

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner

Immungenetische Untersuchungen zum Krankheitsbild der Präeklampsie

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Jens Müller
aus Buchholz i.d.N.

Lübeck 2004

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner

**Immungenetische Untersuchungen
zum Krankheitsbild der Präeklampsie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Jens Müller
aus Buchholz i.d.N.

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Seyfarth.....
2. Berichterstatter:
Tag der mündlichen Prüfung:
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den.....

Meinen Eltern

Häufig verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung(en)
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AST	Aspartataminotransferase
bp	Basenpaar(e)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
DIC	<i>Disseminated Intravascular Coagulation</i> (Disseminierte Intravasale Gerinnung)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP	Dinukleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffer Salt</i> (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (enzymgekoppelter Immunosorbenttest)
EPH	<i>edema</i> (Ödeme), <i>proteinuria</i> (Proteinurie), <i>hypertension</i> (Bluthochdruck)
Ethanol abs.	Ethanol absolutum (absolut)
HELLP	<i>hemolysis</i> (Hämolyse), <i>elevated liver enzymes</i> (Transaminasenerhöhung), <i>low platelets</i> (Thrombozytopenie)
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (Humanes Leukozytenantigen)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxydase)
IL	Interleukin
IL1-RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IUGR	<i>Intrauterine Growth Retardation</i> (intrauterine Wachstumsretardierung)
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Konfidenzintervall
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
Mb	Megabasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
<i>Nco</i> I	<i>Nocardia corallina</i> I
OD	Optische Dichte
OR	<i>Odds Ratio</i> (Kreuzproduktverhältnis)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PCR-SSP	Polymerase-Kettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern
PROM	<i>Premature Rupture of Membranes</i> (vorzeitiger Blasensprung)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)
RSA	<i>Recurrent Spontaneous Abortion</i> (wiederholte spontane Aborte)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSW	Schwangerschaftswoche
sTNF-R	<i>soluble</i> (löslicher) Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
Tab.	Tabelle(n)
TBE	Tris-Borat
Tbl.	Tablette(n)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
Tr.	Tropfen
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Präeklampsie	1
1.2	HLA-System.....	3
1.3	HLA und Präeklampsie	5
1.4	Zytokine und lösliche Zytokinrezeptoren	6
1.4.1	Tumor-Nekrose-Faktor- α	8
1.4.2	Interleukin-1 β und Interleukin-1-Rezeptorantagonist.....	9
1.4.3	Interleukin-6.....	10
1.4.4	Interleukin-8.....	10
1.4.5	lösliche Zytokinrezeptoren.....	10
1.4.5.1	lösliche TNF-Rezeptoren (sTNF-R)	11
1.4.5.2	löslicher IL-6-Rezeptor (sIL-6-R)	11
1.5	TNF-Polymorphismen.....	12
1.6	Fragestellung	13
2	Material	15
2.1	Geräte	15
2.2	Labormaterialien	16
2.3	Testkits	16
2.4	Reagentien für molekularbiologische Arbeiten.....	17
2.5	Chemikalien und sonstige Reagentien	17
2.6	Computersoftware	18
3	Methoden	19
3.1	Charakterisierung des Untersuchungskollektivs	19
3.2	HLA-DRB1- und HLA-DQB1-Typisierung	21
3.2.1	Leukozytenisolierung.....	21
3.2.2	DNA-Extraktion.....	22
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
3.2.4	Gelelektrophorese	24

3.2.5	Ethidiumbromidfärbung.....	26
3.2.6	Allelspezifische Hybridisierung (<i>Reverse-Dot-Blot</i>).....	26
3.2.7	PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP).....	29
3.3	Zytokine und lösliche Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser.....	31
3.3.1	Materialgewinnung	31
3.3.2	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	31
3.4	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analyse (RFLP-Analyse).....	33
3.4.1	TNFA-Polymorphismus.....	34
3.4.2	TNFB-Polymorphismus	35
3.5	Statistik.....	36
4	Ergebnisse	37
4.1	HLA-DRB1- und HLA-DQB1-Typisierung	37
4.1.2	HLA-DRB1-Typisierung	37
4.1.2	HLA-DQB1-Typisierung.....	38
4.2	Zytokine und lösliche Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser.....	38
4.2.1	TNF- α	39
4.2.2	IL-1 β	39
4.2.3	IL-6.....	39
4.2.4	IL-8.....	40
4.2.5	sTNF-R.....	41
4.2.6	sIL-6-R	42
4.2.7	IL-1RA	43
4.2.8	Korrelationsanalysen.....	45
4.2.9	IL-1RA bei männlichen und weiblichen Feten	45
4.3	TNF-Polymorphismen.....	46
4.3.1	TNFA-Polymorphismus.....	46
4.3.2	TNFB-Polymorphismus	47
4.3.3	Kopplungsanalysen	48
5	Diskussion	50
5.1	Rolle des HLA-Systems	51
5.2	Rolle der TNF-Polymorphismen.....	52

VIII

5.3	Rolle der Zytokine im Fruchtwasser	54
5.3.1	TNF- α und sTNF-R	54
5.3.2	IL-1 β	55
5.3.3	IL-6 und sIL-6-R	56
5.3.4	IL-8.....	57
5.3.5	IL-1RA	57
5.4	Korrelationsanalysen	58
5.5	Ausblicke.....	58
6	Zusammenfassung	60
7	Literaturverzeichnis	62
8	Danksagung	73
9	Lebenslauf	75

1 Einleitung

1.1 Präeklampsie

Die Präeklampsie ist eine Erkrankung, die nur in der Schwangerschaft auftritt. Sie ist gekennzeichnet durch eine Hypertonie, eine Proteinurie und generalisierte Ödeme. Die alte Bezeichnung ist EPH-Gestose (EPH = Abk. für *edema*, *proteinuria*, *hypertension*). Die Erkrankung tritt typischerweise in der zweiten Schwangerschaftshälfte - nach der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) - auf. Nach der Geburt klingen die Symptome in den meisten Fällen ab.

Das klinische Erscheinungsbild der Präeklampsie ist häufig nicht eindeutig, weshalb die Diagnose und auch die differentialdiagnostische Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen häufig schwierig sind. Die Präeklampsieforschung wird zudem wesentlich dadurch erschwert, dass die Diagnosekriterien für die Erkrankung in der Vergangenheit nicht einheitlich waren bzw. dies teilweise auch heute noch nicht sind. Ein Vergleich aktueller mit früheren Studien ist daher nur unter deutlichen Vorbehalten möglich.

Heute gelten die von der *US National Institutes of Health working group on hypertension in pregnancy* in einer Klassifikation der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen festgelegten Kriterien als verbindlich (149) (s. „Methoden“).

Zu den hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen (*Pregnancy-induced Hypertension*) gehören nach dieser Einteilung neben der Präeklampsie die Eklampsie und das HELLP-Syndrom. Bei der Eklampsie treten neben den Symptomen der Präeklampsie noch generalisierte Krampfanfälle auf. Diese schwerste Form der Präeklampsie wird heute nur noch selten beobachtet. Zu den Symptomen des HELLP-Syndroms gehören – neben der Hypertonie und der Proteinurie, die beim HELLP-Syndrom jedoch auch fehlen können (124) – eine Hämolyse (*hemolysis*), eine Transaminasenerhöhung (*elevated liver enzymes*) und eine Thrombozytopenie (*low platelets*) (7, 49, 54, 140). Ob das HELLP-Syndrom ebenso wie die Eklampsie nur eine schwere Form der Präeklampsie ist oder aber eine eigenständige Krankheit, ist umstritten.

Eine der wichtigsten Erkenntnisse der Präeklampsieforschung ist, dass es sich bei der Präeklampsie nicht um ein einheitliches Krankheitsbild handelt, sondern um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit wahrscheinlich auch unterschiedlicher Ätiologie (82, 134).

Ness und Roberts (82) unterscheiden die milden Formen der Präeklampsie (ohne Proteinurie) von einer schweren Form der Erkrankung. Wahrscheinlich stellen nur die schwere Form der Präeklampsie und die Eklampsie ein einheitliches Krankheitsbild dar. Die größere Gruppe der milden Formen der Präeklampsie dürfte dagegen ätiologisch heterogen sein (34, 55).

Die Inzidenz der Präeklampsie liegt in den USA bei ca. 5 % der Schwangerschaften (*range* 5 – 10 %). Die Inzidenz der Eklampsie dürfte bei etwa 5 – 7 Fälle pro 10.000 Geburten liegen. Man nimmt an, dass die Zahlen für die Inzidenz der Präeklampsie und Eklampsie in den (entwickelten) Staaten Europas auf einem ähnlichen Niveau liegen. Die Inzidenz der Eklampsie in den Entwicklungsländern dagegen variiert zwischen 1 Fall pro 100 Geburten und 1 Fall pro 1700 Geburten. Obwohl die Eklampsie als eine seltene Schwangerschaftskomplikation gilt, sterben jährlich weltweit an die 50.000 Frauen an der Erkrankung (120). Auch für den Feten stellt die Erkrankung ein lebensbedrohliches Risiko dar. Bei der Präeklampsie ist die perinatale Mortalität um das Fünffache erhöht. Dies ist auf die hohe Frühgeburtenrate bei präeklampsischen Schwangerschaften zurückzuführen: 15 % aller Frühgeburten sind durch die Präeklampsie bedingt (101).

Die Pathogenese und die Ursachen der Präeklampsie sind bis heute weitgehend unbekannt. Übereinstimmung herrscht jedoch darin, dass bei präeklampsischen Schwangerschaften bereits die Implantation pathologisch verläuft: Die Invasion des Trophoblasten erfolgt nur ungenügend mit einer nur teilweisen Umwandlung der utero-plazentaren Gefäße (73, 92, 95, 100, 101, 122). Infolge dessen kann es zu einer Minderversorgung des Feten mit Sauerstoff und Nährstoffen und somit zu einer Wachstumsretardierung des Feten (*Intrauterine Growth Retardation*, IUGR) kommen, welche im Extremfall zum intrauterinen Fruchttod führen kann. Weiterhin kommt es zu einer Hypoxie der Plazenta, die wiederum zu Plazentainfarkten oder zu einer vorzeitigen Plazentalösung führen kann.

Die Ursachen der Implantationsstörung sind bis heute unbekannt.

Pathophysiologisch kommt es zu einem generalisierten Vasospasmus, der zu einer Minderperfusion sämtlicher Organe führt. Die Ursache ist eine generalisierte Funktionsstörung des Gefäßendothels, deren Ätiologie unbekannt ist. Man geht jedoch davon aus, dass in der (hypoxischen) Plazenta ein oder mehrere Faktoren gebildet werden, die – entweder direkt

oder indirekt – systemisch im maternalen Kreislauf zu einer Endothelschädigung führen (99).

Es kann also prinzipiell jedes Organ betroffen sein. Daher kann es, zusätzlich zu den Symptomen der Hypertonie und Proteinurie, zu einer Reihe weiterer Symptome kommen: einer Thrombozytopenie (18), einer Gerinnungsaktivierung (99), selten bis hin zu einer Disseminierten Intravasalen Gerinnung (*Disseminated Intravascular Coagulation*, DIC) (97), einer Transaminasenerhöhung (44) und einer Nierenfunktionsstörung, mit dem histopathologisch typischen Bild einer „glomerulären Endotheliose“ (121). Auch das Zentralnervensystem (ZNS) kann, im Sinne einer Hyperreflexie und Ausbreitung der Reflexzonen, beteiligt sein. Treten zusätzlich generalisierte, d.h. eklamptische Krampfanfälle auf, ist die Präeklampsie in die Eklampsie übergegangen.

Es gibt bis heute keinen (in der klinischen Praxis verwendbaren) prädiktiven Test, mit dem die Diagnose der Präeklampsie sicher zu stellen wäre und mit dem sich der weitere Verlauf der Erkrankung mit einiger Sicherheit vorhersagen ließe (35).

1.2 Das HLA-System

HLA-Moleküle (*Human Leucocyte Antigen*, Humanes Leukozytenantigen) sind Glykoproteine, die sich auf der Zelloberfläche aller (kernhaltigen) Zellen des menschlichen Organismus befinden. Sie stellen den „Erkennungscode“ dar, mit dem das Immunsystem eigene von fremden Zellen unterscheiden kann.

Bei den HLA-Molekülen handelt es sich um Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Aufgrund funktioneller und struktureller Differenzen unterscheidet man HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Moleküle.

Die Gene für die HLA-Moleküle sind im sog. HLA-Komplex auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 angeordnet. Er erstreckt sich über einen Abschnitt von 4 Mb (103) und umfaßt etwa 110 Gene, von denen die meisten für immunologisch relevante Proteine kodieren (20).

Bei den HLA-Genen unterscheidet man „klassische“ (HLA-A, B, C, D) und „nicht-klassische“ (HLA-E, F, G) HLA-Gene. Die klassischen HLA-Gene wiederum werden unterteilt in HLA-Klasse-I (HLA-A, B, C) und HLA-Klasse-II (HLA-D).

Die HLA-Klasse I-Gene kodieren nur für die α -Kette der HLA-Klasse I-Moleküle. Die β -Kette der HLA-Klasse I-Moleküle, das sog. β_2 -Mikroglobulin, ist nicht variabel und wird von einem Gen auf dem Chromosom 15 kodiert.

Die HLA-Klasse-II-Gene kodieren für die α - und die β -Untereinheit der HLA-Klasse II-Moleküle. Man unterscheidet die Gruppen HLA-DR, DP, und DQ. Die α -Kette des HLA-DR-Moleküls wird vom HLA-DRA-Gen kodiert, die β -Kette der meisten HLA-DR-Moleküle vom HLA-DRB1-Gen. Das HLA-DQA1-Gen kodiert für die α -Kette, das HLA-DQB1-Gen für die β -Kette der HLA-DQ-Moleküle.

In dem Genabschnitt zwischen den HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Genen befinden sich eine Reihe von Genen, die für Proteine kodieren, die zum Teil auch immunologische Funktionen erfüllen, so diejenigen für die Komplementfaktoren und für die Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Tumor-Nekrose-Faktor- β (TNF- β).

Die wichtigsten Merkmale des HLA-Komplexes sind eine multiple Allelie sowie ein ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*).

Der Begriff des Kopplungsungleichgewichtes besagt, dass manche HLA-Allele häufiger zusammen vererbt werden als die Produkte ihrer Genfrequenzen erwarten ließen (139).

Multiple Allelie bedeutet, dass es an den meisten HLA-Loci mehrere verschiedene Allele gibt, so dass sich auch eine große Anzahl unterschiedlicher HLA-Haplotypen ergibt. Diese wird noch dadurch erhöht, dass die Allele kodominant vererbt werden, d.h., dass die Allele beider Chromosomen auf jeder Zelle exprimiert werden.

Die Anzahl der Allele an den Loci ist sehr verschieden. So wurden am Genort HLA-DRB1 bisher 322 Allele identifiziert (73 Allele an den Loci HLA-DRB2 bis -DRB9). Am Locus HLA-DQB1 sind bisher 53 Allele bekannt.

Eine Reihe von Krankheiten sind mit dem HLA-System assoziiert, vorwiegend solche mit immunologischer oder autoimmunologischer Genese. Dabei sind die Autoimmunkrankheiten entweder mit einzelnen HLA-Allelen oder mit erweiterten Haplotypen assoziiert. Diese Assoziation bezieht sich entweder auf die Empfänglichkeit oder den Schweregrad der Erkrankung. Der Grad der Krankheitsassoziation reicht dabei von schwach, z.B. beim systemischen Lupus erythematoses, bis sehr stark, z.B. bei der Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew), bei der 90 % der Erkrankten Träger des Allels HLA-B27 sind (nur 8 % in der Normalbevölkerung).

Insbesondere hat man eine Assoziation des erweiterten Haplotyps HLA-A1-B8-DR3 mit mehreren Autoimmunkrankheiten (*Insulin-dependent Diabetes Mellitus*, systemischer Lupus erythematodes, Morbus Basedow, Zöliakie) gefunden. Man bezeichnet ihn daher auch als „Autoimmunhaplotyp“.

1.3 HLA und Präeklampsie

Zahlreiche epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Präeklampsie zu einem großen Teil hereditär ist (2, 5, 6, 24, 25, 26, 29, 31, 56, 132).

Zudem gibt es eindeutige Hinweise auf eine Immunpathogenese der Erkrankung:

So ist die Präeklampsie in den meisten Fällen eine Erkrankung der ersten Schwangerschaft. In nachfolgenden Schwangerschaften tritt sie nicht auf (30, 71). Dies gilt auch dann, wenn die erste Schwangerschaft nicht zu Ende ausgetragen wurde (130). Bedingung für eine protektive Wirkung einer ersten Schwangerschaft ist allerdings, dass weitere Schwangerschaften mit demselben Partner erfolgten. Bei einem Partnerwechsel geht die Protektion der ersten Schwangerschaft verloren (136).

Daraus hat man gefolgert, dass durch eine Schwangerschaft möglicherweise immunsuppressive Reaktionen induziert werden, welche ein Ausbrechen der Erkrankung bei weiteren Schwangerschaften verhindern (81, 146).

Bemerkenswert ist in dem Zusammenhang, dass offenbar das Risiko, an der Präeklampsie zu erkranken, bei einer nur kurzen Zeit des (ungeschützten) Geschlechtsverkehrs vor einer Schwangerschaft erhöht ist (102). Womöglich wird also durch die Spermaantigene selbst bei der Frau eine Protektion induziert. Auch Oralsex soll protektiv wirken, wie Koelman et al. (60) feststellten. Hierbei könnten lösliche HLA-Antigene die Agentien sein, die einen Schutz hervorrufen.

Auch autoimmunologische Phänomene scheinen bei der Präeklampsie eine Rolle zu spielen. So ist die Erkrankung mit Autoimmunfaktoren wie z.B. Antiphospholipid-Antikörpern und dem Lupus-Antikoagulans assoziiert (53, 57, 90, 147).

Die Toleranz des fetalen „Semiallograft“ scheint also die Voraussetzung für eine normale Schwangerschaft zu sein. Diese Toleranz könnte sich, wie bei der Organtransplantation, auf die HLA-Moleküle beziehen. Allerdings läßt sich das Transplantationsmodell nicht

ohne weiteres auf die Schwangerschaft übertragen. Denn der Syncytio- und Cytotrophoblast exprimieren nur die HLA-Antigene HLA-G (38, 39, 61) und HLA-C (59), welche beide minimalpolymorph sind und daher wahrscheinlich vom mütterlichen Immunsystem als eigen erkannt werden.

Insbesondere HLA-G ist wahrscheinlich für die Immuntoleranz des Feten verantwortlich (21).

Es gibt zahlreiche Untersuchungen über eine mögliche Rolle des HLA-Systems bei der Präeklampsie. Dabei wurden immer neue Assoziationen von HLA-Antigenen oder Haplotypen mit der Erkrankung gefunden. Diese konnten allerdings meist von anderen Untersuchern nicht bestätigt werden (58).

Bis vor einigen Jahren erfolgte die HLA-Typisierung ausschließlich serologisch, d.h. es konnten nur die HLA-Moleküle bestimmt werden, die tatsächlich auf den Zellen exprimiert werden, nicht aber die HLA-Allele selbst. Bei der serologischen Methode kommt es jedoch häufig zu Fehltypisierungen, v.a. am HLA-DR-Locus (79, 85). Mytilineos et al. (79) konnten zeigen, dass es bei der serologischen Methode zu Fehltypisierungen von bis zu 25 % kommt.

Molekulargenetische Methoden stehen dagegen erst seit einigen Jahren zur Verfügung, und sie sind nach wie vor sehr aufwändig. Die erste HLA-Typisierung mit molekulargenetischen Methoden erfolgte 1987 mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analyse (RFLP-Analyse). Hierbei handelt es sich um eine indirekte Nachweismethode. Erst 1990 wurde mit der Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ein direkter Nachweis der HLA-Allele möglich.

1.4 Zytokine und lösliche Zytokinrezeptoren

Zytokine sind Polypeptide, die als endogene Mediatoren bei vielen biologischen Prozessen eine Rolle spielen, insbesondere bei der Immunmodulation und -regulation, der Inflammation und der Hämatopoese. Sie wirken vorwiegend auf autokrinem und parakrinem Wege. Die Zytokine werden unterteilt in die Gruppe der Interleukine, der Interferone und der Lymphotoxine.

Die Zytokine beeinflussen sich gegenseitig in einem Netzwerk aus Induktion und Inhibition. Dieses „Zytokinnetzwerk“ ist am besten untersucht bei der inflammatorischen Antwort.

Stimuliert z.B. durch Endotoxin (aus zerfallenden Bakterien), produzieren Makrophagen Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1), die wiederum die Produktion von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und weiterer inflammatorischer Mediatoren induzieren. IL-8 ist ein potentes chemotaktisches Agens für Neutrophile. IL-6 dagegen inhibiert den Neutrophileninflux und die weitere Produktion von TNF- α und IL-1 und begrenzt so die inflammatorische Antwort (8).

In der Schwangerschaft steuern Zytokine die Interaktionen der Zellen maternaler und fetaler Herkunft in der fetoplazentaren Einheit. So kommt es während der Schwangerschaft zu einer massiven Freisetzung von Zytokinen in die Schwangerschaftskompartimente (32). Dabei dürfte das Zytokinmuster von großer Wichtigkeit für eine erfolgreiche Schwangerschaft sein. Man nimmt an, dass z.B. die Proliferation und Invasion des Trophoblasten durch Zytokine gesteuert wird. So könnten bei der Präeklampsie Störungen im Zytokinmuster zu einer verminderten Invasivität des Trophoblasten beitragen (50).

Da, wie oben erwähnt, wahrscheinlich die Toleranz des fetalen „Allograft“ durch das mütterliche Immunsystem die Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft ist, müssen während der Schwangerschaft die antifetalen Immunreaktionen des mütterlichen Immunsystems herunterreguliert werden. Mehrere Studien haben ergeben, dass ein Versagen der Immunregulation während der Schwangerschaft entweder zu wiederholten spontanen Aborten (*Recurrent Spontaneous Abortion*, RSA) (27, 67) oder zur Präeklampsie (135) führen könnte.

Die Immuninteraktionen an der materno-fetalen Grenzfläche sind zwar noch weitgehend unbekannt. Zytokine dürften aber als Modulatoren der Immuninteraktionen eine wichtige Rolle spielen.

In der fetoplazentaren Einheit werden Zytokine u.a. von Trophoblastzellen, Epithelzellen und Fibroblasten gebildet. Unter pathologischen Bedingungen, z.B. bei intrauteriner Infektion, sind auch Makrophagen und Dezidualzellen an der Produktion beteiligt (126). Die Zytokine im Fruchtwasser werden wahrscheinlich sowohl von maternalen (deziduale Membranen) als auch von fetalen Zellen (plazentare Membranen und der Fetus selbst) gebildet. Hauptsächlich stammen sie aber wohl von der maternalen Seite her (80).

Bei der Pathogenese der Präeklampsie spielen wahrscheinlich v.a. inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) eine Rolle. Es gibt Hinweise, dass bereits die normale

Schwangerschaft einen proinflammatorischen Reiz darstellt. Noch viel mehr ist dies bei der Präeklampsie der Fall (96, 116). Danach wäre auch die Endotheldysfunktion bei der Präeklampsie Teil der inflammatorischen Reaktion. Man nimmt an, dass in der (hypoxischen) Plazenta vermehrt proinflammatorische Zytokine gebildet werden (12). Diese könnten neutrophile Granulozyten bei ihrer Passage durch die Plazenta aktivieren, die dann (durch Freisetzung von Zytokinen und freien Radikalen) systemisch das Endothel schädigen. Es handelt sich also um eine unspezifische inflammatorische Reaktion, die getragen wird von den Zellen des non-adaptiven Immunsystems wie Granulozyten und Monozyten (10, 116, 129).

Daneben kommt es wahrscheinlich auch zu einer Dysfunktion des Gefäßendothels in der Plazenta selbst und zu einer Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-6 durch die Endothelzellen (129).

Bei intrauteriner Infektion kommt es im Fruchtwasser zu einem massiven Anstieg der Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 (105, 106, 109, 111, 112, 118, 126, 127). Die genannten Zytokine führen wahrscheinlich, durch Induktion der Prostaglandinsynthese in Amnion und Dezidua, zur Auslösung von vorzeitigen Wehen bei intraamniarer Infektion (70, 75, 76, 104, 107).

Auch bei der Initiierung der spontanen Wehen am Geburtstermin scheinen inflammatorische Zytokine beteiligt zu sein (46, 128), da es auch hierbei zu einem, wenn auch vergleichsweise nur mäßigen Anstieg von TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 im Fruchtwasser kommt (86, 87, 108, 111, 117, 118, 126, 137). Man nimmt daher an, dass die spontanen Wehen am Geburtstermin durch denselben Mechanismus wie bei intraamniarer Infektion, nämlich durch Induktion der Prostaglandinsynthese, ausgelöst werden (86).

1.4.1 Tumor-Nekrose-Faktor- α

Das Zytokin TNF- α wird v.a. von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten gebildet. Zu den wichtigsten Funktionen des Zytokins gehören die Regulation der Immunantwort, die Modulation von Zellwachstum und -differenzierung sowie die Steuerung der Gerinnung und der Endothelzellfunktion (13, 40).

TNF- α wird auch eine zentrale Rolle beim normalen Schwangerschaftsablauf, insbesondere bei der Plazentation, zugeschrieben (50). In der uteroplazentaren Einheit wird es wahr-

scheinlich von Makrophagen, Trophoblastzellen und Dezidualzellen gebildet (23, 126). Mögliche Produzenten von TNF- α im Fruchtwasser sind die Zellen des Amnionepithels (126).

1.4.2 Interleukin-1 β und Interleukin-1-Rezeptorantagonist

IL-1 β (ebenso wie IL-1 α) wird von aktivierten Monozyten/Makrophagen auf inflammatorische Reize, wie z.B. Endotoxin, hin gebildet. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der inflammatorischen Antwort auf Gewebsverletzung oder Infektion (114). So induziert IL-1 β weitere Zytokine und andere Entzündungsmediatoren (17).

In der Schwangerschaft induziert IL-1 β - ebenso wie TNF- α und IL-6 (s.o.) - die Prostaglandinsynthese und die Kollagenaseaktivität und ist somit wahrscheinlich hauptverantwortlich für die Induktion von vorzeitigen Wehen bei intraamniotischer Infektion.

Der Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) wird ebenfalls zur Gruppe der Zytokine gerechnet. Er bindet wie IL-1 α und IL-1 β an den IL-1 β -Rezeptor, allerdings ohne eine Effektorfunktion auszuüben. IL-1RA wirkt somit als kompetitiver Antagonist zu IL-1 β (4). Er inhibiert auch die Expression von IL-8 und die akute Entzündungsreaktion (8).

In der uteroplazentalen Einheit werden IL-1 β und IL-1RA, d.h. Agonist und Antagonist, von denselben Zellen gebildet, und zwar von Trophoblastzellen, von Zellen des Amnion und des Chorion sowie von glatten Gefäßmuskulzellen und der Dezidua (8).

Die Rolle von IL-1RA in der normalen Schwangerschaft ist bisher ungeklärt. Im Tierversuch ließen sich allerdings durch die Gabe von IL-1RA vorzeitige Wehen verhindern (113). Da IL-1RA im Fruchtwasser in hohen, im Verlauf der Schwangerschaft noch ansteigenden Konzentrationen vorhanden ist (114), verhindert es so möglicherweise die Auslösung von Wehen durch IL-1 β .

Mögliche Quellen von IL-1RA im Fruchtwasser sind der fetale Urin (114), das Amnionepithel (8), die fetalen Membranen, die Dezidua, Sekrete aus dem fetalen Gastrointestinal- und Respirationstrakt sowie Keratinozyten von der Haut des Feten (114).

Man hat gefunden, dass die IL-1RA-Spiegel im Fruchtwasser bei weiblichen Feten höher als bei männlichen Feten sind (16, 114). Eine Ursache hierfür ist bisher nicht bekannt.

1.4.3 Interleukin-6

Zu den Produzenten von IL-6 gehören Monozyten, Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten (37). Das Zytokin wird gebildet bei Gewebsverletzung und Inflammation (150).

IL-6 hat seine Aufgaben in der Regulation der Immunantwort, der Hämatopoese und der Inflammation. Die wichtigsten Funktionen im einzelnen sind:

- die Induktion der Akute-Phase-Proteine in der Leber (43),
- Wachstum und Differenzierung von B-Lymphozyten (33),
- die Aktivierung von T-Lymphozyten (138).

Die Rolle von IL-6 in der normalen Schwangerschaft ist noch unklar. In der fetoplazentaren Einheit konnte es in Cytotrophoblastzellen lokalisiert werden (126). Das IL-6 im Fruchtwasser könnte entweder von der Dezidua oder von fetalen Zellen herkommen (125).

1.4.4 Interleukin-8

IL-8 wird v.a. von aktivierten Makrophagen in Reaktion auf bakterielle Produkte gebildet. Aber auch andere Zelltypen, wie Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, sind in der Lage, IL-8 zu produzieren. Bei diesen Zellen wird die Produktion meist durch andere Zytokine wie TNF- α und IL-1 induziert (93, 110).

IL-8 hat chemotaktische Eigenschaften, d.h. es bringt Neutrophile an den Ort der Entzündung (9, 110).

Die Rolle von IL-8 in der Schwangerschaft ist noch unbekannt. In der fetoplazentaren Einheit wird es von Granulozyten, Makrophagen und hämatopoetischen Zellen (in der Leber des Feten) gebildet (126, 127). IL-8 im Fruchtwasser stammt (bei intraamniarer Infektion) hauptsächlich von choriodezidualen Zellen und vom Feten selbst her (123).

1.4.5 lösliche Zytokinrezeptoren

Die Wirkungen der Zytokine werden durch spezifische Rezeptoren auf den Zellmembranen vermittelt. Die extrazellulären Domänen der membrangebundenen Rezeptoren können durch

proteolytische Spaltung abgetrennt werden (*shedding*). Sie kommen dann als sog. lösliche Rezeptoren (*soluble receptors*) in den Körperflüssigkeiten vor.

Die löslichen Rezeptoren können zugleich agonistische und antagonistische Funktionen haben.

1.4.5.1 lösliche TNF-Rezeptoren (sTNF-R)

Nach ihrem Molekulargewicht unterscheidet man zwei spezifische (zellständige) Rezeptoren für TNF- α : p55 TNF-R mit einem Molekulargewicht von 55 kD und p75 TNF-R mit einem Molekulargewicht von 75 kD. Die entsprechenden löslichen Rezeptoren p55 sTNF-R und p75 sTNF-R sind physiologisch im Serum, im Urin und im Fruchtwasser vorhanden (88).

p55 TNF-R hat wahrscheinlich die größere biologische Bedeutung, da er die Wirkungen von TNF- α auf Endothelzellen, die Hauptzielzellen von TNF- α (40), vermittelt (89). Wir haben daher im Fruchtwasser nur p55 sTNF-R bestimmt (Anm.: der Einfachheit halber ist im folgenden nur von sTNF-R die Rede).

Der Anstieg der sTNF-R erfolgt nach einer Ausschüttung von TNF- α . Dabei bleiben die sTNF-R länger erhöht als das Zytokin, welches wegen seiner kurzen Halbwertszeit von ca. 15 min (im Blut) (68) häufig einer Detektion entgeht. Sie gelten daher als Marker einer TNF- α -Ausschüttung (63, 148).

Die Funktion der sTNF-R ist unklar. Wahrscheinlich stellen sie einen protektiven Mechanismus der Zielzellen gegen eine Überproduktion von TNF- α dar (88). Das *shedding* der sTNF-R wird möglicherweise durch TNF- α oder IL-6 induziert (3, 65).

1.4.5.2 löslicher IL-6-Rezeptor (sIL-6-R)

Der IL-6-R-Komplex besteht aus zwei miteinander verbundenen Einheiten: dem Signaltransduktionsprotein (gp130) und dem Ligandenbindungsprotein (gp180). Letzteres entspricht dem IL-6-R. Durch *shedding* der extrazellulären Domäne des IL-6-R entsteht sIL-6-R. Der Komplex aus sIL-6-R und IL-6 löst die Signaltransduktion aus (88).

sIL-6-R ist physiologischer Bestandteil des Serums, des Urins und des Fruchtwassers (83, 118, 133).

1.5 TNF-Polymorphismen

Es wurden (bei gesunden Probanden) interindividuelle Unterschiede in der Höhe der TNF- α -Produktion (ebenso der IL-1 β -Produktion) auf einen adäquaten Reiz hin gefunden (51, 77). Diese Unterschiede waren stabil, d.h. sie waren unabhängig von der Art und der Dosis des Stimulus (z.B. Lipopolysaccharide, LPS). Allerdings gilt dies nur für Männer. Bei Frauen kam es bei wiederholter Applikation von z.B. LPS zu Fluktuationen der TNF- α -Sekretion (51).

Dies könnte darauf hindeuten, dass es genetisch festgelegte Unterschiede in der Induzierbarkeit der TNF- α -Produktion gibt. So hat man gefunden, dass die Höhe der TNF- α -Produktion mit dem HLA-System assoziiert ist. Wenn die Angaben auch nicht einheitlich sind, so scheinen doch die Allele HLA-DR1, DR3 und DR4 mit hoher TNF- α -Produktion (51, 91, 93), die HLA-Allele DR2 und DR5 dagegen mit einer niedrigen Sekretionsrate des Zytokins assoziiert zu sein (11, 51, 91, 93).

Bei Frauen, welche an der Präeklampsie erkrankten, waren die kombinierten Genfrequenzen von HLA-DR1 und DR3 höher, diejenigen von DR2 und DR5 niedriger als bei nicht-präeklampischen Frauen (145). Dies könnte also darauf hindeuten, dass die Präeklampsie mit einer hohen Induzierbarkeit von TNF- α einhergeht.

Eine Erklärung für die Assoziation der Kapazität der TNF- α -Produktion mit dem HLA-Haplotyp konnte bisher nicht gefunden werden. Man nimmt aber an, dass dies auf Polymorphismen in regulatorischen Abschnitten der TNF-Gene oder in gekoppelten Genen zurückzuführen ist (143).

Die Gene für TNF- α und TNF- β sind gemeinschaftlich in einem 7 kb-Abschnitt innerhalb des HLA-Komplexes angeordnet, ca. 250 kb zentromerisch des HLA-B-Locus und 850 kb telomerisch der HLA-DR-Gene.

In beiden Genen und in deren Satelliten sind mehrere Polymorphismen gefunden worden. Zwei sind besonders gut auf ihren Einfluß auf die Höhe der TNF- α -Produktion hin untersucht: ein diallelischer Polymorphismus in der Promotorregion des TNF- α -Gens (an Stelle -308) (141), dessen Allele mit TNFA1 und TNFA2 bezeichnet werden, sowie ein weiterer diallelischer Polymorphismus im ersten Intron des TNF- β -Gens (an Stelle +250), dessen Allele TNFB1 und TNFB2 benannt wurden.

Der Polymorphismus in der Promotorregion des TNF- α -Gens (TNFA-Polymorphismus) könnte zu einer Änderung der Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren und somit zu einer veränderten Produktionsrate des Zytokins führen (68). Der genaue molekulare Mechanismus konnte jedoch bisher nicht geklärt werden (143).

Der TNFA-Polymorphismus ist mit einigen Infektionskrankheiten assoziiert, welche auch durch eine hohe Produktionsrate von TNF- α gekennzeichnet sind (19, 28, 72, 115).

Der Polymorphismus im TNF- β -Gen (TNFB-Polymorphismus) liegt weiter von der Transkriptions-*start site* des TNF- α -Gens entfernt. Die Produktion von TNF- α könnte durch *cis*-agierende, die Transkription regulierende Elemente wie *enhancer* erhöht werden (68).

Beide TNF-Polymorphismen sind mit der Empfänglichkeit oder dem Schweregrad mehrerer Krankheiten, insbesondere Autoimmunkrankheiten, assoziiert. So ist z.B. der TNFB-Polymorphismus mit dem *Insulin-dependent Diabetes Mellitus* und dem *Lupus erythematoses* assoziiert (41, 93).

Einige Untersucher fanden, dass das TNFA2-Allel, welches das seltenere Allel ist (141), mit einer höheren TNF- α -Sekretion verbunden ist als das TNFA1-Allel (69, 143). Andere Untersucher konnten dagegen keine Unterschiede in der Höhe der TNF- α -Produktion zwischen den Trägern der Allele nachweisen (15, 131).

Das TNFA2-Allel ist besonders stark mit dem erweiterten Haplotyp HLA-A1-B8-DR3-DQ2 assoziiert (142), welcher wiederum mit einer hohen TNF- α -Produktion einhergeht (1, 51). Das TNFA1-Allel ist mit HLA-DR4 und DR6 assoziiert (14, 142).

Bei den TNFB-Allelen ist das TNFB2-Allel häufiger als das TNFB1-Allel (42, 131), und es ist mit einer höheren TNF- α -Sekretion assoziiert (78, 93).

Bei der Präeklampsie konnten Chen et al. (22) zeigen, dass das TNFA1-Allel bei Frauen mit Präeklampsie häufiger vertreten war als das TNFA2-Allel. Dies konnte allerdings in nachfolgenden Untersuchungen nicht bestätigt werden (36, 64, 68).

1.6 Fragestellung

Als wahrscheinlichste Ursache der Präeklampsie gilt eine Störung der materno-fetalen Immuninteraktionen.

Es wurden daher die folgenden immunologischen Parameter untersucht:

1. die mütterlichen HLA-Allele an den Loci DRB1 und DQB1,
2. die Konzentrationen der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und des IL-1RA sowie der löslichen Zytokinrezeptoren sTNF-R und sIL-6-R im Fruchtwasser,
3. die mütterlichen TNF-Polymorphismen TNFA (-308) und TNFB (+205).

Bei der Auswertung der Ergebnisse haben wir auch mögliche Kopplungen der HLA-Allele mit den TNF-Allelen untersucht.

2 Material

2.1 Geräte

Auto-LiPA (Innogenetics, Temse/Belgien, Vertrieb durch Abbott, Wiesbaden)

Bubble Jet Printer BJ-300 (Canon, Tokyo/Japan)

Elektrophorese-Netzgerät GPS 200/400 (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala/Schweden)

ELISA-Reader Anthos Reader 2001 (Anthos Labtec Instruments, Wals, Salzburg/Österreich)

ELISA-Washer Biotest ELISA-Washer II (Biotest, Dreieich)

Gefrierschrank (Forma Scientific, Inc., Marietta, OH/USA)

Inkubator (Heraeus, Hamburg)

Laborwaage LC 6200 S (Sartorius, Göttingen)

Magnetrührer MR 3002 (Heidolph, Kelheim)

Mikrowellenherd (Bosch, München)

NEC Pinwriter P 30 (NEC Computers Inc., Sacramento, CA/USA)

pH-Meter PHM 83 AUTOCAL (Radiometer, Kopenhagen/Dänemark)

Schüttelgeräte:

- Reax 2000 (Heidolph, Kelheim)
- Titramax 100 (Heidolph, Kelheim)

Spectrophotometer U-3000 (Hitachi, Tokyo/Japan)

The Imager Documentation System (Appligene, Pleasanton, CA/USA)

Thermocycler:

- DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Instruments, Inc., Norwalk, CT/USA)
- GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Instruments, Inc., Norwalk, CT/USA)
- GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Instruments, Inc., Norwalk, CT/USA)

Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)

UV-Betrachter N 90 KW 254 nm (Konrad Benda, Wiesloch)

UV-Tisch N90 KW 254 nm (Konrad Benda, Wiesloch)

Wasserbad (GFL, Burgwedel)

Werkbank II, A/B3 (NuAire, Inc., Plymouth, MN/USA)

Zentrifugen:

- Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg)

- Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hamburg)
- Varifuge 3.2 RS (Heraeus, Hamburg)

2.2 Labormaterialien

Biosphere *filter tips*, 10 μ l, 100 μ l (Sarstedt, Nümbrecht)
 Combitips 5 ml (Eppendorf, Hamburg)
 Einmal-Untersuchungshandschuhe Peha-soft (Hartmann, Heidenheim)
 Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
 PCR Tubes 0,2 ml (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)
 Pipetten 0,5 - 10 μ l, 10 -100 μ l, 200 - 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg)
 Pipetten 10 ml, 25 ml (Greiner, Nürtingen)
 Pipettenspitzen 0,5 - 10 μ l, 10 -100 μ l, 200 - 1000 μ l (Greiner, Nürtingen)
 PP-Röhrchen, steril, 50 ml (Greiner, Nürtingen)
 Reagiergefäße 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
 15 ml Röhre, steril (Sarstedt, Nümbrecht)
 Röhren 75 x 11,5 mm aus Glas (Sarstedt, Nümbrecht)
 Röhren-Tubes, 5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
 Safeseat-Tips bis 10 μ l, 100 μ l (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)
 S-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht)
 Thermal Paper for Mitsubishi Video Copy Processor K61B (Mitsubishi Electric, Japan)
 Wägebapier (neoLab, Heidelberg)

2.3 Testkits

Amlifizierungs-Kit (P-1068) (Innogenetics, Temse/B, Vertrieb durch Abbott, Wiesbaden)
Human IL-1ra ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN/USA)
 IL-1 β ELISA (Bender MedSystems Diagnostics, Wien/Österreich)
 IL-6 ELISA (Bender MedSystems Diagnostics, Wien/Österreich)
 IL-8/Nap-1 ELISA (Bender MedSystems Diagnostics, Wien/Österreich)
 INNO-LiPA DQB *Typing Test* (Innogenetics, Temse/B, Vertrieb durch Abbott, Wiesbaden)

LiPA HLA-DRB *Decoder* (Innogenetics, Temse/B, Vertrieb durch Abbott, Wiesbaden)

Micro SSP Generic HLA Class II DNA Typing Kit (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA/USA)

sTNF-R (60 kDa) ELISA (Bender MedSystems Diagnostics, Wien/Österreich)

TNF- α ELISA (Bender MedSystems Diagnostics, Wien/Österreich)

2.4 Reagentien für molekularbiologische Arbeiten

AmpliTaq DNA Polymerase 5 U/ μ l (Perkin Elmer Instruments, Inc., Norwalk, CT/USA)

123 bp DNA Leiter (Life Technologies, Karlsruhe)

dNTP-Mix (Promega, Mannheim)

Ethidiumbromid Tbl., 10 mg (Appligene, Pleasanton, CA/USA)

Mineralöl (Perkin Elmer Instruments, Inc., Norwalk, CT/USA)

NEBuffer 10x (New England BioLabs, Beverly, MA/USA)

10x PCR Puffer (Perkin Elmer Instruments, Inc., Norwalk, CT/USA)

sense und *antisense* Primer für die Amplifikation der Gene für TNF- α und TNF- β (TIB MOLBIOL, Berlin)

Restriktionsenzym *Nco* I 10.000 U/ml (New England BioLabs, Beverly, MA/USA)

2.5 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Agarose NA (Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)

Ammoniumchlorid (NH₄Cl) (Merck, Darmstadt)

Aqua ad iniectabilia (B. Braun Melsungen, Melsungen)

Borsäure (Merck, Darmstadt)

Bromphenolblau (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA)

DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PO₄)) (Bio Whittaker, Verviers/Belgien)

Ficoll 400 (Merck, Darmstadt)

Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃) (Merck, Darmstadt)

Natriumchlorid (NaCl) (Merck, Darmstadt)

NuSieve Agarose (Paesel und Lorei, Frankfurt a.M.)

Plasmasteril (6 % Hydroxyethylstärke (HES 450/07) in isotonischer NaCl-Lösung)
Fresenius, Bad Homburg)

Sodiumdodecylsulfat (SDS) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA/USA)

Titriplex[®] III (Ethylendinitrioltetraessigsäure, Dinatrium-Dihydrat) (Merck, Darmstadt)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt)

Xylene Cyanole FF (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA/USA)

2.6 Computersoftware

LIA-LiPA *Interpretation Software* (Innogenetics, Temse/Belgien, Vertrieb durch Abbott, Wiesbaden)

U-3000 (Software zur Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration) (Hitachi, Tokyo/Japan)

3 Methoden

3.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs

Das Untersuchungskollektiv bestand aus 51 Schwangeren. 8 Frauen erkrankten während der Schwangerschaft an einer Präeklampsie bzw. an einem HELLP-Syndrom (Studiengruppe) – 3 an einer Präeklampsie und 5 an HELLP-Syndrom. In der Kontrollgruppe befanden sich 43 Schwangere, welche (in der Index-Schwangerschaft) weder an einer Präeklampsie noch an einem HELLP-Syndrom erkrankten.

Alle Frauen wurden durch (primäre oder sekundäre) Sectio caesarea entbunden.

5 der 51 Schwangeren hatten eine Zwillingschwangerschaft, 1 in der Studiengruppe und 4 in der Kontrollgruppe. Höhergradige Schwangerschaften waren nicht vertreten.

Bei dreien der Zwillingspaare konnten wir Fruchtwasser aus beiden Fruchtblasen gewinnen. Hier wurden auch alle 6 Proben untersucht. Bei zweien der Zwillingspaare gelang es dagegen nur aus je einer Fruchtblase Fruchtwasser zu gewinnen (oder wir konnten zwar Fruchtwasser gewinnen; es war dann aber nicht ausreichend für die Zytokinmessungen), so dass auch nur das Fruchtwasser aus einer der Fruchtblasen untersucht werden konnte.

Es standen somit für die Konzentrationsbestimmungen der Zytokine und löslichen Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser 52 Proben zur Verfügung (8 aus präeklampsischen Schwangerschaften, 44 aus nicht-präeklampsischen Schwangerschaften).

Als Diagnosekriterien für die Präeklampsie galten die von der *US National Institutes of Health working group on hypertension in pregnancy* festgelegten Kriterien (49, 149):

- ein Blutdruckanstieg - welcher in der 2. Schwangerschaftshälfte (≥ 20 . SSW) erfolgte - von ≥ 30 mmHg systolisch und/oder ≥ 15 mmHg diastolisch gegenüber vergleichenden Messungen in der Frühschwangerschaft bzw., wenn diese fehlten, ein Blutdruck $\geq 140/90$ mmHg
- eine Proteinurie (≥ 3 g/24 h).

Folgende Laborbefunde führten zur Diagnose eines HELLP-Syndroms:

- Hämolyse (charakteristischer Blutausschlag, Lactatdehydrogenase (LDH) > 600 U/l)
- Aspartataminotransferase (AST) > 70 U/l

- Thrombozytopenie (Thrombozyten < 100.000/ μ l).

Die Diagnosen (Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom) haben wir den Patientenakten entnommen. Sie wurden von den Ärzten der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck gestellt.

Die Frauen in der Studiengruppe waren zwischen 28 und 38 Jahre (Median: 32 Jahre), in der Kontrollgruppe zwischen 18 und 39 Jahre alt (Median: 31 Jahre). Der Geburtstermin lag in der Studiengruppe zwischen der 32+4 und 39+1 SSW (Median: 35+4 SSW), in der Kontrollgruppe zwischen der 28+4 und 41+3 SSW (Median: 38+0 SSW). Für die Frauen waren die Index-Schwangerschaften die erste bis achte Schwangerschaft (1- bis 8-Gravidae), die Geburten die erste bis fünfte Geburt (1- bis 5-Parae) (Tab. 1).

Tab. 1: Klinische Daten aller untersuchten Patientinnen mit Angabe von Median sowie ggf. von minimalem und maximalem Wert (in Klammern). *p < 0,05.

	Kontrollgruppe n = 43	Studiengruppe n = 8
Index-Schwangerschaft:		
Alter der Patientinnen (in Jahren)	31 (18 - 39)	32 (28 - 38)
Gravidität	2 (1 - 8)	3 (1 - 5)
Parität	2 (1 - 8)	2 (1 - 2)
SSW	38+0 (28+4 - 41+3)	35+4 (32+4 - 39+1)
Geburtsgewicht (in g)	3025 (570 - 4750)	2080 (1340 - 3980)
Entbindung \leq 28. SSW	1	0
Entbindung 29.-32. SSW	1	1
Entbindung \geq 33. SSW	41	7
Mehrlingsschwangerschaft	4	1
männlicher Fetus	23	6
HELLP-Syndrom	0	5
sekundäre Sectio	6	1
geburtshilfliche Anamnese:		
1-Gravidae	18	3
1-Parae	19	3
Aborte in früheren Schwangerschaften	8	3

Es wurden nur Frauen in die Studiengruppe aufgenommen, welche durch Sectio caesarea entbunden wurden, vorzugsweise durch primäre, d.h. geplante Sectio. 7 Patientinnen wurden durch sekundäre, d.h. nicht geplante Sectio entbunden (1 in der Patientengruppe, 6 in der Kontrollgruppe).

Es wurden nur Schwangere ohne klinische Anzeichen einer intrauterinen Infektion und ohne sonstige Infektionskrankheiten ausgewählt.

3.2 HLA-DRB1- und HLA-DQB1-Typisierung

3.2.1 Leukozytenisolierung

Die HLA-Typisierung an den Loci DRB1 und DQB1 erfolgte mit Hilfe der PCR. Hierfür benötigten wir DNA in reiner Form.

Dazu mußten zunächst Leukozyten aus der EDTA-Blutprobe isoliert, d.h. von den Erythrozyten getrennt werden. Dies gelang mittels eines Dichtegradienten, wobei die Erythrozyten sedimentierten und die Leukozyten im Trennmedium zurückblieben.

verwendete Reagenzien:

Reagens	Zusammensetzung	Menge
Plasmasteril*	6 % Hydroxyethylstärke (HES 450/07) in isotoni-scher NaCl-Lösung	-
<i>Dulbecco's Phosphate Buf-fer Salt (DPBS)*</i>	CaCl ₂ KCl KH ₂ PO ₄ MgCl ₂ ×6H ₂ O NaCl Na ₂ HPO ₄ ×7H ₂ O Aqua dest.	0,1 g 0,3 g 0,2 g 0,1 g 8,0 g 2,16 g ad 1000 g

Hämolysepuffer	NH ₄ Cl	4,15 g
	KHCO ₃	0,5 g
	Titriplex [®] III (EDTA)	0,018 g
	Aqua dest.	ad 500 g

*Fertiglösung vom Hersteller

Vorgehen:

- S-Monovette 2 min bei 3040 g zentrifugieren, Überstand (Plasma) verwerfen
- Blut und Plasmasteril getrennt auf 37°C erwärmen
- Blut zum Plasmasteril geben und 30 min bei 37°C inkubieren
- Überstand abheben und 5 min bei 690 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellpellet aufschütteln, mit 3 ml Hämolysepuffer 3 min bei 37°C inkubieren
- mit DPBS auffüllen und 5 min bei 690 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellpellet aufschütteln, nochmals mit DPBS auffüllen und 5 min bei 690 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellpellet aufschütteln, 2 - 3 ml DPBS dazugeben und in Cryo Tubes überführen
- Cryo Tubes 5 min bei 690 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellpellet aufschütteln und Cryo Tubes bei -80°C einfrieren

3.2.2 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion aus den Leukozyten haben wir die Methode von MILLER (74) in einer modifizierten Form durchgeführt.

Das Prinzip der Methode besteht darin, zunächst mittels einer Protease die Zellen zu lysieren und die Zellproteine aufzulösen. Dann wird die DNA durch Zugabe von Ethanol abs. ausgefällt. Sie wird in Ethanol 70 % gewaschen und wieder in Wasser gelöst.

verwendete Reagenzien:

Reagens	Zusammensetzung	Menge
Lysepuffer	Tris (10mM)	1,21 g
	Titriplex [®] III (EDTA) (10mM)	3,72 g
	NaCl (50 mM)	2,90 g
	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5,0 g
	Aqua dest.	ad 1000 g
	(pH 7,6 steril filtrieren)	

Vorgehen:

- Leukozyten in 6 ml Lysepuffer resuspendieren und 2 h im Wasserbad bei 56°C inkubieren
- 2,4 ml 6M NaCl dazugeben und 50mal schwenken
- 15 min bei 1950 g und 4°C zentrifugieren
- Überstand in neues Gefäß dekantieren und wiederum 15 min bei 1950 g und 4°C zentrifugieren
- Überstand in neues Gefäß dekantieren und mit der 2,5-fachen Menge Ethanol abs. überschichten
- vorsichtig schwenken, bis ein vollständig geknäuelter DNA-Faden vorliegt
- DNA-Faden in Ethanol 70 % geben und 2 - 5 min bei 1810 g zentrifugieren
- Ethanol dekantieren und DNA ca. 30 min trocknen lassen
- 1 ml Aqua dest. dazugeben und über Nacht bei 37°C inkubieren
- Konzentration photometrisch bestimmen und DNA-Lösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml herstellen; die DNA sollte in einer Reinheit von mindestens 1,6 - 1,8 OD (E_{260}/E_{280}) vorliegen (Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm resp. 280 nm; DNA hat ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm)
- DNA-Lösung bei -80°C einfrieren

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren. Durch sie kann sowohl doppelsträngige DNA als auch einzelsträngige RNA vervielfältigt werden.

Bei der PCR macht man sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen zunutze, doppelsträngige DNA zu vervielfältigen. Die Voraussetzung dafür ist allerdings ein freies 3'-OH-Ende eines der DNA-Einzelstränge. Dieses wird künstlich geschaffen, indem man dem Reaktionsansatz kurze DNA-Fragmente von ca. 20 Nucleotiden Länge, sog. sequenzspezifische Oligonucleotid-Primer (*sense* Primer), zugibt. Diese lagern sich nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung an den DNA-Abschnitt an, der vervielfältigt werden soll (*annealing*).

Zuvor muß jedoch die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgespalten werden. Dazu wird der Reaktionsansatz kurzzeitig auf 92 - 98°C erhitzt (Denaturierung). Bei der anschließenden Abkühlung des Ansatzes erfolgt die Anlagerung der Oligonucleotid-Primer. Die optimale Temperatur für die Anlagerung ist von dem jeweils verwendeten Oligonucleotid-Primer abhängig.

Anschließend wird der Ansatz wiederum auf 72°C erhitzt. Dies ist das Temperaturoptimum für die DNA-Polymerase. Diese verlängert nun die Oligonucleotid-Primer (Extension). So entsteht ein neuer DNA-Doppelstrang, der zu dem Ausgangsstrang identisch ist.

Gibt man nun einen weiteren Oligonucleotid-Primer zu, der sich an den anderen, übriggebliebenen DNA-Einzelstrang anlagert (*antisense* Primer), so verdoppelt sich die anfangs vorhandene DNA-Menge.

Wiederholt man die beschriebenen Schritte mehrere Male, so erreicht man eine exponentielle Vervielfältigung der DNA. Um eine für die PCR ausreichende Menge an DNA zu erhalten, sind etwa 30 - 35 Zyklen, bestehend aus Denaturierung, *annealing* und Extension, notwendig.

3.2.4 Gelelektrophorese

Nach Durchführung der PCR war es notwendig, den Erfolg derselben zu überprüfen, d.h. zu kontrollieren, ob eine Amplifikation stattgefunden hatte und ob nur der zu analysierende Genabschnitt oder noch andere Abschnitte vervielfältigt worden waren. In diesem Fall hät-

te die PCR wiederholt werden müssen. Zu diesem Zweck wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Bei der Gelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung des PCR-Produktes nach der Größe der DNA-Fragmente. Durch Vergleich mit einem Längenstandard (= Fragmente bekannter Größe) ist eine Zuordnung der Fragmente möglich.

Als Trägermaterial für die Gelelektrophorese verwendet man Agarosegele. Die Wahl der Art und der Konzentration der Agarose richtet sich nach der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente im Amplifikat. Bei kleineren Fragmenten wählt man eine höhere Konzentration der Agarose und umgekehrt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente im Agarosegel ist proportional der angelegten Spannung.

Als Laufpuffer verwendeten wir Tris-Borat-Puffer (TBE-Puffer). Dem Amplifikat haben wir außerdem einen Auftragspuffer zugesetzt. Dieser diente zum einen dazu, die Dichte der DNA zu erhöhen, so dass die DNA-Lösung in die Geltaschen absank und nicht in den Laufpuffer diffundierte. Zum anderen enthielt der Auftragspuffer einen Farbstoff, durch den die Wanderung der DNA im Gel sichtbar gemacht werden konnte.

verwendete Reagenzien:

Reagens	Zusammensetzung	Menge
1x TBE-Puffer	Tris Borsäure Titriplex [®] III (EDTA) (pH 8,0)	108 g 55 g 7,4 g
10x TBE-Puffer (Laufpuffer)	1x TBE-Puffer Aqua dest.	100 ml ad 1000 ml
Auftragspuffer	Bromphenolblau <i>Xylene Cyanole FF</i> Ficoll 400 Aqua dest. (Lagerung bei Raumtemperatur)	0,025 g 0,025 g 1,5 g ad 10 g

DNA-Längenstandard	123 bp DNA-Leiter	120 µl
	10x PCR-Puffer	40 µl
	Aqua dest.	160 µl
	Auftragspuffer	80 µl

Vorgehen:

- 1 g Agarose NA (für ein 2 %iges Gel) bzw. 2 g Agarose NuSieve (für ein 4 %iges Gel) 3:1 zu 50 ml 10x TBE-Puffer geben und in der Mikrowelle ca. 2 min bei 600 W aufkochen, bis sich die Agarose aufgelöst hat
- im Wasserbad auf 60°C abkühlen lassen
- Gel in Schale gießen, Gelkämme einsetzen und Gel erstarren lassen
- Schale mit Gel in Elektrophoresekammer hängen und diese mit 10x TBE-Puffer auffüllen
- weiter „Allelspezifische Hybridisierung“ (s.u.)

3.2.5 Ethidiumbromidfärbung

Nach der Gelelektrophorese müssen die DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden. Dazu haben wir die Gele in ein Ethidiumbromidbad gelegt. Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur in doppelsträngige DNA interkaliert. Unter UV-Bestrahlung emittiert er Licht im orange-roten Bereich (590 nm).

Ethidiumbromidlösung:

1 Tbl. (10 mg) Ethidiumbromid in 1 ml Aqua dest. auflösen (Stocklösung); zu 100 µl Stocklösung 100 ml 10x TBE-Puffer dazugeben

3.2.6 Allelspezifische Hybridisierung (*Reverse-Dot-Blot*)

Zur Typisierung an den Loci HLA-DRB1 und HLA-DQB1 haben wir zunächst die allelspezifische Hybridisierung (*Reverse-Dot-Blot*) durchgeführt. Wir verwendeten hierzu den HLA-DRB *decoder*[®] und den INNO-LiPA DQB *Typing Test*[®].

In einem ersten Schritt wurde das zweite Exon des HLA-DRB1- bzw. des HLA-DQB1-Locus mittels PCR amplifiziert. Hierzu verwendeten wir den Amplifizierungs-Kit (P-1068)[®]. Der Primer - und somit auch das Amplifikat - waren biotinyliert.

Bei der allelspezifischen Hybridisierung dienen synthetische Oligonucleotide mit einer Länge von bis zu 150 Nucleotiden als DNA-Sonden. Diese sind der DNA komplementär und werden daher „sequenzspezifische“ Oligonucleotide genannt. Die sequenzspezifischen Oligonucleotide sind parallel auf einer Membran gebunden.

Die DNA wird zunächst denaturiert und gegen die sequenzspezifischen Oligonucleotide hybridisiert, d.h. die (biotinylierten) DNA-Einzelstränge binden nach dem Prinzip der Basenpaarung an die auf der Membran aufgetragenen Oligonucleotide. Bei einem nachfolgenden Waschschrift wird nicht gebundene DNA entfernt.

Anschließend wird Streptavidin, an welches das Enzym Alkalische Phosphatase gebunden ist, zugegeben. Das Streptavidin bindet an die biotinylierten DNA-Einzelstränge. Schließlich wird als Substrat für die Alkalische Phosphatase ein Chromogen zugegeben, das von dem Enzym zu einem Farbstoff umgesetzt wird. Man erhält so ein allelspezifisches Bandenmuster, das mit Hilfe einer speziellen Software ausgewertet werden kann.

Das beschriebene Verfahren wurde mit dem Auto-LiPA[®] durchgeführt.

Mit Hilfe der allelspezifischen Hybridisierung konnte der HLA-Haplotyp am Locus DQB1 bei allen 48 Patientinnen eindeutig bestimmt werden. Bei der Typisierung am Locus HLA-DRB1 gelang dies nur bei 41 Patientinnen. Bei den übrigen 7 Patientinnen haben wir zur eindeutigen Identifikation des Haplotyps anschließend noch eine PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP, s.u.) durchgeführt.

Der Vorteil der allelspezifischen Hybridisierung gegenüber der PCR-SSP besteht darin, dass für die Typisierung an den Loci HLA-DRB1 und HLA-DQB1 nur eine einzige PCR durchgeführt werden muß. Der DNA-Verbrauch bei der allelspezifischen Hybridisierung ist also wesentlich geringer als bei der PCR-SSP. Auch lassen sich mit der allelspezifischen Hybridisierung eine größere Anzahl Proben parallel bearbeiten.

PCR-Ansätze:

PCR-Ansatz für HLA-DRB	N x 24,5 µl	Aqua dest.
	N x 10 µl	Amplifikations-Puffer
	N x 10 µl	Primer-Lösung
	N x 0,5 µl	Taq-Polymerase (2U/µl)
PCR-Ansatz für HLA-DQB	N x 14,6 µl	Aqua dest.
	N x 10 µl	Amplifikations-Puffer
	N x 10 µl	Primer-Lösung
	N x 10 µl	MgCl ₂ -Lösung
	N x 0,4 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)

PCR-Protokoll:

- Ansätze in PCR-Gefäße pipettieren
- je 5 µl Amplifikat zugeben
- je 2 Tr. Mineralöl zugeben
- Gefäße im Thermocycler plazieren und PCR-Programm starten

PCR-Programm (für HLA-DRB und HLA-DQB):

1 Zyklus	95°C	5 min
35 Zyklen	95°C	30 sec
	58°C	20 sec
	72°C	30 sec
1 Zyklus	72°C	10 min

Gelelektrophorese:

- in einer Mikrotiterplatte je 2 µl Gelladepuffer vorlegen und mit 5 µl PCR-Produkt vermischen; jeweils 5 µl in die Geltaschen geben; 5 µl Längenstandard direkt in die Geltaschen geben
- Spannung von 90 V anlegen und ca. 20 - 30 min auftrennen

allelspezifische Hybridisierung:

- Auto-LiPA einschalten und vorbereiten

- LiPA-Streifen in die dafür vorgesehenen Schalen legen
- 10 µl Denaturierungslösung in die obere Ecke jeder Schale pipettieren
- mit 10 µl Amplifikat vermischen
- Programmlauf starten
- nach 5 min werden 2 ml Hybridisierungslösung dazugegeben und durch Schwenken der Schalen mit dem denaturierten PCR-Produkt vermischt
- bei 56°C wird 30 min inkubiert
- die Flüssigkeit wird aspiriert
- die Streifen werden mit je 2 ml stringenter Waschlösung gewaschen; anschließend wird die Waschlösung aspiriert
- dieser Waschschrift wird einmal wiederholt
- bei 56°C wird 10 min inkubiert
- die Streifen werden zweimal mit je 2 ml Spüllösung gewaschen
- es werden je 2 ml des Konjugates zugegeben; anschließend wird bei 20 - 25°C 30 min inkubiert; dabei werden die Schalen geschwenkt
- die Streifen werden zweimal mit je 2 ml Spüllösung und anschließend wiederum mit 2 ml Substratpuffer gewaschen
- es werden 2 ml Substratlösung zugegeben; anschließend wird bei 20 - 25°C 30 min inkubiert
- die Farbreaktion wird durch Zugabe von 2 ml Aqua dest. gestoppt; dabei werden die Schalen 5 min geschwenkt
- Streifen aus den Schalen nehmen und auf die Protokollbögen kleben, mit Hilfe der Schablonen auswerten

3.2.7 PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)

Der Unterschied der PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) zur allelspezifischen Hybridisierung besteht darin, dass bei dieser die Amplifizierung der DNA unspezifisch erfolgt. Bei der PCR-SSP dagegen werden mehrere verschiedene Primerpaare (*sense* und *antisense* Primer) verwendet, die für jeweils bestimmte Sequenzen spezifisch sind. Eine Vervielfältigung erfolgt hier also nur, wenn die entsprechenden Sequenzen vorhanden sind.

Für die PCR-SSP haben wir einen DNA-Typisierungskit (Micro SSP Generic HLA Class II DNA Typing Kit®) verwendet. Mit diesem erfolgt die Typisierung an den Loci HLA-DRB1, 3, 4, 5 und HLA-DQB1.

In mehreren Reaktionsgefäßen sind sequenzspezifische, lyophilisierte (d.h. optimierte) Primerpaare aufgebracht. Dazu werden die DNA-Probe, Taq Polymerase sowie ein dNTP-Mix, in dem sich auch ein Farbstoff befindet, gegeben.

Nach PCR, Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung erfolgt die Auswertung mittels eines Auswerteschemas.

PCR-Protokoll:

- in 32 Reaktionsgefäßen befinden sich lyophilisierte Primerpaare bzw. eine Negativkontrolle, ein D-Mix-Röhrchen enthält den dNTP-Mix sowie einen Farbstoff
- 1 µl Aqua dest. in das Reaktionsgefäß für die Negativkontrolle geben
- 2 µl Taq Polymerase in das D-Mix-Röhrchen geben, durchmischen
- 9 µl D-Mix in das Gefäß für die Negativkontrolle geben
- 39 µl DNA-Probe in das D-Mix-Röhrchen geben, durchmischen
- je 10 µl D-Mix in jedes Reaktionsgefäß (außer der Negativkontrolle) pipettieren
- Reaktionsgefäße verschließen

PCR-Programm:

1 Zyklus	94°C	130 sec
	63°C	60 sec
9 Zyklen	94°C	10 sec
	63°C	60 sec
20 Zyklen	94°C	10 sec
	59°C	50 sec
	72°C	30 sec
	4°C	∞

Gelelektrophorese:

- 2 %iges Gel herstellen (s.o.)
- Spannung von 90 V anlegen und ca. 30 min auftrennen

- 9 μ l PCR-Produkt direkt in die Geltaschen füllen (ohne Gelladepuffer, kein Längenstandard)
- Spannung von 90 V anlegen und 30 min auftrennen
- 15 min im Ethidiumbromidbad anfärben, auf dem UV-Tisch fotografieren und mit Hilfe des mitgelieferten Auswerteschemas auswerten

3.3 Zytokine und lösliche Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser

3.3.1 Materialgewinnung

Das Fruchtwasser haben wir bei Sectiones abgenommen: Nach (amnionerhaltender) Uterotomie wurde - bei stehendem Amnion - Fruchtwasser in einer 50 ml-Spritze asserviert. Anschließend erfolgte die Entwicklung des Kindes.

Die Proben wurden nur verwendet, wenn sie nicht sichtbar mit Blut kontaminiert waren.

Sie wurden bei 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bei -20°C eingefroren.

3.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist eine Methode zur Konzentrationsbestimmung einer Substanz in einer Lösung. Sie beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion: Die Substanz, deren Konzentration in einer Lösung gemessen werden soll, wird an einen mit einem Enzym markierten (monoklonalen) Antikörper gebunden. Das Enzym kann anschließend durch eine Chromogenumwandlung sichtbar gemacht werden und seine Konzentration photometrisch bestimmt werden.

Die verwendeten Testkits sind alle nach dem Prinzip des *sandwich*-ELISA aufgebaut: Der monoklonale Antikörper, der jeweils für die zu bestimmende Substanz (das Antigen) spezifisch ist, ist in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte aufgebracht. Wird die Probe (in dem Fall das Fruchtwasser) dazugegeben, bindet das Antigen (in diesem Fall ein Zytokin oder ein Zytokinrezeptor) an den Antikörper. Durch einen Waschschriff wird die restliche Lösung entfernt.

Anschließend wird ein weiterer (polyklonaler oder monoklonaler) Antikörper (Zweitantikörper) zugegeben, der ebenfalls an das Antigen bindet, allerdings an ein anderes Epitop als der Erstantikörper. Dieser Zweitantikörper ist mit Biotin konjugiert. In einem weiteren Schritt wird nun Streptavidin-HRP-Konjugat (HRP = *Horseradish Peroxidase*) zugegeben, welches an das Biotin bindet. Schließlich wird als Substrat ein farbloses Chromogen zugegeben, welches durch das HRP zu einem farbigen Produkt umgesetzt wird.

Die Farbintensität kann mit dem *ELISA-Reader* photometrisch bestimmt werden. Sie ist der Menge des gebundenen Antigens (= der zu messenden Substanz) proportional. Durch Vergleich mit einer Standardkurve kann so die Konzentration der Substanz ermittelt werden.

Da die verwendeten Testkits für die verschiedenen Zytokine und Zytokinrezeptoren sehr ähnlich sind, sei hier beispielhaft das Protokoll für den TNF- α -ELISA wiedergegeben:

- Standardverdünnungsreihe herstellen aus Standardlösung und Standardverdünnungslösung in den Konzentrationen: 1000 pg/ml, 400 pg/ml, 160 pg/ml, 64 pg/ml, 25,6 pg/ml (Vorgabe durch den Hersteller)
- 50 μ l Standard bzw. Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben; jede Probe/jeden Standard doppelt bestimmen; als Leerwert Standardverdünnungslösung verwenden
- in jede Vertiefung 50 μ l des biotinylierten Antikörpers zugeben
- abgedeckt 2 h bei Raumtemperatur inkubieren
- dreimal mit 300 μ l Waschpuffer waschen
- 100 μ l Streptavidin-HRP-Lösung zugeben
- abgedeckt bei Raumtemperatur 30 min inkubieren
- dreimal mit 300 μ l Waschpuffer waschen
- 100 μ l Substratlösung zugeben
- ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubieren; 100 μ l Stopplösung zugeben
- OD bei 450 nm im Mikro-ELISA-Reader messen

3.4 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analyse (RFLP-Analyse)

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonucleasen, d.h. sie binden an doppelsträngige DNA und spalten diese. Die verschiedenen Restriktionsenzyme unterscheiden sich hinsichtlich der Erkennungssequenz und der Spaltstelle an der DNA, welche beide für das jeweilige Restriktionsenzym spezifisch sind.

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen ist es möglich, DNA an bestimmten, genau definierten Stellen zu spalten. Man erhält so Fragmente einer bestimmten Größe, welche dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Durch Vergleich mit einem Längenstandard ist eine Aussage über die Größe der Fragmente möglich.

Da jedes Restriktionsenzym die DNA an einer spezifischen Stelle bindet und spaltet, kann aus der Größe der Fragmente auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer Schnittstelle geschlossen werden. Dadurch ist eine grobe Charakterisierung einer DNA-Sequenz möglich.

Ist die Schnittstelle für ein Restriktionsenzym durch eine Mutation verändert, wird die DNA an dieser Stelle nicht geschnitten. Man spricht man von einem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP).

Es lassen sich hierbei drei Fälle unterscheiden: Ist nur ein Chromosom von der Mutation betroffen, wird die DNA partiell geschnitten. Sind beide Chromosomen betroffen, wird die DNA überhaupt nicht geschnitten. Ist keines der Chromosomen betroffen, wird sie dagegen vollständig geschnitten. Man kann also aus dem Bandenmuster in der Gelelektrophorese ablesen, ob ein bestimmtes Allel vorhanden ist und ob es in homozygoter oder heterozygoter Form vorliegt.

Bei der Restriktion großer eukaryontischer Genome entstehen so viele Restriktionsfragmente, dass diese in der Gelelektrophorese nicht mehr aufgetrennt werden können. Es entsteht ein Gemisch, welches gemeinhin als „DNA-Schmier“ bezeichnet wird. Daher ist es notwendig, dass der zu analysierende DNA-Abschnitt vorher mittels PCR amplifiziert wird.

3.4.1 TNFA-Polymorphismus

Der Polymorphismus in der Promoterregion (-308) des TNF- α -Gens (TNFA1/TNFA2) liegt zwar nicht in der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Nco* I (aus *Nocardia corallina*). Eine solche Sequenz kann aber durch eine gezielte Basenfehlpaarung nahe dem 3'-Ende des *sense* Primers (-313) bei der PCR eingeführt werden.

PCR-Ansatz:

Aqua dest.	aliquotieren zu 43 μ l
Taq-Puffer	N x 5 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	N x 1 μ l
<i>sense</i> Primer (20 μ M)	N x 1 μ l
<i>antisense</i> Primer (20 μ M)	N x 1 μ l
DNA	100 ng

PCR-Protokoll:

- PCR-Ansatz kurz zentrifugieren
- 5 min im Thermomixer bei 95° denaturieren; anschließend ca. 5 min auf Eis abkühlen
- je 0,5 μ l Taq-Polymerase und 2 Tropfen Mineralöl dazugeben

PCR-Programm:

1 Zyklus	94°C	3 min
35 Zyklen	94°C	1 min
	60°C	1 min
	72°C	1 min
1 Zyklus	72°C	5 min

Restriktionsansatz:

Amplifikat	25,5 μ l
Puffer 10x	3,0 μ l
<i>Nco</i> I	1,5 μ l (20 U)

Restriktion:

- Restriktionsansatz kurz zentrifugieren
- 1,5 - 2 h im Thermomixer bei 37° inkubieren; anschließend kühl lagern

Gelelektrophorese:

- 4 %iges Gel herstellen (s.o.)
- jeweils „verdautes“ und „unverdautes“ (d.h. restringiertes bzw. nicht-restringiertes) Amplifikat nebeneinander auftragen
- je 2 µl Gelladepuffer in einer Mikrotiterplatte vorlegen und mit 7 µl PCR-Produkt vermischen; je 7 µl in die Geltaschen füllen; 7 µl Längenstandard direkt in die Geltaschen geben
- 95 V Spannung anlegen und Gel auftrennen, bis der Abstand zwischen den Flecken ca. 1¹/₂ - 2 Querfinger beträgt
- 10 min im Ethidiumbromidbad anfärben und auf dem UV-Tisch auswerten

Auswertung:

eine Bande bei 87 bp:	geschnitten (homozygot für TNFA1)
je eine Bande bei 87 bp und 107 bp:	partiell geschnitten (heterozygot)
eine Bande bei 107 bp:	ungeschnitten (homozygot für TNFA2)

3.4.2 TNFB-Polymorphismus

Der Polymorphismus im ersten Intron (+250) des TNF-β-Gens (TNFB1/TNFB2) liegt in der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Nco* I.

PCR-Protokoll:

s. PCR-Protokoll TNFA-Polymorphismus

PCR-Programm:

30 Zyklen	94°C	1 min
	70°C	1,5 min
	72°C	1,5 min

Restriktionsansatz:

Amplifikat	25,5 µl
Puffer 10x	3,0 µl
<i>Nco</i> I	1,5 µl (15 U)

Restriktion:

s. Restriktion TNFA-Polymorphismus

Gelelektrophorese:

- 2 %iges Gel herstellen (s.o.)
- s. Gelelektrophorese TNFA-Polymorphismus

Auswertung:

eine Bande bei 598 bp:	geschnitten (homozygot für TNFB1)
je eine Bande bei 598 bp und 782 bp:	partiell geschnitten (heterozygot)
eine Bande bei 782 bp:	ungeschnitten (homozygot für TNFB2)

3.5 Statistik

Für die HLA-DRB1- und HLA-DQB1-Allele sowie für die TNFA- und TNFB-Allele wurden jeweils die *Odds Ratio* (OR) und das 95%-Konfidenzintervall (KI) berechnet (WinBiAS). War die OR > 1 und enthielt das 95 %-KI nicht den Wert 1, war das Risiko bei dem betreffenden Allel als erhöht anzusehen (45).

Für die Beurteilung der Assoziationen der einzelnen HLA-Allele mit den TNF-Allelen haben wir *Fisher's-Exact-Test* durchgeführt (WinBiAS). Eine Assoziation konnte als signifikant gelten, wenn die gefundene Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als die angenommene Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % war ($p < 0,05$).

Für die Konzentrationen der Zytokine und löslichen Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser wurden für jedes Zytokin bzw. jeden Zytokinrezeptor der Median, der minimale und maximale Wert sowie das 25 %-Quartil und 75 %-Quartil bestimmt (SPSS). Das Signifikanz-

niveau wurde mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Test's* berechnet (SPSS). Die Mediane in der Studien- bzw. in der Kontrollgruppe galten als signifikant verschieden, wenn $p < 0,05$ war. Die grafische Darstellung erfolgte in Form der Boxplots (SPSS).

Für die Korrelationen zwischen den einzelnen Zytokinen und Zytokinezeptoren wurden für jede Korrelation der Spearman'sche Korrelationskoeffizient (r) und das Signifikanzniveau (p) berechnet (SPSS). Ein r nahe 1 bzw. -1 und ein $p < 0,05$ deuteten auf eine starke (positive bzw. negative) Korrelation zwischen den Parametern hin.

4 Ergebnisse

4.1 HLA-DRB1- und HLA-DQB1-Typisierung

Die Typisierung am Locus HLA-DRB1 wurde bei 47 Patientinnen durchgeführt (7 aus der Studiengruppe, 40 aus der Kontrollgruppe), die Typisierung am Locus HLA-DQB1 bei 48 Frauen (7 aus der Studiengruppe, 41 aus der Kontrollgruppe).

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren am Locus HLA-DRB1 322 Allele und am Locus HLA-DQB1 53 Allele bekannt.

4.1.1 HLA-DRB1-Typisierung

Bei der HLA-DRB1-Typisierung konnten wir mittels allelspezifischer Hybridisierung in 41 von 48 Fällen den Haplotyp eindeutig bestimmen. In den übrigen 7 Fällen mußten wir noch zusätzlich eine PCR-SSP durchführen, wonach auch hier in allen Fällen ein eindeutiger Haplotyp ermittelt werden konnte (Tab. 1).

Bei 10 Patientinnen konnte neben der Hauptgruppe - entweder bei einem Allel oder bei beiden Allelen - auch eine Nebengruppe bzw. eine stumme Mutationen angegeben werden.

Tab. 1: Verteilung der HLA-DRB1-Allele in der Studiengruppe und der Kontrollgruppe. *Odds Ratio* (OR), 95 %-Konfidenzintervall (KI). Angegeben sind nur die Hauptgruppen der Allele.

	Kontrollgruppe n = 40	Studiengruppe n = 7	OR	95 %-KI
DRB1*01	10	2	1,20	0,20 - 7,31
DRB1*03	13	1	0,35	0,04 - 3,01
DRB1*04	9	1	0,57	0,06 - 5,42
DRB1*07	10	2	1,20	0,20 - 7,31
DRB1*08	3	1	2,06	0,19 - 22,8
DRB1*11	7	1	0,79	0,08 - 7,75
DRB1*13	11	1	0,44	0,05 - 3,98
DRB1*14	4	1	1,50	0,14 - 16,0
DRB1*15	9	3	2,58	0,50 - 13,4

DRB1*16	2	0	0	-
---------	---	---	---	---

4.1.2 HLA-DQB1-Typisierung

Am Locus HLA-DQB1 gelang es uns, mittels allelspezifischer Hybridisierung in allen 48 Fällen einen eindeutigen Haplotyp zu identifizieren. In 19 Fällen konnte (bei einem der Allele oder beiden Allelen) auch eine Nebengruppe bzw. stumme Mutation angegeben werden (Tab. 2).

Tab. 2: Verteilung der HLA-DQB1-Allele. *Odds Ratio* (OR), 95 %-Konfidenzintervall (KI). Angegeben sind nur die Hauptgruppen der Allele.

	Kontrollgruppe n = 41	Studiengruppe n = 7	OR	95 %-KI
DQB1*02	20	2	0,42	0,07 - 2,38
DQB1*03	18	2	0,51	0,09 - 2,94
DQB1*04	1	1	6,67	0,50 - 89,1
DQB1*05	13	3	1,62	0,31 - 8,35
DQB1*06	20	3	0,79	0,15 - 4,03

Bei keinem der HLA-DRB1- bzw. der HLA-DQB1-Allele war die OR > 1 und enthielt das 95 %-KI nicht den Wert 1, d.h. bei keinem der Allele war das Risiko für die Präeklampsie erhöht.

4.2 Zytokine und lösliche Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser

Die Konzentrationen der Zytokine und löslichen Zytokinrezeptoren haben wir in 52 Fruchtwasserproben gemessen (8 aus der Studiengruppe, 44 aus der Konrollgruppe).

4.2.1 TNF- α

TNF- α ließ sich in keiner der Fruchtwasserproben nachweisen.

4.2.2 IL-1 β

IL-1 β konnten wir nur in 2 Fruchtwasserproben nachweisen: in Probe 35 (59,9 pg/ml) und Probe 47 (76,3 pg/ml). Beide Proben stammten aus der Kontrollgruppe.

4.2.3 IL-6

IL-6 war in 50 Proben in meßbaren Konzentrationen vorhanden. Der Median in der Studiengruppe war 367 pg/ml, in der Kontrollgruppe 358 pg/ml ($p > 0,05$; Tab. 3 und Abb. 1). Die Spannweite (*range*) war in beiden Gruppen sehr hoch: in der Studiengruppe 0 - 3.570 pg/ml, in der Kontrollgruppe 0 - 75.400 pg/ml. In zwei Proben haben wir extrem hohe IL-6-Konzentrationen gemessen: 54.400 pg/ml (Probe 35) bzw. 75.400 pg/ml (Probe 47). Diese Proben waren dieselben, in denen allein das Zytokin IL-1 β nachgewiesen werden konnte (s.o.).

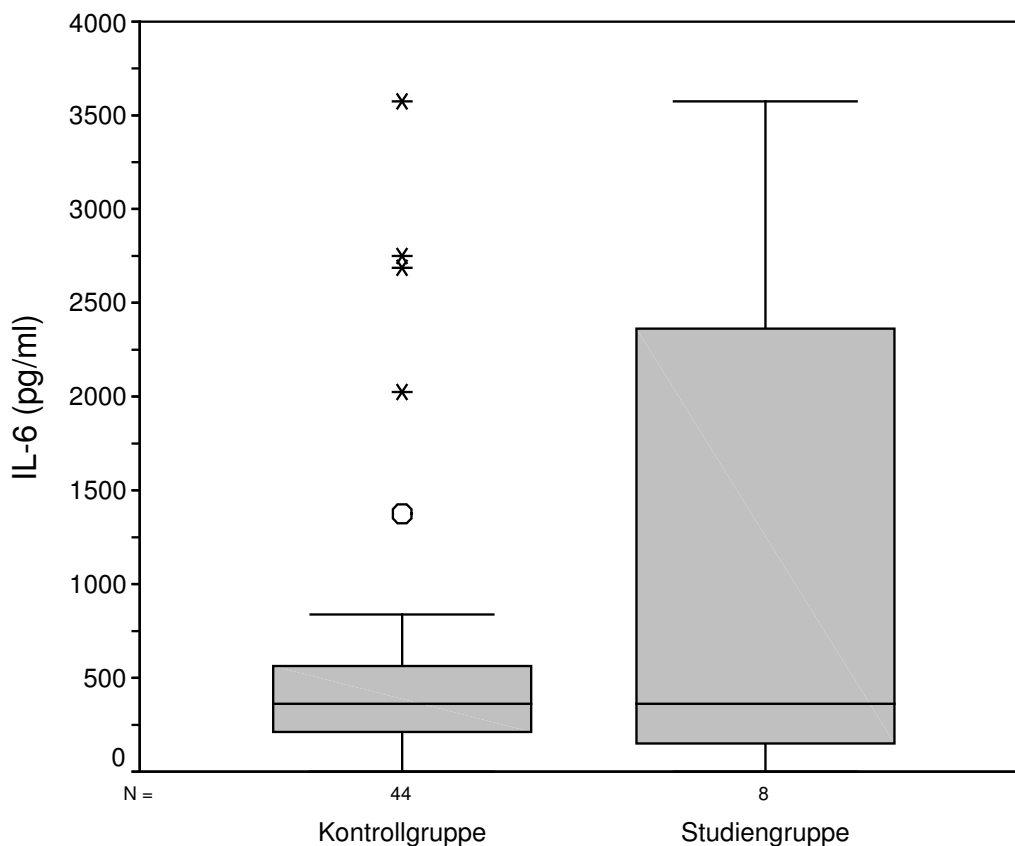


Abb. 1: IL-6 (pg/ml) im Fruchtwasser in Form der Boxplots. Median, 25 %-Quartil, 75 %-Quartil. o = Ausreißer, * = Extremwerte. Folgende Extremwerte nicht mit abgebildet: IL-6 = 54.400 pg/ml (Probe 35) und IL-6 = 75.400 pg/ml (Probe 47).

4.2.4 IL-8

Der Nachweis von IL-8 gelang in 28 Fruchtwasserproben. Der Median in der Studiengruppe war 0 pg/ml, in der Kontrollgruppe 69,0 pg/ml ($p > 0,05$; Tab. 3 und Abb. 2). Die höchsten IL-8-Konzentrationen wurden wiederum in den Proben 35 und 47 gemessen (5.030 pg/ml resp. 815 pg/ml).

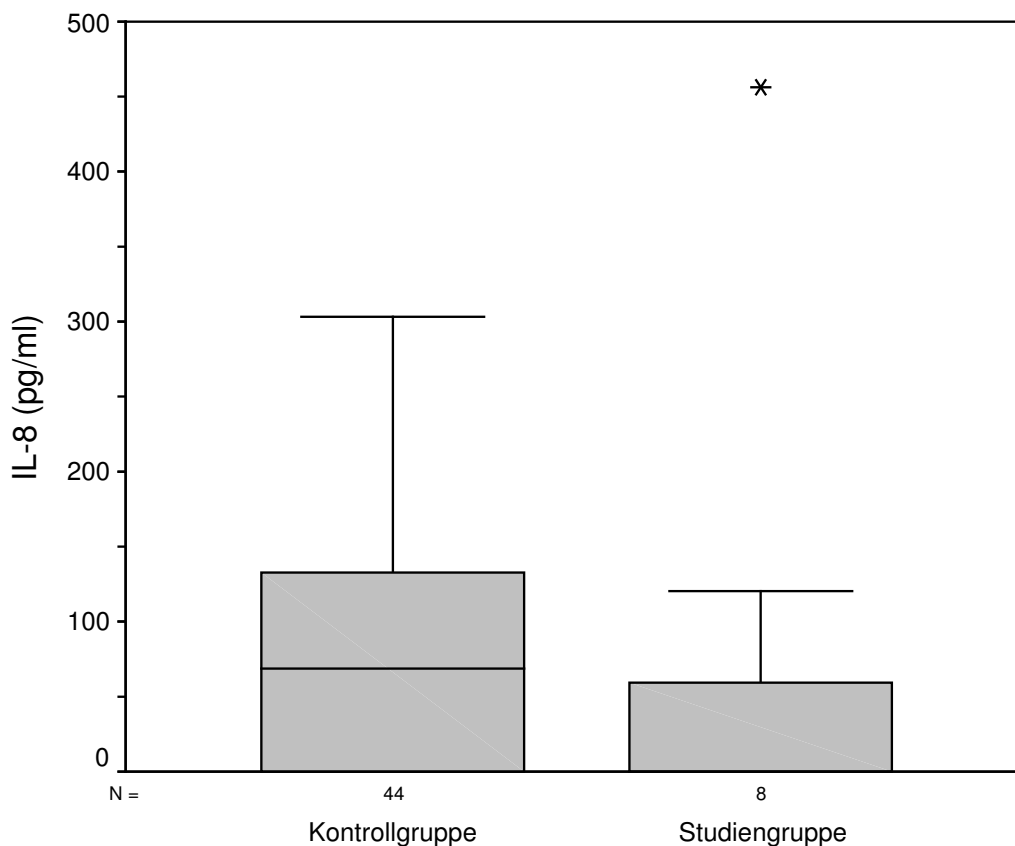


Abb. 2: IL-8 (pg/ml) im Fruchtwasser in Form der Boxplots. * = Extremwerte. Folgende Extremwerte nicht mit abgebildet: IL-8 = 5.030 pg/ml (Probe 35) und IL-8 = 815 pg/ml (Probe 47).

4.2.5 sTNF-R

sTNF-R konnten wir in allen Proben nachweisen. Der Median in der Studiengruppe war 3,72 ng/ml, in der Kontrollgruppe 2,63 ng/ml ($p > 0,05$; Abb. 3).

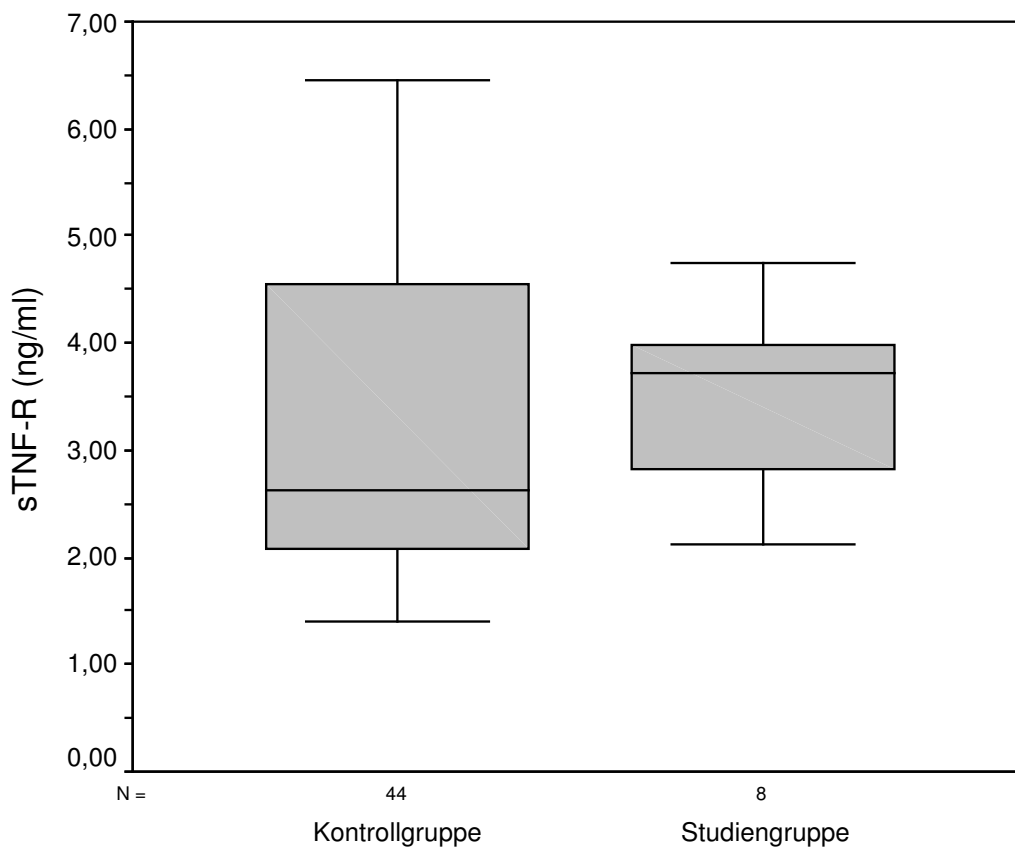


Abb. 3: sTNF-R (ng/ml) im Fruchtwasser in Form der Boxplots. Folgender Extremwert nicht mitabgebildet: sTNF-R = 27,4 ng/ml (Probe 36).

4.2.6 sIL-6-R

sIL-6-R war ebenfalls in allen Fruchtwasserproben nachweisbar. Der Median in der Studiengruppe war 12,5 ng/ml, in der Kontrollgruppe 10,7 ng/ml ($p > 0,05$; Tab. 3 und Abb. 4).

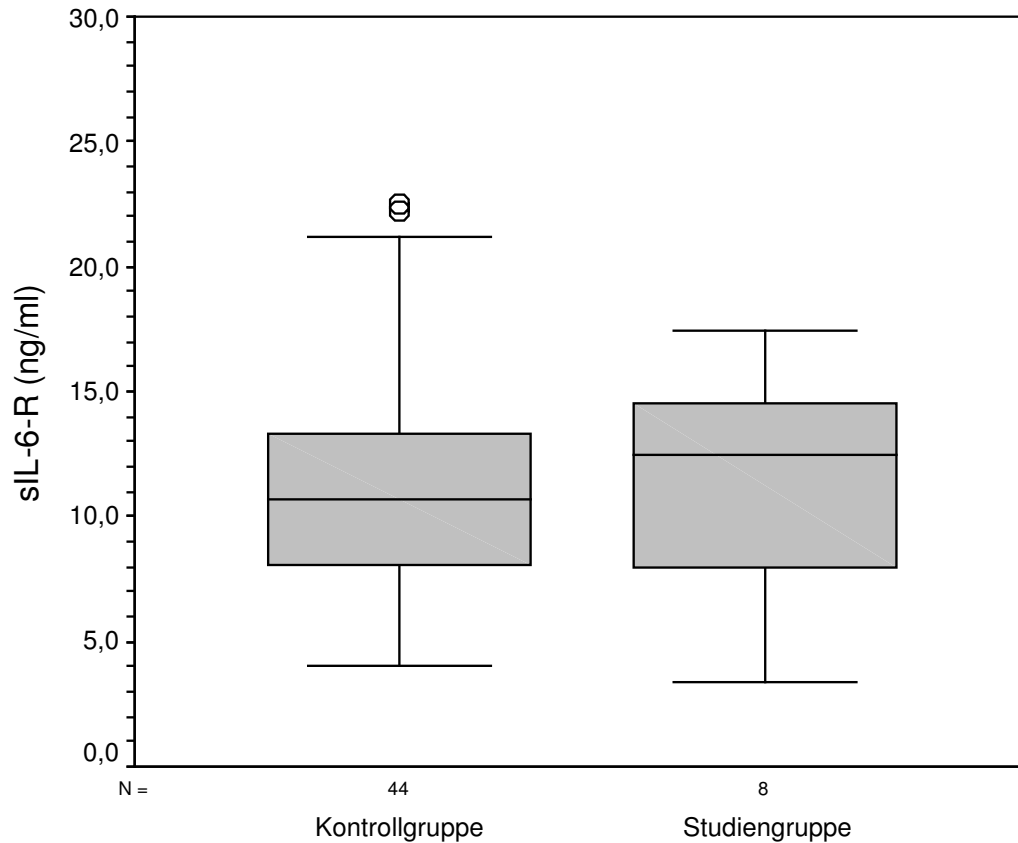


Abb. 4: sIL-6-R (ng/ml) im Fruchtwasser in Form der Boxplots. o = Ausreißer. Kontrollgruppe: n = 44, Studiengruppe: n = 8.

4.2.7 IL-1RA

IL-1RA konnte in allen Fruchtwasserproben nachgewiesen werden. Der Median in der Studiengruppe war 70,0 ng/ml, in der Kontrollgruppe 80,5 ng/ml ($p > 0,05$; Tab. 3 und Abb. 5).

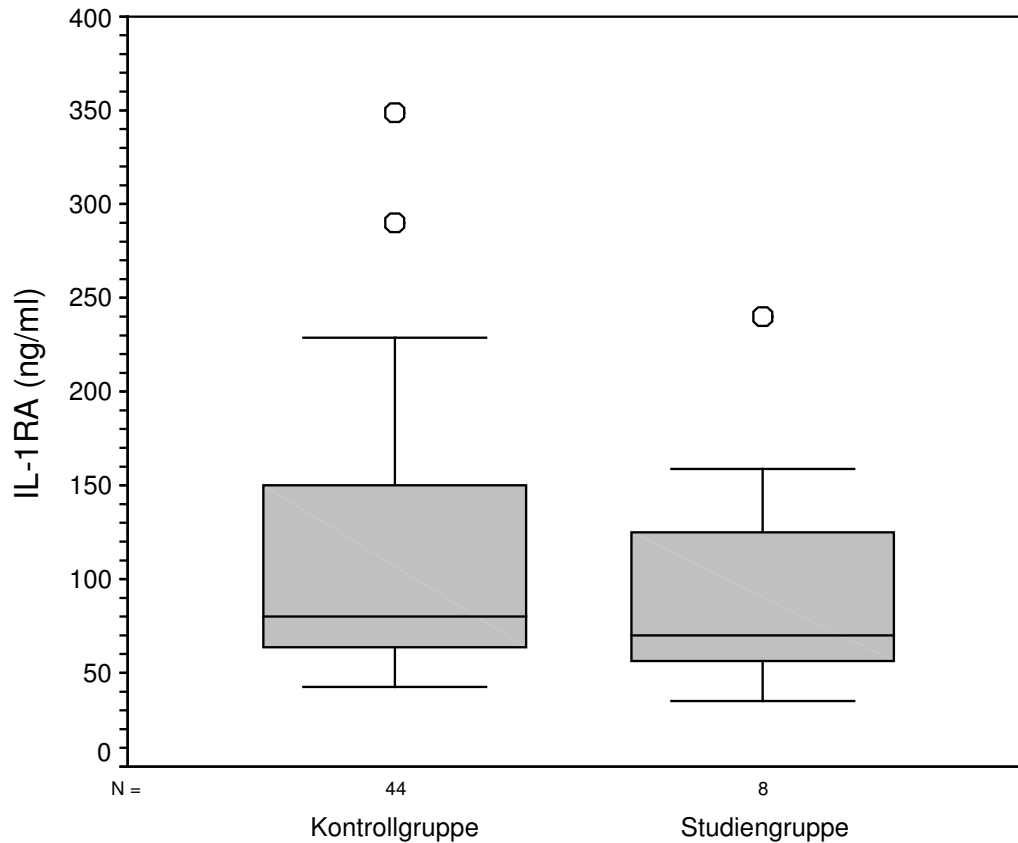


Abb. 5: IL-1RA (ng/ml) im Fruchtwasser in Form der Boxplots. o = Ausreißer.

Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung der quantitativen Bestimmungen von verschiedenen Zytokinen und löslichen Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser. Median (minimaler – maximaler Wert) (obere Zeile), 25 %-Quartil, 75 %-Quartil (untere Zeile). * $p < 0,05$.

	Kontrollgruppe n = 44	Studiengruppe n = 8
IL-6 (pg/ml)	358 (0 - 75.400) 208; 571	367 (0 - 3.570) 145; 2.410
IL-8 (pg/ml)	69,0 (0 – 5.030) 0; 133	0 (0 - 457) 0; 90,0
sTNF-R (ng/ml)	2,63 (1,39 - 27,4) 2,04; 4,56	3,72 (2,13 - 4,75) 2,55; 4,01
sIL-6-R (ng/ml)	10,7 (4,03 - 22,5) 7,92; 13,3	12,5 (3,35 - 17,4) 6,59; 15,3
IL-1RA (ng/ml)	80,5 (42,5 - 349) 63,3; 152	70,0 (34,6 - 240) 54,4; 142

4.2.8 Korrelationsanalysen

Die Korrelationen zwischen den Konzentrationen der folgenden Zytokine und löslichen Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser waren signifikant ($p < 0,05$): IL-6 und IL-8 ($r = 0,06$), IL-6 und sTNF-R ($r = 0,45$) sowie IL-8 und sTNF-R ($r = 0,37$) (Tab. 5 und Abb. 6 - 8).

Tab. 5: Korrelationen zwischen den Spiegeln der Zytokine und löslichen Zytokinrezeptoren. r = Spearman'scher Korrelationskoeffizient. * $p < 0,05$.

	IL-8	IL-1RA	sTNF-R	sIL-6-R
IL-6	$r = 0,60^*$	$r = -0,06$	$r = 0,47^*$	$r = -0,19$
IL-8		$r = -0,10$	$r = 0,41^*$	$r = -0,16$
IL-1RA			$r = 0,21$	$r = -0,07$
sTNF-R				$r = 0,06$

4.2.9 IL-1RA bei männlichen und weiblichen Feten

Der Median der IL-1RA-Konzentrationen im Fruchtwasser war bei den männlichen Feten ($n = 29$) 64,4 ng/ml, bei den weiblichen Feten 154,5 ng/ml ($p < 0,05$) (Tab. 6 und Abb. 7).

Tab. 6: IL-1RA-Konzentrationen im Fruchtwasser bei männlichen und weiblichen Feten. Median (minimaler – maximaler Wert) (obere Zeile), 25 %-Quartil, 75 %-Quartil (untere Zeile). * $p < 0,05$.

	männliche Feten n = 29	weibliche Feten n = 23
IL-1RA (ng/ml)	64,4 (34,6; 162)	155* (42,5; 349)
	55,4; 74,6	120; 211

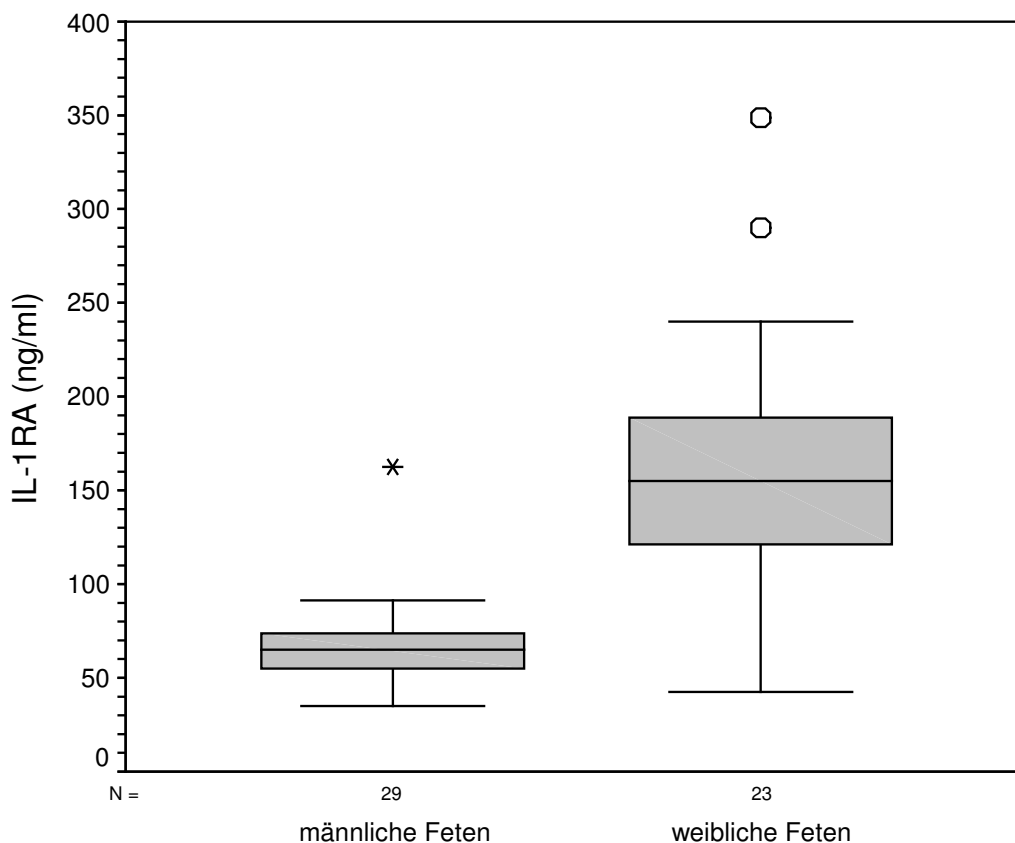


Abb. 7: IL-1RA (ng/ml) im Fruchtwasser bei männlichen und weiblichen Feten in Form der Boxplots. o = Ausreißer, * = Extremwerte. $p < 0,05$.

4.3 TNF-Polymorphismen

Die Allele des TNFA- und des TNFB-Polymorphismus wurden bei 48 Patientinnen bestimmt (7 aus der Studiengruppe, 41 aus der Kontrollgruppe).

4.3.1 TNFA-Polymorphismus

Die TNFA-Polymorphismen waren in den Gruppen wie folgt verteilt: Das TNFA1-Allel hatten in der Studiengruppe 7 Frauen und in der Kontrollgruppe 40 Frauen im Genom. Das TNFA2-Allel war in der Studiengruppe bei einer Frau und in der Kontrollgruppe bei 17 Frauen vertreten.

Bei keinem der Allele war die OR > 1 und enthielt das 95 %-KI nicht den Wert 1, d.h. keines der Allele war mit der Präeklampsie assoziiert (Tab. 7).

Bei den TNFA-Haplotypen zeigte sich die folgende Verteilung: In der Studiengruppe waren 6 Patientinnen homozygot für das TNFA1-Allel. Eine war heterozygot. Homozygot für das TNFA2-Allel war dagegen keine der Präeklampsiepatientinnen. In der Kontrollgruppe waren 24 Frauen homozygot für TNFA1, 16 waren heterozygot, und nur eine Schwangere ohne Präeklampsie war homozygot für das TNFA2-Allel (Tab. 8).

4.3.2 TNFB-Polymorphismus

Das TNFB1-Allel war in der Studiengruppe bei 3 Patientinnen, in der Kontrollgruppe bei 23 Frauen vertreten. Das TNFB2-Allel hatten in der Studiengruppe 6 Frauen und in der Kontrollgruppe 36 Frauen in ihrem Genom.

Auch beim TNFB-Polymorphismus war die OR bei beiden Allelen nicht > 1 und enthielt das 95 %-KI nicht den Wert 1. Somit zeigten auch die TNFB-Allele keine Assoziation mit der Präeklampsie (Tab. 7).

Bei den Haplotypen war die Verteilung wie folgt: In der Studiengruppe war eine Frau homozygot für TNFB1, 2 Patientinnen waren heterozygot, und 4 waren homozygot für das TNFB2-Allel. In der Kontrollgruppe waren 5 Frauen homozygot für das TNFB1-Allel, 18 waren heterozygot, und ebenfalls 18 waren homozygot für das TNFB2-Allel (Tab. 8).

Tab. 7: Verteilung der TNFA- und TNFB-Allele in der Studiengruppe und der Kontrollgruppe. *Odds Ratio* (OR), 95 %-Konfidenzintervall (KI).

	Kontrollgruppe n = 41	Studiengruppe n = 7	OR	95 %-KI
TNFA1	40	7	-	-
TNFA2	17	1	0,24	0,03 - 1,90
TNFB1	23	3	0,59	0,12 - 2,98
TNFB2	36	6	0,83	0,08 - 8,62

Tab. 8: Verteilung der TNFA- und TNFB-Haplotypen in der Studiengruppe und der Kontrollgruppe.

	Kontrollgruppe n = 41	Studiengruppe n = 7
TNFA1/TNFA1	24	6
TNFA1/TNFA2	16	1
TNFA2/TNFA2	1	-
TNFB1/TNFB1	5	1
TNFB1/TNFB2	18	2
TNFB2/TNFB2	18	4

4.3.3 Kopplungsanalysen

Folgende Assoziationen von HLA-DRB1- bzw. HLA-DQB1-Allelen mit TNFA- bzw. TNFB-Allelen waren signifikant ($p < 0,05$): HLA-DRB1*03 und TNFA2, HLA-DRB1*03 und TNFB1, DRB1*14 und TNFB1, DQB1*02 und TNFA2, DQB1*02 und TNFB1 (Tab. 9 - 12).

Tab. 9: Assoziationen der HLA-DRB1-Allele mit den TNFA-Allelen. * $p < 0,05$.

	TNFA1+ n = 46	TNFA1- n = 1	TNFA2+ n = 18	TNFA2- n = 29
DRB1*01	12	0	6	6
DRB1*03	13	1	11	3*
DRB1*04	8	0	2	8
DRB1*07	12	0	5	7
DRB1*08	4	0	2	2
DRB1*11	8	0	1	7
DRB1*13	10	1	4	8
DRB1*14	5	0	0	5
DRB1*15	12	0	4	8
DRB1*16	2	0	1	1

Tab. 10: Assoziationen der HLA-DRB1-Allele mit den TNFB-Allelen. *p < 0,05.

	TNFB1+ n = 26	TNFB1- n = 21	TNFB2+ n = 41	TNFB2- n = 6
DRB1*01	8	4	9	2
DRB1*03	12	2*	11	3
DRB1*04	5	5	9	1
DRB1*07	7	5	11	1
DRB1*08	3	1	3	1
DRB1*11	2	6	8	0
DRB1*13	8	4	9	2
DRB1*14	0	5*	5	0
DRB1*15	6	6	11	1
DRB1*16	1	1	1	1

Tab. 11: Assoziationen der HLA-DQB1-Allele mit den TNFA-Allelen. *p < 0,05.

	TNFA1+ n = 47	TNFA1- n = 1	TNFA2+ n = 18	TNFA2- n = 30
DQB1*02	20	1	14	8*
DQB1*03	20	0	5	15
DQB1*04	2	0	0	2
DQB1*05	16	0	6	10
DQB1*06	22	1	9	14

Tab. 12 Assoziationen der HLA-DQB1-Allele mit TNFB-Allelen. *p < 0,05.

	TNFB1+ n = 26	TNFB1- n = 22	TNFB2+ n = 42	TNFB2- n = 6
DQB1*02	16	6*	19	3
DQB1*03	8	12	18	2
DQB1*04	1	1	1	1
DQB1*05	8	8	14	2
DQB1*06	13	10	20	3

5 Diskussion

Die in den letzten Jahren oder Jahrzehnten zur Präeklampsie durchgeführten Studien haben gezeigt, dass es sich bei der Erkrankung nicht um ein einheitliches Krankheitsbild, sondern um eine Gruppe von Krankheiten handelt, die wahrscheinlich auch ätiologisch heterogen sind (82, 134).

Ein Problem vieler, insbesondere früher Studien ist, dass nicht exakt zwischen den verschiedenen Formen der Erkrankung differenziert wurde. Wir haben daher nur Frauen untersucht, welche an der schweren Form der Präeklampsie oder an einem HELLP-Syndrom erkrankt waren. Voraussetzung für eine Aufnahme in die Studie war also eine Proteinurie. Diese stellt unserer Ansicht nach ein zuverlässiges Kriterium der Erkrankung dar.

Man nimmt allerdings an, dass es wiederum verschiedene Ursachen sowohl für die schwere Form der Präeklampsie als auch für das HELLP-Syndrom gibt (144). Allgemein geht man daher heute von einer multifaktoriellen Genese der Präeklampsie aus (58).

Sicher ist allerdings, dass die Erkrankungen eine starke hereditäre Komponente haben, d.h. v.a. genetisch bedingt sind. Dabei spielen wahrscheinlich die Gene des HLA-Komplexes und die TNF-Polymorphismen eine zentrale Rolle (58).

Ein weiteres Problem v.a. derjenigen Studien, in denen die Rolle des Immunsystems bei der Präeklampsie untersucht wurde, ist, dass meist nur einzelne oder einige wenige immunologische Parameter untersucht wurden. Wir haben daher gleich eine ganze Reihe von Immunparametern, welche wir für relevant erachteten, untersucht, um so ein *monitoring* von immunologischen Befunden an einem Patientenkollektiv durchzuführen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es dabei auch, einen möglichen (immunologischen) *disease marker* für die Präeklampsie zu finden.

Neu gegenüber früheren Studien, welche sich mit der Zusammensetzung des Fruchtwassers bei der Präeklampsie befaßt haben, war bei unserer Untersuchung zudem die Art der Fruchtwassergewinnung bei Schnittentbindungen (*Sectiones caesareae*): Nach (amnion-erhaltender) Uterotomie wurde das Fruchtwasser asserviert. Anschließend erfolgte die Entwicklung des Kindes.

Bei früheren Studien wurde das Fruchtwasser dagegen entweder transvaginal gewonnen, d.h. bei einer Amniotomie, einem Blasensprung oder durch transvaginale Amniozentese, oder durch transabdominelle Amniozentese. Bei der transvaginalen Methode kann das

Fruchtwasser jedoch durch Vaginalsekret verändert werden (86, 87). Zudem stammt das Fruchtwasser bei dieser Methode aus dem unteren Teil der Fruchthöhle, der von dem übrigen Teil der Fruchthöhle weitgehend isoliert ist. Daher unterscheidet sich die Zusammensetzung des Fruchtwassers aus diesem Teil der Fruchthöhle wahrscheinlich von dem der übrigen Fruchthöhle. Die transabdominelle Amniozentese wiederum ist mit einigen Risiken behaftet, nämlich mit dem einer Blutung, einer Infektion und vor allem dem Risiko eines vorzeitigen Blasensprungs.

Da wir das Fruchtwasser vorwiegend bei primären Sectiones abgenommen haben, wurde zudem der (mögliche) Einfluß von Wehen auf die Zytokinkonzentrationen weitgehend ausgeschlossen.

An der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, werden im Jahr ca. 450 Schnittentbindungen durchgeführt (primäre und sekundäre Sectiones). Daher war es nicht schwer, genügend Patientinnen für die Kontrollgruppe zu rekrutieren. Es war jedoch aufgrund der strengen Auswahlkriterien für die Studiengruppe – Frauen mit schwerer Präeklampsie oder mit HELLP-Syndrom, welche durch primäre Sectio entbunden wurden – schwer, genügend Patientinnen für selbige zu finden. Daher haben wir auch einige Frauen mit Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom in die Studiengruppe aufgenommen, welche durch sekundäre Sectio entbunden wurden.

5.1 Rolle des HLA-Systems

Die bisher durchgeführten Untersuchungen über eine mögliche Rolle des HLA-Systems bei der Präeklampsie sind mit einer Reihe methodischer Probleme, die HLA-Analytik betreffend, behaftet:

1. Bis vor einiger Zeit konnten nur die serologischen Spezifitäten der HLA-Allele, d.h. die HLA-Moleküle auf den Zellen, bestimmt werden, nicht aber die HLA-Allele selbst. Dabei kommt es jedoch zu Fehltypisierungen (79, 85).
2. Im Laufe der Jahre wurden immer neue serologische Spezifitäten bzw. HLA-Allele entdeckt, und die bekannten Spezifitäten/Allele konnten weiter untergruppiert werden, so dass ein Vergleich neuerer mit älteren Studien nur unter Vorbehalten möglich ist. Zudem ist die Anzahl der heute bekannten HLA-Allele so hoch, dass eine große Zahl

von Probanden typisiert werden muß, um statistisch verwertbare Ergebnisse zu bekommen und um rein zufällige Assoziationen auszuschließen.

3. Häufig reicht es nicht aus, nur die Hauptgruppe eines HLA-Allels zu bestimmen. So sind beispielsweise von dem Allel HLA-B27, dem HLA-Allel mit der stärksten bekannten Krankheitsassoziation, 11 Subtypen bekannt, von denen allerdings nur einige mit der Ankylosierenden Spondylitis (Morbus Bechterew) assoziiert sind (84).
4. Schließlich wird der Vergleich der Studien zum HLA-System auch dadurch erschwert, dass die Allele in den Populationen in jeweils unterschiedlichen Häufigkeiten vorkommen. Ebenso ist es natürlich auch denkbar, dass Krankheiten in den Populationen mit unterschiedlichen HLA-Allelen assoziiert sind.

Wir haben uns bei unserer molekulargenetischen Untersuchung des HLA-Systems auf die Allele konzentriert, die derzeit im Hinblick auf die Krankheitsassoziation als relevant gelten, nämlich die HLA-DRB1- und HLA-DQB1-Allele. Dabei konnten wir eine Assoziation der untersuchten HLA-Allele mit der Präeklampsie nicht nachweisen.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass nicht nur der maternale, sondern auch der fetale (d.h. paternale) Genotyp bei der Präeklampsie eine Rolle spielt (66) bzw. dass eine wie auch immer geartete Interaktion beider Genotypen Ursache für die Entstehung der Krankheit ist. Unser Anliegen war es jedoch, im Genom der Mutter einen möglichen *disease marker* zu finden, so dass durch eine Screening-Untersuchung bei schwangeren Frauen ein möglicherweise bestehendes erhöhtes Risiko für die Präeklampsie rechtzeitig entdeckt werden könnte.

Möglicherweise sind jedoch neben den HLA-Genen auch noch andere Gene, wie z.B. die TNF-Polymorphismen (22), an der Entstehung der Erkrankung beteiligt.

5.2 Rolle der TNF-Polymorphismen

Chen et al. (22) fanden eine Assoziation eines der TNFA-Allele, des TNFA1-Allels, mit der Präeklampsie. Allerdings hatten sie ihre Untersuchung nur an wenigen Patientinnen durchgeführt (14 mit Präeklampsie). Nachfolgende Studien an größeren Kollektiven konnten dieses Ergebnis denn auch nicht bestätigen (36, 64, 68).

Auch die Untersuchung des TNFB-Polymorphismus ergab bisher keine Assoziation der Allele (TNFB1 und TNFB2) mit der Präeklampsie (68).

Die von uns durchgeführte Untersuchung ergab ebenfalls keine Assoziation der Allele des TNFA- bzw. des TNFB-Polymorphismus mit der Präeklampsie.

Die Regulation der TNF- α -Produktion erfolgt auf der transkriptionellen und posttranskriptionellen Ebene (119), d.h. die Höhe der TNF- α -Sekretion auf einen bestimmten Reiz hin ist zwar genetisch bedingt, z.B. durch das Vorhandensein eines bestimmten TNF-Allels. Darüber hinaus wird sie jedoch durch eine Reihe weiterer Faktoren beeinflusst. Dazu gehören u.a. der HLA-Haplotyp, die Expression von CD14 auf Monozyten und andere (modulatorische) Zytokine (69).

Es ist daher wahrscheinlich unmöglich, einen direkten funktionalen Effekt der TNF-Allele auf die Pathogenese der Präeklampsie bzw. den Verlauf der Erkrankung aufzuzeigen. Vielmehr könnte eine mögliche Assoziation eines der TNF-Allele mit der Präeklampsie allein dadurch zustande kommen, dass es in einem Kopplungsungleichgewicht mit dem eigentlichen verursachenden Gen steht (143).

Das Gesagte gilt ebenso für die HLA-Allele. Auch sie könnten entweder direkt für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich sein. So könnte etwa HLA-DR als *immune response modifier* eine Rolle spielen. Genau so gut könnten sie aber auch nur indirekt eine Rolle spielen, z.B. als Teil eines erweiterten Haplotyps zusammen mit den TNF-Polymorphismen (51). Denkbar wäre auch, dass ein und dasselbe HLA-Allel einerseits als *immune response modifier* die TNF- α -Produktion fördert und andererseits als Teil eines erweiterten (*low responder*-)Haplotyps diese supprimiert (58).

Nach Kilpatrick (58) ist dies sogar die wahrscheinlichste Variante, dass die HLA-Allele nur indirekt eine Rolle bei der Entstehung der Präeklampsie spielen, nämlich als Teil eines erweiterten Haplotyps, z.B. im Kopplungsungleichgewicht mit den TNF-Allelen.

In dem Zusammenhang haben wir Kopplungsanalysen durchgeführt, um zu sehen, ob möglicherweise HLA-Allele mit den TNF-Allelen assoziiert sind. Dabei ergab sich, dass die folgenden HLA- bzw. TNF-Allele signifikant häufiger miteinander vorkamen: HLA-DRB1*03 und TNFA2, HLA-DRB1*03 und TNFB1, DRB1*14 und TNFB1, DQB1*02 und TNFA2, DQB1*02 und TNFB1.

Möglicherweise sind diese Ergebnisse aber rein zufällig aufgrund der großen Anzahl der untersuchten Allele bei einer nur relativ geringen Anzahl gescreenter Patientinnen.

5.3 Rolle der Zytokine im Fruchtwasser

Es gibt zahlreiche Studien über die mögliche Rolle der Zytokine in der normalen Schwangerschaft und bei der Präeklampsie. Dabei wurden die Zytokinkonzentrationen meistens im peripheren (venösen) Blut der Mutter gemessen. Stallmach et al. (126), die in einer Untersuchung die Konzentrationen von mehreren Zytokinen in fünf verschiedenen Kompartimenten – im peripheren Blut der Mutter, im venösen und im arteriellen Blut des Feten, im retroplazentaren Blut und im Fruchtwasser - gemessen haben, konnten jedoch zeigen, dass die Konzentrationen der Zytokine jeweils im Fruchtwasser am höchsten und im peripheren Blut der Mutter am niedrigsten waren, d.h. dasjenige Kompartiment, welches am leichtesten zugänglich ist, ist diagnostisch am wenigsten aussagekräftig.

Wir haben daher in unserer Untersuchung die Konzentrationen der Zytokine und der löslichen Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser gemessen.

Das Fruchtwasser, eine anfangs gelbliche, später klare Flüssigkeit, wird von der inneren Eihaut, dem Amnion als Teil der Fruchthülle, gebildet. Es ist Teil des extraembryonalen Kreislaufes und dient dem Schutz des Embryos.

Im folgenden sollen die Zytokine bzw. die löslichen Zytokinrezeptoren im einzelnen diskutiert werden.

5.3.1 TNF- α und sTNF-R

Die Angaben in der Literatur über die Spiegel von TNF- α im Fruchtwasser bei normalen Schwangerschaften und bei der Präeklampsie sind uneinheitlich.

Bei normalen Schwangerschaften konnten einige Untersucher das Zytokin nur im Fruchtwasser des 2. Trimesters nachweisen (48, 52, 106). Andere fanden es auch im Fruchtwasser des 3. Trimesters (86, 87, 126). Im Fruchtwasser des 1. Trimesters konnte es bisher nicht nachgewiesen werden (86).

Bei Frauen, welche später an der Präeklampsie erkrankten, wurden im 2. Trimenon sowohl erhöhte (48) als auch normale (47, 80) TNF- α -Spiegel im Fruchtwasser gemessen. Im 3. Trimenon fanden Opsjohn et al. (87) bei Frauen mit Präeklampsie keine erhöhten Spiegel von TNF- α .

Wir konnten das Zytokin in keiner der Fruchtwasserproben nachweisen - und das, obwohl der von uns verwendete Testkit eine Empfindlichkeit von 16 pg/ml hatte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der ELISA durch eventuell im Fruchtwasser vorhandene Agonisten oder Inhibitoren behindert wurde (86, 118). Ebenso könnte die kurze Halbwertszeit von TNF- α (< 30 min) die Ursache gewesen sein. Schließlich wird TNF- α pulsatorisch ausgeschüttet und entgeht daher leicht einer Detektion.

Geeigneter zum Nachweis von TNF- α ist daher die indirekte Nachweismethode des Zytokins durch Messung eines der beiden löslichen Rezeptoren (p55 bzw. p75 sTNF-R). Meistens wird in der Labordiagnostik nur p55 sTNF-R bestimmt.

Bei normalen Schwangerschaften steigen die Spiegel von sTNF-R im Fruchtwasser vom 1. zum 2. Trimester an. Im 3. Trimester sinken sie zum Geburtstermin hin wieder ab (88). Untersuchungen zu den sTNF-R-Konzentrationen im Fruchtwasser bei der Präeklampsie gibt es unseres Wissens bisher keine.

sTNF-R konnten wir in allen Fruchtwasserproben nachweisen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen in der Studien- und der Kontrollgruppe zeigte sich jedoch nicht.

Allerdings haben wir in einer der Proben (Nr. 36) einen im Vergleich extrem hohen Wert von sTNF-R gemessen. In dieser Probe waren auch die Konzentrationen anderer Zytokine bzw. Rezeptoren (IL-6, IL-8, sIL-6-R, IL-1RA) zum Teil deutlich erhöht. Die Schwangerschaft der Patientin war kompliziert durch Plazentainsuffizienz und vorzeitige Wehen. Dies spricht zumindest für eine Rolle der genannten Zytokine bei einer gestörten Schwangerschaft.

5.3.2 IL-1 β

IL-1 β ist bei normalen Schwangerschaften im Fruchtwasser des 1. und 2. Trimesters nicht oder nur in geringen Konzentrationen vorhanden (86, 126). Im 3. Trimester ist es dagegen meist im Fruchtwasser nachweisbar (86, 126, 127, 137).

Bei präeklampsischen Schwangerschaften wurden in früheren Untersuchungen im Fruchtwasser des 3. Trimenons normale bis erniedrigte Spiegel von IL-1 β gemessen (62, 87).

Wir konnten das Zytokin nur in zwei Fruchtwasserproben nachweisen. Auch diese beiden Patientinnen (Nr. 35 und Nr. 47, beide aus der Kontrollgruppe) hatten schwere Schwanger-

schaftskomplikationen (Nr. 35: Nabelschnurknoten, Plazentainsuffizienz, Zervixinsuffizienz, Schwangerschaftsblutungen, vorzeitige Wehen; Nr. 47: bei der Patientin mußte wegen drohender Uterusruptur eine Sectio durchgeführt werden). In beiden Proben waren wiederum auch andere Zytokine (IL-6 und IL-8) erhöht. Auch diese Fälle sprechen somit für eine Rolle der Zytokine bei gestörten Schwangerschaften.

5.3.3 IL-6 und sIL-6-R

IL-6 konnte bei normalen Schwangerschaften von mehreren Untersuchern im Fruchtwasser des 2. und 3. Trimenons nachgewiesen werden (86, 109, 126). Im 1. Trimenon war es dagegen nicht vorhanden (86).

Bei der Präeklampsie sind die Angaben uneinheitlich. Bei Schwangeren im 2. Trimester, welche später eine Präeklampsie entwickelten, wurden im Fruchtwasser sowohl normale als auch erhöhte IL-6-Konzentrationen gemessen (47, 80). Im 3. Trimenon waren die Spiegel dagegen normal bis erniedrigt (87, 125).

In unserer Untersuchung konnten wir IL-6 in allen Proben nachweisen. Dabei waren die Konzentrationen in der Kontrollgruppe und der Studiengruppe nicht signifikant verschieden.

Auffällig ist, dass die Spannweite (*range*) der IL-6-Konzentrationen im Fruchtwasser in beiden Gruppen sehr hoch war, d.h., dass die Konzentrationen des Zytokins großen interindividuellen Schwankungen unterliegen.

In zwei Proben waren die IL-6-Spiegel extrem hoch (Patientinnen Nr. 35 und Nr. 47, s.o.).

Die Rolle von IL-6 in der (normalen) Schwangerschaft ist bis heute ungeklärt. Man nimmt an, dass es die plazentare und fetale Entwicklung beeinflusst und hier insbesondere bei der Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt. So könnten etwa erniedrigte Spiegel von IL-6 in der uteroplazentaren Einheit ein vermindertes Wachstum und eine mangelhafte Entwicklung des Trophoblasten zur Folge haben. Dies wiederum könnte zu einer Wachstumsretardierung des Feten und/oder zur Entwicklung einer Präeklampsie führen (125). Möglicherweise sind erniedrigte Spiegel von IL-6 bei diesen Erkrankungen aber auch nur Zeichen für ein vermindertes Wachstum der Gewebe (125).

Die Spiegel des löslichen Rezeptors von IL-6, sIL-6-R, steigen in der normalen Schwangerschaft vom 1. zum 2. Trimester an und bleiben dann bis zum Geburtstermin unverändert (88).

Bei der Präeklampsie hat man - im Fruchtwasser des 3. Trimesters - keine Unterschiede in den sIL-6-R-Konzentrationen gegenüber normalen Schwangerschaften feststellen können (88).

In unserer Untersuchung waren die sIL-6-R-Fruchtwasserspiegel in der Studien- und der Kontrollgruppe ebenfalls nicht signifikant verschieden.

5.3.4 IL-8

Im 3. Trimester wurden bei Frauen mit normalen Schwangerschaften hohe Konzentrationen von IL-8 im Fruchtwasser gemessen (47, 126, 127).

Bei Schwangeren im 2. Trimester, welche später in der Schwangerschaft an einer Präeklampsie erkrankten, waren die Spiegel des Zytokins normal bis erhöht (47, 80).

In unserer Untersuchung konnten wir IL-8 in 28 (von 52) Fruchtwasserproben nachweisen, wobei die Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen wiederum nicht signifikant waren.

In zwei Fruchtwasserproben waren die IL-8-Spiegel extrem hoch (Patientinnen Nr. 35. und Nr. 47, s.o.).

5.3.5 IL-1RA

Das Zytokin IL-1RA kommt bei normalen Schwangerschaften in sehr hohen Konzentrationen im Fruchtwasser vor (114). Untersuchungen bei präeklampsischen Schwangerschaften liegen unseres Wissens bisher keine vor.

Auch wir konnten IL-1RA in allen Fruchtwasserproben in sehr hohen Konzentrationen nachweisen. Es ergab sich jedoch auch bei diesem Zytokin kein signifikanter Unterschied zwischen den Fruchtwasserspiegeln in der Studien- und der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse zweier früherer Studien, in denen bei weiblichen Feten höhere IL-1RA-Konzentrationen als bei männlichen gefunden wurden (16, 114), konnten wir bestätigen. Eine Erklärung für diese Korrelation hat man bisher nicht gefunden.

5.4 Korrelationsanalysen

Wir haben die Fruchtwasserkonzentrationen der einzelnen Zytokine und löslichen Rezeptoren miteinander korreliert. Dabei erreichten die folgenden Korrelationen das Signifikanzniveau: IL-6 und IL-8, IL-6 und sTNF-R sowie IL-8 und sTNF-R ($p < 0,05$). Am stärksten war die Korrelation zwischen IL-6 und IL-8 ($p < 0,001$). Dies ist im Einklang mit einer früheren Studie von Nakabayashi et al. (80), welche ebenfalls eine Korrelation von IL-6 und IL-8 im Fruchtwasser fanden.

Die Korrelationen der Konzentrationen der Zytokine bzw. ihrer löslichen Rezeptoren erklären sich wahrscheinlich aus der wechselseitigen Beeinflussung derselben im Sinne der Induktion bzw. Stimulation und der Inhibition im sog. Zytokinnetzwerk.

5.5 Ausblicke

Bei der Präeklampsie handelt es sich um eine komplexe Erkrankung, welche überwiegend genetisch bedingt ist und deren Ursachen sicherlich in einer Maladaptation des (mütterlichen) Immunsystems liegen.

In bisherigen Studien wurden meist nur ein oder einige wenige immunologische Parameter untersucht. Wir haben dagegen in der vorliegenden Arbeit an einem Patientenkollektiv mehrere Immunparameter bestimmt, welche wir für relevant erachteten.

Unser primäres Ziel war es, einen immunologischen *disease marker* zu finden - in Form eines HLA-Allels oder eines TNF-Allels, welches über ein eventuell bestehendes erhöhtes Erkrankungsrisiko Aufschluß geben könnte, bzw. in Form eines Zytokins oder löslichen Zytokinrezeptors im Fruchtwasser, welches bzw. welcher Hinweise über den weiteren Verlauf der Erkrankung geben könnte. Leider gelang es uns nicht, einen solchen Marker zu finden. Dennoch ist nicht ausgeschlossen, dass ein HLA-Allel oder ein TNF-Allel mit der Erkrankung assoziiert ist. Hierzu sollten breiter angelegte Reihenuntersuchungen durchgeführt werden.

Was die Zytokine bzw. die löslichen Zytokinrezeptoren im Fruchtwasser betrifft, ist zum einen die Gewinnung der Fruchtwasserproben mittels Amniozentese problematisch, da diese mit einem hohen Risiko für Mutter und Fetus verbunden ist.

Zum anderen ist fraglich, ob sich tatsächlich ein einzelnes Zytokin bzw. ein einzelner Rezeptor finden läßt, welches bzw. welcher als *disease marker* dienen könnte. Vielmehr müssen hier, aufgrund der ausgesprochenen Komplexität des Zytokinnetzwerkes, welches zu großen Teilen noch unverstanden ist und welches durch eine Vielzahl von teils selbst noch unbekanntem Faktoren beeinflusst wird, sicher immer zumindest mehrere Parameter gemeinsam betrachtet werden.

6 Zusammenfassung

Die Präeklampsie ist eine Schwangerschaftserkrankung, deren Ursachen bis heute weitgehend unbekannt ist. Man weiß allerdings, dass die Erkrankung vorwiegend genetisch bedingt ist und dass ihre Ursachen am ehesten in einer Maladaptation des mütterlichen Immunsystems auf die Schwangerschaft zu suchen sind.

Es gibt für die Präeklampsie bis heute noch keine zuverlässige Früherkennungsmethode.

Wir haben daher bei einem Studienkollektiv (Schwangere mit Präeklampsie oder HELLP-Syndrom, n = 8) und bei einem Kontrollkollektiv (Schwangere ohne Präeklampsie, n = 43) folgende Immunparameter, welche wir - nach aktueller Literaturlage - für relevant erachteten, untersucht:

- die HLA-DRB1- und HLA-DQB1-Allele der Mütter,
- die TNFA- und TNFB-Allele der Mütter,
- im Fruchtwasser die (inflammatorischen) Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8, das Zytokin IL-1RA sowie die löslichen Zytokinrezeptoren sTNF-R (55p) und sIL-6-R.

Ziel war es, einen möglichen *disease marker* im Genom der Mutter bzw. im Fruchtwasser zu finden, um so ein möglicherweise vorhandenes erhöhtes Risiko, an der Präeklampsie zu erkranken, vorhersagen zu können.

Zur Bestimmung der Allele haben wir Leukozyten aus mütterlichem (EDTA-)Blut isoliert und daraus die DNA nach der Methode nach MILLER extrahiert. Anschließend haben wir die HLA-Allele mittels PCR bestimmt.

Zur Bestimmung der TNF-Allele wurde zunächst ebenfalls eine PCR durchgeführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Allele mittels RFLP-Analyse.

Das Fruchtwasser haben wir bei (primären) Schnittentbindungen gewonnen. Die Konzentrationen der Zytokine und der löslichen Zytokinrezeptoren haben wir mittels ELISA bestimmt.

Die statistische Auswertung ergab, dass die Präeklampsie weder mit den untersuchten HLA-DRB1 bzw. HLA-DQB1-Allelen, noch mit den TNFA- und TNFB-Allelen assoziiert war. Auch waren die Konzentrationsunterschiede der Zytokine und löslichen Rezeptoren im Fruchtwasser in den Studien- und der Kontrollgruppe nicht signifikant.

Es gelang uns somit nicht, einen *disease marker* für die Präeklampsie zu finden.

Nebenbefundlich fanden wir (positive) Assoziationen zwischen den folgenden HLA-Allelen und TNF-Allelen: HLA-DRB1*03 und TNFA2, HLA-DRB1*03 und TNFB1, DRB1*14 und TNFB1, DQB1*02 und TNFA2, DQB1*02 und TNFB1. Auch fanden wir (positive) Korrelationen zwischen folgenden Zytokinen bzw. löslichen Zytokinrezeptoren: IL-6 und IL-8, IL-6 und sTNF-R, IL-8 und sTNF-R. Diese erklären sich wahrscheinlich aus der gegenseitigen Abhängigkeit der Zytokine und ihrer Rezeptoren im Sinne der Induktion bzw. Inhibition im sog. Zytokinnetzwerk.

Es war der Ansatz der Arbeit, an einem Patientenkollektiv nicht wie in bisherigen Untersuchungen nur einen oder einige wenige, sondern mehrere Immunparameter zu untersuchen, da wir der Ansicht waren, dass nur so neue Erkenntnisse über die Rolle des Immunsystems bei der Präeklampsie gewonnen werden können. Auf dieser Basis sollten daher weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Abraham LJ, French MA, Dawkins RL: Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumor necrosis factor- α . *Clin Exp Immunol* 92, 14–18 (1993)
2. Adams EM, Finlayson A: Familial aspects of pre-eclampsia and hypertension in pregnancy. *Lancet* 23, 1375–1378 (1961)
3. Aderka D, Engelmann H, Wallach D: Soluble tumor necrosis factor receptors in health and disease. In: Fiers W, Buurman WA (Hrsg.): *Tumor Necrosis Factor: Molecular and Cellular Biology and Clinical Relevance*. 191–198, Karger, Basel, 1993
4. Arend WP: Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 88, 1445–1451 (1991)
5. Arngrimsson R, Bjornsson S, Geirsson RT, Bjornsson H, Walker JJ, Snaedal G: Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. *Br J Obstet Gynaecol* 97, 762–769 (1990)
6. Arngrimsson R, Bjornsson S, Geirsson RT: Analysis of different inheritance patterns in preeclampsia/eclampsia syndrome. *Hypertens Preg* 14, 27–38 (1995)
7. Audibert F, Friedman SA, Frangieh AY, Sibai BM: Clinical utility of strict diagnostic criteria for the HELLP-syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 175, 460–464 (1996)
8. Baergen R, Benirschke K, Ulich TR: Cytokine expression in the placenta. The role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist expression in chorioamnionitis and parturition. *Arch Pathol Lab Med* 118, 52–55 (1994)
9. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84, 1045–1049 (1989)
10. Barden A, Graham D, Beilin LJ, Ritchie J, Baker R, Walters BN, Michael CA: Neutrophil CD11b expression and neutrophil activation in preeclampsia. *Clin Sci* 92, 37–44 (1997)
11. Bendtzen K, Morling N, Fomsgaard A, Svenson M, Jakobsen B, Odum N, Svejgaard A: Association between HLA-DR2 and production of tumor necrosis factor α and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* 28, 599–606 (1988)
12. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP: Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1582–1588 (1997)
13. Beutler B, Cerami A: The biology of cachectin/TNF - a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7, 625–655 (1989)

14. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, Blomberg BM von, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Pena AS: Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 43, 456–463 (1996)
15. Brinkman BMN, Zuijdgheest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL: Relevance of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) -308 promotor polymorphism in the TNF-alpha gene regulation. *J Inflamm* 46, 32–41 (1996)
16. Bry K, Lappalainen U, Waffarn F, Teramo K, Hallman M: Influence of fetal gender on the concentration of the interleukin-1 receptor antagonist in amniotic fluid and newborn urine. *Pediatr Res* 35, 130–134 (1994)
17. Bry K, Teramo K, Lappalainen U, Waffarn F, Hallman M: Interleukin-1 receptor antagonist in the fetomaternal compartment. *Acta Paediatr* 84, 233–236 (1995)
18. Burrows RF, Hunter DJ, Andrew M, Kelton JG: A prospective study investigating the mechanism of thrombocytopenia in pre-eclampsia. *Obstet Gynecol* 70, 334–338 (1987)
19. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM: Polymorphism in the tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 182, 1259–1264 (1995)
20. Campbell RD, Trowsdale J: Map of the human MHC. *Immunol Today* 14, 349–352 (1993)
21. Carosella ED, Dausset J, Rouas-Freiss N: Immunotolerant functions of HLA-G. *Cell Mol Life Sci* 55, 327–333 (1999)
22. Chen G, Wilson R, Wang SH, Zheng HZ, Walker JJ, McKillop JH: Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) gene polymorphism and expression in preeclampsia. *Clin Exp Immunol* 104, 154–159 (1996)
23. Chen HL, Yang Y, Hu X-L, Yelavarthi KK, Fishback JL, Hunt JS: Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am J Pathol* 139, 327–335 (1991)
24. Chesley LC, Cosgrove RA, Annitto JE: Pregnancy in the sisters and daughters of eclamptic women. *Path Microbiol* 24, 662–666 (1961)
25. Chesley LC, Annitto JE, Cosgrove RA: The familial factor in toxemia of pregnancy. *Obstet Gynecol* 32, 303–311 (1968)
26. Chesley LC, Cooper DW: Genetics of hypertension in pregnancy: Possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *Br J Obstet Gynaecol* 93, 898–908 (1986)
27. Christiansen OB: A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. *Hum Reprod Update* 2, 271–293 (1996)

28. Conway DJ, Holland MJ, Bailey RL, Campbell AE, Mahdi OSM, Jennings R, Mibena E, Mabey DCW: Scarring trachoma is associated with polymorphism in the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene promoter and with elevated TNF- α levels in the tear fluid. *Infect Immun* 65, 1003–1006 (1997)
29. Cooper DW, Liston WA: Genetic control of severe pre-eclampsia. *J Med Genet* 16, 409 - 416 (1979)
30. Cooper DW: Genetics and immunology of severe pre-eclampsia. *Oxford Rev Reprod Biol* 3, 127–155 (1982)
31. Cooper DW, Hill JA, Chesley LC, Bryans CI: Genetic control of susceptibility to eclampsia and miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 95, 644–653 (1988)
32. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ: Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266, 1508–1518 (1994)
33. Damme J van, Opendakker G, Simpson RJ, Rubira MR, Cayphas S, Vink A, Billiau A, Snick A van: Identification of the human 26-kD protein, interferon beta₂, as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 165, 914–919 (1987)
34. Davey DA, MacGillivray I: The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 158, 892-898 (1988)
35. Dekker GA, Sibai BM: Early detection of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 165, 160–172 (1991)
36. Dizon-Townson DS, Major H, Ward K: A promoter mutation in the tumor necrosis factor α gene is not associated with preeclampsia. *J Reprod Immunol* 38, 55–61 (1998)
37. Dudley DJ, Trautman MS, Edwin SS, Mitchell MD: Decidual cell biosynthesis of interleukin-6 and its regulation by cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 884–889 (1992)
38. Ellis SA, Sargent IL, Redman CWG, McMichael AJ: Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 59, 595–601 (1986)
39. Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ: Human trophoblast and the carcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J Immunol* 144, 731–735 (1990)
40. Fiers W: Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 285, 199–212 (1991)
41. Fugger L, Morling N, Ryder LP, Georgsen J, Jakobsen BK, Svejgaard A, Andersen V, Oxholm P, Karup Pedersen F, Friis J: *NcoI* restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the tumor necrosis factor (TNF α) region in four autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 34, 17–22 (1989)

42. Fugger L, Morling N, Ryder LP, Platz P, Georgsen J, Jakobsen BK, Svejgaard A, Dalhoff K, Ranek L: *NcoI* restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the tumor necrosis factor (TNF α) region in primary biliary cirrhosis and in healthy Danes. *Scand J Immunol* 30, 185–189 (1989)
43. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H: Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7251-7255 (1987)
44. Girling JC, Dow E, Smith JH: Liver function tests in pre-eclampsia: importance of comparison with a reference range derived from normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 104, 246-250 (1997)
45. Guggenmoos-Holzmann I, Wernecke K-D: *Medizinische Statistik*. Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin, Wien (u.a.), 1995
46. Halgunset J, Johnsen H, Kjollesdal AM, Qvigstad E, Espevik T, Austgulen R: Cytokine levels in amniotic fluid and inflammatory changes in the placenta from normal deliveries at term. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 56, 153-160 (1994)
47. Heikkinen J, Möttönen M, Pulkki K, Lassila O, Alanen A: Cytokine levels in midtrimester amniotic fluid in normal pregnancy and in the prediction of pre-eclampsia. *Scand J Immunol* 53, 310–314 (2001)
48. Heyborne KD, Witkin SS, McGregor JA: Tumor necrosis factor- α in midtrimester amniotic fluid is associated with impaired intrauterine fetal growth. *Am J Obstet Gynecol* 167, 920–925 (1992)
49. Hösli I, Holzgreve W: *Hypertensive Erkrankungen*. In: Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider K-TM, Weiss JM (Hrsg.): *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 346–351, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1999
50. Hunt JS, Chen H-L, Miller L: Tumor necrosis factors: Pivotal components of pregnancy? *Biol Reprod* 54, 554–562 (1996)
51. Jacob CO, Fronek Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO: Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor α : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1233–1237 (1990)
52. Jäättelä M, Kuusela P, Saksela E: Demonstration of tumor necrosis factor in human amniotic fluids and supernatants of placental and decidual tissues. *Lab Invest* 58, 48–52 (1988)
53. Katano K, Aoki K, Sasa H, Ogasawara M, Matsuura E, Yagami Y: Beta 2-Glykoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies as a predictor of adverse pregnancy outcomes in healthy pregnant women. *Hum Reprod* 11, 509–512 (1996)
54. Kenny L, Baker PN: *Maternal pathophysiology in pre-eclampsia*. Baillière's Clin Obstet Gynaecol 13, 59–75 (1999)

55. Kilpatrick DC, Liston WA, Jazwinska EC, Smart GE: Histocompatibility studies in pre-eclampsia. *Tissue Antigens* 29, 232–236 (1987)
56. Kilpatrick DC, Liston WA, Gibson F, Livingstone J: Association between susceptibility to pre-eclampsia within families and HLA DR4. *Lancet* 4, 1063–1065 (1989)
57. Kilpatrick DC, Liston WA: Obstetric significance of cardiolipin antibodies in subjects without systemic erythematosis. *J Obstet Gynaecol* 12, 82–86 (1992)
58. Kilpatrick DC: Influence of human leucocyte antigen and tumor necrosis factor genes on the development of pre-eclampsia. *Hum Reprod Update* 5, 94–102 (1999)
59. King A, Boocock C, Sharkey AM, Gardner L, Beretta A, Siccardi AG, Loke YW: Evidence for the expression of HLA-C Class I mRNA and protein by first trimester trophoblast. *J Immunol* 156, 2068–2076 (1996)
60. Koelman CA, Coumans ABC, Nijman HW, Doxiadis IIN, Dekker GA, Claas FHJ: Correlation between oral sex and a low incidence of preeclampsia: a role for soluble HLA in seminal fluid? *J Reprod Immunol* 46, 155–166 (2000)
61. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R: A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248, 220–223 (1990)
62. Kupfermanc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML: Tumor necrosis factor- α is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 170, 1752–1759 (1994)
63. Kupfermanc MJ, Peaceman AM, Aderka D, Wallach D, Socol ML: Soluble tumor necrosis factor receptors and interleukin-6 levels in patients with severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 88, 420–427 (1996)
64. Lachmeijer AMA, Crusius JBA, Pals G, Dekker GA, Arngrimsson R, ten Kate LP: Polymorphisms in the tumor necrosis factor and lymphotoxin- α gene region and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 98, 612–619 (2001)
65. Lantz M, Malik S, Slevin ML, Olsson I: Infusion of tumor necrosis factor (TNF) causes an increase in circulating TNF-binding protein in humans. *Cytokine* 2, 402–406 (1990)
66. Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM: Fetal and maternal contributions to the risk of pre-eclampsia: Population-based study. *Br Med J* 316, 1343–1347 (1998)
67. Lim KJ, Odukoya OA, Li TC, Cooke ID: Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2, 469–481 (1996)
68. Livingston JC, Park V, Barton JR, Elfering S, Haddad B, Mabie WC, Quasney M, Sibai BM: Lack of association of severe preeclampsia with maternal and fetal mutant alleles for tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha genes and plasma tumor necrosis factor alpha levels. *Am J Obstet Gynecol* 184, 1273–1277 (2001)

69. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, Groote D de, Louis R, Belaiche J: Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 113, 401–406 (1998)
70. Lundin-Schiller S, Mitchell MD: Prostaglandin production by human chorion leave cells in response to inflammatory mediators. *Placenta* 12, 353–363 (1991)
71. MacGillivray I: Some observations on the incidence of pre-eclampsia. *J. Obstet Gynaecol Br Emp* 65, 536-539 (1958)
72. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D: Variation of the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371, 508–511 (1994)
73. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, Van Assshe AF: A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 101, 669-674 (1994)
74. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 16, 1215 (1988)
75. Mitchell MD, Dudley DJ, Edwin SS, Lundin-Schiller S: Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells. *Eur J Pharmacol* 192, 189–191 (1991)
76. Mitchell MD, Branch DW, Lundin-Schiller S, Romero RJ, Daynes RA, Dudley DJ: Immunologic aspects of preterm labor. *Semin Perinatol* 15, 210–224 (1991)
77. Mölvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, Nielsen LS, Svejgaard A, Nerup J: Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scand J Immunol* 27, 705-716 (1988)
78. Mölvig J, Pociot F, Baek L, Worsaae H, Wogensen LD, Christensen P, Staub-Nielsen LS, Mandrup-Poulsen T, Manogue K, Nerup J: Monocyte function in IDDM patients and healthy individuals. *Scand J Immunol* 32, 297–306 (1990)
79. Mytilineos J, Scherer S, Opelz G: Comparison of RFLP-DR beta and serological HLA-DR typing in 1500 individuals. *Transplantation* 5, 870–873 (1990)
80. Nakabayashi M, Sakura M, Takeda Y, Sato K: Elevated IL-6 in midtrimester amniotic fluid is involved with the onset of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 39, 329–334 (1998)
81. Nargarkatti PS, Clark DA: In vitro activity and in vivo correlates of alloantigen-specific murine suppressor T cells induced by allogeneic pregnancy. *J Immunol* 131, 638–643 (1983)
82. Ness RB, Roberts JM: Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: A hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol* 175, 1365-1370 (1996)

83. Novick D, Engelmann H, Wallach D, Rubinstein M: Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Exp Med* 170, 1409–1414 (1989)
84. Nuki G: Ankylosing spondylitis, HLA-B27 and beyond. *Lancet* 351, 767–768 (1998)
85. Opelz G, Mytilineos J, Scherer S, Dunckley H, Trejaut J, Chapman J, Middleton D, Savage D, Fischer O, Bignon J-D, Bensa J-C, Albert E, Noreen H: Survival of DNA HLA-DR typed and matched cadaver kidney transplants. *Lancet* 338, 461–463 (1991)
86. Opsjon SL, Wathen NC, Tingulstad S, Wiedswang G, Sundan A, Waage A, Austgulen R: Tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 169, 397–404 (1993)
87. Opsjon SL, Austgulen R, Waage A: Interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor at delivery in preeclamptic disorders. *Acta Obstet Gynecol Scand* 74, 19–26 (1995)
88. Opsjon SL, Novick D, Wathen NC, Cope AP, Wallach D, Aderka D: Soluble tumor necrosis factor receptors and soluble interleukin-6 receptor in fetal and maternal sera, coelomic and amniotic fluids in normal and pre-eclamptic pregnancies. *J Reprod Immunol* 29, 119–134 (1995)
89. Paleolog EM, Delasalle SA, Buurman WA, Feldmann M: Functional activities of receptors for tumor necrosis factor- α on human vascular endothelial cells. *Blood* 84, 2578–2590 (1994)
90. Pattison NS, Chamley LW, McKay EJ, Liggins GC, Butler WS: Antiphospholipid antibodies in pregnancy: prevalence and clinical association. *Br J Obstet Gynaecol* 100, 909-913 (1993)
91. Peces R, Urra JM, de la Torre M: Influence of HLA-DR phenotype on tumor necrosis factor- α -production in renal-transplant recipients. *Nephron* 71, 180–183 (1995)
92. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruysse L, Van Assche AF: Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 98, 648-655 (1991)
93. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mölvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A: Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 23, 224–231 (1993)
94. Puchner T, Egarter C, Wimmer C, Lederhilger F, Weichselbraun I: Amniotic fluid interleukin-8 as a marker for intraamniotic infection. *Arch Gynecol Obstet* 253, 9–14 (1993)
95. Redman CWG: Current topic: Pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 12, 301-308 (1991)
96. Redman CWG, Sacks G, Sargent I: Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180, 499–506 (1999)

97. Roberts JM, May WJ: Consumptive coagulopathy in severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 48, 163-166 (1976)
98. Roberts JM: Pregnancy-related hypertension. In: Creasy R, Resnik R (Hrsg.): *Maternal-fetal Medicine: Principles and Practice*. 777-823, Saunders, Philadelphia, 1989
99. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK: Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 161, 1200-1204 (1989)
100. Roberts JM, Redman CWG: Pre-eclampsia: More than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 341, 1447-1451 (1993)
101. Roberts JM: Preeclampsia: What we know and what we do not know. *Semin Perinat* 24, 24-28 (2000)
102. Robillard PY, Hulseley TC, Perianin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E: Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet* 344, 973-975 (1994)
103. Robson EB, Lamm LU: Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. *Human gene mapping 7. Cytogenet Cell Genet* 37, 47-70 (1984)
104. Romero R, Durum S, Dinarello CA, Oyarzun E, Mitchell MD: Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion. *Prostaglandins* 37, 13-22 (1989)
105. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, Durum SK: Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 160, 1117-1123 (1989)
106. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, Cerami A: Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 161, 336-341 (1989)
107. Romero R, Mazor M, Wu YK, Avila C, Oyarzun E, Mitchell MD: Bacterial endotoxin and tumor necrosis factor stimulate prostaglandin production by human decidua. *Prostaglandins, Leukotrienes & Fatty Acids* 37, 183-186 (1989)
108. Romero R, Parvizi ST, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Avila C, Athanassiadis AP, Mitchell MD: Amniotic fluid interleukin-1 in spontaneous labor at term. *J Reprod Med* 35, 235-238 (1990)
109. Romero R, Avila C, Santhanum U, Seghal PB: Amniotic fluid interleukin-6 in preterm labor: association with infection. *J Clin Invest* 85, 1392-1400 (1990)
110. Romero R, Ceska M, Avila C, Mazor M, Behnke E, Lindley I: Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8 in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 165, 813-820 (1991)

111. Romero R, Mazor M, Brandt F, Sepulveda W, Avila C, Cotton DB: Interleukin-1 α and interleukin-1 β in preterm and term human parturition. *Am J Reprod Immunol* 27, 117–123 (1992)
112. Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, Copeland D, Williams J: Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am J Obstet Gynecol* 166, 1576–1587 (1992)
113. Romero R, Tartakovsky B: The natural interleukin-1 receptor antagonist prevents interleukin-1-induced preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol* 167, 1041–1045 (1992)
114. Romero R, Gomez R, Galasso M, Mazor M, Berry SM, Quintero RA, Cotton DB: The natural interleukin-1 receptor antagonist in the fetal, maternal, and amniotic fluid compartments: The effect of gestational age, fetal gender, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 171, 912–921 (1994)
115. Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CGN, Saha B, Hazra SK, Hill AVS, Kwiatowski D: Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* 176, 530–532 (1997)
116. Sacks GP, Studena K, Sargent IL, Redman CWG: Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 179, 80–86 (1998)
117. Saito S, Kashara T, Kato Y, Ishihara Y, Ichijo M: Elevation of amniotic fluid interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition. *Cytokine* 5, 81–88 (1993)
118. Santhanam U, Avila C, Romero R, Viguet H, Ida N, Sakurai S, Sehgal PB: Cytokines in normal and abnormal parturition: elevated amniotic fluid interleukin-6 levels in women with premature rupture of membranes associated with intruterine infection. *Cytokine* 3, 155–163 (1991)
119. Sariban E, Imamura K, Luebbers R, Kufe D: Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes. *J Clin Invest* 81, 1506–1510 (1988)
120. Shah AK: Preeclampsia and Eclampsia. www.emedicine.com/neuro/topic323.htm, *last update* 04.01.04
121. Sheehan HL, Lynch JB (Hrsg.): *Pathology of Toxaemia of Pregnancy*. 524-584. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1973
122. Sheppard BI, Bonnar J: The ultrastructural study of utero placental arteries in hypertensive and normotensive pregnancy and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 88, 695-705 (1981)
123. Shimoya K, Matsuzaki N, Taniguchi T, Jo T, Saji F, Fujimura M, Nakayama M, Tanizawa O: Interleukin-8 in cord sera: A sensitive and specific marker for the detection of preterm chorioamnionitis. *J Inf Dis* 165, 957–960 (1992)

124. Sibai BM, Taslimi MM, el-Nazer A, Amon E, Mabie BC, Ryan GM: Maternal-perinatal outcome associated with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets in severe preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 155, 501–509 (1986)
125. Silver RM, Schwinzer B, McGregor JA: Interleukin-6 levels in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancies: preeclampsia, small-for-gestational-age fetus and premature labor. *Am J Obstet Gynecol* 169, 1101–1105 (1993)
126. Stallmach T, Hebisch G, Joller H, Kolditz P, Engelmann M: Expression pattern of cytokines in the different compartments of the fetomaternal unit under various conditions. *Reprod Fertil Dev* 7, 1573–1580 (1995)
127. Stallmach T, Hebisch G, Joller-Jemelka HI, Orban P, Schwaller J, Engelmann M: Cytokine production and visualized effects in the fetomaternal unit. *Lab Invest* 73, 384–392 (1995)
128. Steinborn A, Gunes H, Halberstadt E: Signal for term parturition is of trophoblast and therefore of fetal origin. *Prostaglandins* 50, 237–252 (1995)
129. Steinborn A, Sohn C, Sayehli C, Niederhut A, Schmitt E, Kaufmann M: Preeclampsia, a pregnancy-specific disease, is associated with fetal monocyte activation. *Clin Immunol* 100, 305–313 (2001)
130. Strickland DM, Guzik DS, Cox K, Gaut N, Rosenfeld CR: The relationship between abortion in the first trimester and development of pregnancy-induced hypertension in the subsequent pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 154, 146–148 (1986)
131. Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U: A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- α concentrations and outcome in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 24, 381–384 (1996)
132. Sutherland A, Cooper DW, Howie PW, Liston WA, MacGillivray I: The incidence of severe pre-eclampsia amongst mothers and mothers-in-law of pre-eclamptics and controls. *Br J Obstet Gynaecol* 88, 785–791 (1981)
133. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58, 573–581 (1989)
134. Tálósi G, Endreffy E, Túri S, Németh I: Molecular and genetic aspects of preeclampsia: State of the art. *Mol Genet Metab* 71, 565–572 (2000)
135. Taylor RN: Review: Immunology of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 37, 79–86 (1997)
136. Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B: Change in paternity: A risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology* 7, 240–244 (1996)
137. Tsunoda H, Tamatani T, Oomoto Y, Hirai Y, Kasahara T, Iwasaki H, Onozaki H: Changes in interleukin 1 levels in human amniotic fluid with gestational ages and delivery. *Microbiol Immunol* 34, 377–385 (1990)

138. Uyttenhove C, Coulie PG, Snick J van: T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. *J Exp Med* 167, 1417–1427 (1988)
139. Vogel F, Motulsky AG: Formal Genetics of Humans: Linkage Analysis and Gene Clusters. In: *Human Genetics*. 3. Auflage, 163-187, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
140. Weinstein L: Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count: A severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 142, 159–167 (1982)
141. Wilson AG, Giovine FS di, Blakemore AIF, Duff GW: Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene detectable by *Nco*I restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1, 353 (1992)
142. Wilson AG, Vries N de, Pociot F, Giovine FS di, Putte LBA van de, Duff GW: An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor α promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med* 177, 557–560 (1993)
143. Wilson AG, Syons JA, McDowell TL, McDewitt HO, Duff GW: Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3195–3199 (1997)
144. Wilton AN, Cooper DW, Brennecke S, Bishop SM, Marshall P: Absence of close linkage between maternal genes for susceptibility to pre-eclampsia/eclampsia and HLA DR β . *Lancet* 336, 653–657 (1990)
145. Wilton AN, Barendse WJ, Donald JA, Marshall P, Trudinger B, Gallery EDM, Brennecke SP, Cooper DW: HLA-DRB types in pre-eclampsia and eclampsia. *Tissue Antigens* 38, 137–141 (1991)
146. Wood ML, Okazaki H, Monaco AP: The effect of blood transfusions on the immune response. *Transplant Proc* 20, 1200–1203 (1988)
147. Yasuda M, Takakuwa K, Tokunaga A, Tanaka K: Prospective studies of the association between anticardiolipin antibody and outcome of pregnancy. *Obstet Gynecol* 86, 555–559 (1995)
148. Zee KJ van, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF: Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4845–4849 (1992)
149. National High Blood Pressure Education Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 163, 1691–1712 (1990)
150. Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *Ann N Y Acad Sci* 557, 1-583 (1989)

8 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. M. Seyfarth, für die interessante Themenstellung, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die hervorragende Betreuung der Doktorarbeit. Er war immer ansprechbar und hilfsbereit und stets geduldig.

Mein großer Dank gilt auch meinem Betreuer an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Herrn PD Dr. med. P. Baumann, welcher mir bei gynäkologischen bzw. geburtshilflichen Fragestellungen hilfreich zur Seite stand. Ich bedanke mich insbesondere für seine Hilfe und die gute Koordination der Aufgaben bei der Beschaffung der Forschungsmaterialien in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. med. H. Kirchner für die die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Immunologie und Transfusionmedizin.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. K. Diedrich für die guten Arbeitsbedingungen an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe.

Ich bedanke mich weiter ganz herzlich bei allen MitarbeiterInnen des Instituts für Immunologie und Transfusionmedizin, insbesondere bei Frau Beate Höschler, Frau Sylvia Hartz, Frau Bianca Randig und Frau Kerstin Mussehl.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei allen ÄrztInnen, Hebammen, Krankenschwestern und MTA's der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe für ihre Hilfe und Unterstützung, v.a. bei der Gewinnung der Fruchtwasserproben.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. med. HJ Friedrich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Auch danke ich Frau Dr. med. Angelika Reil für ihre Hilfe bei der Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und in die Laborarbeit.

Schließlich bedanke ich mich ganz herzlich bei den Sekretärinnen von Herrn Professor Dr. med. M. Seyfarth, Frau Carola Vedder und Frau Ivonne Krisch.

9 Lebenslauf

Name:	Jens Müller
Geburtsdatum:	8. Mai 1973
Geburtsort:	Buchholz in der Nordheide
Eltern:	Lothar und Christel Müller
1979 – 1983	Grundschule, Jesteburg
1983 – 1985	Orientierungsstufe, Buchholz i.d.N.
1985 – 1992	Albert-Einstein-Gymnasium, Buchholz i.d.N.
05/1992	Abitur
1992 – 1993	Zivildienst, Kreiskrankenhaus Buchholz i.d.N.
1993–1994	Studium der Germanistik und Lateinischen Philologie an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
1994–2001	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09/1996	Ärztliche Vorprüfung
08/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02 – 04/2003	Arzt im Praktikum am Institut für Radiologie der Zentralklinik Emil von Behring, Berlin
seit 05/2003	Assistenzarzt am Institut für Radiologie des Kantonsspitals Schaffhausen/Schweiz