet. Dabei wurde zunächst untersucht, inwiefern eine ATM-Inhibition die CI-Werte in ECFC beeinflusst. Nach einem Vergleich der basalen CI-Werte in unbehandelten PE- und NP-ECFC wurde daran anschließend außerdem analysiert, welchen Einfluss der PE-Status auf den CI unter ATM-Inhibition besitzt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der unter Abschnitt 4.12 beschriebenen Methodik.

5.2.1.1 Einfluss der ATM-Inhibition auf den CI von ECFC

Nach Behandlung mit einem ATMi zeigte sich beim Vergleich des normalisierten CI von ECFC gesunder und präeklampsischer Schwangerer zu den Messzeitpunkten nach 16 h, 32 h, 48 h und 64 h im Allgemeinen ein geringerer CI als bei der jeweiligen Kontrolle. Diese mit ATMi-Applikation assoziierte Verminderung der CI-Werte war dabei zum Zeitpunkt 16 h für beide Versuchsgruppen und zum Zeitpunkt 64 h für die PE-Versuchsgruppe signifikant. Weitere statistisch signifikante Ergebnisse konnten für diesen Trend nicht nachgewiesen werden (Abb. 20, Tabelle 19 [Anhang]).

Außerdem konnte innerhalb einer Versuchsgruppe beim Vergleich zwischen den frühen (16 h, 32 h) und späten (48 h, 64 h) Messzeitpunkten ansteigende CI-Werte beobachtet werden (Abb. 20).

Dieser Anstieg war bei den in Tabelle 14 aufgeführten Vergleichen zwischen frühen und späten Messzeitpunkten innerhalb derselben Versuchsgruppe signifikant. Die anderen statistischen Vergleiche zwischen frühen und späten Messzeitpunkten zeigten sich nicht signifikant (Abb. 20, Tabelle 14).

Tabelle 14: Signifikante Früh-Spät-Unterschiede des Zell-Index von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung ATM-Inhibitor (ATMi).

Angabe von Median (MD) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum frühen Messzeitpunkt. n = 5.

Versuchsgruppe	Früher Messzeitpunkt	Späte Messzeitpunkte	Korrespondierende Codierung des Vergleichspaares in Abb. 20
NP (CTRL)	16 h (MD = 16.875)	48 h (MD = 35.888; p < 0,001)	a
		64 h (MD = 44.509; p < 0,001)	b
NP (ATMi)	16 h (MD = 15.078)	48 h (MD = 35.303; p < 0,001)	c
		64 h (MD = 43.682; p < 0,001)	d
PE (CTRL)	16 h (MD = 19.813)	48 h (MD = 48.108; p < 0,001)	y
		64 h (MD = 62.066; p < 0,001)	z
	32 h (MD = 34.155)	64 h (MD = 62.066; p = 0,03)	q
PE (ATMi)	16 h (MD = 16.457)	32 h (MD = 33.188; p < 0,001)	w
		48 h (MD = 46.850; p < 0,001)	p
		64 h (MD = 56.604; p < 0,001)	m

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine ATMi-Behandlung im Allgemeinen mit verminderten CI-Werten einhergeht und mit zunehmender Zeit ein signifikant höherer CI im Vergleich zu früheren Messzeitpunkten deutlich wurde.

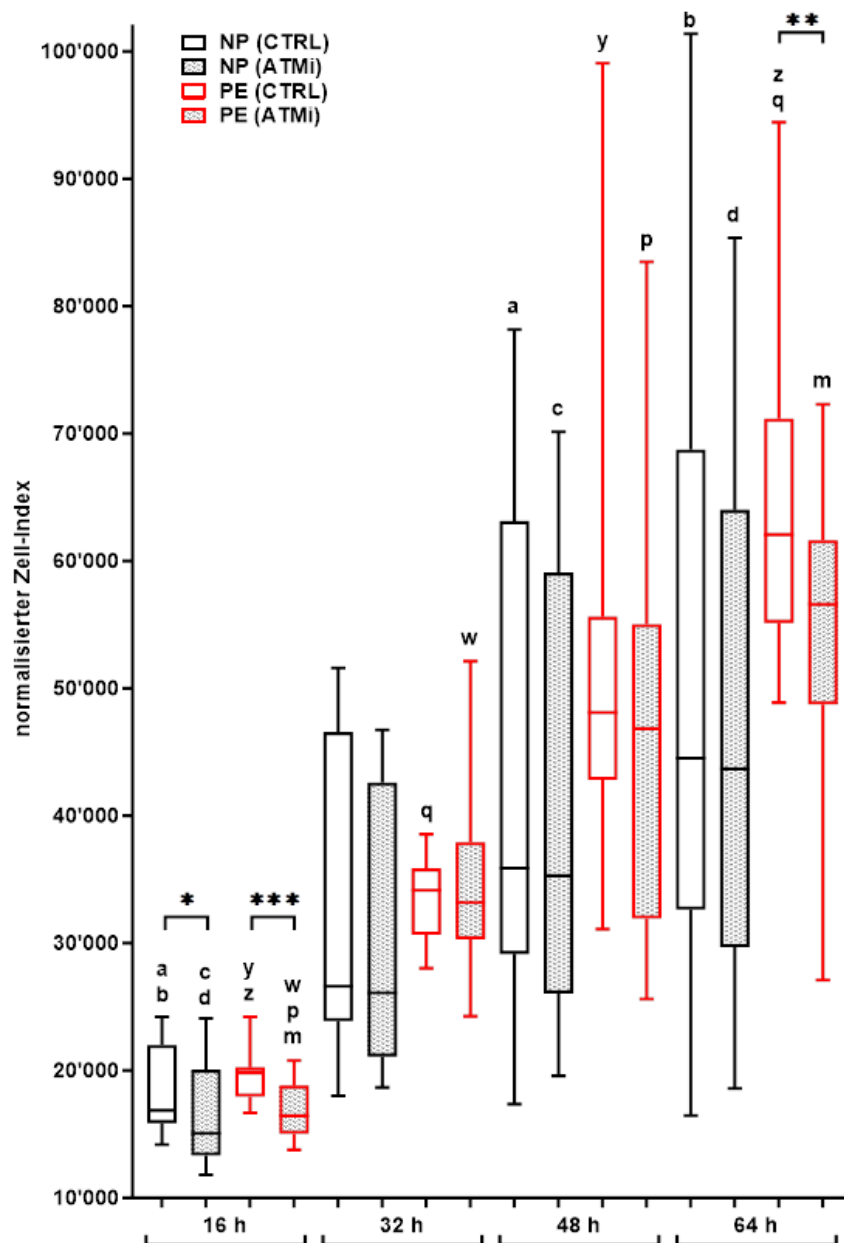


Abb. 20: Zell-Index von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi).

xCELLigence-basierte Messung der elektrischen Impedanz, Konvertierung in den Zell-Index und Normalisierung auf den Zeitpunkt $t = 0$ (ATMi-Zugabe). Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Statistische Berechnung: Mann-Whitney-U-Test, ungepaarter t-Test, Kruskal-Wallis-Test; Signifikanzniveau (identische Buchstaben bzw. Klammern markieren einen Vergleich zwischen zwei Gruppen): $p < 0,05$: *, q; $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***, a, b, c, d, y, z, w, p, m. $n = 5$. CTRL: Kontrolle.

Diese ATMi-assoziierte Abnahme des CI zeigte sich sowohl bei NP- als auch PE-ECFC, fiel bei Letzteren jedoch tendenziell etwas stärker aus. Das heißt, dass die ATMi-Behandlung einer ECFC-Versuchsgruppe zum Messzeitpunkt nach 16 h, 32 h, 48 h mit einer signifikanten Verminderung des relativen CI im Vergleich zur Kontrollgruppe einherging (Tabelle 15, Abb. 21).

Tabelle 15: Vergleich des auf die Kontrollgruppe normalisierten relativen Zell-Index nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).

Angabe von Median (MD) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Einstichproben-t-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTRL = 1). n = 5. Statistisch signifikante Ergebnisse sind durch eine graue Hintergrundfarbe hervorgehoben.

Messzeitpunkt	NP (ATMi)	PE (ATMi)
16 h	MD = 0,885; p < 0,001	MD = 0,846; p < 0,001
32 h	MD = 0,939; p = 0,04	MD = 0,907; p < 0,001
48 h	MD = 0,915; p = 0,03	MD = 0,872; p < 0,001
64 h	MD = 0,917; p = 0,08	MD = 0,881; p < 0,001

Auch zum Messzeitpunkt nach 64 h konnte eine relative Abnahme der CI-Werte festgestellt werden. Diese war jedoch nur in der Versuchsgruppe der PE-ECFC signifikant (Tabelle 15, Abb. 21).

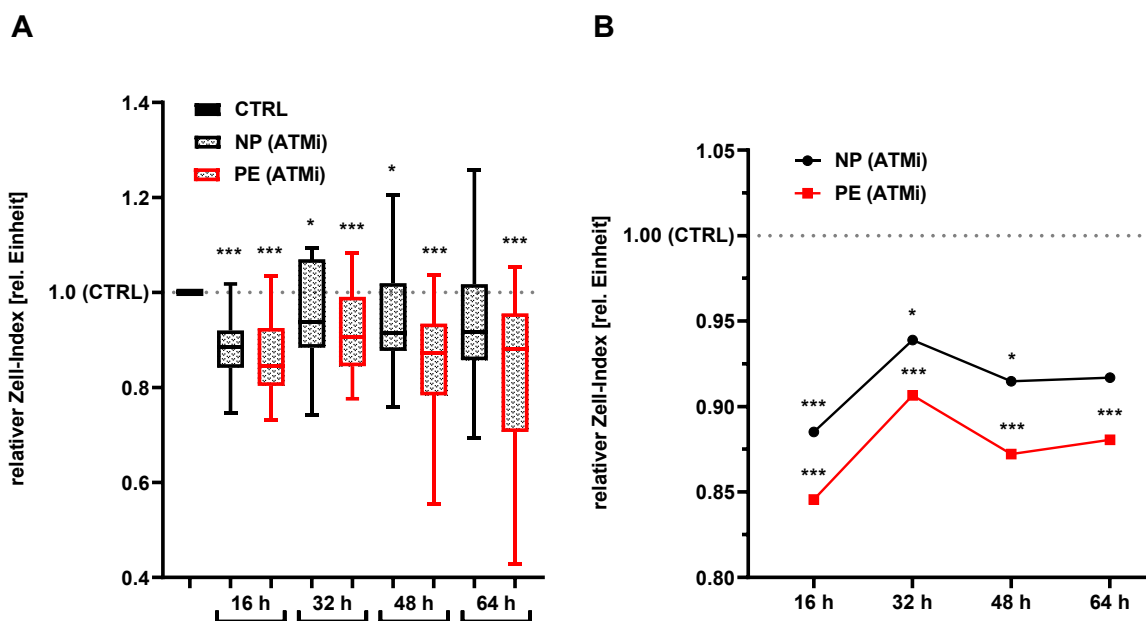


Abb. 21: (A) Zell-Index von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) und (B) Einzeldarstellung der Mediane aus A.

xCELLigence-basierte Messung der elektrischen Impedanz, Konvertierung in den Zell-Index und Normalisierung auf den Zeitpunkt $t = 0$ (ATMi-Zugabe). Normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: $y = 1$). Darstellung von: (A): Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box), (B): Median (Punkte auf Verbindungslinie). Statistische Berechnung: Einstichproben-t-Test, *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$. n = 5.

Dies konnte auch durch die Analyse des CI über den gesamten Zeitverlauf des Versuches hinweg bestätigt werden. Unter Behandlung mit ATMi wurden sowohl bei ECFC gesunder Schwangerer (Abb. 22A) als auch bei ECFC präeklaptischer Schwangerer (Abb. 22B) geringere CI-Werte als in der entsprechenden Kontrollgruppe detektiert. Interessanterweise war diese ATMi-induzierte CI-Wert-Veränderung zwischen der ATMi-Behandlungsgruppe und der entsprechenden Kontrollgruppe bei PE-ECFC signifikant stärker ausgeprägt als bei ECFC aus gesunden Schwangerschaften ($p < 0,0001$ (MW)) (Abb. 22C).

Unter Behandlung mit ATMi wurde in PE- und NP-ECFC ein kontinuierlicher Anstieg der CI-Werte mit zunehmender Versuchsdauer festgestellt (Abb. 22A, B). Bis zum Zeitpunkt $t \approx 25$ h konnte ein nahezu gleichförmiger Anstieg der CI-Werte in allen Untersuchungsgruppen detektiert werden. Danach

zeigte sich bei den ECFC aus PE-Schwangerschaften ein verstärkter Anstieg des CI im Vergleich zum CI gesunder ECFC (Abb. 22A, B). Ab dem Zeitpunkt von ca. 45 h konnte die Tendenz zum verminderten Anstieg und stattdessen zur Plateaubildung der CI-Werte in allen Versuchsgruppen festgestellt werden (Abb. 22A, B).

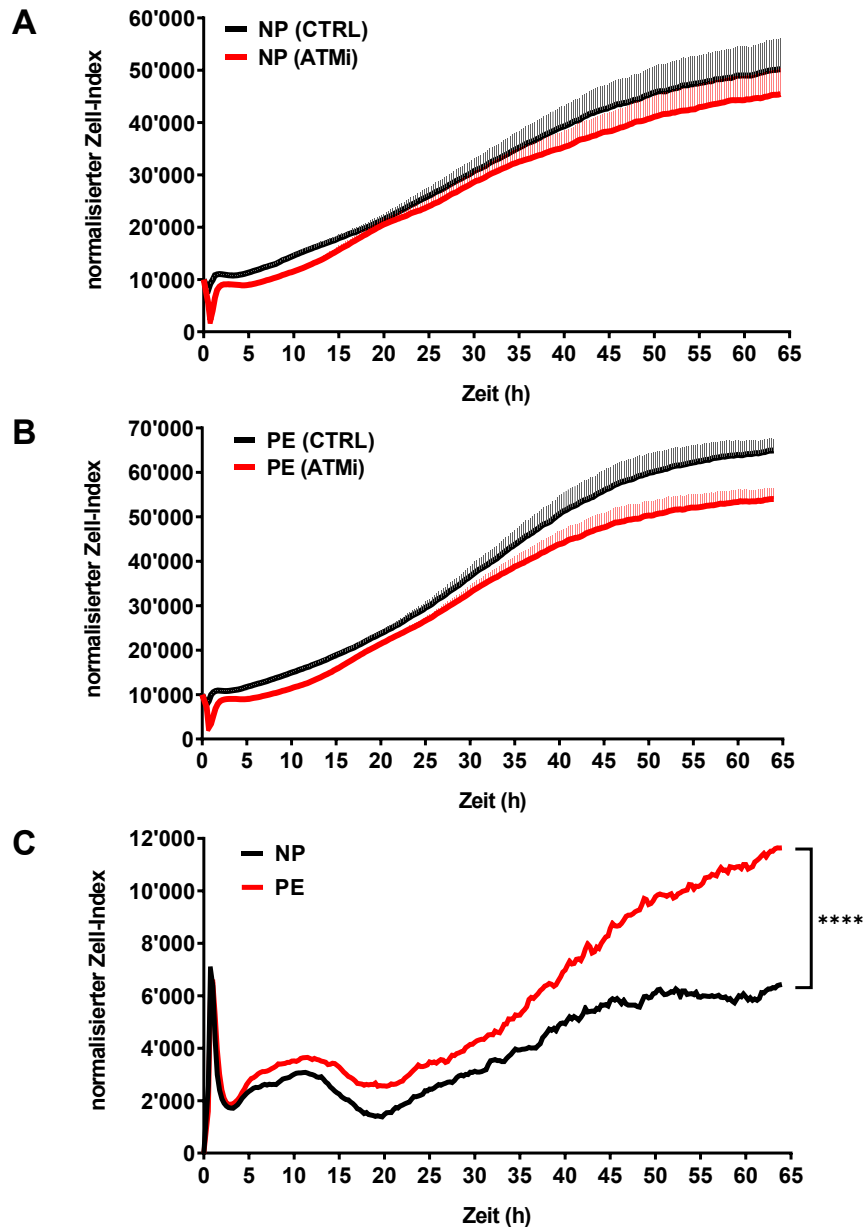


Abb. 22: Zell-Index-Profil von ECFC (A) gesunder (NP) und (B) präeklampsischer (PE) Patientinnen nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) sowie (C) die jeweilige ATMi-induzierte Veränderung des Zell-Index.

xCELLigence-basierte Messung der elektrischen Impedanz, Konvertierung in den Zell-Index und Normalisierung auf den Zeitpunkt $t = 0$ (ATMi-Zugabe). Darstellung von: Mittelwert (Verbindungsline), Standardfehler des Mittelwertes (Senkrechte über der Verbindungsline). Statistische Berechnung: Mann-Whitney-U-Test; Signifikanzniveau: $p < 0,0001$: ****. $n = 5$. CTRL: Kontrolle.

Zusammenfassend konnte also eine Tendenz dahingehend gezeigt werden, dass eine ATMi-Behandlung in ECFC mit einer Erniedrigung des CI bei NP- und PE-ECFC einherging, welche in PE-ECFC stärker ausfällt als bei NP-ECFC (Abb. 21, Abb. 22).

Zusätzlich konnte eine aufgrund voranschreitender zellulärer Proliferationsprozesse erwartete Zunahme des CI über den Zeitverlauf detektiert werden, wobei sowohl in den ATMi-behandelten als nicht-ATMi-behandelten Versuchsgruppen zu späteren Messzeitpunkten signifikant höhere CI-Werte als zu früheren Messzeitpunkten festgestellt wurden (Abb. 20, Abb. 22).

5.2.1.2 Einfluss des PE-Status auf den CI unter ATM-Inhibition

Als nächstes sollte der Einfluss des PE-Status auf den CI unter ATM-Inhibition näher untersucht werden. Um eine genaue Differenzierung zwischen diesen beiden Einflussfaktoren (ATM-Inhibition, PE-Status) auf den CI vornehmen zu können, wurde zunächst ermittelt, welchen Einfluss der PE-Status auf den CI-Wert in unbehandelten ECFC-Populationen besitzt.

Hierfür wurde ein Vergleich zwischen unbehandelten ECFC von gesunden Schwangeren und von PE-Patientinnen durchgeführt. Dabei zeigte sich in der Gruppe der PE-Patientinnen zu den Messzeitpunkten 16 h und 32 h ein nicht signifikant erhöhter CI sowie zu den Messzeitpunkten 48 h und 64 h ein signifikant erhöhter CI im Vergleich zur Gruppe der gesunden Schwangeren (Abb. 23, Tabelle 20 [Anhang]).

Darüber hinaus konnte innerhalb derselben Versuchsgruppe beim Vergleich zwischen den frühen (16 h, 32 h) und späten (48 h, 64 h) Messzeitpunkten ansteigende CI-Werte beobachtet werden. Dieser Anstieg war bei den in Tabelle 16 aufgeführten frühen und späten Messzeitpunkten innerhalb derselben Versuchsgruppen signifikant.

Tabelle 16: Signifikante Früh-Spät-Unterschiede des Zell-Index unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer.

Angabe von Median (MD) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum frühen Messzeitpunkt. n = 5.

Versuchsgruppe	Früher Messzeitpunkt	Späte Messzeitpunkte	Korrespondierende Codierung des Vergleichspaares in Abb. 23
NP	16 h (MD = 16.581)	32 h (MD = 25.010; p = 0,04)	a
		48 h (MD = 33.729; p < 0,001)	b
		64 h (MD = 44.084; p < 0,001)	c
PE	16 h (MD = 19.366)	32 h (MD = 34.212; p = 0,02)	d
		48 h (MD = 52.303; p < 0,001)	y
		64 h (MD = 65.350; p < 0,001)	z
	32 h (MD = 34.212)	64 h (MD = 65.350; p = 0,01)	w

Es konnte also einerseits festgestellt werden, dass der PE-Status im Allgemeinen mit nicht signifikant höheren CI-Werten einhergeht. Zudem fiel in NP- und PE-ECFC zu späteren Messzeitpunkten im Vergleich zu früheren Messzeitpunkten ein signifikant höherer CI auf (Abb. 23, Tabelle 16).

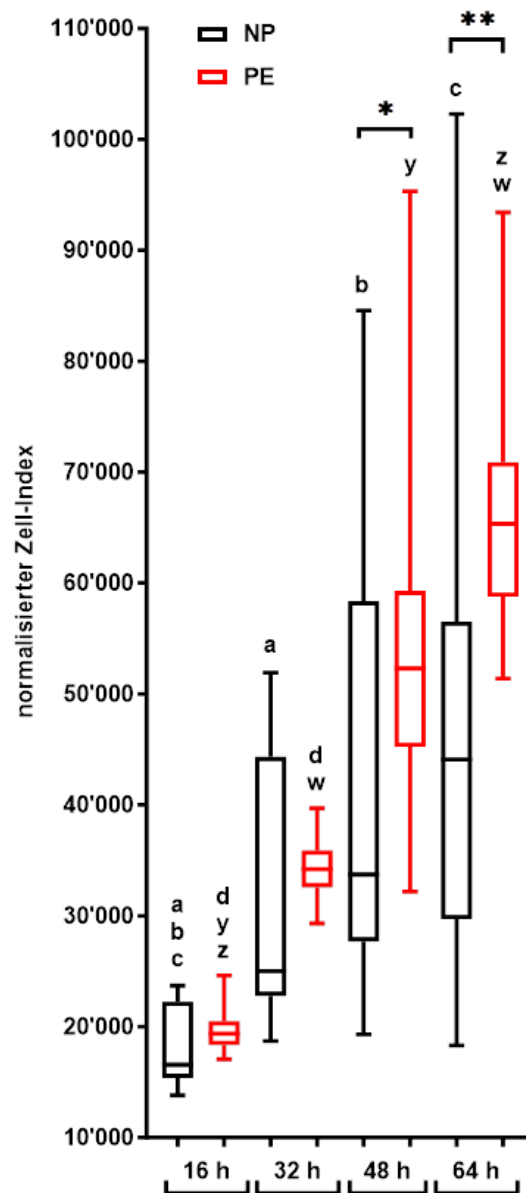


Abb. 23: Zell-Index unbehandelter ECFC gesunder (NP) und preklampptischer (PE) Schwangerer.

xCELLigence-basierte Messung der elektrischen Impedanz, Konvertierung in den Zell-Index und Normalisierung auf den Zeitpunkt $t = 0$. Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Statistische Berechnung: Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test; Signifikanzniveau (identische Buchstaben über den Balken bzw. Klammern markieren einen Vergleich zwischen zwei Gruppen): $p < 0,05$: *, a, d, w; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: b, c, y, z. $n = 5$.

Die Feststellung von erhöhten CI-Werten in PE-ECFC im Vergleich zu NP-ECFC konnte auch bei Untersuchung des CI über den gesamten Zeitverlauf des Versuches hinweg bestätigt werden. Beim Vergleich von unbehandelten ECFC gesunder Schwangerer mit unbehandelten ECFC von PE-Patientinnen wurde aufgrund voranschreitender zellulärer Proliferation erwartungsgemäß ein kontinuierlich ansteigender CI festgestellt. Dieser Anstieg verlief bis zum Zeitpunkt um ca. 15 h nahezu gleichförmig. Danach stieg der CI der PE-ECFC jedoch steiler an und verlief bis zum Ende des Versuches stets deutlich über dem Impedanzprofil der NP-ECFC. Um den Zeitpunkt von 50 h kam es zur Abflachung der beiden Profilverläufe und zum langsamen Einsetzen einer Plateauentwicklung der CI-Werte (Abb. 24).

Es wurde also deutlich, dass der CI mit zunehmender Zeit in beiden Versuchsgruppen zunahm und, dass ECFC mit PE-Status höhere CI-Werte zeigten als ECFC mit NP-Status.

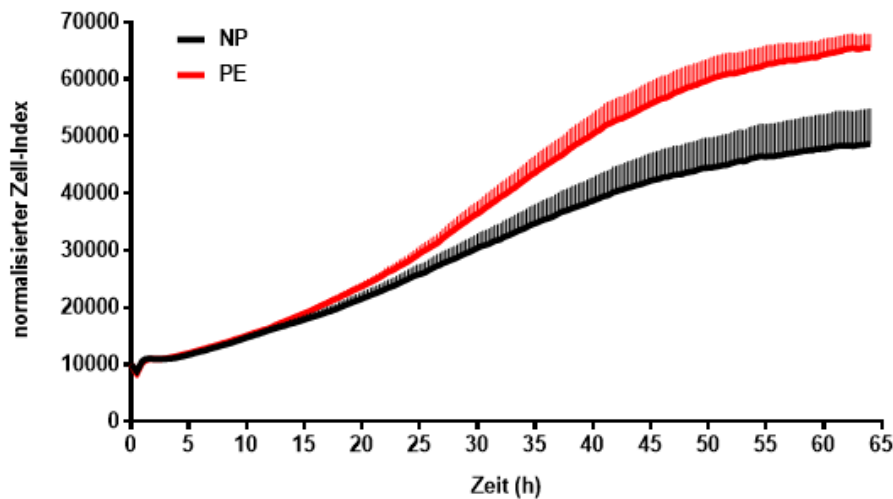


Abb. 24: Zell-Index-Profil von ECFC gesunder (NP) und präeklampsischer (PE) Schwangerer.

xCELLigence-basierte Messung der elektrischen Impedanz, Konvertierung in den Zell-Index und Normalisierung auf den Zeitpunkt $t = 0$. Darstellung von: Mittelwert (Verbindungsline), Standardfehler des Mittelwertes (Senkrechte über der Verbindungsline). $n = 5$.

Darauf aufbauend konnte nun anschließend zusätzlich untersucht werden, welchen Einfluss der PE-Status bei ATMi-behandelten ECFC-Populationen auf den CI-Wert besitzt.

In PE-ECFC konnte unter Behandlung mit ATMi eine relative Verminderung des Zellindex im Vergleich zur gesunden Versuchsgruppe festgestellt werden. Das heißt, dass der PE-Status einer ECFC-Versuchsgruppe unter ATMi-Behandlung zum Messzeitpunkt nach 16 h und 32 h mit einer nicht signifikanten relativen Abnahme und zu den Messzeitpunkten 48 h und 64 h mit einer signifikanten relativen Abnahme der CI-Werte im Vergleich zur NP-Vergleichsgruppe assoziiert war (Abb. 25A, Tabelle 17).

Tabelle 17: Vergleich des auf die gesunde Kontrollgruppe (NP = 1) normalisierten Zell-Index nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklampsischer (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).

Angabe von Median (MD) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test t im Vergleich zur NP = 1. $n = 5$. Statistisch signifikante Ergebnisse sind durch eine graue Hintergrundfarbe hervorgehoben.

Messzeitpunkt	PE (CTRL)	PE (ATMi)
16 h	MD = 1,13; $p = 0,05$	MD = 0,97; $p = 0,19$
32 h	MD = 1,40; $p = 0,008$	MD = 0,98; $p = 0,39$
48 h	MD = 1,55; $p < 0,001$	MD = 0,91; $p = 0,001$
64 h	MD = 1,50; $p < 0,001$	MD = 0,93; $p = 0,001$

In der nicht mit ATMi behandelten PE-Kontrollgruppe zeigte sich eine gegensätzliche Entwicklung hin zu einer relativen Erhöhung der CI-Werte im Vergleich zur NP-Versuchsgruppe. Zum Messzeitpunkt nach 16 h wurde eine nicht signifikante relative Erhöhung der CI-Werte detektiert. Zu den

Messzeitpunkten nach 32 h, 48 h und 64 h fiel diese Erhöhung der CI-Werte statistisch signifikant aus (Abb. 25 A, Tabelle 17).

Dabei wurde im Zeitverlauf der Mediane deutlich, dass die nicht-signifikante, PE-Status-assoziierte Verringerung des relativen CI unter ATMi-Behandlung zu späten Zeitpunkten tendenziell geringfügig stärker ausgeprägt war als zu früheren Zeitpunkten (16 h [PE ATMi]: MD = 0,97; 32 h [PE ATMi]: MD = 0,98; 48 h [PE ATMi]: MD = 0,91; 64 h [PE ATMi]: MD = 0,93) (Abb. 25B).

Auch in der Versuchsgruppe ohne ATMi-Behandlung kam es zu späteren Zeitpunkten tendenziell zu einer dezent verstärkten Ausprägung der PE-assoziierten Zunahme des CI (16 h [PE CTRL]: MD = 1,13; 32 h [PE CTRL]: MD = 1,40; 48 h [PE CTRL]: MD = 1,55; 64 h [PE CTRL]: MD = 1,50) (Abb. 25B). Eine statistische Signifikanz zeigten diese Trends dabei jeweils nicht.

Allgemein schien der PE-Status einer ECFC-Population also mit der Tendenz zu erhöhten CI-Werten, unter ATMi-Behandlung jedoch mit einer relativen Verminderung des CI assoziiert zu sein. Es wurde deutlich, dass sich beide Trends mit zunehmender Zeit zu verstärken schienen.

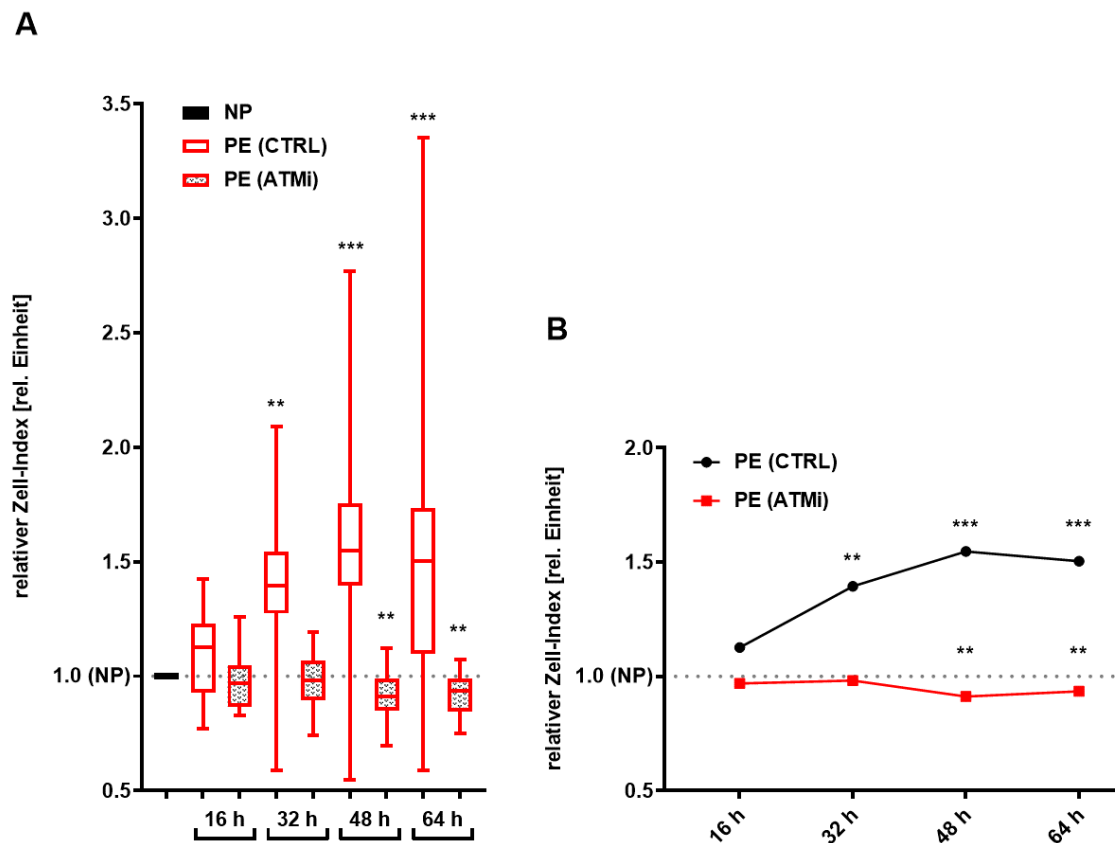


Abb. 25: (A) Zell-Index von ECFC präeklaptischer Patientinnen (PE) nach Behandlung mit ATMi-Inhibitor (ATMi) und (B) Einzeldarstellung der Mediane aus A.

xCELLigence-basierte Messung der elektrischen Impedanz, Konvertierung in den Zell-Index und Normalisierung auf den Zeitpunkt $t = 0$ (ATMi-Zugabe). Normalisiert auf die gesunde Kontrolle (NP: $y = 1$). Darstellung von: (A): Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box), (B): Median (Punkte auf Verbindungslinie). Statistische Berechnung: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. $n = 5$; CTRL: Kontrolle.

Zusammenfassend konnte eine Tendenz dahingehend gezeigt werden, dass der PE-Status einer ECFC-Population mit höheren CI-Werten einhergeht als in einer gesunden Kontrollpopulation. Diese Tendenz zeigte sich mit zunehmender Versuchsdauer immer ausgeprägter (Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25). Aufgehoben wurde dieser Trend bei Vorbehandlung mit ATMi: in mit ATMi-behandelten ECFC wurde eine PE-assoziierte Abnahme des CI detektiert (Abb. 25).

5.2.2 Einfluss der ATM-Inhibition auf die intrazellulären oxidativen Stresslevel in ECFC gesunder Schwangerer im Vergleich zu ECFC von Schwangeren mit Präeklampsie

In diesem Versuch wurde der Einfluss der ATM-Inhibition auf die Ausbildung intrazellulärer ROS in ECFC gesunder und präeklaptischer Schwangerer untersucht. Dafür wurde die Fluoreszenzintensität (in RFU) von fluoreszierendem 2', 7'- Dichlorodihydrofluoreszein (DCF) als indirekter Indikator für das Auftreten intrazellulärer ROS-Intermediate und somit erhöhter IOS-Level gemessen. Dabei wurde zunächst untersucht, inwiefern eine ATM-Inhibition die IOS-Level in ECFC beeinflusst. Nach einem Vergleich der basalen IOS-Level in unbehandelten PE- und NP-ECFC wurde außerdem analysiert, welchen Einfluss der PE-Status auf die IOS-Level unter ATM-Inhibition besitzt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der unter Abschnitt 4.13 beschriebenen Methodik.

5.2.2.1 Einfluss der ATM-Inhibition auf die IOS in ECFC

Nach Behandlung mit einem ATMi wurden in der Versuchsgruppe der NP-ECFC und der PE-ECFC zu den Messzeitpunkten nach 1 h, 3 h, 4 h, 21 h, 26 h und 28 h moderat höhere IOS-Level als in der jeweiligen Kontrollgruppe gemessen. Dabei konnte bei der Analyse der RFU-Rohdaten als Indikator für die IOS-Level keine statistische Signifikanz festgestellt werden. (Abb. 26, Tabelle 21 [Anhang]).

Es konnte also unter ATMi-Applikation eine nicht signifikante Tendenz zu erhöhten IOS-Leveln gezeigt werden.

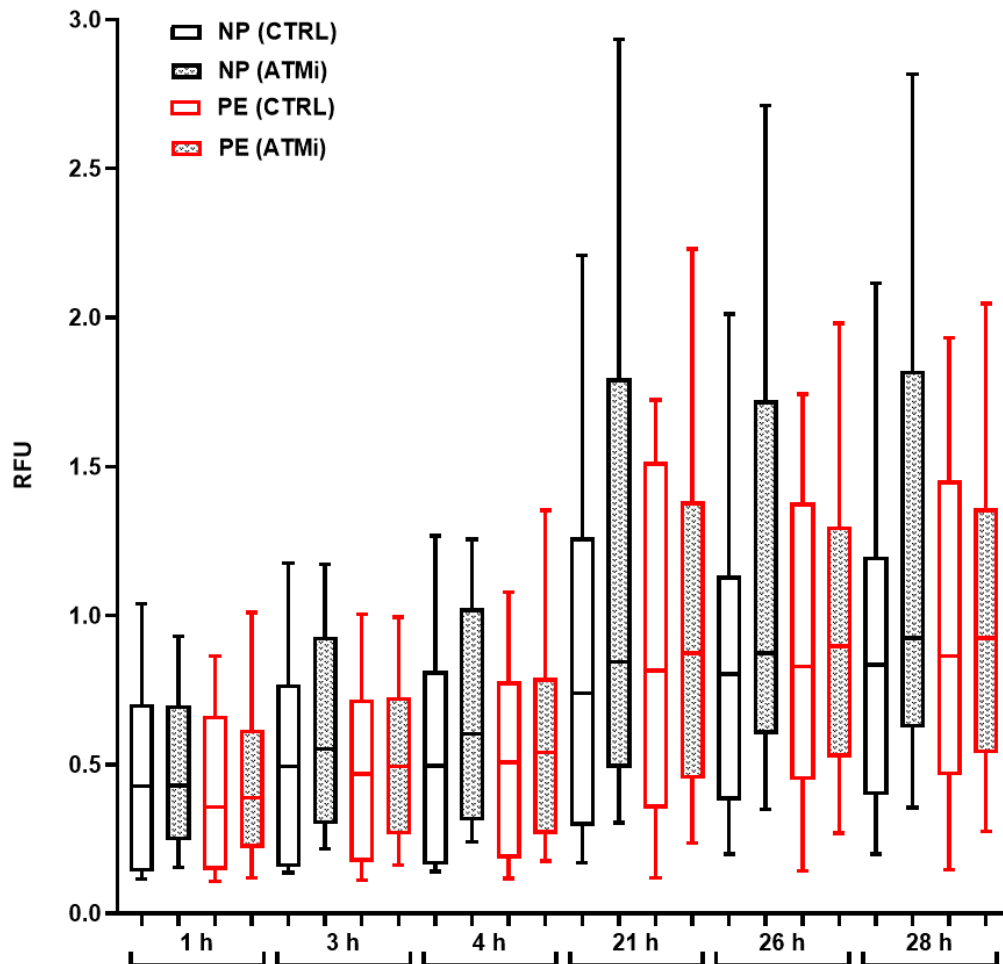


Abb. 26: Intrazelluläre oxidative Stresslevel von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi).

Bestimmung des intrazellulären oxidativen Stresslevels in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) nach Inkubation mit 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein zu verschiedenen Messzeitpunkten nach ATMi-Zugabe. Darstellung von: Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 6 (inkl. ein technisches Replikat). CTRL: Kontrolle.

Diese mit ATM-Inhibition assoziierte Zunahme der IOS-Level im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich sowohl bei NP- als auch PE-ECFC nach Normalisierung der RFU-Rohdaten auf die entsprechende Kontrollgruppe im überwiegenden Teil der Messzeitpunkte signifikant und fiel in der PE-Versuchsgruppe tendenziell etwas schwächer aus. Das heißt, dass die ATMi-Behandlung einer ECFC-Versuchsgruppe zum Messzeitpunkten nach 1 h, 3 h, 4 h, 21 h, 26 h und 28 h mit einer Erhöhung der IOS-Level im Vergleich zur Kontrollgruppe einherging, die sich für einige Versuchsgruppen signifikant zeigte (Abb. 27, Tabelle 22 [Anhang]).

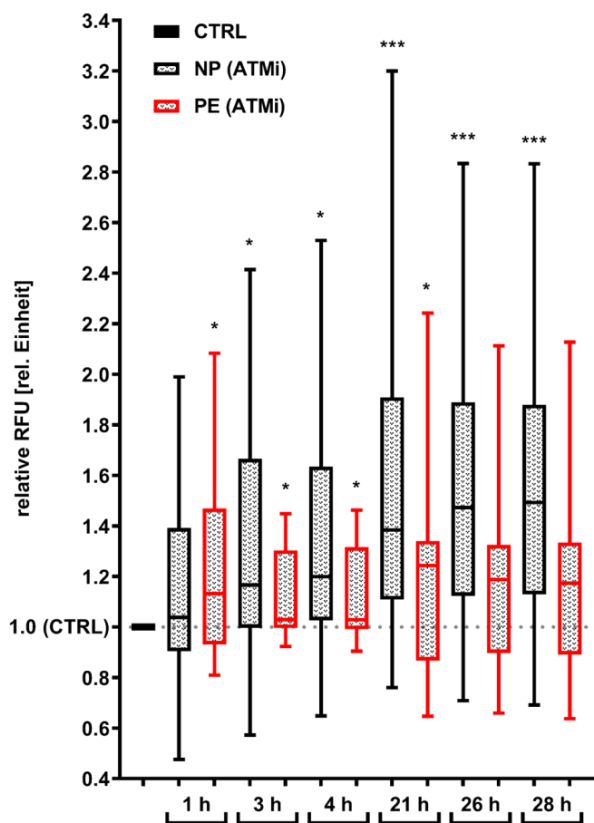
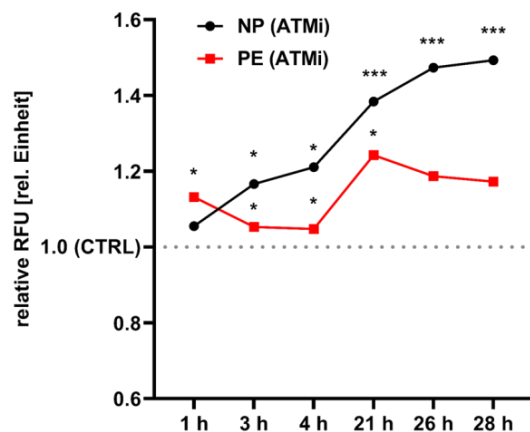
A**B**

Abb. 27: (A) Intrazelluläre oxidative Stresslevel von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) und (B) Einzeldarstellung der Mediane aus A. Bestimmung des intrazellulären oxidativen Stresslevels in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) nach Inkubation mit 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein zu verschiedenen Messzeitpunkten nach ATMi-Zugabe. Normalisiert auf die Kontrolle (CTRL: $y = 1$). Darstellung von: (A): Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box), (B): Median (Punkte auf Verbindungslinie). Statistische Berechnung: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$. $n = 6$ (inkl. ein technisches Replikat). CTRL: Kontrolle.

Diese ATMi-assoziierte Erhöhung der IOS-Level konnte auch durch die Analyse der IOS-Level über den gesamten Zeitverlauf des Versuches hinweg bestätigt werden. Dabei zeigten sich nach ATMi-Behandlung sowohl bei NP-ECFC (Abb. 28A) als auch bei PE-ECFC (Abb. 28B) höhere IOS-Level als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Unter Behandlung mit ATMi wurde in PE- und NP-ECFC mit zunehmender Versuchsdauer überwiegend kontinuierlich ansteigende IOS-Level gemessen (Abb. 28). Bis zum Zeitpunkt $t \approx 4$ h konnte im Zeitraum der frühen (5 min bis 1 h) und mittleren (1,5 h bis 4 h) Messphase ein nahezu gleichförmiger Anstieg der IOS-Level in allen Untersuchungsgruppen detektiert werden. Mit Beginn der späten Messphase (21 h bis 28 h) konnte eine Tendenz zum verminderten Anstieg und stattdessen zur Plateaubildung der IOS-Level in allen Versuchsgruppen beobachtet werden (Abb. 28). Interessanterweise war die ATMi-induzierte Veränderung der IOS-Level zwischen der ATMi-Behandlungsgruppe und der entsprechenden Kontrollgruppe bei PE-ECFC tendenziell schwächer ausgeprägt als bei ECFC aus gesunden Schwangerschaften (Abb. 28C).

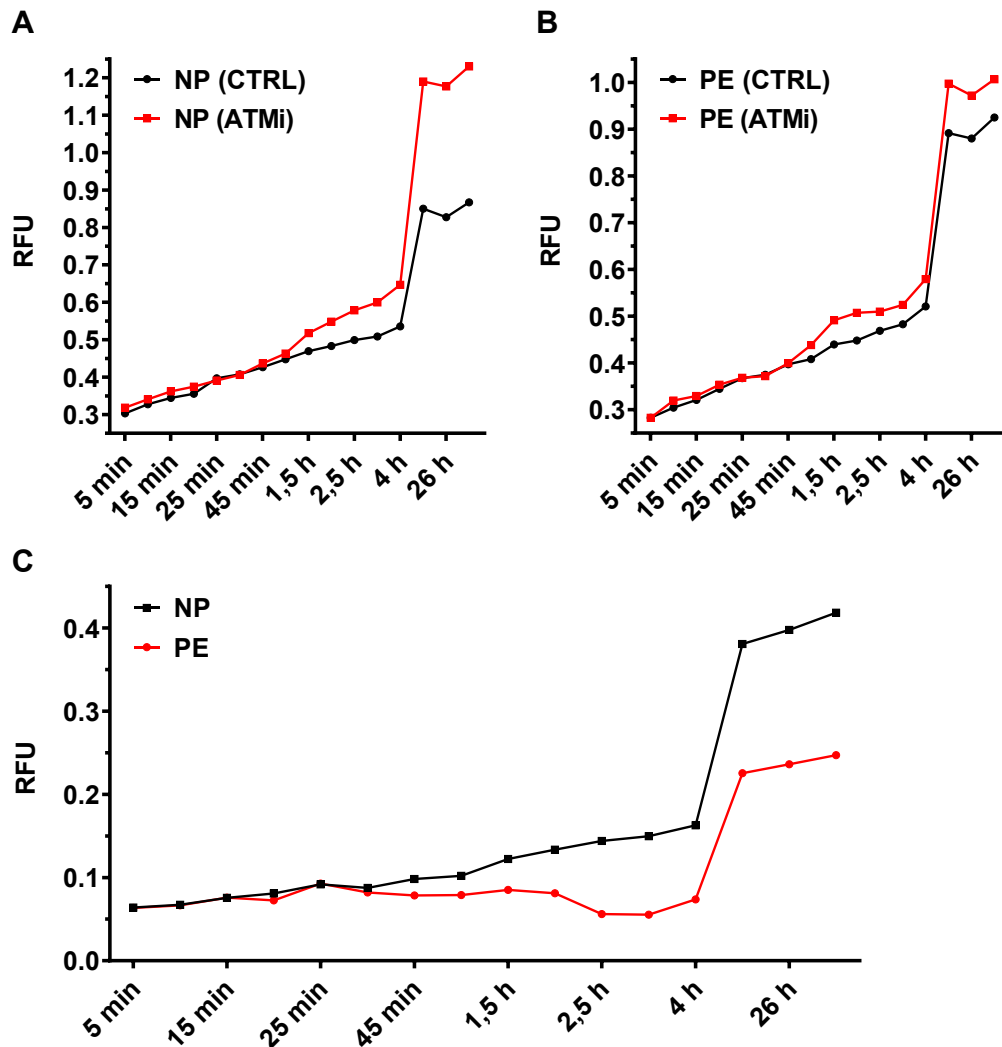


Abb. 28: Profil der intrazellulären oxidativen Stresslevel von (A) ECFC gesunder (NP) und (B) präeklampsischer (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) sowie (C) die jeweilige ATMi-induzierte Veränderung der Fluoreszenzintensität.

Bestimmung der intrazellulären oxidativen Stresslevel in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) nach Inkubation mit 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein zu verschiedenen Messzeitpunkten nach ATMi-Zugabe. Darstellung von: Mittelwert (Punkte auf Verbindungslinie). n = 6 (inkl. ein technisches Replikat). CTRL: Kontrolle.

Zusammenfassend konnte eine Tendenz dahingehend festgestellt werden, dass die ATM-Inhibition mit einer Erhöhung der IOS-Level in NP- und PE-ECFC einherging (Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28A, B). Diese ATMi-assoziierte Zunahme der IOS-Level zeigte sich bei ECFC mit PE-Status tendenziell schwächer ausgeprägt als bei NP-ECFC (Abb. 27, Abb. 28C).

Außerdem wurde über den gesamten Zeitverlauf der Fluoreszenzintensitätsmessung ein aufgrund voranschreitender zellulärer Proliferationsprozesse erwarteter kontinuierlicher Anstieg der IOS-Level in allen Versuchsgruppen beobachtet, wobei zu späten Messzeitpunkten höhere IOS-Level als zu früheren Messzeitpunkten ermittelt wurden (Abb. 26, Abb. 28A,B).

5.2.2.2 Einfluss des Präeklampsie-Status auf die Ausbildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies unter ATM-Inhibition

Als nächstes sollte der Einfluss des PE-Status auf die IOS-Level in ECFC unter ATM-Inhibition analysiert werden. Um eine genaue Differenzierung zwischen diesen beiden Einflussfaktoren (ATMi-

Inhibition, PE-Status) auf die IOS-Level vornehmen zu können, wurde zunächst ermittelt, welchen Einfluss der PE-Status auf die IOS-Level von unbehandelten ECFC-Populationen besitzt. Dafür wurden unbehandelte ECFC gesunder Schwangerer mit unbehandelten ECFC von PE-Patientinnen verglichen. Dabei zeigten sich in der Gruppe der PE-ECFC im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten 1 h, 3 h, 4 h, 21 h, 26 h und 28 h dezent erhöhte IOS-Level ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz (Abb. 29A, Tabelle 23 [Anhang]). Darüber hinaus wurden innerhalb derselben Versuchsgruppe beim Vergleich zwischen den frühen (1 h, 3 h, 4 h) und späten (21 h, 26 h, 28 h) Messzeitpunkten zu späteren Messzeitpunkten höhere IOS-Level gemessen. Dieser Unterschied war bei den in Tabelle 18 aufgeführten Vergleichen zwischen frühen und späten Messzeitpunkten signifikant (Abb. 29A).

Tabelle 18: Signifikante Früh-Spät-Unterschiede der intrazellulären oxidativen Stresslevel unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklampsischer (PE) Schwangerer.

Angabe von Median (MD) in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum frühen Messzeitpunkt. n = 6 (inkl. ein technisches Replikat).

Versuchsgruppe	Früher Messzeitpunkt	Späte Messzeitpunkte	Korrespondierende Codierung des Vergleichspaares in Abb. 29A
NP	1 h (MD = 0,28)	21 h (MD = 0,80; p = 0,03)	a
		26 h (MD = 0,88; p = 0,002)	b
		28 h (MD = 0,90; p = 0,001)	c
PE	1 h (MD = 0,31)	21 h (MD = 0,99; p = 0,002)	d
		26 h (MD = 0,90; p < 0,001)	y
		28 h (MD = 0,92; p < 0,001)	z
	3 h (MD = 0,40)	28 h (MD = 0,92; p = 0,04)	w

Es konnte festgestellt werden, dass der PE-Status mit einer leichten Erhöhung der IOS-Level einhergeht. Es fielen außerdem im Zeitverlauf zunehmende IOS-Level auf, wobei sowohl in NP-ECFC als auch in PE-ECFC zu späteren Messzeitpunkten im Vergleich zu früheren Messzeitpunkten signifikant höhere IOS-Level gemessen wurden (Abb. 29A).

Die Feststellung von erhöhten IOS-Levels in PE-ECFC im Vergleich zu NP-ECFC konnte auch bei der Messung der IOS-Level über den gesamten Zeitverlauf des Versuches hinweg bestätigt werden. Dabei wurden in PE-ECFC tendenziell höhere IOS-Level detektiert als in NP-ECFC. (Abb. 29B). Sowohl in der NP- als auch in der PE-Versuchsgruppe wurde ein im Zeitverlauf kontinuierlicher Anstieg der IOS-Level detektiert, sodass auch hier zu späteren Messzeitpunkten stets höhere IOS-Level gemessen wurden als zu früheren Messzeitpunkten (Abb. 29B).

Ähnlich wie zuvor bereits bei ATMi-behandelten NP- und PE-ECFC festgestellt (Abb. 28), konnte auch bei unbehandelten ECFC in beiden Versuchsgruppen bis zum Zeitpunkt $t \approx 4$ h im Zeitraum der frühen (5 min bis 1 h) und mittleren (1,5 h bis 4 h) Messphase ein nahezu gleichförmiger Anstieg der IOS-Level gemessen werden. Mit Beginn der späten Messphase (21 h bis 28 h) wurde ebenso eine Tendenz zum verminderten Anstieg und stattdessen zur Plateaubildung der IOS-Level beobachtet (Abb. 29B).

Es wurde also deutlich, dass die IOS-Level mit zunehmender Zeit in beiden Versuchsgruppen zunahmen und dass ECFC mit PE-Status höhere IOS-Level zeigten als ECFC mit NP-Status.

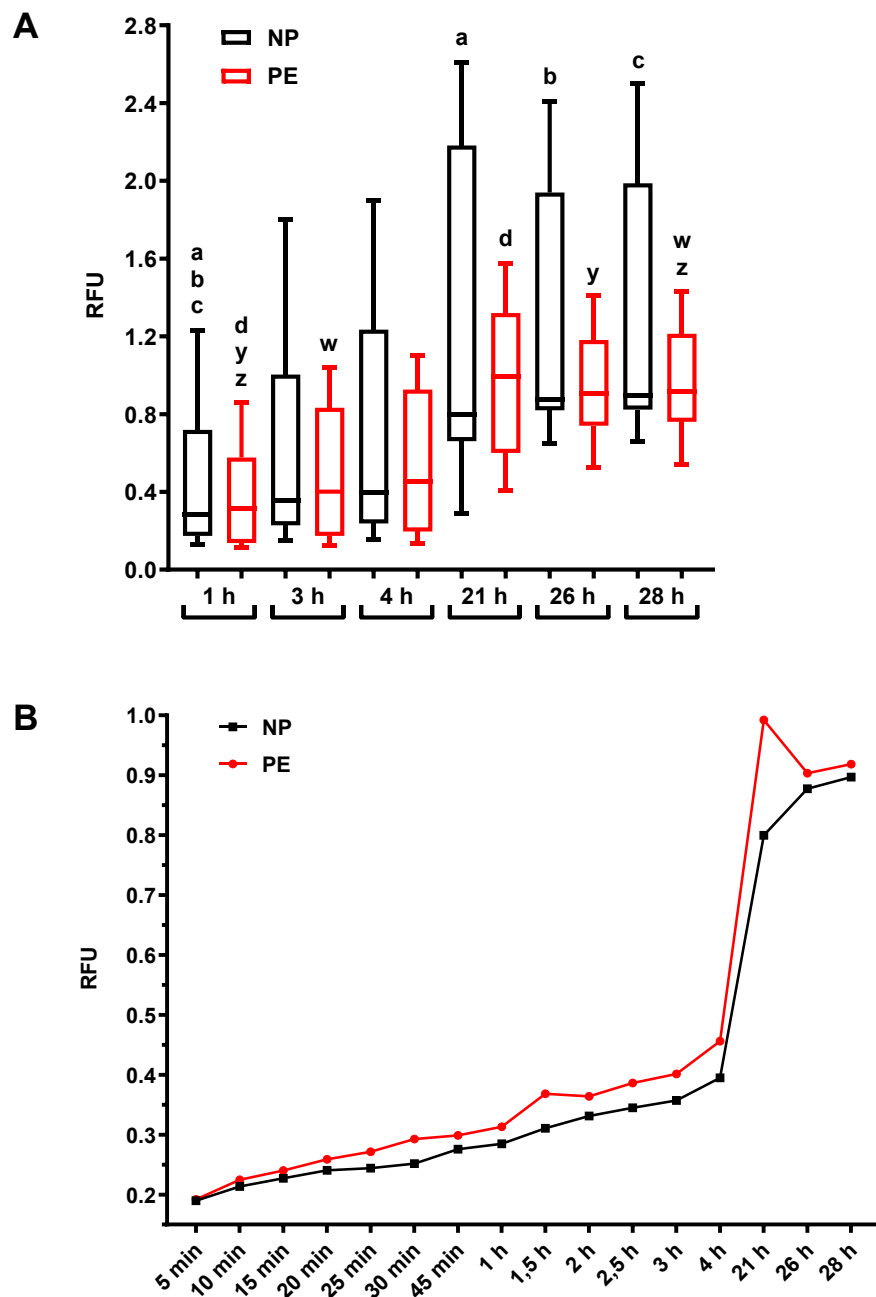


Abb. 29: (A) Intrazelluläre oxidative Stresslevel und (B) Profil der intrazellulären oxidativen Stresslevel unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer.

Bestimmung des intrazellulären oxidativen Stresslevels in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) nach Inkubation mit 2', 7'-Dichlorodihydrofluoreszein zu verschiedenen Messzeitpunkten. Darstellung von: (A): Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagrechte in der Box), (B): Median (Punkte auf Verbindungslinie). Statistische Berechnung: Kruskal-Wallis-Test; Signifikanzniveau (identische Symbole über den Balken markieren einen Vergleich zwischen zwei Gruppen): $p < 0,05$: a, w; $p < 0,01$: d, c, b; $p < 0,001$: y, z. $n = 6$ (inkl. ein technisches Replikat).

Darauf aufbauend konnte nun anschließend zusätzlich untersucht werden, welchen Einfluss der PE-Status bei ATMi-behandelten ECFC-Populationen auf die IOS-Level besitzt.

In PE-ECFC konnte unter ATM-Inhibition in der mittleren und späten Messphase eine nicht signifikante relative Verminderung der IOS-Level im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden. Das heißt, dass der PE-Status einer ECFC-Versuchsgruppe zum Messzeitpunkt nach 3 h, 4 h, 21 h, 26 h und 28 h, mit einer nicht signifikanten relativen Abnahme der IOS-Level im Vergleich zur NP-Vergleichsgruppe assoziiert war. Dieser Trend der PE-Status-assoziierten Verringerung der IOS-Level unter ATMi-Behandlung zeigte sich mit zunehmender Zeit verstärkt. Lediglich zum frühen

Messzeitpunkt nach 1 h wurde noch eine relative Zunahme der IOS-Level detektiert. Eine statistische Signifikanz zeigte sich jeweils nicht (Abb. 30, Tabelle 24 [Anhang]).

In der nicht mit ATMi behandelten PE-Kontrollgruppe zeigte sich hingegen während der mittleren und späten Messphase eine gegensätzliche Entwicklung in Richtung konstanter bzw. relativ erhöhter IOS-Level im Vergleich zur NP-Vergleichsgruppe. Dies spiegelte sich in den Messzeitpunkten 3 h, 4 h, 21 h, 26 h und 28 h wider. Auch hierbei kam es zu späteren Zeitpunkten tendenziell zu einer verstärkten Ausprägung der PE-assoziierten Zunahme der IOS-Level. Lediglich zum frühen Messzeitpunkt nach 1 h wurde noch eine relative Abnahme der IOS-Level detektiert. Eine statistische Signifikanz konnte für keine dieser Beobachtungen festgestellt werden. (Abb. 30, Tabelle 24 [Anhang]).

Allgemein schien der PE-Status einer ECFC-Population also mit der Tendenz zu erhöhten IOS-Levels, unter ATM-Inhibition jedoch mit einer Verminderung der IOS-Level assoziiert zu sein. Beide Trends schienen sich mit zunehmender Zeit leicht zu verstärken (Abb. 29, Abb. 30, Tabelle 24 [Anhang]).

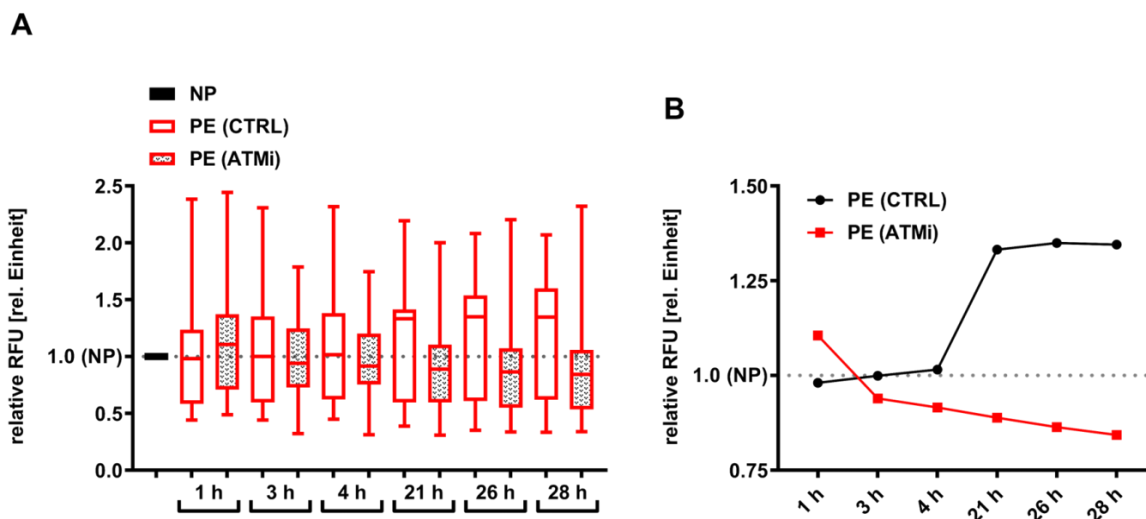


Abb. 30: (A) intrazellulärer oxidativer Stresslevel von ECFC präeklaptischer Patientinnen (PE) nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) und (B) Einzeldarstellung der Mediane aus A.

Bestimmung der intrazellulären oxidativen Stresslevel in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) nach Inkubation mit 2', 7'-Dichlorodihydrofluoreszein zu verschiedenen Messzeitpunkten nach ATMi-Zugabe. Normalisiert auf die gesunde Kontrolle (NP: $y = 1$). Darstellung von: (A): Interquartilsabstand (Box), Minimal- / Maximalwert (untere / obere Antenne), Median (Waagerechte in der Box), (B): Median (Punkte auf Verbindungslinie). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. $n = 6$ (inkl. ein technisches Replikat). CTRL: Kontrolle.

Zusammenfassend konnte eine Tendenz dahingehend gezeigt werden, dass der PE-Status einer ECFC-Population mit höheren IOS-Levels als in der gesunden Kontrollpopulation einherging. Dieser Trend zeigte sich mit zunehmender Versuchsdauer immer ausgeprägter (Abb. 29, Abb. 30). Die ATM-Inhibition wirkte der PE-Status-assoziierten Zunahme der IOS-Level entgegen. In ATMi-behandelten ECFC wurde stattdessen insbesondere zu mittleren und späten Messzeitpunkten eine im Zeitverlauf zunehmende PE-assoziierte Abnahme der IOS-Level detektiert (Abb. 30). Aufgrund voranschreitender zellulärer Proliferation wurden in unbehandelten ECFC aus gesunden und präeklaptischen Schwangeren über den Zeitverlauf erwartungsgemäß kontinuierlich ansteigende IOS-Level gemessen, wobei zu späten Messzeitpunkten signifikant höhere IOS-Level als zu früheren Messzeitpunkten ermittelt wurden (Abb. 29).

6 Diskussion

6.1 Teilprojekt 1: Einfluss von Vitamin D₃ auf die Proteine der ATM-basierten DNA-Schadenssignalkaskade unter dem Einfluss präeklaptischer Stressoren in ECFC

Es konnte in den Versuchen von Teilprojekt 1 mittels Immunzytochemie und Immunoblotverfahren gezeigt werden, dass VD im Milieu oxidativen Stresses in ECFC die Proteinlevel von ATM, Akt, pCHK2 und die Ausprägung von γ H2AX-Foci, pATM-Foci sowie von MN modifizieren kann.

Dabei konnte für VD im Allgemeinen ein abschwächender Effekt auf die unter ROS-Einwirkung detektierte Veränderung der Proteinlevel und Foci- bzw. MN-Anzahl in ECFC beobachtet werden. Diese abschwächende Tendenz scheint teilweise durch die VD-Dosis und die Art des ROS-Induktors variiert zu sein.

6.1.1 Akt

6.1.1.1 Einfluss präeklaptischer Stressoren

Generell konnten unter Simulation PE-ähnlicher Stressbedingungen mit erhöhtem oxidativem Stress durch die Behandlung von ECFC mit H₂O₂ bzw. Hypoxie reduzierte pAkt- und Akt-Proteinlevel festgestellt werden. Dies deutet in diesem Fall darauf hin, dass Akt nicht durch PE-ähnliche Stressoren in ECFC aktiviert wurde. Ähnliches beobachteten die Arbeitsgruppen Jia et al. und Uberti et al. an humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC). Unter oxidativem Stressbedingungen mit H₂O₂- und Hypoxie-Behandlung stellten auch sie keine Akt-Aktivierung, sondern überwiegend verminderte pAkt- bzw. Akt-Proteinlevel fest. (134, 135).

6.1.1.2 Einfluss von Vitamin D₃

Nach alleiniger Behandlung von ECFC mit VD konnten in ECFC reduzierte pAkt- und Akt-Proteinlevel festgestellt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Akt in ECFC nicht durch VD aktiviert wurde. Jia et al. und Uberti et al. konnten im Gegensatz dazu ansteigende Proteinlevel unter VD-Gabe in HUVEC beobachten und vermuten daher eine gesteigerte pAkt-Proteinexpression unter VD. Abweichungen zu den hier vorliegenden Ergebnissen könnten sich aus der Verschiedenheit der applizierten VD-Dosis (50 nM bzw. 1 nM) und zellspezifischen Unterschieden (HUVEC als reife Endothelzellen) ergeben haben (134, 135).

Speziell bezogen auf den Einfluss von VD auf die Akt-Proteinlevel in ECFC unter oxidativem Stress in einem simulierten PE-ähnlichen Milieu wurde in der vorliegenden Studie Folgendes festgestellt: Eine VD-Behandlung zeigte unter hypoxischen Bedingungen keinen eindeutigen Effekt auf die Akt-Proteinexpressionslevel in ECFC. Es wurde unter 0,1 nM VD eine Tendenz zur Verstärkung und unter 10 nM VD eine Tendenz zur Umkehr der unter Hypoxie beobachteten Veränderungen der Akt-

Proteinexpressionslevel festgestellt. Bei Gabe von VD zeigten sich die unter alleiniger H_2O_2 -Behandlung in ECFC beobachteten reduzierenden Effekte auf die Akt-Proteinexpressionslevel leicht rückläufig. Es war somit erkennbar, dass VD die Akt-Proteinexpressionslevel in ECFC beeinflusst und tendenziell, insbesondere in der höheren Dosierung von 10 nM, mit einer Abschwächung der unter alleiniger Behandlung mit einem PE-ähnlichen Stressor beobachteten Effekte in Verbindung gebracht werden kann. Ein Bezug zwischen höheren VD-Dosen und einem damit einhergehenden erhöhten pAkt-Proteinexpressionslevel konnte in HUVEC gezeigt werden (134). Die Arbeitsgruppen Jia et al. und Uberti et al. konnten in Versuchen mit HUVEC ebenfalls einen abmildernden Einfluss von VD auf die unter ROS und Hypoxie verminderte Akt-Aktivierung feststellen (134, 135).

Zusammenfassend konnte für Akt also festgestellt werden, dass die pAkt- und Akt-Proteinexpressionslevel sowie die Akt-Phosphorylierungsgrade in einem PE-ähnlichen Stressmilieu mit erhöhtem oxidativem Stress durch VD beeinflusst werden. VD scheint dabei bis zu einem gewissen, dosisabhängigen Grad die PE-Stressor-assoziierte Verminderung der Akt-Proteinexpressionslevel abschwächen zu können. Untersuchungen mit ähnlichen Resultaten an anderen endothelialen Zellen (HUVEC) stützen diese Schlussfolgerung.

6.1.2 ATM

6.1.2.1 Einfluss präeklaptischer Stressoren

Allgemein wurden in ECFC unter Simulation PE-ähnlichen Stressbedingungen mit erhöhtem oxidativem Stress durch eine H_2O_2 - bzw. Hypoxie-Behandlung folgende Auswirkungen auf ATM beobachtet: Nach Behandlung mit H_2O_2 konnten im Immunoblot-Verfahren tendenziell verminderte ATM-Proteinexpressionslevel detektiert werden. Demgegenüber steht das Resultat von erhöhten pATM- und ATM-Proteinexpressionsleveln unter hypoxischen Bedingungen. Die dabei signifikant verminderten Phosphorylierungsgrade deuten auf das vermehrte Vorliegen des nicht-phosphorylierten ATM hin, was vermuten lässt, dass es sich vordergründig nicht um eine pATM-Aktivierung, sondern eine generell vermehrte Expression von ATM unter 1 % Hypoxie handelt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ATM unter hypoxischen Bedingungen zwar erhöhte ATM- und pATM-Proteinexpressionslevel zeigt, sich dies insgesamt jedoch nicht in einer gesteigerten Phosphorylierung, also Aktivierung widerspiegelt (signifikant verminderter ATM-Phosphorylierungsgrad).

H_2O_2 und Hypoxie als PE-simulierende Stressoren zeigten also bezüglich ihrer Auswirkung auf die ATM-Proteinexpressionslevel in ECFC unterschiedliche Effekte. Insgesamt schienen sie ATM in ECFC im Rahmen dieser Arbeit nicht entscheidend zu aktivieren. Dies konnte auch immunzytochemisch bestätigt werden. Nach Behandlung von ECFC mit H_2O_2 bzw. Hypoxie konnte eine reduzierte Anzahl von pATM-Foci pro Zelle festgestellt werden. Dies deutet insgesamt darauf hin, dass ATM unter Einwirkung von H_2O_2 und Hypoxie in ECFC im Rahmen der hier durchgeführten Experimente nicht vermehrt aktiviert wurde.

Das Ausbleiben der Formierung klarer pATM-Foci unter Hypoxie beobachteten auch Bencokova et al. Sie stellten fest, dass sich die morphologische Charakteristik von pATM-Foci nach Behandlung von YZ3-Fibroblasten mit der DNA-Strangbrüche-induzierenden Substanz Neocarzinostatin (einzelnstehende, große Foci), klar von den Foci unterscheidet, die nach 18-stündiger Hypoxie-Behandlung beobachtet wurden (diffuser, unregelmäßiger). Dabei wurde jedoch nur die optische Charakterisierung der Foci unterschieden. Eine quantitative Unterscheidung nehmen Bencokova et al nicht vor (136). Dennoch könnte diese Beobachtung einen Hinweis darauf geben, warum in der vorliegenden Arbeit unter Hypoxie keine erhöhte Anzahl an pATM-Foci detektiert wurde: Denn wenn Foci aufgrund ihrer Morphologie nicht eindeutig als solche erkennbar waren, konnten sie in der Auszählung auch nicht berücksichtigt werden. Sie gingen somit auch nicht in die Auszählergebnisse der Foci-Anzahl pro Zelle ein. In zukünftigen Studien könnte es daher nützlich sein, eine genau Charakterisierung der pATM-Foci-Morphologie in ECFC unter Hypoxie vorzunehmen oder die Quantifizierung technisch zu unterstützen. Eine Möglichkeit könnte darin bestehen, eine automatisierte, Bild-Analyse-Software-gestützte Foci-Quantifizierung in Anlehnung an das „Auto-Foci“-System vorzunehmen. Damit kann – neben zahlreichen anderen Parametern, die für das menschliche Auge unzureichend differenzierbar sind – eine genauere Berücksichtigung des Hintergrundes einer immunzytochemischen Färbung ermöglicht werden, da diese für die Detektion einzelner Foci eine wichtige Rolle spielt (137).

Im Unterschied zur vorliegenden Studie fanden Bencokova et al. in ihren Versuchen mittels WB-Verfahren auch heraus, dass ATM in lymphoblastoiden Zellen nach Behandlung mit 0,02 % O₂ (5-fach höhere Hypoxie als in dieser Studie angewandt) aktiviert und phosphoryliert werden kann. Unter 1 % O₂ zeigten sich hingegen keine erhöhten pATM-Expressionslevel (136). Dies verdeutlicht auch den expliziten Zusammenhang zwischen ATM-Aktivierung und Stressor-Dosis (Näheres siehe auch unter Abschnitt 6.1.6).

Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen beobachteten Ting et al. an murinen BPH-1-Zellen einen Anstieg der pATM- und ATM-Proteinlevel unter durch H₂O₂ induziertem oxidativem Stress. Die abweichenden Ergebnisse könnten u.a. durch die abweichende H₂O₂ -Dosis und -Applikationsdauer (0,1 bis 1 mM H₂O₂ für 30 min) sowie in speziesspezifischen Unterschieden zwischen murinen und humanen Zellen begründet liegen (138). Auch Zhan et al. konnten unter Applikation von 100 µM H₂O₂ in HUVEC eine Aktivierung von ATM, Akt und γH2AX via Immunoblot- bzw. Immunzytochemie-Verfahren nachweisen (139). Dies verdeutlicht die bisher nicht eindeutig geklärte, z.T. zellspezifisch sehr variable ATM-Reaktion auf ROS.

Guo et al. haben die Reaktionen von ATM unter ROS näher untersucht. Sie konnten feststellen, dass die DDR-basierte ATM-Aktivierung unter H₂O₂ inhibiert sein kann, weil es zu einer gestörten Bindung von MRN an die DNA kommen kann (140). Um auszuschließen, dass dies auch in ECFC der Fall sein könnte, wäre es in zukünftigen Studien möglich, eine entsprechende Bestimmung der MRN-Expressions- und Aktivitätslevel in ECFC vorzunehmen, und diese mit den gleichzeitig ermittelten pATM- und ATM-Proteinexpressionsleveln abzugleichen.

Guo et al. konnten außerdem zeigen, dass ATM auch unabhängig von DSB und dem MRN-Komplex direkt durch oxidativen Stress aktiviert werden kann (141). Dabei kommt es zur Ausbildung kovalenter intermolekularer Disulfidbrücken im ATM-Homodimer (142). Für die Aktivierung durch oxidativen Stress nimmt der Cys-2991-Rest am C-terminalen Ende des ATM-Proteins eine essenzielle Rolle ein. Seine Mutation führt zur gestörten ATM-Aktivierung unter H_2O_2 (77, 141). Guo et al. nutzen für ihre Versuche im Unterschied zur hier vorliegenden Studie jedoch humane primäre Fibroblasten und embryonale Nierenzellen und verwendeten eine mehr als doppelt so hohe H_2O_2 -Dosis (250 μM), sodass eine generelle Übertragbarkeit der Ergebnisse nicht uneingeschränkt möglich ist (141).

Darüber hinaus erscheint eine funktionsbeeinträchtigende Cys-2991-Mutation im ATM-Gen bei den hier verwendeten fünf verschiedenen ECFC-Zelllinien als alleinige Erklärung für eine ausbleibende ATM-Aktivierung unter ROS in ECFC nicht ausreichend. Dennoch könnte durch zusätzliche genspezifische Untersuchungen im Vorfeld zukünftiger Studien dieser potenzielle Einflussfaktor berücksichtigt werden. Auch wäre es möglich, die ATM-Aktivität in ECFC einem entsprechenden Vergleich mit anderen endothelialen Zellen (z.B. HUVEC) zu unterziehen, um zellspezifische Unterschiede und ggf. Dysfunktionalitäten in der ATM-Funktionalität näher beurteilen zu können.

Die Arbeitsgruppe um Paull und Guo fand bei weiteren Untersuchungen *in vivo* außerdem heraus, dass die ATM-Aktivierung unter H_2O_2 auch durch das Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) unterdrückt werden kann (141). NAC wird als Arzneimittel vorwiegend als Mukolytikum und Antidot bei Paracetamol-Intoxikationen eingesetzt. Jedoch sind die Bioverfügbarkeit ($< 10\%$) und Plasmakonzentrationen bei oraler Einnahme so gering, dass die intrazelluläre NAC-Konzentration und damit die antioxidative Kapazität *in vivo* als vernachlässigbar klein angesehen werden kann (143). Erkrankungen, bei welchen die Gabe von NAC indiziert wäre, waren zudem Teil der Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der vorliegenden Studie (vgl. Abschnitt 4.9.1). Theoretisch wäre es zwar möglich gewesen, dass alle Schwangere, von welchen ECFC für diesen Versuch entnommen wurden, NAC ohne vorherige Dokumentation bei Studienbeginn als Nahrungsergänzungsmittel in für eine potenzielle intrazelluläre Wirkung infrage kommenden ausreichend hoher Dosis eingenommen hatten. Eine daraus resultierende relevante intrazelluläre NAC-Akkumulation kann praktisch jedoch ausgeschlossen werden, da sich die in dieser Versuchsreihe verwendeten ECFC alle in Passage 4 oder 5 befanden, d.h. also bereits mindestens die dritte „Nachfolgegengeneration“ der ursprünglich entnommenen ECFC darstellten. Es ist anzunehmen, dass eine – wenn überhaupt vorhandene – intrazelluläre NAC-Akkumulation im Laufe der bis Passage 4 notwendigen Vermehrungsprozesse aufgehoben wurde.

Die Arbeitsgruppen um Paull und Hammond haben in den letzten zwei Jahrzehnten einen großen Beitrag zum besseren Verständnis der verschiedenen Aktivierungswege von ATM geleistet. Sie trugen u.a. wesentlich dazu bei, das Wissen um die ATM-Aktivierung unabhängig von DNA-Schäden zu erweitern. Diese Art der ATM-Aktivierung wird – in Abgrenzung zur vorher entdeckten, „regelhaft-klassischen“ ATM-Aktivierung durch DNA-Schäden in Verbindung mit dem MRN-Komplex – mittlerweile gemeinhin als nicht-kanonisch, also „nicht der (klassischen) Regel entsprechend“, bezeichnet (76, 80, 144). Bisher bleibt jedoch weitestgehend unklar, inwiefern diese überwiegend durch Versuche mit

lymphoblastoiden Zelllinien und Fibroblasten gewonnenen Erkenntnisse zur nicht-kanonischen Aktivierung von ATM unter ROS und Hypoxie auch auf andere Zelltypen übertragbar, in Versuchsreihen mit $n > 1$ zuverlässig reproduzierbar und auch bei Untersuchungen, die über die reine Proteininteraktion innerhalb von Signalkaskaden hinausreichen, anwendbar sind (136, 140, 141).

6.1.2.2 Einfluss von Vitamin D

Sowohl im WB- als auch ICC-Verfahren konnten für die alleinige Behandlung mit VD in ECFC keine aktivierenden Einflüsse auf ATM beobachtet werden. Es zeigten sich hingegen sehr geringfügig verminderte ATM-Proteinexpressionslevel sowie eine reduzierte Anzahl von pATM-Foci pro Zelle.

Dass eine VD-Behandlung eher mit einer Verminderung der pATM-Proteinexpressionslevel einhergeht, konnten auch Halicka et al. in humanen lymphoblastoiden TK6-Zellen, humanen A549-Lungenadenokarzinom-Zellen und in Lymphozyten nachweisen (145).

In der hier vorliegenden Studie konnte mittels WB-Verfahren unter hypoxischen Bedingungen und VD in ECFC eine Umkehr der erhöhten ATM-Proteinexpressionslevel hin zu verminderten ATM-Proteinexpressionsleveln (signifikant unter 0,1 nM VD) beobachtet werden, wobei sich der ATM-Phosphorylierungsgrad konstant zeigte. Auch unter H₂O₂-Behandlung und gleichzeitiger Applikation von VD zeigten sich die ATM-Proteinexpressionslevel-reduzierenden Effekte unter H₂O₂ in ECFC leicht rückläufig, wobei sich dieser Trend bei niedrigeren H₂O₂-Konzentrationen eindeutiger darstellte. Insgesamt konnte also festgestellt werden, dass VD die ATM-Proteinexpressionslevel im PE-ähnlichen oxidativen Stressmilieu in ECFC beeinflusst und am ehesten mit einer Abschwächung der unter alleiniger Applikation eines PE-Stressors beobachteten Effekte in Verbindung gebracht werden kann. Diese Tendenz zur Abmilderung der mit PE-Stressoren-assoziierten Veränderung der ATM-Proteinexpressionslevel konnte in ECFC auch immunzytochemisch nachgewiesen werden. Dabei konnte für die VD-Behandlung unter hypoxischen Bedingungen eine Abschwächung der Hypoxie-assoziierten Abnahme der pATM-Foci-Anzahl beobachtet werden, während dieser Trend unter H₂O₂-Behandlung deutlich weniger stark ausgeprägt war. Die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung von ATM deuten darauf hin, dass VD die pATM-Foci-Ausprägung in ECFC modifizieren kann und abmildernde Effekte insbesondere auf die Reduktion der pATM-Foci unter Hypoxie besitzen könnte.

Zusammenfassend zeigen diese Resultate, dass die ATM-Proteinexpression im präeklaptischen Stressmilieu durch VD in ECFC beeinflusst wird. Dieser Einfluss könnte einer Variabilität bzgl. der PE-Stress-auslösenden Substanz unterworfen sein. VD scheint dabei insbesondere ausgleichende Effekte auf die im PE-ähnlichen oxidativen Stressmilieu beobachteten Veränderungen der ATM-Proteinexpression zu besitzen und könnte somit eine stabilisierende Rolle innerhalb der pATM-ATM-Homöostase in ECFC besitzen.

6.1.3 CHK2

6.1.3.1 Einfluss präeklaptischer Stressoren

Nach Behandlung mit H_2O_2 konnten in ECFC erhöhte pCHK2-Proteinexpressionslevel detektiert werden, wobei der Einfluss einer CHK2-Proteinlevelerhöhung insgesamt, ähnlich wie bei ATM detektiert, hierbei nicht ausgeschlossen werden kann. Unter 1 % O_2 und VD-Applikation zeigten sich die pCHK2-Proteinexpressionslevel weitestgehend unverändert.

Die Ergebnisse legen eine differenzierte Aktivierung von CHK2 unter präeklaptischen Stressbedingungen nahe, wobei diese unter ROS (H_2O_2) bevorzugt stattzufinden scheint. Dass eine CHK2-Aktivierung in Folge zytotoxischer Einflüsse und erhöhter intrazellulärer oxidativer Stresslevel erfolgen kann, ist durch verschiedene Arbeitsgruppen auch an anderen endothelialen Zellen (HUVEC) nachgewiesen worden, wobei dabei jedoch jeweils andere potentiell genotoxische Stressoren verwendet wurden (146-148).

CHK2 ist ein dem ATM-Protein nachgeschalteter und durch ATM aktivierter Effektor der DNA-Schadenssignalkaskade (vgl. Abschnitt 2.3.2). Daher ist die Detektion einer gesteigerten CHK2-Phosphorylierung unter H_2O_2 bei gleichzeitig unveränderten pCHK2-Leveln unter 1 % O_2 sowie dem Ausbleiben einer klaren ATM-Aktivierung unter H_2O_2 oder Hypoxie kritisch zu hinterfragen. Insbesondere auch deswegen, weil die Beobachtung der ATM-Proteinlevel zeigen konnten, welche Bedeutung die Bestimmung der Gesamtproteinlevel einnehmen kann, um die Relevanz einer erhöhten Phosphorylierung zu bewerten. Daher kann in diesem Zusammenhang eine eindeutige CHK2-Aktivierung unter H_2O_2 nicht uneingeschränkt angenommen werden, sondern dies allenfalls als Hinweis darauf angesehen werden. Die gleichzeitige Bestimmung der Gesamtproteinlevel, die eine Berechnung des Phosphorylierungsgrades erlauben würde, könnte dazu in zukünftigen Studien nähere Erkenntnisse bringen.

6.1.3.2 Einfluss von Vitamin D

Unter alleiniger VD-Applikation konnte in ECFC keine klare Steigerung der pCHK2-Proteinexpressionslevel nachgewiesen werden. Auch unter hypoxischen Bedingungen führte eine VD-Behandlung zu keiner relevanten Veränderung der pCHK2-Proteinexpressionslevel. Auffällig war jedoch, dass sich bei Gabe von VD die pCHK2-Proteinexpressionslevel-steigernden Effekte unter H_2O_2 -Behandlung leicht rückläufig zeigten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass VD die pCHK2-Proteinexpressionslevel in ECFC beeinflusst und insbesondere abmildernde Effekte auf die pCHK2-Proteinexpressionslevel unter H_2O_2 -Behandlung besitzen könnte.

Insgesamt konnte daher gezeigt werden, dass VD einen Einfluss auf die pCHK2-Proteinexpressionslevel im präeklaptischen Stressmilieu besitzt. Dieser scheint PE-Stress-Induktor-abhängig unter H_2O_2 -induziertem oxidativem Stress deutlicher ausgeprägt und bezogen auf die CHK2-Proteinexpressionslevel von reduzierendem Charakter zu sein. Im Vergleich zu den anderen Ergebnissen des ersten Teils dieser Arbeit scheinen auch die Ergebnisse zu CHK2 in das Bild einer von

VD vermittelten Modulation der DDR-Proteinlevel unter PE-ähnlichen-Stressbedingungen in ECFC zu passen und somit eine generelle intrinsische Plausibilität der Ergebnisse über CHK2 zu belegen.

6.1.4 γ H2AX

6.1.4.1 Einfluss präeklaptischer Stressoren

Zusammenfassend konnte unter Bedingungen mit PE-ähnlichem Stress, insbesondere bei Behandlung mit Hypoxie und einer erhöhten H₂O₂-Konzentration, in ECFC mehrheitlich eine Zunahme der γ H2AX-Foci beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass es unter PE-Stressoren zur vermehrten Rekrutierung von γ H2AX kam.

Ähnliches konnte an murinen hyperplastischen Prostatazellen nachgewiesen werden. 0.1 mM bis 1 mM H₂O₂ für 30 min führte dabei zur immunzytochemisch vermehrten γ H2AX-Expression (138). Im Kontext der hier vorliegenden Ergebnisse und im Vergleich zum derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand (vgl. Abschnitt 2.3) erscheint die Beobachtung einer verstärkten γ H2AX-Proteinexpression unter ROS-Einwirkung unerwartet. γ H2AX wird als zuverlässiger DSB-Marker angesehen und markiert defekte DNA, bevor es anschließend auch an der Rekrutierung von ATM zur Schadensstelle beteiligt ist. Eine verstärkte ATM-Aktivierung konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden – weder per Immunoblot- noch per ICC-Verfahren. Auch die nicht erhöhte Anzahl an MN pro Zelle in ROS-behandelten Zellen (s.u.) lässt nicht den Schluss auf ein vermehrtes Auftreten von DNA-Schädigungen, insbesondere DSB, unter oxidativem Stress zu. Warum es in diesem Zusammenhang dennoch zur verstärkten γ H2AX-Expression kommt, bleibt im Rahmen dieser Studie offen und könnte in Folgestudien z.B. durch ein alternatives Nachweisverfahren der γ H2AX-Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie in ECFC unter PE-Stressoren überprüft werden. Außerdem lässt sich auch in diesem Fall eine ECFC-spezifische Auswirkung auf die γ H2AX nicht ausschließen.

Einen Anhaltspunkt zum Vergleich könnte eine Untersuchung der Anzahl an γ H2AX- und pATM-Foci sowie der MN-Anzahl in PE-ECFC liefern, in welcher NP-ECFC als Kontrollgruppe dienen. Schröder-Heurich et al. konnten dabei in PE-ECFC eine erhöhte Anzahl an γ H2AX- und pATM-Foci sowie eine erhöhte MN-Anzahl pro Zelle nachweisen. In der Kontrollgruppe (NP-ECFC) ihrer Untersuchungen konnte unter H₂O₂-Behandlung eine erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle festgestellt werden, was als Übereinstimmung zu den hier vorliegenden Ergebnissen angesehen werden kann (149).

Einen möglichen Erklärungsansatz könnten die Untersuchungen von Hammond et al. liefern: Sie konnten zeigen, dass γ H2AX auch unabhängig von DSB durch Hypoxie aktiviert wird (150). Darauf aufbauende Versuche dieser Arbeitsgruppe erweitern dieses Wissen um die Erkenntnis, dass γ H2AX unter Hypoxie unabhängig von ATM aktiviert wird (136). Dies könnte erklären, warum auch in der vorliegenden Arbeit unter Hypoxie-Behandlung eine gesteigerte γ H2AX-Foci-Anzahl bei gleichzeitig fehlendem Nachweis einer gesteigerten ATM-Proteinexpression detektiert wurde. Für die von den Arbeitsgruppen um Bencokova und Hammond gewonnenen Erkenntnisse ist jedoch zu beachten, dass

methodische Unterschiede u.a. bezüglich der verwendeten Zelllinien, des genutzten Hypoxie-Inkubationssystems und der Dauer der Hypoxie-Inkubation bestehen (136, 150).

Gegensätzliche Resultate dokumentierten Guo et al. bei Versuchen mit humanen Fibroblasten, die im direkten Vergleich mit 250 μM H_2O_2 oder dem DSB-induzierenden Chemotherapeutikum Bleomycin behandelt wurden: Eine γH2AX -Proteinexpression im WB konnte nur nach Behandlung mit Bleomycin nachgewiesen werden. Die alleinige Behandlung mit H_2O_2 führte nicht zu einem γH2AX -Nachweis (141). Dies könnte darauf hinweisen, dass H_2O_2 in diesem Fall nicht den notwendigen Umfang an DNA-Schädigung hervorrief, der zur Aktivierung von H2AX notwendig ist. Dadurch wird die Frage aufgeworfen, ob alternative Aktivierungsmechanismen für H2AX auch einen Erklärungsansatz für die hier beobachteten Ergebnisse liefern könnten.

Neben ATM könnten auch die katalytische Untereinheit von DNA-PK und ATR die Phosphorylierung von H2AX in Folge von DNA-Schäden vornehmen (151, 152). Während ATM vorwiegend die DDR in Reaktion auf DSB koordiniert, wird für die ATR-Kinase angenommen, dass sie eine zentrale Rolle bei der Detektion von DNA-Einzelstrangbrüchen sowie einzelsträngiger DNA einnimmt (76, 151). Auch H_2O_2 und Hypoxie haben das Potenzial, DNA-Einzelstrangbrüche einzuleiten (63, 151). Wenn es in den hier durchgeführten Versuchen unter H_2O_2 und Hypoxie überwiegend zu SSB gekommen ist, wäre eine H2AX-Aktivierung durch ATR anzunehmen und könnte die hier ausgebliebene Aktivierung von ATM erklären. Aufschluss darüber könnte die nähere Untersuchung des ATR-Signalwegs in ECFC nach Behandlung mit H_2O_2 oder Hypoxie liefern. Die Bestimmung der Proteinexpressionslevel von ATR und seiner nachgeschalteten Kinasen (z.B. CHK1) könnte nähere Hinweise darauf liefern, ob unter PE-Stressoren die Aktivierung des ATR-Signalwegs in ECFC ggf. eine dem ATM-Signalweg übergeordnete Rolle spielen könnte.

Zur vermehrten Detektion von γH2AX -Foci unter H_2O_2 und Hypoxie könnte es auch aufgrund der fehlenden Unzweideutigkeit von γH2AX als DSB-Marker gekommen sein. Obwohl DSB zur Formierung von γH2AX -Foci führen, muss dies nicht zwingend bedeuten, dass alle γH2AX -Detektionen gleichzeitig auch einen DSB darstellen (153-155). Da in der vorliegenden Arbeit die immunzytochemische Färbung für γH2AX (S139) bereits gleichzeitig auch um pATM (S1981) als weiteren DNA-Schadensmarker ergänzt wurde, könnte die erhöhte Anzahl an γH2AX -Foci und gleichzeitig erniedrigte Anzahl an pATM-Foci darauf hindeuten, dass es hier unter Behandlung von ECFC mit H_2O_2 oder Hypoxie nicht zu DSB gekommen ist. Für durch radioaktive Strahlung induzierte DNA-Schäden gilt die immunzytochemische Co-Färbung von γH2AX , pATM und 53BP1 als Möglichkeit zur Erhöhung der Genauigkeit einer ICC-basierten Detektion von DSB (156). Zukünftige Studien mit ECFC können darauf zurückgreifen und zusätzlich 53BP1 als einen der ATM-Kinase nachgeschalteten DNA-Schadensmarker nutzen und eine Co-Färbung dieser beiden Marker vornehmen. Somit könnte es möglich sein, zu überprüfen, ob in ECFC nach Behandlung mit H_2O_2 und Hypoxie DSB vorliegen und diese zu einer verstärkten γH2AX -Expression geführt haben. Zusätzlich könnte auch die Anwendung des Comet-Assays als alternative Nachweismethode von DNA-Strangbrüchen dabei helfen, DNA-Schäden noch zuverlässiger nachzuweisen (157).

6.1.4.2 Einfluss von Vitamin D

Die Behandlung mit VD allein zeigte hingegen keine eindeutige Tendenz zu erhöhten oder verminderten γ H2AX-Foci-Anzahlen in ECFC. Unter 0,1 nM VD-Behandlung war diese vermindert, unter 10 nM VD-Behandlung jedoch erhöht.

Andere Arbeitsgruppen konnten in diesem Zusammenhang ebenfalls Hinweise auf ein reduziertes Auftreten von γ H2AX-Foci unter VD-Behandlung finden. An unbehandelten lymphoblastoiden TK6-Zellen, humanen A549-Lungenadenokarzinom-Zellen und Lymphozyten wurde nach Behandlung mit 2 nM oder 10 nM VD durchflusszytometrisch ein Abfall der γ H2AX-Expression detektiert (145, 158). Auch im Tiermodell mit pulmonalen Hamsterzellen zeigte sich bei zunehmender VD-Dosis (10, 50, 100 nM) eine Verminderung der γ H2AX-Foci-positiven Zellen (159). Methodische Unterschiede u.a. bezüglich des untersuchten Zelltyps und der γ H2AX-Bestimmung (anwenderunabhängige Detektion mittels Durchflusszytometrie, Mengen-gruppierte Auszählung immunzytochemischer Foci) müssen beim Vergleich dabei jedoch berücksichtigt werden (145, 158, 159).

Für den Einfluss von VD auf γ H2AX unter Einwirkung von ROS in ECFC konnte die vorliegende Studie beobachten, dass eine VD-Behandlung mit der Abschwächung der unter H_2O_2 -Applikation beobachteten Effekte auf die γ H2AX-Foci-Anzahl in Zusammenhang gebracht werden konnte. Eine VD-Behandlung zeigte unter hypoxischen Bedingungen in ECFC jedoch keinen eindeutigen Effekt. Es wurde unter 0,1 nM VD eine Tendenz zur Verstärkung und unter 10 nM VD eine Tendenz zur Umkehr der unter Hypoxie beobachteten Veränderungen festgestellt.

Dies deutet zusammenfassend darauf hin, dass VD einen Einfluss auf die unter präeklampsichen Stressbedingungen in ECFC beobachteten Veränderungen der γ H2AX-Foci-Zahl pro Zelle besitzt. VD kann insbesondere in höheren Dosierungen von 10 nM VD mit einer Abschwächung der unter PE-Stressoren beobachteten Effekte in Verbindung gebracht werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung zu Halicka et al. und Ting et al., die jeweils nach Induktion von oxidativem Stress mit H_2O_2 eine VD-assoziierte Modifikation der H2AX-Aktivität hin zu niedrigeren γ H2AX-Expressionen nachweisen konnten (138, 145).

Vergleichbar dazu zeigen sich auch Erkenntnisse aus Studien, in welchen Zellen nicht Hypoxie oder H_2O_2 , sondern den bekanntermaßen zytotoxischen und somit ebenfalls potenziell intrazellulär oxidativ wirksamen Einflüssen von Zytostatika (Cyclophosphamid) oder ionisierender Strahlung ausgesetzt waren. VD-Applikationen von ≥ 10 nM konnten auch in diesen Experimenten mit einer Abmilderung des unter Cyclophosphamid bzw. ionisierender Strahlung registrierten Anstiegs der γ H2AX-Aktivierung in Zusammenhang gebracht werden. Unterschiede bzgl. der genotoxischen Potenz von Cyclophosphamid und ionisierender Strahlung im Vergleich zu Hypoxie und ROS müssen bei der Beurteilung dieser Ergebnisse jedoch berücksichtigt werden (159, 160).

Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass VD die γ H2AX-Foci-Anzahl unter PE-ähnlichen Stressbedingungen in ECFC modifizieren kann. VD scheint dabei bis zu einem gewissen, dosisabhängigen Grad den PE-Stressor-assoziierten Anstieg der γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle

abschwächen zu können und damit positiv-modulierende Eigenschaften auf die γ H2AX-Aktivität unter präeklampschen Stressbedingungen zu besitzen.

6.1.5 Mikronuklei

6.1.5.1 Einfluss präeklampscher Stressoren

Insgesamt konnte nach Behandlung von ECFC mit H_2O_2 bzw. Hypoxie tendenziell eine reduzierte Anzahl an MN pro Zelle festgestellt werden. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass es unter oxidativem Stress in ECFC, z.B. im Rahmen ausbleibender DNA-Schädigungen, nicht zu einer vermehrten MN-Formierung kam.

Im Gegensatz dazu fanden Studien an HUVEC heraus, dass bei diesen endothelialen Zellen durch mutmaßlich ROS-induzierende Einflüsse (Titandioxid-Nanopartikel, Silicium-Nanopartikel, Cisplatin) ein Anstieg der MN pro Zelle beobachtet werden konnte (161-163). Methodische Unterschiede bei der immunzytochemischen Anfärbung sowie Bestimmung der MN sind dabei jedoch neben zellspezifischen Unterschieden zu berücksichtigen.

6.1.5.2 Einfluss von Vitamin D

Für die alleinige Behandlung mit VD hingegen zeigte sich keine eindeutige Tendenz hin zu erhöhten oder verminderten MN-Anzahlen in ECFC. Eine VD-Behandlung von ECFC zeigte unter hypoxischen Bedingungen bei 0,1 nM VD eine Tendenz zur Verstärkung und unter 10 nM VD eine Tendenz zur Umkehr der unter Hypoxie beobachteten Veränderung der MN-Anzahl. Eine VD-Behandlung von ECFC konnte unter 100 μM H_2O_2 mit einer Tendenz zur Verstärkung und unter 25 μM H_2O_2 mit einer Tendenz zur Abschwächung der unter reiner H_2O_2 -Behandlung beobachteten Veränderung der MN-Anzahl in Verbindung gebracht werden. Dies deutet darauf hin, dass VD einen Einfluss auf die unter ROS beobachtete Veränderung der MN-Anzahl pro Zelle in ECFC besitzt. Dieser Einfluss könnte bezüglich der VD-Dosis und der ROS-Intensität von variablem Charakter sein.

Im Unterschied dazu konnte in Untersuchungen an Brustkrebszellen nach Induktion von intrazellulärem oxidativem Stress durch ionisierende Strahlung ein Anstieg der Anzahl an MN pro Zelle detektiert werden. Eine gleichzeitige Inkubation mit einem VD-Analogon hatte dabei keinen Einfluss auf die MN-Ausprägung (164). Große Abweichungen in der experimentellen Methodik lassen hierbei jedoch nur einen sehr oberflächlichen Vergleich zu.

Da die Formierung von MN im engen Zusammenspiel mit dem Zellzyklus stattfindet und VD diesen z.B. durch Induktion eines Zell-Zyklus-Arrests beeinflussen kann, ist ein Einfluss dieses Zusammenhangs auf die vorliegenden Ergebnisse nicht auszuschließen (68, 165, 166). In weiterführenden Untersuchungen könnte dieser Zusammenhang durch eine vergleichende Zell-Zyklus-Analyse der ECFC zum Zeitpunkt der VD-Behandlung einerseits und zum Zeitpunkt der H_2O_2 -/Hypoxie-Behandlung andererseits genauer analysiert werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass VD die Anzahl der MN unter präeklaptischen Stressbedingungen in ECFC modifizieren kann. VD scheint dabei – je nach Intensität des PE-Stressors und in Abhängigkeit von der jeweiligen VD-Dosis – bis zu einem gewissen Grad sowohl verstärkende als auch abschwächende Einflüsse auf die PE-Stressor-assoziierten Veränderung der MN-Anzahl pro Zelle in ECFC zu besitzen. Ein Einfluss von VD auf den Zellzyklus und die damit einhergehende mögliche Auswirkung auf die Formierung von MN in ECFC kann nicht ausgeschlossen werden und bedarf eingehenderer Untersuchungen.

6.1.6 Methodische Aspekte

6.1.6.1 Experimentelle und statistische Limitationen

Zu den Limitationen der hier präsentierten Ergebnisse zählt aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus u.a. die geringe Anzahl der Wiederholungen sowie aufgrund des hochspezifischen Probandinnenkollektivs der begrenzte Stichprobenumfang. Damit einher geht eine teilweise breite Streuung der Messergebnisse, die bei den WB- und ICC-basierten Versuchen besonders deutlich wurde und zu einer möglicherweise herabgesetzten Aussagekraft der Ergebnisse geführt haben könnte. Zudem wurden bereits initial geringe Proteinlevel bzw. Foci-Anzahlen durch Normalisierung auf die entsprechenden (Lösungsmittel)-Kontrollgruppen zusätzlich vermindert. Bei gleichzeitig hohen Schwankungen der Messparameter könnte dies ein Grund für die ausgebliebene Detektion veränderter Proteinexpressionen gewesen sein.

6.1.6.2 H₂O₂ und 1 % O₂ als präeklaptische Stressoren zur Simulation eines PE-ähnlichen Milieus

In dieser Studie wurde auf Grundlage des oben ausführlich beschriebenen derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstands davon ausgegangen, dass eine Behandlung von ECFC mit H₂O₂ und Hypoxie PE-ähnliche Stressbedingungen mit erhöhtem intrazellulären ROS und hypoxischem Stress simulieren können. Inwiefern dies jedoch auch auf die in dieser Studie verwendeten ECFC sowie die hier angewandten PE-ähnlichen-Stress-induzierenden Stressordosen zutrifft, bleibt vorerst noch ungeklärt.

Versuche von anderen Arbeitsgruppen, die endotheliale Zellen (HUVEC) ebenfalls Bedingungen mit erhöhtem oxidativem Stress (100 µM H₂O₂) aussetzten, konnten dabei eine gesteigerte Aktivierung von ATM, Akt und γH2AX nachweisen (139). Dies verdeutlicht die bisher nicht eindeutig geklärte sehr variable Reaktion von Endothelzellen auf ROS, die somit auch von der jeweiligen endothelialen Zellsubgruppe bzw. dem Differenzierungsgrad der Zellen abhängig sein könnte.

In Folgeversuchen könnte dies als Ansatz genommen werden, um z.B. mit dem auch in dieser Studie angewandten DCF-Fluoreszenz-basierten OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit zu untersuchen, ob und in welcher Höhe H₂O₂ und Hypoxie die oxidativen Stresslevel speziell in ECFC beeinflussen. Anschließend wäre dabei auch interessant zu beobachten, ob VD in einem solchen Ansatz einen Einfluss

auf die IOS-Level zeigt und wie dieser in Zusammenhang zu den hier vorliegenden Ergebnissen gebracht werden kann.

Unterschiede bezüglich zelltypspezifischer Unterschiede in der ROS-Ausbildung könnten sich bei ECFC als multipotente endotheliale Vorläuferzellen überwiegend durch ihre Besonderheit der bisher unvollständigen Ausdifferenzierung ergeben haben. Bei zukünftigen Versuchen könnte daher im Rahmen eines Etablierungsversuches zunächst geprüft werden, ob H_2O_2 und Hypoxie messbaren intrazellulären oxidativen Stress in ECFC hervorrufen und falls ja, welche Dosen dieser ROS-Induktoren dafür notwendig sind, ohne gleichzeitig eine zu stark zytotoxische Wirkung zu entfalten.

Zur Prüfung des Anstiegs der intrazellulären oxidativen Stresslevel könnten ROS z.B. auch mittels einer antioxidativ wirksamen Substanz inhibiert werden. N-Acetylcystein konnte in anderen endothelialen Zellen (HUVEC) dafür erfolgreich eingesetzt werden (139). In diesem Zusammenhang könnten in zukünftigen Studien zunächst DCF-Fluoreszenz-basiert die intrazellulären ROS-Basislevel in unbehandelten ECFC bestimmt und anschließend mit jenen von Hypoxie- oder H_2O_2 -behandelten ECFC verglichen werden. Die Gabe der antioxidativen Substanz N-Acetylcystein könnte anschließend mit einer VD-Applikation verglichen werden, um einen möglichen Einflussmechanismus von VD auf die ROS-Homöostase in ECFC näher zu beleuchten.

Neben der in dieser Arbeit angewandten DCF-Fluoreszenz-basierten ROS-Messung könnte für zukünftige Arbeiten auch alternative Assays zur Bestimmung der intrazellulären oxidativen Stresslevel eruiert werden. Die durchflusszytometrischen Detektion von fluoreszierendem DCF sowie der Cytochrome-C-Reduktions-Assay, der auf der Messung von freiwerdendem Superoxid-Anion basiert, stellen dabei etablierte und anwendungserprobte Alternativen dar (134, 135, 145).

Die exakte Simulation präeklampsischer, plazentarer Bedingungen ist *in vitro* auch bezüglich der Behandlung mit 1 % O_2 bestimmten technischen Limitierungen unterworfen. Aufgrund ethischer Implikationen ist die Sauerstoffmessung in der Plazenta nur indirekt umsetzbar. Der Nachweis einer intraplazentaren Hypoxie bei PE bzw. präzise Aussagen zu den genauen Sauerstoffkonzentrationen *in vivo* sind daher nicht eindeutig möglich (167). Außerdem wird angenommen, dass es bei PE vielmehr zu einem intermittierenden Wechsel zwischen plazentaren Zuständen mit Hypoxie und Reoxygenierung kommt, was eine noch stärkere Erhöhung des plazentaren oxidativen Stresses hervorrufen könnte (168). Die hier angewandte chronische Hypoxie-Behandlung von ECFC konnte also die bei PE vorherrschenden Bedingungen nicht exakt nachstellen und war von Studienbeginn an als Simulation geplant. Das Ziel einer Simulation scheint unter Berücksichtigung der aktuell verfügbaren technischen Möglichkeiten und des limitierten Wissens über die plazentaren Bedingungen bei PE *in vivo* dennoch erreicht worden zu sein.

In zukünftigen Versuchen könnte mit technisch fortgeschrittenen Inkubationssystemen die Möglichkeiten zur Anwendung von im Zeitverlauf undulierenden Sauerstoffkonzentrationen während der Inkubation geprüft werden. ECFC, die unter vorher festgelegten wechselnden Intervallen von plazentarer Hypoxie und Normoxie inkubiert werden, könnten eine noch genauere Simulation der *in vivo*-Zustände bei PE erlauben. Ein Vergleich des Einflusses der Häufigkeit, Dauer und Intensität

hypoxischer Zustände auf ECFC wäre damit möglich. In Korrelation zu diesen Parametern ließen sich Unterschiede der ausgeprägten intrazellulären oxidativen Stresslevel oder weiterer Messgrößen (z.B. DDR-Proteinexpressionslevel) noch genauer evaluieren, womit das Verständnis über die pathophysiologischen Zustände der Plazenta bei PE weiter ausgebaut werden könnte.

6.1.6.3 Immunzytochemische Foci-Detektion

In dieser Arbeit wurden die ECFC direkt nach Ende der Einwirkung von H_2O_2 oder Hypoxie fixiert. Bezüglich der Foci-Ausprägung von DDR-Proteinen liegen Beobachtungen vor, dass es im Zeitverlauf zu einer dynamischen Veränderung der Foci-Anzahl nach Applikation genotoxischer Substanzen kommen kann (160). Eine solche Untersuchung der Foci-Entstehung im zeitlichen Verlauf könnte auch in ECFC interessante Erkenntnisse liefern und ausschließen, dass es u.U. erst zu einer verspäteten – und daher in dieser Arbeit nicht detektierten – Foci-Formation unter den verwendeten oxidativen Stressoren kommt. Des Weiteren könnte in weiterführenden Projekten die Validität der Foci-Detektion durch die Anwendung einer vom Untersuchenden unabhängigen Methode erhöht werden. Laserscan- oder Durchflusszytometrie-basierte Verfahren sowie die automatisierte Foci-Quantifizierung mittels Bild-Analyse-Software könnten dabei dazu beitragen, den subjektive Einfluss des menschlichen Auges auf die Foci-Erkennung auszuschließen (137, 145, 158).

6.1.7 Konklusion zu Teilprojekt 1

Im Teilprojekt 1 dieser Arbeit konnten zusammenfassend Hinweise darauf gefunden werden, dass die Applikation von H_2O_2 oder Hypoxie die Proteinexpression von Akt, ATM, pCHK2 und H2AX in ECFC tendenziell beeinflussen kann. Eine eindeutig verstärkte, signifikante Aktivierung von Akt, ATM und pCHK2 unter H_2O_2 oder Hypoxie konnte dabei in ECFC jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit dem nicht detektierten vermehrten Auftreten von MN unter Anwendung dieser Stressoren, was auf das Ausbleiben markanter DNA-Schäden hinweist. Der beobachtete Anstieg von γ H2AX-Foci in ECFC nach Behandlung mit H_2O_2 oder Hypoxie steht der Mehrheit dieser Beobachtungen entgegen, konnte jedoch im gleichen Zelltyp unter sehr ähnlichen experimentellen Bedingungen in einer anderen Studie ebenfalls nachgewiesen werden (149).

Das vermehrte Auftreten von γ H2AX-Foci wurde zudem u.a. auch in seneszierenden Zellen beobachtet und gilt als Zeichen für irreparable, anhaltende DNA-Schädigungen, die zur Einleitung zellulärer Seneszenz führen könnten (83, 169-171). Auch in Endothelzellen wird γ H2AX im Zusammenhang mit der Vermittlung zellulärer Seneszenzmechanismen gesehen und kann in Kombination mit anderen Seneszenz-Markern zum Nachweis von Zellseneszenz eingesetzt werden (172, 173). Seneszenz bezeichnet den Zustand des irreversiblen Zell-Zyklus-Arrests und damit den endgültigen Proliferationsstopp von Zellen z.B. in Folge nicht-reparierter DNA-Schäden und oxidativen Stresses (174). Der in Verbindung mit Seneszenz beobachtete Zell-Zyklus-Arrest könnte einen Hinweis darauf liefern, warum unter Behandlung mit H_2O_2 und Hypoxie nur für γ H2AX erhöhte Proteinexpressionslevel festgestellt werden konnten, jedoch nicht für ATM, pCHK2 und Akt: Nach

DNA-Schädigung durch H_2O_2 oder Hypoxie und initialer DNA-Schadensdetektion durch MRN und $\gamma H2AX$ könnte die ATM-basierte DDR durch Einleitung eines Zell-Zyklus-Arrests abgebrochen worden sein. Nachgeschaltete DDR-Signalverstärker wie MDC1 und 53BP1 würden nicht aktiviert und die positive Feedbackmechanismen zur Verstärkung der ATM-Aktivität würden nicht ausgelöst werden (70). In Folge dessen wäre auch kein verstärkter Nachweis der Proteinexpression von ATM oder seiner nachgeschalteten Kinasen CHK2 und Akt zu erwarten.

Im pathophysiologischen Erklärungsmodell der PE wird ebenfalls die vorzeitige, übermäßige plazentare Seneszenz als möglicher Einflussfaktor diskutiert (175). Aufgrund des unvollständigen Umbaus der Spiralarterien könnte es durch Induktion plazentarer Hypoxie und eines Zustands erhöhten oxidativen Stresses (vgl. Abschnitt 2.1.4) zu stressinduzierter frühzeitiger Seneszenz (*stress-induced premature senescence* (SIPS)) kommen (176). SIPS könnte demnach als weiterer möglicher vermittelnder Mechanismus zwischen Phase 1 (mangelhafte Plazentation) und Phase 2 (PE als klinische Multisystemerkrankung) der pathophysiologischen Entstehung der PE identifiziert worden sein, den es in Zukunft näher zu charakterisieren gilt (175, 176). Ansatzpunkt dafür könnte es sein, zu untersuchen, in welchem exakten Umfang H_2O_2 und Hypoxie in ECFC intrazellulären Stress hervorrufen (z.B. intrazelluläre ROS-Quantifizierung nach Behandlung mit H_2O_2 oder 1 % O_2) und wie es zur Einleitung bzw. Vermittlung von Seneszenzvorgängen u.a. via Zell-Zyklus-Arrest (z.B. Zellzyklusanalysen) oder der Aktivierung verschiedener anderer Signalwege der DDR (z.B. ATR- / DNA-PK-gesteuerte DDR) kommen könnte.

Für VD konnte gezeigt werden, dass es die Expression von Akt, ATM, CHK2, $\gamma H2AX$ und MN unter H_2O_2 - oder Hypoxie-Applikation beeinflusst. Dabei wurde für VD überwiegend eine abschwächende Modulation der unter H_2O_2 und Hypoxie beobachteten Veränderung der DDR-Proteinlevel in ECFC beobachtet. Die von VD ausgeübten Einflüsse scheinen dabei teilweise einer von der PE-Stressor-Intensität und VD-Dosis abhängigen Variabilität zu unterliegen.

In der Zusammenschau dieser Erkenntnisse kann vermutet werden, dass VD in ECFC einen stabilisierend-ausgleichenden Einfluss auf die Proteinlevel der DDR im Milieu präeklampsischen Stresses besitzt. Dieser wurde hier insbesondere für die $\gamma H2AX$ -Aktivitätslevel beobachtet. Speziell in der Dosierung von 10 nM konnte VD mit einer Abschwächung des unter H_2O_2 - und Hypoxie-Behandlung beobachteten Anstiegs der $\gamma H2AX$ -Proteinexpression – einem möglichen Hinweis auf zelluläre Seneszenz – in Verbindung gebracht werden. Diese Beobachtung geht mit Untersuchungen einher, die VD im engen Zusammenhang mit der Verzögerung zellulärer Seneszenzvorgänge sehen und einen VD-Mangel mit beschleunigten Alterungsprozessen assoziieren (177-180). Somit kann vermutet werden, dass sich VD auch in Hinblick auf vorzeitige plazentare Seneszenzvorgänge bei PE verlangsamernd auswirken könnte und somit protektiv-präventive Eigenschaften besitzen könnte. Dies könnte als Ansatzpunkt für zukünftige Studien verwendet werden, um die hier festgestellten prohomöostatischen Effekte von VD auf Akt, ATM, CHK2 und $\gamma H2AX$ unter präeklampsischen Bedingungen näher zu charakterisieren. Dabei könnte insbesondere das VD-Klotho-Nrf2-

Signalnetzwerk wichtige weiterführende Anknüpfungspunkte liefern, da es an der Regulation von Alterungsprozessen aufgrund oxidativen Stresses involviert zu sein scheint (180).

6.2 Teilprojekt 2: Einfluss der ATM-Inhibition auf den Zell-Index und den intrazellulären oxidativen Stresslevel in ECFC gesunder Schwangerer und Schwangerer mit Präeklampsie

Insgesamt konnte in Teilprojekt 2 festgestellt werden, dass eine ATM-Inhibition die Ausbildung von ROS und den CI in ECFC beeinflusst. In Verbindung mit ATMi konnte im Allgemeinen ein Anstieg der intrazellulären ROS-Level und ein Abfall des CI beobachtet werden. PE-ECFC waren dabei weniger stark vom ATMi-assoziierten intrazellulären ROS-Anstieg betroffen als NP-ECFC, zeigten jedoch im Vergleich zu NP-ECFC einen stärkeren ATMi-assoziierten Abfall des CI.

6.2.1 Einfluss der ATM-Inhibition auf den Zellindex

6.2.1.1 Einfluss von ATMi und des PE-Status

Zusammenfassend konnte unter ATM-Inhibition eine Abnahme der CI-Werte bei PE- und NP-ECFC detektiert werden. Von dieser Reduktion der CI-Werte unter ATMi waren PE-ECFC stärker betroffen als NP-ECFC. Die stärkere Reduktion der CI-Werte unter ATMi in PE-ECFC könnte auf eine intensivere Wirkung von ATMi unter präeklampsischen Bedingungen oder auf eine erhöhte Vulnerabilität von PE-ECFC für eine ATM-Inhibition hinweisen. Der PE-Status von ECFC konnte mit erhöhten CI-Werten in Zusammenhang gebracht werden. Eine ATMi-Behandlung schwächte diesen PE-Status-assoziierten CI-Anstieg ab. Der PE-Status scheint also im Vergleich zu ECFC aus gesunden Schwangeren mit einem erhöhten CI einherzugehen.

Die Zellproliferation ist einer von mehreren Faktoren, der die elektrische Impedanz und den daraus abgeleitete CI beeinflussen kann (129). In vorherigen Studien konnten für PE-ECFC verminderte Proliferationseigenschaften im Vergleich zu NP-ECFC beobachtet werden. Im Unterschied zur vorliegenden Studie wurde die Proliferationskapazität dabei jedoch durch Ermittlung der Verdopplungszeit der Zellpopulation berechnet (55). Da diese Methode auf einer exakten Auszählung der Zellzahl beruht, ist sie im Gegensatz zur Impedanzmessung weniger durch eine mögliche Variabilität durch z.B. die zelluläre Morphologie, Motilität oder Adhärenz beeinflusst (55, 129). Für PE-ECFC sind ebendiese Veränderungen der Zellmorphologie im Vergleich zu NP-ECFC nachgewiesen worden. PE-ECFC besitzen größere Zell-Durchmesser und -Flächenmaße sowie eine verminderte Zellmotilität- und -fortbewegungsgeschwindigkeit (149). Diese könnten auch im Zusammenhang zu den für PE-ECFC bekannten funktionalen Einschränkungen (verminderte Proliferations-, Angiogenese- und Migrationsfähigkeit) stehen (55). PE-ECFC zeigen also sowohl Charakteristika funktionaler Einschränkungen als auch morphologischer Aberration, die in einem

Zusammenhang zu stehen scheinen. Die hier festgestellte Erhöhung der CI-Werte kann als Ausdruck dieser spezifischen morpho-funktionalen Veränderung von PE-ECFC im Vergleich zu gesunden ECFC angesehen werden.

Für die *in vitro* als Modell zur Erforschung grundlegender funktionaler Eigenschaften von Endothelzellen auch häufig eingesetzten HUVEC konnte nach Hemmung von Sirtuin-1 (Sirt1) – einem Schlüsselenzym bei der zellulären Regulation von Apoptose- und Seneszenzprozessen – erhöhte Seneszenz-Biomarker (*senescence-associated β -galactosidase* [SA- β -gal]) sowie seneszenztypische Veränderungen der Zellmorphologie (vergrößerte und abgeflachte Zellen) als Zeichen vorzeitiger Seneszenz festgestellt werden (181). Zhan et al. konnten in diesem Zusammenhang unter ATMi-Behandlung eine Abmilderung des H₂O₂-assoziierten Anstiegs des SA- β -gal-Gehalts in HUVEC nachweisen (139). DNA-Schäden und oxidativer Stress werden auch in Endothelzellen als Auslöser von SIPS angesehen (172, 182, 183).

Die Erhöhung der CI-Werte in PE-ECFC wird durch ATM-Inhibition vermindert, was darauf hindeuten könnte, dass ATMi der PE-Status-assoziierten Erhöhung des CI entgegenwirkt und den PE-assoziierten Anstieg des CI im Vergleich zur NP-Population tendenziell nivelliert. In Anlehnung an die oben beschriebenen Beobachtungen der vorliegenden Arbeit und die in anderen Studien gewonnen Erkenntnisse könnte für ATMi somit ein protektiver Effekt vor mit Seneszenz in Verbindung stehenden Einflüssen und Auswirkungen in PE-ECFC vermutet werden. Um dies zu überprüfen, könnten PE-ECFC auf weitere seneszenztypische Charakteristika überprüft werden und der Einfluss von ATMi auf diese Charakteristika im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen ermittelt werden. Dafür könnte u.a. eine Bestimmung der Seneszenz-Biomarker SA- β -gal oder CDK-Inhibitor 2A (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A* [CDKN2A]) sowie das Vorliegen eines Zellzyklusarrests durch Zellzyklusanalysen angewendet werden (172, 182, 183).

ECFC sind ein Subtyp von EPC (47). In EPC von präeklampsischen Schwangeren konnte eine erhöhte SA- β -gal-Aktivität bereits nachgewiesen werden. Eine Untersuchung des Einflusses von ATMi erfolgte dabei jedoch nicht (184, 185). Eine Übertragung und Anwendung der SA- β -gal-Bestimmung auf ECFC in zukünftigen Versuchen erscheint auf dieser Grundlage jedoch vielversprechend.

6.2.1.2 Einfluss der Zeit

Mit zunehmender Zeit konnten steigende CI-Werte festgestellt werden, sodass signifikante Unterschiede zwischen frühen und späten Messzeitpunkten nachgewiesen werden konnten. Dies deutet auf die erwartungsgemäße kontinuierliche Zunahme des CI in allen Behandlungsgruppen im Zeitverlauf des Versuches aufgrund voranschreitender Zellproliferation hin. Abfallende CI-Werte hätten z.B. in Folge von Apoptoseprozessen Hinweise auf u.U. inadäquate Zellkultivierungsbedingungen oder unausgewogene Dosierung von Behandlungsreagenzien sein können.

In dieser Arbeit wurden bei PE-ECFC mit zunehmendem Zeitverlauf tendenziell höhere CI-Werte detektiert als bei NP-ECFC. Diese Beobachtung erscheint vor dem Hintergrund der für PE-ECFC vorbeschriebenen eingeschränkten funktionalen und proliferativen Zelleigenschaften (vgl. Abschnitt

2.2 und 6.2.1.1) zunächst überraschend. Sie ist im Zusammenhang mit dem eventuell verstärkten Auftreten von SIPS in PE-ECFC und unter Berücksichtigung damit potenziell einhergehender seneszenztypischer zellmorphologischer Veränderungen jedoch nachvollziehbar (vgl. Abschnitt 6.2.1.1). Damit könnte sie als Hinweis darauf angesehen werden, dass die SIPS-assoziierten Veränderungen in PE-ECFC im Zeitverlauf kontinuierlich immer stärker zunehmen. Dies geht einher mit der Beobachtung ansteigender intrazellulärer oxidativer Stresslevel im Zeitverlauf, die in PE-ECFC ebenso stärker ausfallen und im Zusammenhang mit Seneszenzprozessen stehen könnten (vgl. Abschnitt 6.2.2).

In diesem Zusammenhang muss auch die methodische Limitation bzgl. der im Zeitverlauf ebenso weiterhin stattfindenden Veränderung der Zellzahl-, -proliferation, -morphologie und -motilität berücksichtigt werden, die ihrerseits auch zu einer Zunahme der elektrischen Impedanz und damit des CI führen können (129). Daher kann der in dieser Arbeit gemessene CI-Anstieg im Zeitverlauf ursächlich nicht allein auf eine zeitliche Komponente zurückgeführt werden, sondern könnte gleichzeitig auch durch andere zelluläre Anpassungsvorgänge, die Impedanzveränderungen bedingen können, zusätzlich beeinflusst worden sein.

Andererseits ermöglicht diese Echtzeitmessung jedoch eine möglichst realistische Analyse der zellulären Prozesse, die den dynamisch-kontinuierlichen Veränderungen *in vivo* sehr ähnlich ist. Denn auch *in vivo* verlaufen die komplexen Veränderungen des CI unter Einfluss exogener Faktoren weiter. Eine dynamische Messung dieser Veränderungen im Zeitverlauf erscheint daher als sehr zielführend, um die *in vivo* stattfindenden zellulären Anpassungsvorgänge besser verstehen zu lernen.

6.2.2 Einfluss der ATM-Inhibition auf den intrazellulären Stresslevel

6.2.2.1 Einfluss von ATMi und des PE-Status

In PE-ECFC konnten allgemein höhere IOS-Basis-Level als in der gesunden Kontrollpopulation detektiert werden. Eine ATMi-Behandlung stand in NP- und PE-ECFC mit erhöhten IOS-Leveln in Verbindung. Diese Erhöhung der IOS-Level unter ATMi fiel in PE-ECFC schwächer aus als in NP-ECFC. Der Anstieg der IOS-Level unter ATMi könnte auf eine intrazelluläre Akkumulation von ROS in ATM-inhibierten PE-ECFC und NP-ECFC hindeuten.

Dass der Anstieg der IOS-Level unter ATMi in PE-ECFC schwächer als in NP-ECFC ausfällt, könnte z.B. auf eine geringere ATMi-Wirkung unter präeklaptischen Bedingungen oder eine erhöhte Resistenz von PE-ECFC gegenüber ATMi hinweisen. Zudem wurden für unbehandelte PE-ECFC im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bereits erhöhte IOS-Basislevel gemessen, sodass ein weiterer IOS-Level-Anstieg unter ATMi maskiert worden sein könnte.

Es ist außerdem bekannt, dass PE-ECFC Merkmale eingeschränkter endothelialer Funktionalität im Sinne einer PE-bedingten Vorschädigung vorweisen (55). Außerdem zeigen PE-ECFC erhöhte ATM-mRNA-Expressionen, basal erhöhte ATM-Proteinlevel, eine gesteigerte γ H2AX- und pATM-Proteinexpression sowie ein gehäuftes Auftreten von MN im Vergleich zu NP-ECFC (149). Dies weist

auf vermehrt genotoxische Prozesse in PE-ECFC hin. In diesem Zusammenhang lässt sich vermuten, dass es in Folge dieser zellulären Vorschädigung adaptiv bereits zu einer verstärkten ATM-Grundaussprägung in PE-ECFC kommt, die eine ATM-Inhibition teilweise kompensieren könnte.

Untersuchungen an ECFC konnten außerdem zeigen, dass die γ H2AX-Foci-Anzahl unter oxidativem Stress in PE-ECFC weniger stark anstieg als in NP-ECFC. Dies wird als Hinweis darauf angesehen, dass in PE-ECFC eine bereits basal erhöhte DDR-Protein-Aktivität vorliegt (149). Eine mögliche Ursache dieser festgestellten Hinweise auf vermehrte DNA-Schäden und basale DDR-Proteinaktivität in PE-ECFC könnten die in der hier vorliegenden Studie festgestellten intrazellulär erhöhten oxidativen Stresslevel sein.

Zukünftige Studien könnten durch eine Messung der basalen ATM-Aktivität und der Expression relevanter Proteine der ATM-gesteuerten DDR im direkten Vergleich von PE- und NP-ECFC weitere Erkenntnisse dazu liefern. Eine Differenzierung im experimentellen Aufbau durch z.B. mit oxidativen Stressoren behandelten Versuchsgruppen könnte den Erkenntniszuwachs dabei weiter erhöhen. Darüber hinaus könnte in diesem Zusammenhang auch geprüft werden, wie sich die intrazellulären ROS-Level nach Applikation eines ROS-Induktors in PE- und NP-ECFC verändern und ob sich PE-ECFC auch unter diesen erhöhten oxidativen Stressbedingungen weiterhin weniger vulnerabel für eine ATM-Inhibition unter ROS zeigen. In der vorliegenden Studie konnten Nachweisverfahren für ATM und ATM-assoziierte Proteine mittels Immunoblot- und Immunzytochemie-Assay (vgl. Abschnitte 4.10 und 4.11) bereits für NP-ECFC etabliert und angewendet werden. Diese Verfahren ließen sich auch mit PE-ECFC durchführen. Die in dieser Studie angewendete Methode zur Bestimmung der intrazellulären ROS-Level ließe sich in Anlehnung an die hier durchgeführten Immunoblot- und Immunzytochemie-Versuche auch um eine Vorbehandlung der ECFC mit z.B. H_2O_2 oder Hypoxie erweitern.

Ein Hinweis auf erhöhten intrazellulären oxidativen Stress und damit auch potenziell erhöhte ATM-Aktivitätslevel konnte auch im Rahmen dieser Arbeit gefunden werden. Der PE-Status von ECFC konnte mit erhöhten IOS-Levels in Zusammenhang gebracht werden. Unter ATMi-Behandlung konnte eine Abschwächung dieser PE-Status-assoziierte Erhöhung der IOS-Level beobachtet werden. Der PE-Status schien also insbesondere in der langfristigen Beobachtung mit höheren IOS-Levels assoziiert zu sein. Die präeklampsische Vorprägung von ECFC und die damit einhergehenden Merkmale zellulärer Vorschädigungen könnten dafür eine mögliche Ursache sein. Wie oben bereits ausführlich beschrieben, steht sie im Zusammenhang mit Funktionseinschränkungen, morphologischen Aberrationen sowie einer gesteigerten basalen γ H2AX- und pATM-Proteinexpression als Hinweisen auf vermehrte DNA-Schädigungen (55, 149).

ATMi scheint diese PE-Status assoziierte Erhöhung der IOS-Level abzumildern, was darauf hindeutet, dass eine ATMi-Behandlung der PE-Status-assoziierten Zunahme der intrazellulären ROS-Akkumulation entgegenwirken könnte. Für ATMi könnten somit protektiv-antioxidative bzw. ROS-reduzierende Effekte in PE-ECFC vermutet werden. Dass Untersuchungen an anderen Zelltypen andere Schlussfolgerungen nahelegen, verdeutlicht die anhaltend intensive Forschung zur Wirkweise und zum differenzierten Anwendungsspektrum von ATM-Inhibitoren (78, 80, 186-188).

Die hier beobachteten potenziell protektiv-antioxidativen Effekte von ATMi in PE-ECFC gehen einher mit den Ergebnissen vergleichender Analysen der γ H2AX-Foci-Anzahl in PE-ECFC und NP-ECFC. Unter Gabe eines ATM-Inhibitors konnte dabei die Aufhebung des PE-Status-assoziierten γ H2AX-Foci-Anstiegs in PE-ECFC und eine Normalisierung der γ H2AX-Foci-Anzahl auf ein mit NP-ECFC vergleichbares Niveau beobachtet werden (149). Die Aktivierung von γ H2AX kann allgemein als Indikator für oxidativ verursachte DNA-Schäden angesehen werden (84, 85).

Es kann daher vermutet werden, dass PE-ECFC einem genotoxischen Basismilieu mit erhöhtem intrazellulärem oxidativem Stress unterliegen, welches zu einer zielgerichteten reaktiven γ H2AX-ATM-Aktivierung in Folge möglicherweise vermehrter oxidativer DNA-Schäden führt. Bleibt die DNA-Schadensreparatur erfolglos oder kommt es zur Häufung genetischer Läsionen, ist die genomische Integrität der Zelle gefährdet und kann zur Induktion von Apoptose- und Seneszenzprozessen führen (189). Es ist bekannt, dass ROS in Endothelzellen unter Beteiligung von ATM- und Akt- gesteuerten Signalkaskaden zelluläre Seneszenzprozesse auslösen kann (139). ATMi könnte in diesem Zusammenhang auch in PE-ECFC eine entscheidende, potenziell protektive Vermittlerfunktion einnehmen, da eine ATM-Inhibition in PE-ECFC sowohl die Hinweise auf DNA-Schäden (γ H2AX-Foci) als auch den möglicherweise SIPS-bedingten Anstieg der intrazellulären ROS-Pegel abmildern konnte.

6.2.2.2 Einfluss der Zeit

Mit zunehmender Zeit wurden in ECFC erhöhte IOS-Level detektiert und es konnten signifikante Unterschiede zwischen frühen und späten Messzeitpunkten nachgewiesen werden. Ein Anstieg der IOS-Level im Zeitverlauf war im Rahmen des technischen Versuchsaufbaus u.a. aufgrund der zunehmenden Akkumulation von zellulären Stoffwechselendprodukten, dem voranschreitenden Verbrauch von Nährstoffen des Mediums sowie den inkonstanten Inkubationsbedingungen durch die regelmäßigen Messungen im Fluoreszenzlesegerät außerhalb des Inkubationsschranks zu einem gewissen Grad erwartbar. Technische Einflüsse dieser Art betrafen alle Behandlungsgruppen gleichermaßen, da die Anzucht und Versuchsdurchführung in einer gemeinsamen 96-Well-Platte erfolgten. Von externen Störfaktoren waren daher alle Behandlungsgruppen gleichermaßen betroffen, was Vergleiche zwischen den IOS-Levels der verschiedenen Behandlungsgruppen auch über den Zeitverlauf weiterhin ermöglicht.

Die zunehmenden IOS-Level über den Zeitverlauf könnten zusätzlich auch als ein Hinweis darauf angesehen werden, dass die intrazellulären ROS-Level sowohl in der gesunden als auch in der präeklaptischen Versuchsgruppe über den Zeitverlauf hinweg anstiegen und zu späteren Zeitpunkten signifikant höhere intrazelluläre ROS-Level als zu früheren Zeitpunkten vorherrschten. Diese Beobachtung legt ein Voranschreiten der prooxidativen, intrazellulären Prozesse im Zeitverlauf nahe. Das PE-ECFC im gesamten Zeitverlauf stets höhere IOS-Level als NP-ECFC aufweisen, verdeutlicht zusätzlich, dass sie z.B. aufgrund zeitlich voranschreitender Seneszenzprozesse stärker von diesen ROS-akkumulierenden Veränderungen betroffen sein könnten. Dies geht einher mit den oben beschriebenen

im Zeitverlauf zunehmenden CI-Werten, die in PE-ECFC mit zunehmender Zeit immer höher ausfielen als in NP-ECFC. Auch dies könnte als Hinweis darauf angesehen werden, dass die SIPS-assoziierten zellmorphologischen Veränderungen in PE-ECFC sowie die intrazelluläre ROS-Akkumulation im Zeitverlauf immer stärker zunehmen.

Für die Messung der IOS-Level muss in diesem Zusammenhang ebenfalls die methodische Limitation bzgl. der zunehmenden Zellproliferation im Zeitverlauf berücksichtigt werden. Da die verwendeten Zellen im gesamten Zeitverlauf der RFU-Messung weiter Proliferations- und Wachstumsprozesse ausführen, sind die ermittelten IOS-Level potenziell stets davon beeinflusst, dass es mit zunehmender Zellzahl auch zu einer verstärkten Freisetzung von ROS kommen kann. Daher ist der im Zeitverlauf gemessene Anstieg der IOS-Level nicht allein durch eine zeitliche Komponente verursacht, sondern wird gleichzeitig auch durch die dynamische Veränderung der Zellpopulation bedingt.

Mit Assays, welche die intrazellulären ROS-Level nach Inhibition des Zellwachstums messen, könnte diese Limitation umgangen werden. Andererseits verfügen die Ergebnisse von Assays dieser Art jedoch über eine geringere Übertragbarkeit auf die Prozesse *in vivo*. Die hier angewandte dynamische Messung der IOS-Level erlaubt einen besseren Vergleich zu den realen Bedingungen *in vivo*, wo alle zellulären Prozesse auch weiter stattfinden.

6.2.3 Konklusion zu Teilprojekt 2

Im Teilprojekt 2 dieser Studie konnte gezeigt werden, dass PE-ECFC intrazellulär erhöhte ROS-Level aufweisen, was auf erhöhten intrazellulären oxidativen Stress deutet. ATM-Inhibition konnte diesen PE-Status-assoziierten ROS-Anstieg abschwächen. Schröder-Heurich et al. konnten zeigen, dass in PE-ECFC eine bereits basal erhöhte DDR-Protein-Aktivität vorliegt, die durch ATM-Inhibition abgeschwächt werden konnte (149). Eine mögliche Ursache dieser erhöhten DDR-Proteinaktivität in PE-ECFC könnte das vermehrte Vorliegen von DNA-Schäden sein, die z.B. wiederum durch erhöhten oxidativen Stress entstanden sein könnten.

Erhöhte oxidative Stresslevel und DNA-Schäden sind bekannte mögliche Auslöser von SIPS, die sich phänotypisch allgemein durch eine morphologische Abflachung und Vergrößerung der betroffenen Zellen äußert (172, 182, 183). Solche seneszenztypische Charakteristika konnten auch in unbehandelten PE-ECFC nachgewiesen werden (149). Die in PE-ECFC beobachtete Vergrößerung von Zellfläche und -durchmesser würde in der Impedanz-basierten Bestimmung des CI zu dessen Erhöhung führen. Ebendies konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden. Daher kann vermutet werden, dass sich PE-ECFC in einem SIPS-ähnlichen Zustand befinden.

Auf Grundlage dieses Erklärungsansatzes konnte für eine ATM-Inhibition in PE-ECFC ein tendenziell protektiver Einfluss gegenüber seneszenzassoziierten zellulären Veränderungen festgestellt werden. Einerseits konnte unter ATMi eine Abschwächung des potenziell seneszenzauslösenden intrazellulären ROS-Level-Anstiegs in PE-ECFC beobachtet werden, andererseits zeigte sich unter ATMi eine Abmilderung des CI-Anstiegs, was als Hinweis für die Verringerung seneszenztypischer morphologischer Zellveränderungen angesehen werden kann. Es kann also vermutet werden, dass ATM

in PE-ECFC eine wichtige Rolle bei der Vermittlung seneszenzfördernder und prooxidativer Einflüsse einnimmt. Für ATMi hingegen können im Rahmen dieser Schlussfolgerungen potenziell antioxidative und seneszenzverlangsamende Eigenschaften in PE-ECFC angenommen werden, deren weitere Erforschung von sowohl großem klinischen als auch grundlagenwissenschaftlichem Interesse ist. Könnte der genaue Einfluss einer ATM-Inhibition auf die Pathophysiologie der PE und die einhergehende systemische endotheliale Dysfunktion näher aufgeklärt werden, würden sich daraus wertvolle Hinweise auf mögliche therapeutische oder präventive Behandlungsansätze gegen PE ergeben können.

Die in Teilprojekt 1 und 2 gewonnenen Erkenntnisse konnten Hinweise darauf liefern, dass VD und ATMi protektive, seneszenzverlangsamende Effekte auf ECFC im präeklampsischen Milieu ausüben könnten. Um diese näher zu charakterisieren und Auskunft über mögliche regulative Zusammenhänge zu gewinnen, werden jedoch weiterführende Versuche benötigt. Der Zusammenhang zwischen den beschriebenen Ergebnissen sowie deren mögliche Verortung im Kontext vorzeitiger plazentarer Seneszenz als ein bisher vergleichsweise nur rudimentär erforschten Vermittlungsweg der PE werden in Abb. 31 dargestellt.

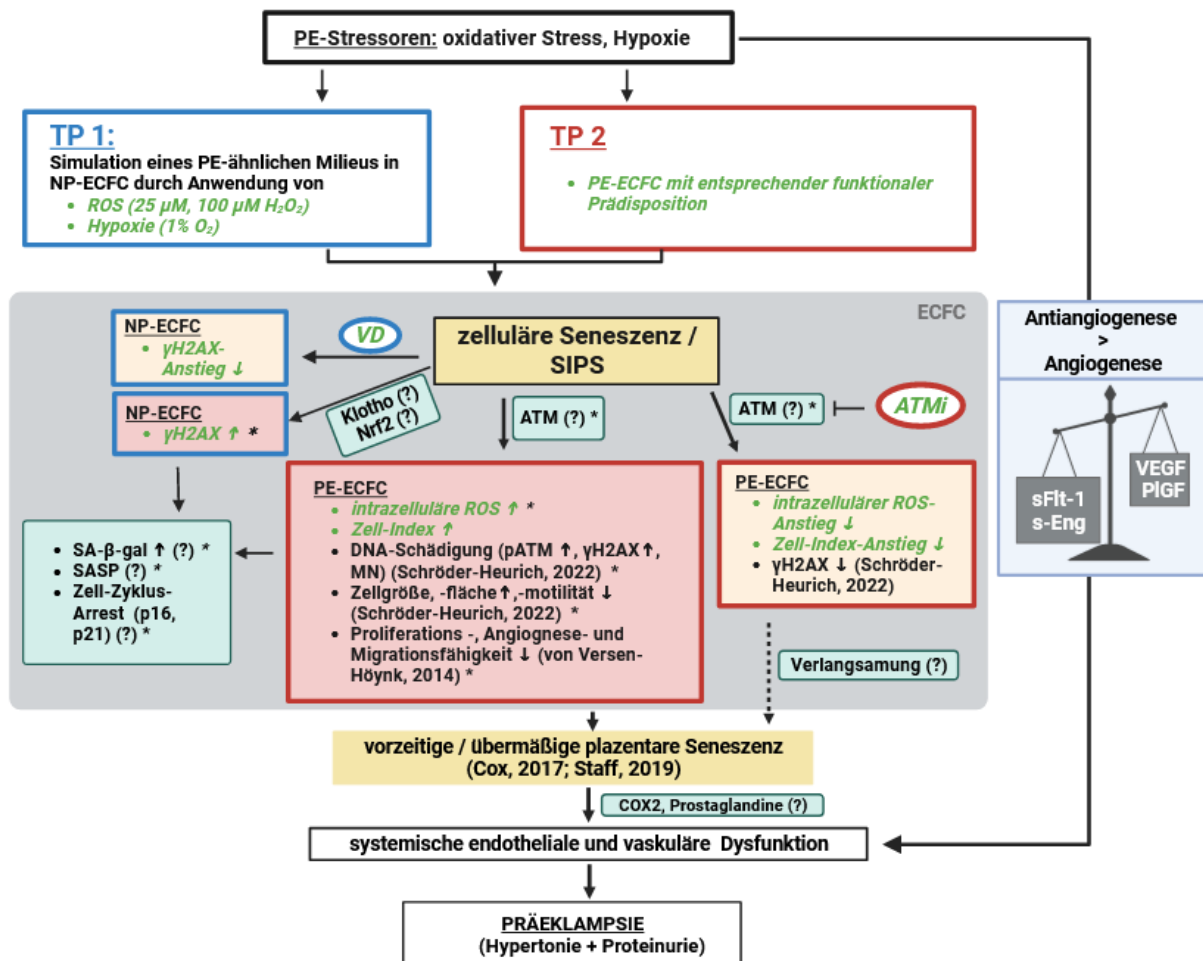


Abb. 31: Schematische Illustration zur möglichen Verortung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Kontext von Phase 2 des pathophysiologischen Erklärungsmodells der Präeklampsie (PE) mit Fokus auf plazentarer Seneszenz

Durch das Zusammenspiel verschiedener Einfluss- und Risikofaktoren (u.a. genetisch, immunologisch, umweltbedingt, maternal) kommt es bei der PE zum unvollständigen Umbau der Spiralarterien mit ausbleibender Dilatation (Phase 1: mangelhaften Plazentation) (nicht dargestellt, Details siehe (6, 10)). Es resultieren erhöhter oxidativer Stress und Hypoxie der Plazenta. Diese Stressoren stehen im Zentrum des multifaktoriellen pathophysiologischen Verständnisses der PE (roter Hintergrund: PE-typische zelluläre Veränderungen). Vermittelt über ein Ungleichgewicht zwischen antiangiogenen (sFlt-1, s-Eng) und proangiogenen (VEGF, PlGF) Faktoren zugunsten eines systemischen antiangiogenen Gesamtzustands leiten sie in Folge die maternale multisystemische Endothelfunktionsstörung als klinisches Erscheinungsbild der PE ein (6, 10). Ob an diesem Übergang in Phase 2 der PE weitere Mechanismen eine Rolle spielen könnten, ist Zustand intensiver Forschung. So gibt es Hinweise darauf, dass plazentarer oxidativer Stress und Hypoxie durch Induktion von stressinduzierter frühzeitiger Seneszenz (*stress-induced premature senescence* [SIPS], oranger Hintergrund) einen weiteren, bisher nicht vollständig untersuchten Vermittlungsweg der PE als mütterliche Multisystemerkrankung bedingen könnte (175, 176). Die Versuche der vorliegenden Arbeit (grün-kursive Schrift) konnten im Teilprojekt (TP) 1 (dunkelblaue Rahmung) für Vitamin D₃ (VD) und im TP 2 (dunkelrote Rahmung) für ATMi (Inhibitor von *ataxia telangiectasia mutated*) Hinweise auf möglicherweise abmildernde Effekte (aufgehellter oranger Hintergrund) bezüglich seneszenzbezogener zellulärer Veränderungen (*) in ECFC (grauer Hintergrund) mit PE-charakteristischen Veränderungen (unter Einwirkung PE-spezifischer Stressoren zur Simulation eines PE-ähnlichen Milieus (TP 1) oder PE-ECFC mit entsprechender funktionaler Prädisposition entstammend aus einer PE-Schwangeren (TP 2) nachweisen. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der genauen Charakterisierung und Vermittlung dieser Effekte sowie ihrer Regulation sind notwendig (grüne Boxen), um diesen Erklärungsansatz näher zu verstehen. grün-kursive Schrift: Behandlungen und Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit. * = Hinweis auf zelluläre Seneszenz. SA-β-gal (*senescence-associated β-galactosidase*); SASP (*senescence-associated secretory phenotype*); ROS (reaktive oxidative Sauerstoffspezies); NP-ECFC (*endothelial colony-forming cells* von gesunden Schwangeren); PE-ECFC (*endothelial colony-forming cells* von Schwangeren mit Präeklampsie); COX2 (Cyclooxygenase-2), PlGF (*placental growth factor*); s-Eng (lösliches Endoglin); sFlt-1 (*soluble Fms-like tyrosine kinase 1*); VEGF (*vascular endothelial growth factor*). (Erstellt mit BioRender.com.; unter Berücksichtigung von: (6, 10, 55, 149, 172, 175, 176, 180)).

7 Zusammenfassung

Die Präeklampsie (PE) als hypertensive Schwangerschaftserkrankung geht mit einer hohen fetalen und maternalen Morbidität und Mortalität einher. Im Rahmen eines mehrphasigen pathogenetischen Prozesses wird von einer gestörten Entwicklung des plazentaren Gefäßsystems ausgegangen, die zunächst zur mangelhaften Plazentation und folglich zur plazentaren Ischämie mit Hypoxie und erhöhtem oxidativen Stress führt. Es resultieren eine plazentare Dysfunktion und schließlich generalisierte maternale Endothelfunktionsstörungen mit multisystemischer Organmanifestation.

Die genaue Vermittlung und mögliche Beeinflussbarkeit dieser vaskulär-endothelialen Dysfunktion ist bisher nur unzureichend geklärt. Hypoxie und das vermehrte Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Zeichen eines oxidativen Stressmilieus besitzen genotoxisches Potenzial und können zur Aktivierung der DNA-Schadensreparaturantwort (DDR), insbesondere der Schlüsselkinase ATM und der mit ihr interagierenden Proteine Akt, CHK2 und H2AX, führen. Für Vitamin D₃ (VD) wurden *in vitro* vasoprotektive, antioxidative und endothelstabilisierende Eigenschaften nachgewiesen. *In vivo* steht VD mit einer Senkung des Präeklampsierisikos in Verbindung. Endotheliale koloniebildende Zellen (ECFC) als Subpopulation endothelialer Vorläuferzellen besitzen proangiogene sowie endothelbildende und -erhaltende Funktionen.

Ziel dieser Dissertation war es einerseits, den Effekt von VD auf die an der ATM-basierten DNA-Schadenssignalkaskade beteiligten Proteine im Milieu prägeklampische Stressoren (ROS, Hypoxie) in ECFC näher zu untersuchen. Dafür wurden ECFC nach VD-Vorbehandlung mit 1 % O₂ oder H₂O₂ inkubiert und anschließend die DDR-Proteinexpression per Immunzytochemie- bzw. Immunoblotverfahren analysiert. Außerdem sollte der Einfluss einer ATM-Inhibition auf die Ausbildung intrazellulärer ROS sowie auf den Zell-Index (CI) von ECFC erforscht werden. Dafür wurden ECFC von gesunden (NP) und PE-Schwangeren mit dem spezifischen ATM-Inhibitor (ATMi) KU-55933 vorbehandelt und anschließend Impedanz-basiert der CI und Fluoreszenzemission-basiert die intrazellulären ROS-Level bestimmt.

Für VD konnte in ECFC ein stabilisierender, teilweise abmildernder Einfluss auf die DDR-Proteinlevel im Milieu prägeklampischer Stressoren nachgewiesen werden, der partiell durch die VD-Dosis sowie die Art und Intensität des PE-Stressors modulierbar zu sein schien.

Die ATM-Inhibition führte in ECFC zum intrazellulären ROS-Anstieg und Abfall des CI. PE-ECFC zeigten im Vergleich zu NP-ECFC einen geringeren ATMi-assoziierten intrazellulären ROS-Anstieg und stärkeren ATMi-assoziierten Abfall des CI. ATMi konnte der mit dem PE-Status einhergehenden Tendenz zu erhöhten intrazellulären ROS-Leveln und CI-Werten entgegenwirken.

Im Kontext stressinduzierter frühzeitiger Seneszenz (SIPS) – die auch als pathogenetischer Einflussfaktor der PE diskutiert wird – lassen diese Ergebnisse für ATMi und VD protektive Eigenschaften vor SIPS unter PE-ähnlichen Bedingungen vermuten. Die nähere Charakterisierung und Vermittlung der regulativen Funktion von VD, ATM und ATMi auf zelluläre Seneszenzprozesse unter prägeklampischen Stressbedingungen bedürfen weiterer Forschung.

8 Anhang

Tabelle 19: Vergleich des Zell-Index nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).

Angabe von Median (MD) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Mann-Whitney-U-Test (MW) oder ungepaartem t-Test (UT) im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTRL). n = 5. Statistisch signifikante Ergebnisse sind durch eine graue Hintergrundfarbe hervorgehoben.

Messzeitpunkt	NP (CTRL)	NP (ATMi)	PE (CTRL)	PE (ATMi)
16 h	MD = 16.875	MD = 15.078 p = 0,04 (MW)	MD = 19.813	MD = 16.457 p < 0,001 (UT)
32 h	MD = 26.604	MD = 26.104 p = 0,49 (MW)	MD = 34.155	MD = 33.188 p = 0,37 (UT)
48 h	MD = 35.888	MD = 35.303 p = 0,51 (MW)	MD = 48.108	MD = 46.850 p = 0,31 (MW)
64 h	MD = 44.509	MD = 43.682 p = 0,54 (UT)	MD = 62.066	MD = 56.604 p = 0,005 (UT)

Tabelle 20: Vergleich des Zell-Index unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer.

Angabe von Median (MD) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Mann-Whitney-U-Test. n = 5. Statistisch signifikante Ergebnisse sind durch eine graue Hintergrundfarbe hervorgehoben.

Messzeitpunkt	NP	PE	p
16 h	MD = 16.581	MD = 19.366	p = 0,15
32 h	MD = 25.010	MD = 34.212	p = 0,30
48 h	MD = 33.729	MD = 52.303	p = 0,03
64 h	MD = 44.084	MD = 65.350	p = 0,002

Tabelle 21: Vergleich der intrazellulären oxidativen Stresslevel von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi).

Angabe von Median (MD) in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Mann-Whitney-U-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTRL). Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 6 (inkl. ein technisches Replikat)

Messzeitpunkt	NP (CTRL)	NP (ATMi)	PE (CTRL)	PE (ATMi)
1 h	MD = 0,428	MD = 0,429; p = 0,56	MD = 0,357	MD = 0,389; p = 0,50
3 h	MD = 0,493	MD = 0,553; p = 0,29	MD = 0,468	MD = 0,493; p = 0,41
4 h	MD = 0,495	MD = 0,604; p = 0,28	MD = 0,507	MD = 0,539; p = 0,42
21 h	MD = 0,739	MD = 0,845; p = 0,25	MD = 0,816	MD = 0,875; p = 0,65
26 h	MD = 0,803	MD = 0,874; p = 0,23	MD = 0,829	MD = 0,897; p = 0,61
28 h	MD = 0,835	MD = 0,924; p = 0,21	MD = 0,863	MD = 0,925; p = 0,63

Tabelle 22: Vergleich der auf die Kontrollgruppe normalisierten intrazellulären oxidativen Stresslevel von ECFC nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).

Angabe von Median (MD) in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTRL = 1). n = 6 (inkl. ein technisches Replikat). Statistisch signifikante Ergebnisse sind durch eine graue Hintergrundfarbe hervorgehoben.

Messzeitpunkt	NP (ATMi)	PE (ATMi)
1 h	MD = 1,04; p = 0,21	MD = 1,13; p = 0,04
3 h	MD = 1,17; p = 0,02	MD = 1,03; p = 0,03
4 h	MD = 1,20; p = 0,01	MD = 1,03; p = 0,04
21 h	MD = 1,38; p < 0,001	MD = 1,24; p = 0,04
26 h	MD = 1,47; p < 0,001	MD = 1,19; p = 0,07
28 h	MD = 1,49; p < 0,001	MD = 1,17; p = 0,12

Tabelle 23: Vergleich der intrazellulären oxidativen Stresslevel unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer.

Angabe von Median (MD) in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Mann-Whitney-U-Test. Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 6 (inkl. ein technisches Replikat).

Messzeitpunkt	NP	PE	p
1 h	MD = 0,28	MD = 0,31	p = 0,46
3 h	MD = 0,36	MD = 0,40	p = 0,39
4 h	MD = 0,40	MD = 0,46	p = 0,39
21 h	MD = 0,80	MD = 0,99	p = 0,79
26 h	MD = 0,88	MD = 0,90	p = 0,58
28 h	MD = 0,90	MD = 0,92	p = 0,50

Tabelle 24: Vergleich der auf die gesunde Kontrollgruppe (NP = 1) normalisierten intrazellulären oxidativen Stresslevel nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).

Angabe von Median (MD) in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) und p-Wert nach Berechnung des Signifikanzniveaus mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test im Vergleich zu NP = 1. Die Ergebnisse sind nicht signifikant. n = 6 (inkl. ein technisches Replikat).

Messzeitpunkt	PE (CTRL)	PE (ATMi)
1 h	MD = 0,98; p = 0,80	MD = 1,11; p = 0,47
3 h	MD = 1,00; p = 0,97	MD = 0,94; p = 0,70
4 h	MD = 1,02; p = 0,80	MD = 0,92; p = 0,83
21 h	MD = 1,33; p = 0,35	MD = 0,89; p = 0,20
26 h	MD = 1,35; p = 0,21	MD = 0,86; p = 0,14
28 h	MD = 1,35; p = 0,18	MD = 0,84; p = 0,14

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Unvollständiger Umbau der Spiralarterien bei Präeklampsie.....	7
Abb. 2:	Schematische Übersichtsdarstellung der ATM-basierten DNA-Schadensantwort.....	12
Abb. 3:	Schematisch vereinfachte Übersichtsdarstellung der Teilprojekte (TP) der vorliegenden Arbeit.	17
Abb. 4:	(A) pAkt- und (B) Akt-Proteinlevel und (C) Akt-Phosphorylierungsgrade (pAkt/Akt-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H ₂ O ₂	36
Abb. 5:	(A) pAkt- und (B) Akt-Proteinlevel und (C) Akt-Phosphorylierungsgrade (pAkt/Akt-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H ₂ O ₂ ± Vitamin D ₃ sowie (D) exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.	38
Abb. 6:	(A) pAkt- und (B) Akt-Proteinlevel und (C) Akt-Phosphorylierungsgrade (pAkt/Akt-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie ± Vitamin D ₃ sowie (D) exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.	40
Abb. 7:	(A) pATM- und (B) ATM-Proteinlevel und (C) ATM-Phosphorylierungsgrade (pATM/ATM-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H ₂ O ₂	42
Abb. 8:	(A) pATM- und (B) ATM-Proteinlevel und (C) ATM-Phosphorylierungsgrade (pATM/ATM-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H ₂ O ₂ ± Vitamin D ₃ sowie (D) exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.	44
Abb. 9:	(A) pATM- und (B) ATM-Proteinlevel und (C) ATM-Phosphorylierungsgrade (pATM/ATM-Ratio) in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie ± Vitamin D ₃ sowie (D) exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.	46
Abb. 10:	pCHK2-Proteinlevel in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit (A) H ₂ O ₂ , (B) H ₂ O ₂ ± Vitamin D ₃ oder (C) Hypoxie ± Vitamin D ₃ sowie (D, E) jeweils die exemplarische Darstellung eines entsprechenden Immunoblots.....	48
Abb. 11:	Exemplarische Darstellung der immunzytochemischen Anfärbung mit einem anti-pATM-Antikörper von ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit 100 µM H ₂ O ₂ oder 1 % O ₂	49
Abb. 12:	(A) Absolute und (B) relative Anzahl der pATM-Foci pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H ₂ O ₂ ± Vitamin D ₃	50
Abb. 13:	(A) Absolute und (B) relative Anzahl der pATM-Foci pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie ± Vitamin D ₃	51

Abb. 14:	Exemplarische Darstellung der immunzytochemischen Anfärbung mit einem anti- γ H2AX-Antikörper von ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit 100 μ M H ₂ O ₂ oder 1 % O ₂ .	52
Abb. 15:	(A) Absolute und (B) relative Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H ₂ O ₂ $\pm$ Vitamin D ₃ .	54
Abb. 16:	(A) Absolute und (B) relative Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie $\pm$ Vitamin D ₃ .	55
Abb. 17:	Exemplarische Darstellung einer ECFC mit Mikronukleus.	56
Abb. 18:	(A) Absolute und (B) relative Anzahl der Mikronuklei pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit H ₂ O ₂ $\pm$ Vitamin D ₃ .	57
Abb. 19:	(A) Absolute und (B) relative Anzahl der Mikronuklei pro Zelle in ECFC gesunder Schwangerer nach Behandlung mit Hypoxie $\pm$ Vitamin D ₃ .	58
Abb. 20:	Zell-Index von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi).	61
Abb. 21:	(A) Zell-Index von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) und (B) Einzeldarstellung der Mediane aus A.	62
Abb. 22:	Zell-Index-Profil von ECFC (A) gesunder (NP) und (B) präeklampscher (PE) Patientinnen nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) sowie (C) die jeweilige ATMi-induzierte Veränderung des Zell-Index.	63
Abb. 23:	Zell-Index unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer.	65
Abb. 24:	Zell-Index-Profil von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer.	66
Abb. 25:	(A) Zell-Index von ECFC präeklampscher Patientinnen (PE) nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) und (B) Einzeldarstellung der Mediane aus A.	67
Abb. 26:	Intrazelluläre oxidative Stresslevel von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi).	69
Abb. 27:	(A) Intrazelluläre oxidative Stresslevel von ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) und (B) Einzeldarstellung der Mediane aus A.	70
Abb. 28:	Profil der intrazellulären oxidativen Stresslevel von (A) ECFC gesunder (NP) und (B) präeklampscher (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) sowie (C) die jeweilige ATMi-induzierte Veränderung der Fluoreszenzintensität.	71
Abb. 29:	(A) Intrazelluläre oxidative Stresslevel und (B) Profil der intrazellulären oxidativen Stresslevel unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklampscher (PE) Schwangerer.	73

Abb. 30:	(A) intrazellulärer oxidativer Stresslevel von ECFC präeklaptischer Patientinnen (PE) nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi) und (B) Einzeldarstellung der Mediane aus A.	74
Abb. 31:	Schematische Illustration zur möglichen Verortung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Kontext von Phase 2 des pathophysiologischen Erklärungsmodells der Präeklampsie (PE) mit Fokus auf plazentarer Seneszenz	96

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	18
Tabelle 2: Primäre Antikörper.....	21
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper.....	22
Tabelle 4: biologische Substanzen.....	22
Tabelle 5: Kits.....	22
Tabelle 6: Proliferationsmedium für ECFC.....	23
Tabelle 7: Behandlungsmedium.....	23
Tabelle 8: Geräte.....	23
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 10: Software.....	25
Tabelle 11: Demografische und klinische Daten der Schwangeren.....	26
Tabelle 12: Zusammensetzung der Sammelgele für die SDS-PAGE.....	31
Tabelle 13: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE.....	31
Tabelle 14: Signifikante Früh-Spät-Unterschiede des Zell-Index von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer nach Behandlung ATM-Inhibitor (ATMi).....	60
Tabelle 15: Vergleich des auf die Kontrollgruppe normalisierten relativen Zell-Index nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).....	62
Tabelle 16: Signifikante Früh-Spät-Unterschiede des Zell-Index unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer.....	64
Tabelle 17: Vergleich des auf die gesunde Kontrollgruppe (NP = 1) normalisierten Zell-Index nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).....	66
Tabelle 18: Signifikante Früh-Spät-Unterschiede der intrazellulären oxidativen Stresslevel unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer.....	72
Tabelle 19: Vergleich des Zell-Index nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).....	98
Tabelle 20: Vergleich des Zell-Index unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer.....	98
Tabelle 21: Vergleich der intrazellulären oxidativen Stresslevel von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer nach Behandlung mit ATM-Inhibitor (ATMi).....	98
Tabelle 22: Vergleich der auf die Kontrollgruppe normalisierten intrazellulären oxidativen Stresslevel von ECFC nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).....	99
Tabelle 23: Vergleich der intrazellulären oxidativen Stresslevel unbehandelter ECFC gesunder (NP) und präeklaptischer (PE) Schwangerer.....	99

Tabelle 24: Vergleich der auf die gesunde Kontrollgruppe (NP = 1) normalisierten intrazellulären oxidativen Stresslevel nach Behandlung von ECFC gesunder (NP) und präeklampsischer (PE) Schwangerer mit ATM-Inhibitor (ATMi).....	99
--	----

11 Literaturverzeichnis

1. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGG). Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen: Diagnostik und Therapie [Internet] S2k-Level, AWMF-Registry No. 015/018, 03/2019. Accessed 28.01.2022. URL: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/015-018.html>2019.
2. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2019;145(S1):1-33.
3. Ives CW, Sinkey R, Rajapreyar I, Tita ATN, Oparil S. Preeclampsia-Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(14):1690-702.
4. Stone JH. HELLP syndrome: hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets. *Jama*. 1998;280(6):559-62.
5. Liu S, Joseph KS, Liston RM, Bartholomew S, Walker M, León JA, et al. Incidence, risk factors, and associated complications of eclampsia. *Obstet Gynecol*. 2011;118(5):987-94.
6. Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(8):466-80.
7. Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH. Competing Risks Model in Early Screening for Preeclampsia by Biophysical and Biochemical Markers. *Fetal Diagnosis and Therapy*. 2013;33(1):8-15.
8. Jung E, Romero R, Yeo L, Gomez-Lopez N, Chaemsaitong P, Jaovisidha A, et al. The etiology of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022;226(2):S844-S66.
9. Jim B, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathogenesis, Prevention, and Long-Term Complications. *Seminars in Nephrology*. 2017;37(4):386-97.
10. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circulation Research*. 2019;124(7):1094-112.
11. Brosens I. A study of the spiral arteries of the decidua basalis in normotensive and hypertensive pregnancies. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth*. 1964;71:222-30.
12. Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Korzeniewski SJ, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 2: prediction, prevention and management. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(9):531-40.
13. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005;308(5728):1592-4.
14. Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney International* 2007;71(10):977-84.
15. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(10):992-1005.
16. Sircar M, Thadhani R, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2015;24(2):131-8.

17. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine*. 2006;12(6):642-9.
18. ACOG. Gestational Hypertension and Preeclampsia: American College of Obstetrics and Gynecology Practice Bulletin, Number 222. *Obstetrics and Gynecology*. 2020;135(6):e237-e60.
19. Bartsch E, Medcalf KE, Park AL, Ray JG. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *BMJ*. 2016;353:i1753.
20. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2005;330(7491):565.
21. Poon LC, Nicolaides KH. Early prediction of preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology International*. 2014;2014:297397.
22. Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, Verlohren S, Brennecke S, Chantraine F, et al. Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45(3):241-6.
23. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2016;374(1):13-22.
24. Rolnik DL, Wright D, Poon LC, O'Gorman N, Syngelaki A, de Paco Matallana C, et al. Aspirin versus Placebo in Pregnancies at High Risk for Preterm Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2017;377(7):613-22.
25. Duley L, Meher S, Hunter KE, Seidler AL, Askie LM. Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019;2019(10).
26. Duley L. Pre-eclampsia, eclampsia, and hypertension. *BMJ Clinical Evidence*. 2011;1402.
27. Dall'Asta A, D'Antonio F, Saccone G, Buca D, Mastantuoni E, Liberati M, et al. Cardiovascular events following pregnancy complicated by pre-eclampsia with emphasis on comparison between early- and late-onset forms: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2021;57(5):698-709.
28. Brown MC, Best KE, Pearce MS, Waugh J, Robson SC, Bell R. Cardiovascular disease risk in women with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2013;28(1):1-19.
29. Theilen LH, Fraser A, Hollingshaus MS, Schliep KC, Varner MW, Smith KR, et al. All-Cause and Cause-Specific Mortality After Hypertensive Disease of Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*. 2016;128(2):238-44.
30. Brouwers L, van der Meiden-van Roest AJ, Savelkoul C, Vogelvang TE, Lely AT, Franx A, et al. Recurrence of pre-eclampsia and the risk of future hypertension and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2018;125(13):1642-54.
31. Theilen LH, Meeks H, Fraser A, Esplin MS, Smith KR, Varner MW. Long-term mortality risk and life expectancy following recurrent hypertensive disease of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2018;219(1):107.e1-e6.
32. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7.
33. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95(4):343-53.

34. Van Craenenbroeck AH, Van Craenenbroeck EM. Endothelial progenitor cells and cardiovascular risk: does ageing trump all other factors? *Ann Transl Med.* 2016;4(24):553.
35. Caiado F, Dias S. Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5:4.
36. Edwards N, Langford-Smith AWW, Wilkinson FL, Alexander MY. Endothelial Progenitor Cells: New Targets for Therapeutics for Inflammatory Conditions With High Cardiovascular Risk. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:200.
37. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1185-9.
38. Mund JA, Estes ML, Yoder MC, Ingram DA, Jr., Case J. Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(4):1045-53.
39. Michowitz Y, Goldstein E, Wexler D, Sheps D, Keren G, George J. Circulating endothelial progenitor cells and clinical outcome in patients with congestive heart failure. *Heart.* 2007;93(9):1046-50.
40. Andreou I, Tousoulis D, Tentolouris C, Antoniadis C, Stefanadis C. Potential role of endothelial progenitor cells in the pathophysiology of heart failure: clinical implications and perspectives. *Atherosclerosis.* 2006;189(2):247-54.
41. Luo S, Xia W, Chen C, Robinson EA, Tao J. Endothelial progenitor cells and hypertension: current concepts and future implications. *Clin Sci (Lond)* 2016;130(22):2029-42.
42. De Pascale MR, Bruzzese G, Crimi E, Grimaldi V, Liguori A, Brongo S, et al. Severe Type 2 Diabetes Induces Reversible Modifications of Endothelial Progenitor Cells Which are Ameliorate by Glycemic Control. *Int J Stem Cells.* 2016;9(1):137-44.
43. Luppi P, Powers RW, Verma V, Edmunds L, Plymire D, Hubel CA. Maternal circulating CD34+VEGFR-2+ and CD133+VEGFR-2+ progenitor cells increase during normal pregnancy but are reduced in women with preeclampsia. *Reprod Sci.* 2010;17(7):643-52.
44. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res.* 2012;110(4):624-37.
45. Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond).* 2011;120(7):263-83.
46. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348(7):593-600.
47. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(5):1316-20.
48. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood.* 2004;104(9):2752-60.
49. Tasev D, Koolwijk P, van Hinsbergh VW. Therapeutic Potential of Human-Derived Endothelial Colony-Forming Cells in Animal Models. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22(5):371-82.

50. Collett JA, Mehrotra P, Crone A, Shelley WC, Yoder MC, Basile DP. Endothelial colony-forming cells ameliorate endothelial dysfunction via secreted factors following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(5):F897-f907.
51. Sipos PI, Crocker IP, Hubel CA, Baker PN. Endothelial progenitor cells: their potential in the placental vasculature and related complications. *Placenta*. 2010;31(1):1-10.
52. Du F, Zhou J, Gong R, Huang X, Pansuria M, Virtue A, et al. Endothelial progenitor cells in atherosclerosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17(6):2327-49.
53. Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2014;229(1):10-6.
54. Powers RW, Catov JM, Bodnar LM, Gallaher MJ, Lain KY, Roberts JM. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia and risk of adverse pregnancy outcome. *Reprod Sci*. 2008;15(4):374-81.
55. von Versen-Höynck F, Brodowski L, Dechend R, Myerski AC, Hubel CA. Vitamin D antagonizes negative effects of preeclampsia on fetal endothelial colony forming cell number and function. *PLoS One*. 2014;9(6):e98990.
56. Attar A, Monabati A, Parsanezhad ME. Endothelial progenitor cell subsets and preeclampsia: Findings and controversies. *J Chin Med Assoc*. 2017;80(10):615-22.
57. Muñoz-Hernandez R, Miranda ML, Stiefel P, Lin RZ, Praena-Fernández JM, Dominguez-Simeon MJ, et al. Decreased level of cord blood circulating endothelial colony-forming cells in preeclampsia. *Hypertension*. 2014;64(1):165-71.
58. Brodowski L, Burlakov J, Myerski AC, von Kaisenberg CS, Grundmann M, Hubel CA, et al. Vitamin D prevents endothelial progenitor cell dysfunction induced by sera from women with preeclampsia or conditioned media from hypoxic placenta. *PLoS One*. 2014;9(6):e98527.
59. Brodowski L, Schröder-Heurich B, Hubel CA, Vu TH, von Kaisenberg CS, von Versen-Höynck F. Role of vitamin D in cell-cell interaction of fetal endothelial progenitor cells and umbilical cord endothelial cells in a preeclampsia-like model. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;317(2):C348-c57.
60. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(15):1475-85.
61. Iyama T, Wilson DM, 3rd. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 2013;12(8):620-36.
62. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58(5):235-63.
63. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179-204.
64. Reczek CR, Chandel NS. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*. 2017;1(1):79-98.
65. Renaudin X. Reactive oxygen species and DNA damage response in cancer. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2021;364:139-61.
66. Xu B, Wang W, Guo H, Sun Z, Wei Z, Zhang X, et al. Oxidative stress preferentially induces a subtype of micronuclei and mediates the genomic instability caused by p53 dysfunction. *Mutat Res*. 2014;770:1-8.

67. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011;26(1):125-32.
68. Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Holland N, Bonassi S, Kirsch-Volders M. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2020;786:108342.
69. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014;2014:761264.
70. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(7):512-22.
71. Lavin MF, Kozlov S, Gatei M, Kijas AW. ATM-Dependent Phosphorylation of All Three Members of the MRN Complex: From Sensor to Adaptor. *Biomolecules*. 2015;5(4):2877-902.
72. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5858-68.
73. Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001;410(6830):842-7.
74. Cremona CA, Behrens A. ATM signalling and cancer. *Oncogene*. 2014;33(26):3351-60.
75. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(4):197-210.
76. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017;66(6):801-17.
77. Paull TT. Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:711-38.
78. Jin MH, Oh D-Y. ATM in DNA repair in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2019;203:107391.
79. Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, Martin NM, Orr AI, et al. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res*. 2004;64(24):9152-9.
80. Lavin MF, Yeo AJ. Clinical potential of ATM inhibitors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2020;821:111695.
81. Pinto DM, Flaus A. Structure and function of histone H2AX. *Subcell Biochem*. 2010;50:55-78.
82. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(17):5678-94.
83. Turinetti V, Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(5):2489-98.
84. Huang X, Tanaka T, Kurose A, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 in cells untreated by genotoxic agents is cell-cycle phase specific and attenuated by scavenging reactive oxygen species. *Int J Oncol*. 2006;29(2):495-501.
85. Tanaka T, Halicka HD, Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle*. 2006;5(17):1940-5.

86. Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol.* 2014;6(6):442-57.
87. Stolz A, Ertych N, Bastians H. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. *Clin Cancer Res.* 2011;17(3):401-5.
88. Hirao A, Cheung A, Duncan G, Girard PM, Elia AJ, Wakeham A, et al. Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Mol Cell Biol.* 2002;22(18):6521-32.
89. Nevanlinna H, Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene.* 2006;25(43):5912-9.
90. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017;169(3):381-405.
91. Götting I, Jendrossek V, Matschke J. A New Twist in Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Altered Cancer Cell Metabolism in Akt-Mediated Therapy Resistance. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22).
92. Szymonowicz K, Oeck S, Malewicz NM, Jendrossek V. New Insights into Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Localized Akt Activation and Compartment-Specific Target Proteins for the Cellular Radiation Response. *Cancers (Basel).* 2018;10(3).
93. Linseisen J, Bechthold A, Bischoff-Ferrari H, Hintzpeter B, Leschik-Bonnet E, Reichrath J, et al. Vitamin D und Prävention ausgewählter chronischer Krankheiten - Stellungnahme. [Internet] Accessed 19.05.2022. URL: <https://www.dge.de/fileadmin/public/doc/ws/stellungnahme/DGE-Stellungnahme-VitD-210803.pdf>2011 01/01.
94. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol.* 2014;21(3):319-29.
95. Feldman D, Pike W, Bouillon R, Giovannucci E, Goltzman D, Hewison M. Vitamin D: Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics. 4 ed: Academic Press; 2018 2018/01/01/.
96. Unholzer S, Rothmund A, Haen E. Alleskönner Vitamin D? *Der Nervenarzt.* 2017;88(5):489-94.
97. Stenhouse C, Suva LJ, Gaddy D, Wu G, Bazer FW. Phosphate, Calcium, and Vitamin D: Key Regulators of Fetal and Placental Development in Mammals. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1354:77-107.
98. de la Guía-Galipienso F, Martínez-Ferran M, Vallecillo N, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F, Pareja-Galeano H. Vitamin D and cardiovascular health. *Clin Nutr.* 2021;40(5):2946-57.
99. Cannell JJ, Grant WB, Holick MF. Vitamin D and inflammation. *Dermatoendocrinol.* 2014;6(1):e983401.
100. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(5):342-57.
101. Schröder-Heurich B, Springer CJP, von Versen-Höynck F. Vitamin D Effects on the Immune System from Periconception through Pregnancy. *Nutrients.* 2020;12(5).
102. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, et al. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health.* 2006;96(2):252-61.
103. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(3):362-71.

104. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(18):6573.
105. Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, Bikle D, White JH, Dawson-Hughes B, et al. Skeletal and Extraskelatal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocr Rev*. 2019;40(4):1109-51.
106. Giustina A, Adler RA, Binkley N, Bollerslev J, Bouillon R, Dawson-Hughes B, et al. Consensus statement from 2(nd) International Conference on Controversies in Vitamin D. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;21(1):89-116.
107. Dalan R, Liew H, Tan WKA, Chew DEK, Leow MK-S. Vitamin D and the endothelium: basic, translational and clinical research updates. *IJC Metabolic & Endocrine*. 2014;4:4-17.
108. Kim DH, Meza CA, Clarke H, Kim JS, Hickner RC. Vitamin D and Endothelial Function. *Nutrients*. 2020;12(2).
109. Schröder-Heurich B, von Hardenberg S, Brodowski L, Kipke B, Meyer N, Borns K, et al. Vitamin D improves endothelial barrier integrity and counteracts inflammatory effects on endothelial progenitor cells. *Faseb j*. 2019;33(8):9142-53.
110. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Simó-Jordá R, Laporta-Martín P, Carratalá-Calvo A, Alonso-Iglesias E. Vitamin D status is linked to biomarkers of oxidative stress, inflammation, and endothelial activation in obese children. *J Pediatr*. 2012;161(5):848-54.
111. Chen L, Yang R, Qiao W, Zhang W, Chen J, Mao L, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D exerts an antiaging role by activation of Nrf2-antioxidant signaling and inactivation of p16/p53-senescence signaling. *Aging Cell*. 2019;18(3):e12951.
112. Ekinçi C, Guler EM, Kocyigit A, Kirik F, Ozdemir H. Effects of 1,25 Dihydroxyvitamin D(3) on Human Retinal Pigment Epithelial Cell Lines. *Int Ophthalmol*. 2021;41(10):3333-40.
113. Pawlowska E, Wysokiński D, Tokarz P, Piastowska-Ciesielska A, Szczepanska J, Blasiak J. Dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 reduce oxidative stress-related DNA damage in differentiating osteoblasts. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):16649-64.
114. Philips N, Samuel P, Keller T, Alharbi A, Alshalan S, Shamlan SA. Beneficial Regulation of Cellular Oxidative Stress Effects, and Expression of Inflammatory, Angiogenic, and the Extracellular Matrix Remodeling Proteins by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 in a Melanoma Cell Line. *Molecules*. 2020;25(5).
115. Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P. Vitamin D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(1):76-89.
116. Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Bmj*. 2013;346:f1169.
117. Tabesh M, Salehi-Abargouei A, Tabesh M, Esmailzadeh A. Maternal vitamin D status and risk of pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(8):3165-73.
118. van der Pligt P, Willcox J, Szymlek-Gay EA, Murray E, Worsley A, Daly RM. Associations of Maternal Vitamin D Deficiency with Pregnancy and Neonatal Complications in Developing Countries: A Systematic Review. *Nutrients*. 2018;10(5).
119. Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, Holick MF, Powers RW, Roberts JM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(9):3517-22.

120. Palacios C, Kostiuk LK, Peña-Rosas JP. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;7(7):Cd008873.
121. Palacios C, Trak-Fellermeier MA, Martínez RX, Lopez-Perez L, Lips P, Salisi JA, et al. Regimens of vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;10(10):Cd013446.
122. Díaz L, Noyola-Martínez N, Barrera D, Hernández G, Avila E, Halhali A, et al. Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. *J Reprod Immunol.* 2009;81(1):17-24.
123. Halhali A, Villa AR, Madrazo E, Soria MC, Mercado E, Díaz L, et al. Longitudinal changes in maternal serum 1,25-dihydroxyvitamin D and insulin like growth factor I levels in pregnant women who developed preeclampsia: comparison with normotensive pregnant women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90(1-5):553-6.
124. Gui J, Rohrbach A, Borns K, Hillemanns P, Feng L, Hubel CA, et al. Vitamin D rescues dysfunction of fetal endothelial colony forming cells from individuals with gestational diabetes. *Placenta.* 2015;36(4):410-8.
125. Grundmann M, Haidar M, Placzko S, Niendorf R, Darashchonak N, Hubel CA, et al. Vitamin D improves the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;303(9):C954-62.
126. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
127. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
128. Türker Şener L, Albeniz G, Dinç B, Albeniz I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp Ther Med.* 2017;14(3):1866-70.
129. Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth C, O'Carroll S, Mez E, et al. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors.* 2015;5(2):199-222.
130. Abassi YA, Xi B, Zhang W, Ye P, Kirstein SL, Gaylord MR, et al. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chem Biol.* 2009;16(7):712-23.
131. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol.* 1983;130(4):1910-7.
132. Brandt R, Keston AS. Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: A stable reagent for fluorometric analysis. *Anal Biochem.* 1965;11:6-9.
133. Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem.* 1965;11:1-5.
134. Jia X, Xu J, Gu Y, Gu X, Li W, Wang Y. Vitamin D suppresses oxidative stress-induced microparticle release by human umbilical vein endothelial cells. *Biol Reprod.* 2017;96(1):199-210.
135. Uberti F, Lattuada D, Morsanuto V, Nava U, Bolis G, Vacca G, et al. Vitamin D protects human endothelial cells from oxidative stress through the autophagic and survival pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(4):1367-74.

136. Bencokova Z, Kaufmann MR, Pires IM, Lecane PS, Giaccia AJ, Hammond EM. ATM activation and signaling under hypoxic conditions. *Mol Cell Biol.* 2009;29(2):526-37.
137. Lengert N, Mirsch J, Weimer RN, Schumann E, Haub P, Drossel B, et al. AutoFoci, an automated high-throughput foci detection approach for analyzing low-dose DNA double-strand break repair. *Scientific Reports.* 2018;8(1):17282.
138. Ting HJ, Yasmin-Karim S, Yan SJ, Hsu JW, Lin TH, Zeng W, et al. A positive feedback signaling loop between ATM and the vitamin D receptor is critical for cancer chemoprevention by vitamin D. *Cancer Res.* 2012;72(4):958-68.
139. Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem.* 2010;285(38):29662-70.
140. Guo Z, Deshpande R, Paull TT. ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle.* 2010;9(24):4805-11.
141. Guo Z, Kozlov S, Lavin MF, Person MD, Paull TT. ATM activation by oxidative stress. *Science.* 2010;330(6003):517-21.
142. Lee JH, Paull TT. Cellular functions of the protein kinase ATM and their relevance to human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(12):796-814.
143. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther.* 2014;141(2):150-9.
144. Phan LM, Rezaeian AH. ATM: Main Features, Signaling Pathways, and Its Diverse Roles in DNA Damage Response, Tumor Suppression, and Cancer Development. *Genes (Basel).* 2021;12(6).
145. Halicka HD, Zhao H, Li J, Traganos F, Studzinski GP, Darzynkiewicz Z. Attenuation of constitutive DNA damage signaling by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Aging (Albany NY).* 2012;4(4):270-8.
146. Liu D, Cheng Y, Mei X, Xie Y, Tang Z, Liu J, et al. Mechanisms of acrolein induces toxicity in human umbilical vein endothelial cells: Oxidative stress, DNA damage response, and apoptosis. *Environ Toxicol.* 2022;37(4):708-19.
147. Yang G, Gao X, Jiang L, Sun X, Liu X, Chen M, et al. 6-Gingerol prevents MEHP-induced DNA damage in human umbilical vein endothelial cells. *Hum Exp Toxicol.* 2017;36(11):1177-85.
148. Wei J, Zhang L, Ren L, Zhang J, Liu J, Duan J, et al. Endosulfan induces cell dysfunction through cycle arrest resulting from DNA damage and DNA damage response signaling pathways. *Sci Total Environ.* 2017;589:97-106.
149. Schröder-Heurich B, Büder T, Meyer N, Vu TH, Richter K, Ramachandran D, et al. Downregulation of miR-1270 mediates endothelial progenitor cell function in preeclampsia: Role for ATM in the Src/VE-cadherin axis. *The FASEB Journal.* 2022;36(7).
150. Hammond EM, Dorie MJ, Giaccia AJ. ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *J Biol Chem.* 2003;278(14):12207-13.
151. Olcina MM, Grand RJ, Hammond EM. ATM activation in hypoxia - causes and consequences. *Mol Cell Oncol.* 2014;1(1):e29903.
152. Schütz CS, Stope MB, Bekeschus S. H2A.X Phosphorylation in Oxidative Stress and Risk Assessment in Plasma Medicine. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:2060986.

153. Cleaver JE, Feeney L, Revet I. Phosphorylated H2Ax is not an unambiguous marker for DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*. 2011;10(19):3223-4.
154. de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, Cleaver JE. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(15):6870-5.
155. Revet I, Feeney L, Bruguera S, Wilson W, Dong TK, Oh DH, et al. Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(21):8663-7.
156. Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z, Burdak-Rothkamm S. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(6):491-504.
157. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004;26(3):249-61.
158. Halicka HD, Zhao H, Li J, Lee YS, Hsieh TC, Wu JM, et al. Potential anti-aging agents suppress the level of constitutive mTOR- and DNA damage- signaling. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(12):952-65.
159. Liu H, Feng X, Wu S, Zong T, Li B, Zhang Z. Vitamin D Resists Cyclophosphamide-Induced Genomic and DNA Damage in CHL Cells In Vitro and in Mice In Vivo. *Nutr Cancer*. 2019;71(6):1030-9.
160. Trémezaygues L, Seifert M, Vogt T, Tilgen W, Reichrath J. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates effects of ionizing radiation (IR) on human keratinocytes: in vitro analysis of cell viability/proliferation, DNA-damage and -repair. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(1-2):324-7.
161. Sharifan A, Etebari M, Zolfaghari B, Aliomrani M. Investigating the effects of bark extract and volatile oil of *Pinus eldarica* against cisplatin-induced genotoxicity on HUVECs cell line. *Toxicol Res (Camb)*. 2021;10(2):223-31.
162. Liao F, Chen L, Liu Y, Zhao D, Peng W, Wang W, et al. The size-dependent genotoxic potentials of titanium dioxide nanoparticles to endothelial cells. *Environ Toxicol*. 2019;34(11):1199-207.
163. Zhou F, Liao F, Chen L, Liu Y, Wang W, Feng S. The size-dependent genotoxicity and oxidative stress of silica nanoparticles on endothelial cells. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(2):1911-20.
164. Demasters G, Di X, Newsham I, Shiu R, Gewirtz DA. Potentiation of radiation sensitivity in breast tumor cells by the vitamin D3 analogue, EB 1089, through promotion of autophagy and interference with proliferative recovery. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(11):2786-97.
165. Bhoora S, Punchoo R. Policing Cancer: Vitamin D Arrests the Cell Cycle. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23).
166. Gocek E, Studzinski GP. DNA Repair in Despair-Vitamin D Is Not Fair. *J Cell Biochem*. 2016;117(8):1733-44.
167. Huppertz B. Oxygenation of the placenta and its role in pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2014;4(3):244-5.
168. Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat*. 2009;215(1):27-35.
169. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*. 2004;6(2):168-70.

170. Pospelova TV, Demidenko ZN, Bukreeva EI, Pospelov VA, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle*. 2009;8(24):4112-8.
171. Chen JH, Hales CN, Ozanne SE. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22):7417-28.
172. Hu C, Zhang X, Teng T, Ma ZG, Tang QZ. Cellular Senescence in Cardiovascular Diseases: A Systematic Review. *Aging Dis*. 2022;13(1):103-28.
173. Meijnikman AS, Herrema H, Scheithauer TPM, Kroon J, Nieuwdorp M, Groen AK. Evaluating causality of cellular senescence in non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep*. 2021;3(4):100301.
174. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014;509(7501):439-46.
175. Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *Journal of Reproductive Immunology*. 2019;134-135:1-10.
176. Cox LS, Redman C. The role of cellular senescence in ageing of the placenta. *Placenta*. 2017;52:139-45.
177. Fantini C, Corinaldesi C, Lenzi A, Migliaccio S, Crescioli C. Vitamin D as a Shield against Aging. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5).
178. Bima A, Eldakhakhny B, Nuwaylati D, Alnami A, Ajabnoor M, Elsamanoudy A. The Interplay of Vitamin D Deficiency and Cellular Senescence in The Pathogenesis of Obesity-Related Co-Morbidities. *Nutrients*. 2021;13(11).
179. Ferri E, Casati M, Cesari M, Vitale G, Arosio B. Vitamin D in physiological and pathological aging: Lesson from centenarians. *Rev Endocr Metab Disord*. 2019;20(3):273-82.
180. Berridge MJ. Vitamin D deficiency accelerates ageing and age-related diseases: a novel hypothesis. *J Physiol*. 2017;595(22):6825-36.
181. Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y. Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(5):571-9.
182. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell*. 2017;169(6):1000-11.
183. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010;24(22):2463-79.
184. Sugawara J, Mitsui-Saito M, Hayashi C, Hoshiai T, Senoo M, Chisaka H, et al. Decrease and senescence of endothelial progenitor cells in patients with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5329-32.
185. Hwang HS, Maeng YS, Park YW, Koos BJ, Kwon YG, Kim YH. Increased senescence and reduced functional ability of fetal endothelial progenitor cells in pregnancies complicated by preeclampsia without intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199(3):259.e1-7.
186. Cirotti C, Filomeni G. ATM plays antioxidant, boosting mitophagy via denitrosylation. *Autophagy*. 2021;17(2):590-2.
187. Cirotti C, Rizza S, Giglio P, Poerio N, Allegra MF, Claps G, et al. Redox activation of ATM enhances GSNOR translation to sustain mitophagy and tolerance to oxidative stress. *EMBO Rep*. 2021;22(1):e50500.

188. Huff LA, Yan S, Clemens MG. Mechanisms of Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Control in the DNA Damage Response to Oxidative Stress, Epigenetic Regulation, and Persistent Innate Immune Suppression Following Sepsis. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(7).
189. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. 2013;32(33):3789-97.

13 Erklärung nach §2 Absatz 2 Nr. 7 und 8 PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Vitamin D₃, Proteine der DNA-Schadensantwort und die Regulation von oxidativem Stress in der Präeklampsie“ in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Prof. Dr. med. Frauke von Versen-Höyneck mit der Unterstützung durch Dr. rer. nat. Bianca Schröder-Heurich ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Teile der Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- The FASEB Journal (Wiley Periodicals)
Schröder-Heurich B, Büder T, Meyer N, et al. Downregulation of miR-1270 mediates endothelial progenitor cell function in preeclampsia: Role for ATM in the Src/VE-cadherin axis. FASEB J. 2022; 36:e22379. doi:10.1096/fj.20220 0040RR

Hannover, den

14 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Menschen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Ohne Eure Unterstützung – in welcher Form auch immer – hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Prof. Dr. Frauke von Versen-Höynck danke ich für die Möglichkeit zur Promotion, die Überlassung des Themas, die enge fachliche Betreuung und die lösungsorientierte Unterstützung. Für ihre engagierte, zuverlässige und motivierende Co-Betreuung danke ich Dr. Bianca Schröder-Heurich als stets verfügbare Ansprechpartnerin vor Ort, die mit Rat, Tat und den passenden Antworten in kniffligen Situationen entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat. Dabei gilt mein Dank auch Katja Richter für die technisch-methodische Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Ich danke zudem Dr. Thilo-Dörk-Bousset als Leiter und allen Kolleginnen und Kollegen des Forschungszentrums der Frauenklinik für die unkomplizierte Aufnahme ins Team, die Unterstützung bei Fragen jeglicher Art und den harmonischen Umgang miteinander. In diesem Zusammenhang gebührt mein Dank insbesondere Britta Wieland für ihr außerordentliches Engagement und die fachliche Expertise beim Umgang mit diversen methodischen Herausforderungen sowie ihrer dabei immer aufbauenden, optimistischen Art.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mitdotorandin Nadia Meyer für das Teilen ihrer Erfahrung und die gegenseitige Hilfsbereitschaft während des gemeinsamen Weges. Für die freundschaftlich-kollegiale Zusammenarbeit mit der notwendigen Prise Spaß und Leichtigkeit danke ich zudem Thu und Franka.

Meinen langjährigen Freunden Nils und Franzi danke ich für ihre zahlreichen Aufmunterungen, Ratschläge und motivierend-empathischen Worte als „promovierende Leidensgenossen“ sowie den stets konstruktiven Austausch während des inoffiziellen, interdisziplinären „Simbacher Doktorandenkolloquiums“. Diesbezüglich danke ich auch Martin für sein stets offenes, freundschaftlich-empathisches Ohr. Ohne die hoffnungsstiftenden, Perspektive-eröffnenden Gespräche mit Tobias, Carmen und Andreas an einem sonnigen Herbstnachmittag wäre diese Arbeit womöglich in einem ihrer tiefsten und längsten Zwischentiefs im Hochsommer ihrer Entstehungsgeschichte gestrandet. Ich bin dankbar für die von ihnen zur rechten Zeit geteilten direkten und ehrlichen Impulse.

Abschließend gilt mein Dank den wichtigsten Menschen in meinem Leben: Ich danke vor allem meinen Eltern, die mein Promotionsvorhaben durch ihre großzügige, bedingungslose und ausdauernde Unterstützung grundlegend ermöglicht haben. Meiner gesamten Familie – besonders meinen Großeltern – danke ich für ihren Rückhalt und Beistand, ihren Zuspruch und ihren schier unerschütterlichen Glauben an mich. Meiner Lebensgefährtin Heidi danke ich für ihre unermüdliche, liebevolle und geduldige Unterstützung in allen kleinen und großen Belangen, die einen wesentlichen Teil zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beitrug. Ich bin dankbar, sie an meiner Seite zu wissen und mich auf sie verlassen zu können.