Zusammenarbeit der Universitätsfrauenklinik (Direktor: Prof. Dr. med. B. Gerber) mit dem

Proteom-Zentrum Rostock (Leiter: Prof. Dr. rer. nat. M. O. Glocker)

Protein-Profiling beim HELLP-Syndrom

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Juliane Christine Finke, geb. am 12.Oktober 1980

aus Rostock

2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0060-8

Dekan	Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger
1. Gutachter	Prof. Dr. rer. nat. Michael O. Glocker
2. Gutachter	PD Dr. med. Toralf Reimer
3. Gutachter	Prof. Dr. med. Marek Zygmunt
Tag der öffentlichen Verteidigung	26.11.2008

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung **5**

2 Einleitung **7**

2.1 Das HELLP-Syndrom 7
2.1.1 Die Klinik des HELLP-Syndroms 8
2.1.2 Pathogenetische Ansätze 11
2.1.3 Pathophysiologie 19
2.2 Proteomics 24
2.3 Fragestellung 26
2.4 Zielsetzung 27

3 Material und Methoden **28**

3.1 Material 28
3.1.1 Probengewinnung 28
3.1.2 Vergleichsgruppen 29
3.1.3 Chemikalien für die 2D-Gelelektrophorese 31
3.1.4 Geräte für die 2D-Gelelektrophorese 32
3.1.5 Chemikalien zum Picken, In-Gel-Verdau und für die Massenspektrometrie 33
3.1.6 Geräte zum Picken, In-Gel-Verdau und für die Massenspektrometrie 33
3.1.7 ELISA 33
3.1.8 Software und Datenbanken 34
3.2 Methoden 35
3.2.1 2D-Gelelektrophorese 35
3.2.2 Massenspektrometrie 39
3.2.3 ELISA 42

4 Ergebnisse **44**

4.1 Patientengut 44
4.2 Proteomprofil des Plasmas von HELLP-Patientinnen 45
4.3 Differentielle Proteinexpressionen beim HELLP-Syndrom 49
4.4 Quantitative Analyse von Serum Amyloid A 55

5 Diskussion **57**

5.1 Die Rolle ausgewählter Proteinfaktoren in der Schwangerschaft sowie für die Diagnose des HELLP-Syndroms 57
5.1.1 Haptoglobin 58
5.1.2 Fibrinogen 59
5.1.3 Inter-α-Trypsin Inhibitor 60
5.1.4 Kininogen 62
5.1.5 Zusammenspiel Kinin-Kallikrein-System und Renin-Angiotensin-System 66
5.1.6 Transthyretin 68
5.1.7 Serum Amyloid A 69
5.2 Neue Ansätze für massenspektrometrie-basierte, multiparametrische Diagnoseverfahren für das HELLP-Syndrom 74
5.3 Grenzen dieser Arbeit und Ausblick 78

6 Literaturverzeichnis **81**

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis **I**
7.2 Abbildungsverzeichnis **II**
7.3 Tabellenverzeichnis **II**
7.4 Curriculum vitae **III**
7.5 Publikationen und Kongressteilnahmen **IV**
7.6 Thesen **V**
7.7 Selbstständigkeitserklärung **VII**
7.8 Danksagung **VIII**

1 Zusammenfassung

Das HELLP-Syndrom stellt eine schwere Verlaufsform der Präeklampsie mit typischer laborchemischer Konstellation dar (H für Hämolyse = hemolysis, EL für erhöhte Leberenzymwerte = elevated liver enzymes und LP für niedrige Thrombozytenzahlen = low platelets). Die Pathogenese ist bisher ungeklärt. Da die Leber als Hauptschädigungsort beim HELLP-Syndrom gleichzeitig einen Großteil der Plasmaproteine produziert und das Blutplasma als Transportmedium im Körper Spiegel komplexer Vorgänge ist, liegt eine globale Proteomanalyse des Blutplasmas nahe. Es sollte untersucht werden, ob ein HELLP-spezifisches Proteinprofil erstellt werden kann.

In dieser Arbeit wurden Plasmaproben von HELLP-Patientinnen und von gesunden Schwangeren mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Von den eingeschlossenen Patientinnen wurde zu zwei Zeitpunkten Blut abgenommen, zum einen bei Diagnosestellung des HELLP-Syndroms beziehungsweise kurz vor der Entbindung (t1), zum anderen nach der Entbindung (t2). In der Gelanalyse konnten differentiell exprimierte Gelbereiche zwischen HELLP-Patientinnen und der Kontrollgruppe detektiert werden und somit ein Referenzgel generiert werden. Dieses Referenzgel stellt ein für das HELLP-Syndrom typisches Proteinprofil dar.

Eine densitometrische Analyse der differentiell exprimierten Gelbereiche wurde vorgenommen. Diese ermöglichte aufgrund von Dichteberechnungen der verschiedenen Proteinspots einen Vergleich und eine statistische Analyse der Gelbereiche. Im Referenzgel konnten sechs Expressionsveränderungen als signifikant bestätigt werden. Diese Proteinspots wurden daraufhin aus den Gelen herausgepickt und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Dies ergab folgende Proteine, welche sich beim HELLP-Syndrom signifikant unterscheiden im Vergleich zu einer gesunden Schwangerschaft: Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor H4, Kininogen 1, Fibrinogen gamma, Transthyretin, Haptoglobin und Serum Amyloid A. Der auffälligste Unterschied war die klare Überexpression einer Spotgruppe im Bereich von 12 kDa in der Mehrzahl der HELLP-Gele. Die Spots bei 12 kDa wurden als Serum Amyloid A (SAA) identifiziert, die Überexpression in einem ELISA-Test gegen humanes SAA validiert und quantifiziert. Es konnte eine signifikante Überexpression von SAA bei HELLP-Patientinnen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bestätigt werden. Die SAA-Werte in der HELLP-Gruppe liegen ausnahmslos über 3,51 mg/l, während sämtliche SAA-Werte der Kontrollgruppe kleiner als 3,51 mg/l sind. Es kann somit eine klare Trennungslinie zwischen der pathologischen und der physiologischen Gruppe gezogen werden.

Mit diesen Ergebnissen ist es nun möglich, die klinische Anwendbarkeit von SAA als einen Marker von einer HELLP-spezifischen Marker-Signatur in longitudinalen Studien mit höherer Fallzahl zu prüfen. Die Quantifizierung der Überexpression von Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor H4, Kininogen 1, Fibrinogen gamma und Transthyretin ist erforderlich, um diese gegebenenfalls als weitere Komponenten einer HELLP-spezifischen Marker-Signatur zu ergänzen. Eine so generierte Marker-Signatur könnte daraufhin auf ihren klinischen und präklinischen Vorhersagewert für das HELLP-Syndrom getestet werden.

2 Einleitung

2.1 Das HELLP-Syndrom

Das HELLP-Syndrom ist eine schwere und lebensbedrohliche Verlaufsform hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen und wird als Komplikation einer Präeklampsie angesehen. Bei der Präeklampsie entwickelt sich eine schwangerschaftsassoziierte Hypertonie und Proteinurie typischerweise ab der 20. Schwangerschaftswoche. Das klassische Leitsymptom des HELLP-Syndroms ist der rechtsseitige Oberbauchschmerz. Zusätzlich kann es zu Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen kommen. Namensgebend für das HELLP-Syndrom war die mit den Symptomen einhergehende typische laborchemische Trias aus Hämolyse (hemolysis), Erhöhung der Leberenzyme (elevated liver enzymes) und Thrombozytopenie (low platelet count) [191,222]. Mit dieser Begriffsprägung gelang Weinstein 1982 ein entscheidender Fortschritt in der Diagnostik des HELLP-Syndroms, welche durch die Vielgestaltigkeit der Symptome und den unkalkulierbaren Verlauf erschwert ist.

Die Inzidenz des HELLP-Syndroms liegt bei 0,17 - 0,85% aller Lebendgeburten [169]. Die Symptome treten typischerweise im dritten Trimenon der Schwangerschaft auf, im Median in der 33. Schwangerschaftswoche. Einzelfälle mit einem früheren Auftreten zwischen der 18. und der 26. Schwangerschaftswoche sind beschrieben, jedoch meist assoziiert mit zusätzlichen Erkrankungen, zum Beispiel dem Antiphospholipid Syndrom [25,206].

In 70% der Fälle entwickelt sich ein HELLP-Syndrom antepartum, davon 10% vor der 27. Schwangerschaftswoche, 70% zwischen der 27. und der 37. Schwangerschaftwoche und 20% nach der 37. Schwangerschaftswoche. In 30% der Fälle tritt das HELLP-Syndrom postpartal innerhalb der ersten sechs Wochenbetttage auf [139]. Das postpartale HELLP-Syndrom entwickelt sich vorwiegend im Anschluss an Termingeburten und geht häufig mit schweren Komplikationen einher. In 10 - 15% der Fälle kann das HELLP-Syndrom mit einer Eklampsie gemeinsam auftreten. In einer Studie von Cavkaytar et al. wurden in 52% der HELLP-Patientinnen Vorboten eines tonisch-klonischen Krampfens in Form von starken (meist frontalen) Kopfschmerzen, Flimmern vor den Augen, neblig doppeltem oder verschwommenem Sehen, Übelkeit und Erbrechen beschrieben [32].

Ein spezifisches Risikoprofil für das Auftreten eines HELLP-Syndroms ist nicht bekannt. Der Anteil der Erstgebärenden wird mit 60% angegeben, wobei das mittlere Lebensalter bei Erkrankung 26 ± 6 Jahre beträgt [71].

2.1.1 Die Klinik des HELLP-Syndroms

Symptome

Das Leitsymptom des HELLP-Syndroms ist der epigastrische beziehungsweise rechtsseitige Oberbauchschmerz. Ihm entspricht eine starke Druckdolenz im rechten oberen Quadranten des Abdomens. Laut Sibai geben 40 - 90% der Patientinnen rechtsseitige Oberbauchbeschwerden an. Weitere typische Symptome sind Bluthochdruck (82 - 88%) und die durch eine starke Proteinurie (86 - 100%) bedingte Ödementwicklung. In 29 - 84% klagen die Patientinnen über Übelkeit und Erbrechen, 33 - 61% geben Kopfschmerzen an [191].
Als „interdisziplinäre Herausforderung“ wird das HELLP-Syndrom von Rath bezeichnet [167]. Er weist damit auf differentialdiagnostische Probleme hin, die sich in der Abgrenzung zu gastrointestinalen Erkrankungen und Lebererkrankungen, beispielsweise der akuten Schwangerschaftsfettleber, dem Zieve-Syndrom, der akuten Virushepatitis oder der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase ergeben. Weiterhin nennt er als wichtige Differentialdiagnose hämatologische Erkrankungen, insbesondere thrombotische Mikroangiopathien. Hierbei wird die Abgrenzung zu ebenfalls lebensbedrohlichen Erkrankungen, wie der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) und dem hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) besonders hervorgehoben. Auch der systemische Lupus Erythematodes (SLE) als Autoimmunerkrankung, bei der es in 2,8 - 25% der Fälle zu einer Pfropfpräeklampsie während der Schwangerschaft kommen kann, ist vom HELLP-Syndrom zu unterscheiden [143].
Diese Unterscheidung kann ebenso schwierig wie wichtig sein, da sich verschiedene klinische Konsequenzen ergeben. Beispielsweise werden eine schwere Präeklampsie, ein HELLP-Syndrom und eine akute Schwangerschaftsfettleber grundsätzlich durch die Entbindung therapiert. Dagegen ist bei einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura, einem hämolytisch-urämischen Syndrom oder einem exazerbierten systemischen Lupus Erythematodes die Erhaltung der Schwangerschaft möglich [192].

Der Verlauf des HELLP-Syndroms ist unkalkulierbar. Einerseits kann es in 20 - 40% der Fälle zu einer Rückbildung beziehungsweise einem intermittierenden Verlauf mit wiederholten HELLP-Schüben kommen. Andererseits kann sich aus initialem Wohlbefinden der Schwangeren innerhalb weniger Stunden ein dekompensierter Zustand mit Störung der Globalgerinnung und Multiorganversagen entwickeln [191].

Die hohe Komplikationsrate führt zu einer mütterlichen Mortalitätsrate von bis zu 24% [139]. Als schwere mütterliche Komplikationen sind zerebrale Blutungen, die Eklampsie, die akute Niereninsuffizienz, das Lungenödem und die Leberruptur zu nennen. Auch die kindliche perinatale Mortalitätsrate von bis zu 70% ist stark erhöht und beruht vor allem auf der Frühgeburtlichkeit und damit verbundener Unreife der Neugeborenen. Daraus ergeben sich Komplikationen wie das ARDS (acute respiratory distress syndrome), bronchopulmonale Dysplasien, intrazerebrale Hämorrhagien und nekrotisierende Enterokolitiden [100].

Diagnostik

Die Diagnosestellung eines HELLP-Syndroms ist derzeit erst im klinischen Stadium möglich. Sie ergibt sich neben den klinischen Symptomen aus dem Nachweis der laborchemischen Trias aus Hämolyse, Transaminasenanstieg und Thrombozytopenie. Für die frühe Erkennung der Hämolyse gilt das Absinken des Haptoglobin-Levels als empfindlichster Marker [223]. Dem Thrombozytenabfall geht meist der Anstieg der Leberenzyme ALAT und ASAT im Blut voraus [169].

Bildgebende Verfahren wie Ultraschall und die Computertomographie werden zur Diagnostik der Leberveränderungen, insbesondere zur Erfassung von subkapsulären Leberhämatomen sowie anderer Komplikationen eingesetzt. Eine Leberpathologie wurde bei 64% von 14 systematisch mittels CT untersuchten Frauen festgestellt, von denen wiederum 89% entweder gleichzeitig Aszites oder einen Pleuraerguss aufwiesen [185].

Martin et al. haben den Thrombozytenabfall als Indikator für den Schweregrad der Erkrankung beschrieben [133]. Als Schweregrad I wurden Fälle definiert, bei denen die Thrombozytenzahl unter 50000/μl^3 abfiel, bei Schweregrad II liegt die Thrombozytenkonzentration zwischen 50000/μl^3 und 100000/μl^3 und bei Schweregrad III zwischen 100000/μl^3 und 150000/μl^3. Die schwersten mütterlichen Komplikationen wurden in Fällen der Kategorie I beobachtet. Barton et al. wiederum konnten keine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Laborveränderungen und der Ausprägung von histopathologischen Veränderungen in der Leber nachweisen [20].

Es existieren somit weder präklinische diagnostische Marker, noch ist während des frühen klinischen Stadiums eine verlässliche Aussage über den Verlauf und somit die Prognose des HELLP-Syndroms möglich.

Therapie

Aufgrund der unklaren Pathogenese existiert für das HELLP-Syndrom keine Kausaltherapie.
Der klinische Verlauf des HELLP-Syndroms ist unvorhersehbar. Meist kommt es zur schrittweisen, in manchen Fällen jedoch auch zu einer plötzlichen und rapiden Verschlechterung des Zustandes von Mutter und Fet. Aus diesem Grund sollten alle Schwangeren bereits bei Verdacht auf ein HELLP-Syndrom umgehend hospitalisiert und in einem Perinatalzentrum überwacht werden.
Erstmaßnahmen bestehen in einer schonenden Blutdrucksenkung (Dihydralazin intravenös, bei Unverträglichkeit oder Nebenwirkungen auch Metoprolol) und einer Eklampsie-Prophylaxe (Magnesiumsulfat intravenös).
Das geburtshilfliche Vorgehen beim HELLP-Syndrom wird kontrovers diskutiert. Typischerweise klingen die Symptome nach der Entbindung ab. Eine Ausnahme bildet hierbei natürlich das postpartale HELLP-Syndrom. Aus diesem Grund wird auf der einen Seite für eine sofortige Schwangerschaftsbeendigung plädiert, um damit vor allem mütterliche Komplikationen zu vermeiden. Andererseits wird besonders in frühen Schwangerschaftswochen (< 32. - 34. SSW) eine konservative Therapie unter engmaschiger Kontrolle in einem Perinatalzentrum angestrebt, um die fetale Organreife zu erreichen. Eine antenatale Kortikosteroid-Therapie hat sich als effektive Methode zur Verbesserung des mütterlichen und fetalen Outcomes etabliert. Auf kindlicher Seite wird dadurch vor allem die Lungenreife induziert, was einen wesentlichen Einfluss auf das fetale Outcome hat [6]. Diese konservative Therapie ist nur vertretbar bei stabiler Situation der Mutter und des Feten, wenn keine Anhaltspunkte für eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) bestehen und unter engmaschigem Monitoring in einem Perinatalzentrum, das neben erfahrenen Geburtshelfern über ebenso erfahrene Neonatologen und Anästhesisten verfügt. Meist wird die Schwangerschaft durch eine Sectio beendet, aber auch eine vaginale Entbindung ist möglich.
Eine postpartale Dexamethason-Therapie zur Reduktion der mütterlichen Morbidität hat keine Wirkung gezeigt, wie neueste Studien ergaben [97].
Martin et al. zeigten, dass bei einem postpartalen HELLP-Syndrom respektive bei Persistenz der Symptome über 72 Stunden postpartal die Plasmapherese eine Therapieoption darstellt [134]. Dabei werden etwa zwei Liter des mütterlichen Plasmas unspezifisch abfiltriert und mit der gleichen Menge Frischplasma ersetzt. Dadurch kommt es zur Regredienz der Symptome.

2.1.2 Pathogenetische Ansätze

Die Pathogenese des HELLP-Syndroms ist bislang ungeklärt. Das HELLP-Syndrom wird als eine besonders schwere, lebensbedrohliche Ausprägungsform der Präeklampsie angesehen [169]. Obwohl heute die Pathophysiologie der Präeklampsie zum großen Teil verstanden ist, bleibt die Ätiologie dieser Erkrankung jedoch ebenfalls unklar. Im Folgenden werden die derzeit diskutierten ätiologischen Ansätze der Präeklampsie und des HELLP-Syndroms aufgeführt.

Um die Pathologie zu verstehen, ist die Kenntnis der Physiologie von großer Bedeutung. Deswegen sollen hier einige einleitende Worte über die gesunde Schwangerschaft vorangestellt werden.
Während der normalen Schwangerschaft finden Anpassungsvorgänge des Kreislaufs statt, um den mütterlichen und kindlichen Anforderungen an den Metabolismus gerecht zu werden. Während das mütterliche Herz-Zeit-Volumen sowie das Plasmavolumen ansteigen, kommt es zu einem leichten Abfall des Gefäßwiderstandes und des arteriellen Blutdrucks. Durch die Reduktion des renalen Gefässwiderstandes ist der renale Plasmafluss erhöht. Weiterhin findet sich eine verminderte Ansprechbarkeit der Druckrezeptoren und eine verminderte Gefäßreaktivität auf vasokonstriktorische Reize wie zum Beispiel durch α-adrenergische Agonisten oder Angiotensin II (ANGII) [38].
Bei der Präeklampsie sind diese Mechanismen entgegengesetzt. Es kommt zu einem Anstieg des Gefässwiderstandes und des Blutdrucks, der renale Plasmafluss ist reduziert. Weiterhin weisen die Druckrezeptoren eine erhöhte Reaktivität gegenüber vasokonstriktorischen Reizen auf.
Die Ursachen dieser Veränderungen bei der Präeklampsie sind unklar. Es werden verschiedene Ansätze und Beobachtungen diskutiert.

Genetische Disposition

Das Wiederholungsrisiko eines HELLP-Syndroms bei einer folgenden Schwangerschaft liegt laut Isler et al. bei 19 - 27% [89]. Ein 4- beziehungsweise 6-fach erhöhtes Präeklampsierisiko bei Frauen mit vorbelasteter Mutter beziehungsweise Schwester im Vergleich zu Schwangeren mit unauffälliger Familienanamnese legt eine familiäre Disposition nahe [27].
Bereits im Jahre 1968 wurde von Chesley et al. eine große epidemiologische Studie vorgestellt, welche genetische Auslöser der Präeklampsie postulierte [33]. Sie zeigte, dass in 26% der ersten Schwangerschaft von Töchtern und in 25% der ersten Schwangerschaft der Enkelinnen von

amerikanischen Frauen, die selbst eine Präeklampsie entwickelten, ebenfalls eine Präeklampsie auftrat, dagegen aber nur in 8% der Schwiegertöchter.

Man konnte bei Präeklampsie-Patientinnen genetische Mutationen nachweisen, zum Beispiel eine Häufung von HLA-DR 1,3 und 4. Individuen mit diesen HLA-Allelen werden als „high-TNF-Responder“ bezeichnet. Sie reagieren auf entsprechende Stimuli mit einer gesteigerten TNF-Produktion [99]. TNFα ist ein Zytokin, welches in lokale und systemische Entzündungen involviert ist. Es wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet, kann aber auch von anderen Zellen, zum Beispiel von Endothelzellen, gebildet werden. Seine wichtigste Funktion ist die Regelung der Aktivität verschiedener Immunzellen. TNF kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine anregen. Die Regulationsmechanismen sind äußerst komplex, ebenfalls die Wirkung auf die verschiedenen Organsysteme. In der Leber bewirkt es zum Beispiel die Bildung von Akute-Phase-Proteinen, auf Makrophagen wirkt es Phagozytose-stimulierend, und auf neutrophile Granulozyten migrationsfördernd [79].
Weiterhin wurden Mutationen im Angiotensin II-Rezeptor [41,103], Mutationen des Angiotensinogengens [221], sowie des NO-Synthasesystems untersucht, insbesondere die in Endothelzellen gebildete eNO-Synthase (eNOS). Man nimmt an, dass ein erhöhtes Präeklampsierisiko bei Patientinnen mit vorbelasteten Geschwistern auf einem Polymorphismus innerhalb des Chromosoms 7q36 (Intron 13) beruhen könnte, welches der Lokalisation des eNOS-Gens entspricht [12,188]. Bei HELLP-Patientinnen wurde eine erniedrigte Expression der NO-Synthase in der Plazenta nachgewiesen [208].

Von unmittelbar klinischer Relevanz ist die Beobachtung, dass mütterliche Erkrankungen, die mit einer Kapillarschädigung einhergehen, wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen und Gerinnungsstörungen, das Risiko einer Präeklampsie erhöhen [119]. Sowohl vererbte (Faktor-V-Leiden-Mutation, Prothrombin-20210-Mutation, Methylentetrahydrofolat-Reduktase-677-(MTHFR)-Mutation, Protein-S-, Protein-C- und Antithrombin-III-Mangel), als auch erworbene (Antiphospholipid-Syndrom mit Lupus antikoagulans- und/oder Antikardiolipin-Antikörper) Gerinnungsstörungen werden als prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie beschrieben [17]. Darüberhinaus wird bei Frauen, die an einer APC-Resistenz (activated protein C resistance) leiden, vermehrt ein HELLP-Syndrom beobachtet [107].

Diese beobachteten Störungen des Gerinnungssystems lassen sich jedoch auf molekularer Ebene nicht klar nachvollziehen. Die Studienlage auf diesem Gebiet ist kontrovers. Einige Gruppen konnten den Zusammenhang zwischen Mutationen im MTHFR-Gen und dem Auftreten einer Präeklampsie darlegen [69,109,202], andere aber nicht [34,94,111,112,164,165]. Vergleichbares gilt für Untersuchungen zur Assoziation der Präeklampsie und der Faktor-V-Leiden-Mutation [26,51,142,151,160] und zu Mutationen im Prothrombin-Gen [81,109,125,126].

Plazentare Hypoxie durch inadäquate Trophoblastinvasion

Im Rahmen der Umwandlung des uteroplazentaren Gefäßbettes während des ersten und zweiten Trimenons kommt es zur Invasion extravillöser fetaler Trophoblastzellen in die Gefäßwand der mütterlichen Spiralarterien. Dadurch werden die muskulären, elastischen und nervalen Zellen der Gefäßwand durch extravillöse Trophoblastzellen und Fibrinoid ersetzt. Durch die Dilatation der Endstrecken der uteroplazentaren Arterien kommt es zur maximalen Durchblutung des intervillösen Raums der Plazenta bei geringem Perfusionsdruck [85,200]. Dies ist wichtig, da der maternale intervillöse Blutdruck physiologischerweise den Druck in den Plazentazotten nicht übersteigen soll, um deren Kompression mit dem nachfolgenden fetoplazentaren Widerstandsanstieg zu vermeiden. Als Folge der schwangerschaftsbedingten Invasion der Gefäßwand durch extravillöse Trophoblastzellen steht das uteroplazentare Gefäßbett nicht mehr unter der vasomotorischen Kontrolle der Mutter. Die Plazenta wird somit unabhängig von Zentralisierungsversuchen des mütterlichen Kreislaufs stets adäquat versorgt [17].
Als initiales Ereignis in der Pathogenese der Präeklampsie führen die meisten Autoren die inadäquate endovaskuläre Trophoblastinvasion mit daraus resultierender plazentarer Hypoxie an [17,168]. Bereits 1972 beschrieben Brosens et al. eine inadäquate Umwandlung der dezidualen und myometranen Segmente der Spiralarterien in Niederdruckgefäße [28]. Dadurch kommt es zu einer Beeinträchtigung der uteroplazentaren Durchblutung während der Phase der „Arterialisierung“ der Plazenta zwischen der 12. bis 18. Schwangerschaftswoche. Das klinische Resultat kann eine fetale Wachstumsretardierung sein. Bereits ab der 16. Schwangerschaftswoche ist dopplersonographisch ein enddiastolischer Flussverlust oder ein reverser enddiastolischer Fluss in der Arteria umbilicalis nachweisbar. Diese Feten sind mit einer hohen perinatalen Mortalität und Morbidität behaftet.

Als Ursachen dieser mangelhaften Trophoblastinvasion werden einerseits eine Störung der invasiven Potenz extravillöser Trophoblastzellen, andererseits eine überschießende mütterliche Abwehrreaktion diskutiert [174].

Immunologische Ansätze

Synzytiotrophoblastzellen exprimieren HLA-G (human leucocyte antigen G), eine Variante der Histokompatibilitätsantigene. Vermutlich spielt diese HLA-G-Expression eine wichtige Rolle in der Induktion der mütterlichen Immuntoleranz gegenüber der Einheit Fet/Plazenta [174]. Extravillöse Trophoblastzellen von Patientinnen mit Präeklampsie/Eklampsie exprimieren vermindert das HLA-G-Protein auf ihrer Oberfläche. Die Folge davon ist eine Antwort des mütterlichen Immunsystems, es kommt zur Apoptose anstelle der Proliferation und Differenzierung der invasiven Spiralarterien [226].

Ein anderer auslösender Mechanismus der überschießenden mütterlichen Abwehrreaktion könnten deportierte Membranbestandteile des Synzytiotrophoblasten oder fetale Zellen sein, die über einen veränderten maternofetalen Austausch über die Plazenta in die mütterliche Zirkulation gelangen [83,102].
Dies bringt den Feten unausweichlich in Kontakt mit immunkompetenten Zellen der Mutter, es kommt zu direkten fetomaternalen Interaktionen [194]. Im dritten Trimenon der Schwangerschaft ist eine Aktivierung mütterlicher Leukozyten im peripheren Blut messbar. Lösliches HLA-Antigen fetaler Herkunft (sHLA-DR) verbindet sich mit diesen aktivierten Immunzellen und führt so zu einer mütterlichen Immunantwort auf den Feten. Da sHLA-DR-Moleküle eine Apoptose induzieren können, ist ein niedriges sHLA-DR-Level für das fetomaternale Immungleichgewicht von Bedeutung. Beim HELLP-Syndrom wurden erhöhte Plasmakonzentrationen von sHLA-DR nachgewiesen. In diesem Sinne wäre das HELLP-Syndrom als akute Abstoßungsreaktion des fetalen „Transplantates“ zu betrachten [203].

Dadurch können immunologische Vorgänge initiiert werden, welche eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNFα und IL-6 zur Folge hat. Es wurde nachgewiesen, dass die TNFα- und IL-6-Konzentrationen im Serum von Schwangeren mit Präeklampsie im Vergleich zu unauffälligen Schwangeren doppelt so hoch sind [110,217].
TNFα führt zu einer vermehrten Freisetzung vom vasokonstriktorisch wirkenden Endothelin aus

dem Endothel führt und zu einer Verminderung der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation [132,220]. Im Tierversuch wurde gezeigt, dass TNFα zu einer Downregulation der Expression der endothelialen NO-Synthase-mRNA führt [230].
Andererseits haben Studien gezeigt, dass zwischen den Plazenten von präeklamptischen und gesunden Schwangeren keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen von TNFα, IL-6 und TNFα-mRNA bestehen [21]. Somit ist davon auszugehen, dass andere Quellen für die erhöhten TNFα- und IL-6-Konzentrationen im mütterlichen Blut bei der Präeklampsie vorhanden sein müssten.
Die Bedeutung einer generellen Aktivierung des Immunsystems der Mutter wird durch zahlreiche Untersuchungen gestützt [49,172,193]. Bisher konnten daraus jedoch keine kausalen Rückschlüsse gezogen werden. Epidemiologische Studien legen die Vermutung nahe, dass eine immunologische Maladaptation der Mutter an die Schwangerschaft respektive den Feten der Ausprägung einer Präeklampsie zugrunde liegt [48].

Wallukat et al. wiesen Autoantikörper bei der Präeklampsie nach, die an den AT1-Rezeptor binden und dort die Wirkung des Angiotensin II imitieren [218]. Angiotensin II nimmt die Schlüsselposition im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ein. Das RAAS ist für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und zur Regulierung des Wasserhaushaltes zuständig. Angiotensin II führt unter anderem zur Vasokonstriktion und hat einen permeabilisierenden Effekt auf das Endothel. Nach der Schwangerschaft sind diese Antikörper nicht mehr nachweisbar.

Angiogenetische Faktoren

Maynard et al. wiesen nach, dass die lösliche fms-like Tyrosinkinase 1 (sFlt1) in Plazenten von Frauen mit Präeklampsie vermehrt exprimiert wird [136]. Die lösliche fms-like Tyrosinkinase 1 ist ein antiangiogenetisches Protein, welches antagonistisch zu PlGF (placental growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor), beides proangiogenetische Proteine, wirkt. Maynard et al. wiesen neben einer erhöhten Konzentration von sFlt1 im mütterlichen Blut von präeklamptischen Patientinnen ebenfalls erniedrigte Werte von VEGF und PlGF nach. Sie vermuteten, dass sFlt1 in der mütterlichen Zirkulation freies (aktives) VEGF und PlGF bindet und somit zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren führt, was zu präeklamptischen Symptomen führt. Tatsächlich führte die Gabe von sFlt1 bei schwangeren Ratten zu Hypertension, Proteinurie und glomerulären endothelialen Schäden.

Karumanchi und seine Arbeitsgruppe wiesen vor kurzem ein weiteres antiangiogenetisches Protein nach, welches im Serum von präeklamptischen Frauen nachweisbar ist, nämlich Endoglin [215]. Endoglin wird ebenfalls in der Plazenta gebildet und auch als löslicher TGF-ß (transforming growth factor) Korezeptor bezeichnet. Endoglin soll die Bindung von TGF-ß1 zu endothelialen Rezeptoren beeinflussen und somit die endotheliale NO-Synthase-vermittelte Vasodilatation vermindern.
Im Tierexperiment wurde durch die gemeinsame Gabe von sFlt1 und Endoglin das Bild einer schweren Präeklampsie bis zum HELLP-Syndrom ausgelöst.
Andererseits konnte eine kürzlich publizierte Studie keine sigifikante Expressionszunahme im Transkriptom von Angiogenese-regulierenden Genen (Endoglin, Flt1, VEGF und PlGF) in Plazentagewebe bei Präeklampsie nachweisen [207].

Levine et al. haben nun verschiedene angiogenetische Proteine (Endoglin und sFlt1:PlGF-Ratio) in einer Fall-Kontroll-Studie auf die Vorhersagbarkeit einer Präeklampsie getestet. Sie konnten bereits zwei bis drei Monate vor der klinischen Manifestation einer Präeklampsie erhöhte Endoglinwerte nachweisen [120]. Dabei konnten sie besonders schwere Verläufe wie das HELLP-Syndrom schon in der 17. - 20. Schwangerschaftwoche durch signifikant erhöhte Endoglin-Werte herausfiltern.
Die WHO (World Health Organisation) prüft derzeit in einer großen prospektiven Beobachtungsstudie die Aussagekraft von sFlt1, Endoglin und PlGF zur Vorhersage der Präeklampsie [122].

Apoptose

Die Apoptose spielt beim physiologischen Alterungsprozess der Plazenta, insbesondere im Trophoblasten der Plazentazotten, eine Rolle [16,200]. Durch Steuerung von Proliferation, Differenzierung und Apoptose wird die Funktion des Zytotrophoblasten erhalten [85,154].
Bei Terminüberschreitung steigt die Zahl der apoptotischen Kerne im villösen Trophoblasten an. Bei intrauteriner Wachstumsretardierung wurde eine deutlich höhere Anzahl von apoptotischen Zellkernen im villösen Trophoblasten nachgewiesen als bei unkomplizierten Schwangerschaften [15,199]. Weiterhin wurde in den Plazenten von Patientinnen mit hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen eine erhöhte Apoptoserate und eine verminderte Expression des Apoptoseinhibitors Bcl-2 festgestellt [233].

Bei der Präeklampsie wurde eine vermehrte Apoptose im Trophoblasten, sowie verschiedene Apoptose-regulierende Zytokine und Wachstumsfaktoren nachgewiesen [153]. Hierbei ist das Fas/Fas-Ligand-System hervorzuheben. Es ist eines der wichtigsten Mechanismen bei der Apoptose. Fas und Fas-Ligand (FasL) werden sowohl von Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, als auch von Nicht-Immunzellen wie Trophoblastzellen exprimiert. Beides sind transmembranöse Proteine der TNFα-Rezeptor-Familie. Fas (CD95) ist ein Typ I-Membranprotein mit einer Masse von 45 kDa, das zur TNF-Rezeptor-Familie gehört. FasL hingegen ist ein Typ II-Membranprotein von 37 kDa, welches zur TNF- und CD40-Ligandenfamilie gehört [150]. Die Bindung von FasL an den Fas-Rezeptor löst eine kaskadenartige Aktivierung von intrazellulären Proteasen, den Caspasen, aus, an deren Ende der apoptotische Zelltod steht [14]. Im Gegensatz zum FasL ist CD95 (Fas) ist in vielen Geweben exprimiert.

Es konnten signifikant erhöhte Werte von löslichem CD95 (Fas) im Serum von HELLP-Patientinnen und Präeklampsie-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Schwangeren nachgewiesen werden [75,84]. Laskowska et al. maßen die Konzentrationen von sFas/sFasL in mütterlichem und umbilikavenösen Blut von präeklamptischen Patientinnen im Vergleich zu gesunden Schwangeren. Bei der Präeklampsie fand sich das lösliche Fas in beiden Lokalisationen erhöht (im mütterlichen Blut höher als im umbilikalen Blut), während sFasL nur im Blut der Umbilikalvenen signifikant erhöht war [117].
Bei Präeklampsie wurde eine erhöhte Apoptoserate des Zytotrophoblasten im Vergleich zu Plazenten gesunder Mütter nachgewiesen [4,56]. Weiterhin bedingen Seren von präeklamptischen Frauen eine erniedrigte Lebensdauer von Trophoblast-Zelllinien, was wahrscheinlich auf eine erhöhte Fas-induzierte Apoptose zurückzuführen ist [152].

Eine Hypothese besagt, dass die erhöhte Apoptoserate Folge der Veränderungen des Zytokin-/Chemokin-/Wachstumsfaktoren-Haushaltes bei der Präeklampsie ist. Die Aktivierung von plazentaren Mediatoren führt zur vermehrten Expression von apoptotisch wirksamen Proteinen, was wiederum zu einer gestörten Trophoblastinvasion führt [153].
Eine andere Hypothese besagt, dass der fehlerhafte Mechanismus in der unkontrollierten Proliferation des Synzytiotrophoblasten liegt. Eine erhöhte Proliferation des Trophoblasten in die Spiralarterien der Plazenta wird anfangs durch eine erhöhte Apoptoserate ausgeglichen [93]. Jedoch kann ab einem bestimmten Punkt der vollständige apoptotische Abbau des anfallenden Zellmaterials nicht mehr gewährleistet werden, so dass es zur Bildung von synzythialen Knoten kommt, die nicht komplett abgebaut wurden [86]. In diesen Gewebeknoten sind sowohl Zeichen

der Apoptose, als auch solche der Nekrose zu beobachten, so dass Formigli et al. diesem Prozess den Namen „Aponekrose“ gaben [58].
Aus diesen synzythialen Knoten kommt es zu einer Freisetzung von fetalem Gewebe in den mütterlichen Kreislauf [83,102]. Dies wiederum führt zu einer systemischen Aktivierung des mütterlichen Immunsystems (siehe Kapitel „Immunologische Ansätze“, S. 14).

Strand et al. wiesen im Lebergewebe von HELLP-Patientinnen Apoptose-Mechanismen nach [204]. Sie konnten zeigen, dass diese Apoptose durch HELLP-Seren ausgelöst wird und dass diese durch die Blockade von CD95L (FasL) vermindert werden konnte. CD95L wird in der Plazenta von HELLP-Patientinnen und gesunden Schwangeren vom Synzytiotrophoblasten exprimiert. Strand et al. injizierten Mäusen intraperitoneal Plazenta-Extrakte. Damit lösten sie eine hepatische Apoptose aus, die wiederum durch Blockade von CD95L drastisch reduziert werden konnte. Weiterhin wirkte das Plazenta-Extrakt zytotoxisch auf humane Hepatozyten. Strand et al. gehen aufgrund ihrer erhobenen Daten davon aus, dass die Plazenta die Quelle von CD95L ist, welches beim HELLP-Syndrom in der Leber zur Apoptose führt. Diese Therorie wird gestützt durch die Hypothese von deportierten Membranbestandteilen des Synzytiotrophoblasten, die über einen veränderten maternofetalen Austausch über die Plazenta in die mütterliche Zirkulation gelangen.

2.1.3 Pathophysiologie

Gesteigerte plazentare Lipidoxidation

Die Folge einer reduzierten uteroplazentaren Perfusion ist eine plazentare Hypoxämie respektive Ischämie, die eine Freisetzung verschiedener plazentarer Faktoren auslösen kann. Man vermutet, dass dadurch kaskadenartige Reaktionen ausgelöst werden, an deren Ende die Dysfunktion des Endotheliums und der glatten Muskulatur der Gefäßwände mit Erhöhung des Gefäßwiderstandes und des Blutdruckes stehen könnte [17]. Der direkte kausale Zusammenhang zwischen der lokalen inadäquaten Trophoblastinvasion und der generalisierten Endotheldysfunktion konnte bislang nicht bewiesen werden. Ebenfalls konnte ein immer wieder postulierter zytotoxischer „Serumfaktor X“ bisher nicht identifiziert werden.
Es wird vermutet, dass es infolge der akuten Atheromatose in der Plazenta zu einer gesteigerten plazentaren Lipidoxidation mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen kommt. Eine adäquate Gegenregulation durch das Antioxidantiensystem, welches potentiell endothelial wirksam ist, bleibt dabei aus [219].
Freigesetzte Sauerstoffradikale (beispielsweise Superoxidanionen) haben einen schädigenden Effekt auf die Membranlipide der Endothelzellen. Weiterhin hemmen sie die endotheliale Prostazyklin-Synthese, inaktivieren Stickstoffoxid (NO) und bewirken eine erhöhte Freisetzung von Endothelin [232].

Endotheldysfunktion

Die hämodynamischen Veränderungen einer gesunden Schwangerschaft werden durch eine vermehrte Bildung respektive Freisetzung von vasodilatativen Substanzen, wie Stickstoffoxid (NO)/EDRF (endothelium-derived relaxing factor), Prostazyklin (PGI2) und EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) erklärt [39,146]. Aufgrund dessen entstand die Theorie, dass der Anstieg des Blutdrucks sowie des peripheren Gefäßwiderstands bei der Präeklampsie durch eine gestörte Endothelfunktion mit veränderter endothelialer Gefäßrelaxation bedingt ist. Gestützt wird diese Theorie unter anderem durch den Nachweis von erhöhten Fibronektin- und Faktor-VIII-Antigen-Konzentrationen bei der Präeklampsie, welche beide als Marker der endothelialen Zellschädigung gelten [61,175].

Tierexperimentell wurde ein Modell der Präeklampsie entwickelt, die sogenannten RUPP-Ratten (reduced uterine perfusion pressure model). Bei diesen schwangeren Ratten wurden die Hauptäste der Aa.uterinae beidseits geklippt, was zu einer Verminderung der uteroplazentaren Perfusion führt. Bei RUPP-Ratten konnte eine verstärkte vaskuläre Reaktivität gegenüber vasokonstriktorischen Substanzen wie zum Beispiel Phenylephrine (Phe), sowie eine verminderte Acetylcholin-vermittelte Gefäßrelaxation im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden [42]. Diese Ergebnisse lassen eine verminderte endothelabhängige Gefäßrelaxation bei der Präeklampsie vermuten. Diese könnte durch eine verminderte Produktion oder Aktivität endothelabhängiger Vasodilatatoren wie Stickstoffoxid, Prostazyklin und EDHF verursacht werden.
Es resultiert ein Ungleichgewicht zwischen vasodilatatorischen, aggregationshemmenden (Stickstoffoxid, Prostazyklin) und vasokonstriktorischen, aggregationsfördernden Substanzen (Thromboxan A_2, Endothelin).

Stickstoffoxid

Stickstoffoxid (NO) ist ein lipophiles Molekül, welches aus der Aminosäure L-Arginin durch das Enzym NO-Synthase (NOS) gebildet wird. Es wirkt über die Relaxation glatter Muskelzellen der Gefäßwand vasodilatierend. Zusätzlich hemmt es die Plättchenaggregation und –adhäsion.
Im Tierexperiment an schwangeren Ratten wurde gezeigt, dass eine Blockade der NO-Synthase mit N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (NAME) zu einer Blutdruckerhöhung, Vasokonstriktion im renalen Gefäßbett, Proteinurie, Thrombozytopenie und zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung, also zu präeklampsieähnlichen Symptomen führt [46,227]. Auch die NO-cGMP-vermittelte Gefäßrelaxation in RUPP-Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren ist reduziert [42].
Klinische Studien zum Stickstoffoxid sind kontrovers. Einige Autoren wiesen erniedrigte Konzentrationen der Abbauprodukte von Stickstoffoxid im Plasma von präeklamptischen Frauen nach, andere Autoren konnten dies nicht bestätigen [149,189]. Möglicherweise ist diese Kontroverse auf eine sehr variable alimentäre Nitrataufnahme der Schwangeren, sowie die Abhängigkeit des Nitratspiegels von Faktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum und körperlicher Aktivität zurückzuführen.

Prostazyklin – Thromboxan A_2

Prostazyklin (PGI_2) ist ein Prostanoid, das im Endothel aus Arachidonsäure synthetisiert wird. Es ist ein potenter Vasodilatator und hemmt die Thrombozytenaggregation. Die Urinausscheidung seiner Abbauprodukte ist während einer gesunden Schwangerschaft erhöht und bei Frauen mit Präeklampsie erniedrigt [229].
Der Antagonist des Prostazyklins ist Thromboxan A_2 (TXA_2), welches in Thombozyten gebildet wird. Thromboxan A_2 wirkt vasokonstriktorisch und fördert die Thrombozytenaggregation. Metaboliten des Thromboxan A_2 konnten im Urin schwangerer Frauen mit Präeklampsie vermehrt nachgewiesen werden. Postpartal waren die Ausscheidung dieser Thromboxan A_2-Metabolite und die klinische Symptomatik wieder rückläufig [57].

Endothelin

Endotheline (ET_A) gehören zu den am stärksten vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen. Sie entfalten ihre Wirkung über ET_A-Rezeptoren an der glatten Gefäßmuskulatur. Weiterhin wirken sie fibrinolytisch, indem sie zur Freisetzung von Plasminogenaktivator führen. Erhöhte Endothelin-Spiegel bei Präeklampsie wurden mehrfach nachgewiesen [35,158].
Im vormals beschriebenen RUPP-Ratten-Modell konnte eine verstärkte Expression von Preproendothelin im renalen Kortex im Vergleich zu Kontrolltieren gefunden werden, das nach der Entbindung innerhalb von 48 Stunden auf ein normales Mass abfällt. Die Gabe von Endothelin-A-Rezeptorantagonist ABT-627 vermindert den Blutdruckanstieg im RUPP-Rattenmodell [3].
Über ET_B -Rezeptoren führen Endotheline über eine Freisetzung von NO, Prostazyklin und EDHF aus dem Endothel zum gegenteiligen Effekt, nämlich zu einer Vasodilatation [66]. So konnte in einem Präeklampsie-Tiermodell ein blutdrucksenkender Effekt durch Applikation des ET_B-Agonisten Sarafotoxin S6c erzielt werden [135].

Aktivierung der neutrophilen Granulozyten

Bei der Schädigung des Endothels spielen neutrophile Granulozyten eine entscheidene Rolle. Der initiale Mechanismus der Neutrophilen-Aktivierung ist noch unklar.

Die Bindung der neutrophilen Granulozyten an die Endothelwand erfolgt über eine Interaktion zwischen endothelialen Adhäsionsmolekülen und Oberflächen-Rezeptoren auf den Neutrophilen. E-Selektin und P-Selektin, ICAM-1 und ICAM-2 (intercellular adhesion molecules) und VCAM-1 (vascular endothelial cell adhesion molecule 1) spielen dabei als Zelladhäsionsmoleküle eine Rolle. Proinflammatorische Zytokine wie TNFα und IL-1 bewirken eine verstärkte Expression dieser Adhäsionsmoleküle [76].

Kommt es zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, werden die Inhaltsstoffe der Granula (Elastasen und Proteasen) freigesetzt. Diese schädigen das Endothel, indem sie zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität sowie –reaktivität führen. Die unkontrollierte Aktivierung und Degranulation führt zu einem ausgedehnten Endotheldefekt. Die Aktivierung der Neutrophilen bei Präeklampsie wurde durch die vermehrte Expression von Oberflächenmarkern, zum Beispiel CD11b, sowie intrazellulären Markern mittels Durchfluss-Zytometrie gemessen [178,179]. Lösliche Marker der Neutrophilen-Aktivierung sind die Elastase und das Laktoferrin.

Sowohl die Laktoferrin-, als auch die Elastase-Konzentration ist im mütterlichen Blut bei Präeklampsie deutlich erhöht [70,73,171].

Ebenfalls nachweisbar im Plasma ist die lösliche Form der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. In einer großen prospektiven, longitudinalen Studie, die 1543 Schwangere einschloss, wurden diese als präklinische Marker zwischen der 22 - 29. Schwangerschaftwoche getestet. Es konnten 55% der komplizierten Schwangerschaften durch mindestens einen erhöhten Wert herausgefiltert werden. Die Sensitivität für Präeklampsie und HELLP-Syndrom betrug 66% [108]. Diese Tests haben sich in der klinischen Anwendung allerdings nicht durchgesetzt.

Neben der direkten endothelschädigenden Wirkung der Neutrophilen aktivieren diese wiederum die Thrombozytenaggregation sowie das Koagulationssystem und führen zu einer Komplementaktivierung.

Thrombozyten lagern sich am Endothel an und bilden Aggregate, was einerseits zum Verbrauch der Plättchen und andererseits zu Mikrozirkulationsstörungen führt. Gleichzeitig kommt es zu einer Thrombin-induzierten Aktivierung der intravaskulären Gerinnung. In den Kapillaren wird Fibrin abgelagert und verstärkt die Störung der Mikrozirkulation [169].

Diese Mikroangiopathie manifestiert sich beim HELLP-Syndrom besonders in der Leber. Klinisch treten rechtsseitige Oberbauchbeschwerden auf, laborchemisch wird eine Erhöhung der Transaminasen im Blut nachgewiesen, die durch eine Zerstörung der Hepatozyten bedingt ist. Pathophysiologisch basiert die Leberpathologie wie die der anderen Organsysteme auf einer Aktivierung der Gerinnung mit Ablagerung von Fibrinthromben. Histologisch findet man ausgedehnte Fibrinablagerungen mit Mikrothromben, sowie hämorrhagische Nekrosen, die in den periportalen Feldern beginnen, und in schweren Fällen konfluierend größere Leberparenchymbereiche erfassen können [185]. Die Leberschwellung sowie insbesondere die Entwicklung von subkapsulären Blutungen führen zu einer Spannung der Glisson-Kapsel, die für den heftigen Schmerz verantwortlich ist. Besonders gefürchtet sind Kapselrupturen mit intraabdomineller Blutung, die rasch zum Vollbild eines akuten hämorrhagischen Schocks führen kann.
Weitere histologische Untersuchungen bei Patientinnen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom zeigten signifikant erhöhte mikrovesikuläre Fetteinlagerungen in Hepatozyten, vergleichbar mit denen bei einer akuten Schwangerschaftsfettleber [144]. Diese mikrovesikulären Fetteinlagerungen waren bei HELLP-Patientinnen stärker ausgreprägt ist als bei Präeklampsie-Patientinnen.

Wird dieser Circulus vitiosus von zunehmender endothelialer Dysfunktion und intravaskulärer Gerinnungsaktivierung nicht rechtzeitig unterbrochen, kann sich innerhalb weniger Stunden eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) entwickeln. Folgen können eine schwere Verbrauchskoagulopathie mit Blutungskomplikationen und Multiorganversagen sein.

2.2 Proteomics

Der Begriff Proteom wurde 1994 von dem Australier Marc R. Wilkins auf einem wissenschaftlichen Kongress im italienischen Siena geprägt, in Anlehnung und Analogie zu den Begriffen Genom und Transkriptom.
Das Proteom stellt das Äquivalent des Genoms auf Proteinebene dar. Lottspeich beschreibt das Proteom als das zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter exakt definierten Rahmenbedingungen quantitativ ermittelte Proteinmuster eines Organismus, einer Zelle, einer Organelle oder auch einer Körperflüssigkeit [128]. Dieses Proteinmuster reflektiert den aktuellen Stoffwechselzustand der untersuchten Einheit, welcher neben dem Genom von verschiedenen Umwelteinflüssen und komplexen Interaktionen der Biomoleküle untereinander beeinflusst wird. Es liefert somit biologisch relevante Aussagen, die aus der Analyse der DNA oder der RNA allein nicht zugänglich sind.
Die Proteomanalyse als umfassende Darstellung von Proteinen und Peptiden in Körperflüssigkeiten erlaubt die Erstellung eines Proteinmusters, welches idealerweise für eine Erkrankung charakteristisch ist.

Das Blutplasma ist eines der komplexesten menschlichen Proteinsysteme, das auch Proteine anderer Gewebe enthält [8,9]. Es unterliegt einem ausgeprägten dynamischen Wandel und ist somit Spiegelbild sämtlicher systemischer Körpervorgänge.
In den vergangenen Jahren hat die Proteomanalyse zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie wird zum Beispiel für die Identifikation von krankheitsspezifischen Biomarkern eingesetzt [64], zur Untersuchung zellulärer Proteine und Mechanismen [22] und zur Charakterisierung von Proteinexpressionsmustern [68]. An der Universität Rostock ist Proteomics im klinischen Kontext etabliert. Bereits zahlreiche klinische Fragestellungen wurden mit Hilfe proteinanalytischer Verfahren untersucht und publiziert [67,92,106,127,195].

In dieser Arbeit wurde eine etablierte Methode zur Identifikation von Proteinen in komplexen Gemischen angewendet. Sie besteht aus der Auftrennung der Proteine mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese), gefolgt von einer proteolytischen Spaltung ausgewählter Proteinspots und anschließenden massenspektrometrischen Analysen. Aufgrund der hohen Nachweisempfindlichkeit und einer schnellen Analyse von komplexen Gemischen hat sich die MALDI-Massenspektrometrie als die derzeit geeignetste Methode zur Identifizierung von Gel-separierten Proteinen mit hohem Durchsatz etabliert [19,205]. Auf diese Weise können Proteinprofile generiert und ihre krankheits- beziehungsweise therapiebedingten Veränderungen untersucht werden.
Die Identifikation vieler Biomarker geht auf die erfolgreiche Anwendung dieser Methode zurück, zum Beispiel auf dem Gebiet der Rheumatoiden Arthritis [67,195].

Es ist hervorzuheben, dass die in den Proteomanalysen generierte Datenmenge nur mit Hilfe einer modernen und effizienten Datenverarbeitung und mit Datenbanken möglich ist, die regelmäßig aktualisiert werden.

2.3 Fragestellung

Aufgrund der komplexen Vorgänge beim HELLP-Syndrom und der Funktion des Blutes als Zirkulations- und somit Transportmedium von Mediatoren ist die Suche nach Veränderungen im Blut naheliegend. Diese Überlegung wird durch die Tatsache gestützt, dass sich das HELLP-Syndrom nach einer unspezifischen Plasmapherese zumindest zeitweilig bessert [134].
Im mütterlichen Plasma könnten Faktoren oder Mediatoren zirkulieren, die mit der HELLP-Symptomatik in Verbindung stehen und durch die Plasmapherese abfiltriert werden. Andererseits könnten auch durch das Frischplasma Faktoren substituiert werden, durch deren Mangel sich ein HELLP-Syndrom ausbildet.
Plasma bietet sich als Untersuchungsmedium weiterhin an, da die Blutentnahme eine der etabliertesten und von den Patienten gut tolerierte Methode der Probengewinnung im klinischen Alltag ist. Weiterhin wird ein Großteil der Plasmaproteine in der Leber gebildet, dem Hauptschädigungsort beim HELLP-Syndrom.

Aus diesen Überlegungen ergeben sich folgende Fragen:
1. Gibt es ein krankheitsspezifisches Proteinprofil von HELLP-Patientinnen?
2. Wie können mögliche Unterschiede charakterisiert und quantifiziert werden?
3. Können diese Ergebnisse diagnostisch, therapeutisch oder prognostisch angewendet werden?

Die Studienlage zeigt, dass es bisher keinen Einzeltest gibt, der eine klare Vorhersage einer Präeklampsie oder eines HELLP-Syndroms erlaubt [120,122]. Die Mehrzahl der Autoren vermuten, dass es weder ein spezifisches auslösendes Gen oder Protein gibt, noch Einzeltests in der Lage sein werden, eine Präeklampsie oder ein HELLP-Syndrom vorherzusagen [37,122,172,193].
Somit liegt es nahe, nach einem spezifischen Proteinprofil im Sinne einer Marker-Signatur beim HELLP-Syndrom zu suchen.

2.4 Zielsetzung

Plasmaproben von HELLP-Patientinnen sollen mit denen gesunder Schwangerer verglichen werden. Um von möglichen Plasmadifferenzen einerseits individuelle und andererseits durch die Schwangerschaft bedingte Proteinveränderungen auszuschließen, wird von beiden Gruppen zu zwei Zeitpunkten Blut entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des HELLP-Syndroms beziehungsweise bei gesunden Schwangeren kurz vor der Entbindung (t1). Die zweite Blutentnahme wird mindestens sechs Wochen nach der Entbindung durchgeführt (t2). Da die biologische Halbwertszeit von Plasmaproteinen zwischen einigen Tagen und drei Wochen (Immunglobuline 1-3 Wochen) liegt, kann zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen werden, dass sich die durch die Schwangerschaft bedingten Proteinveränderungen im Plasma zurückgebildet haben.

Es ergeben sich vier zu vergleichende Gruppen: HELLP (I), post-HELLP (II), gesunde Schwangere (III) und gesunde Mütter (IV). Bei diesen Gruppen soll eine Proteomanalyse durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wird erstmals ein Proteomics-Ansatz zur Untersuchung des HELLP-Syndroms gewählt.

3 Material und Methoden

Die Experimente wurden im Proteom-Zentrum Rostock durchgeführt. Jedes Experiment wurde in der internen Datenbank des Proteom-Zentrums Rostock, der Proteobase, dokumentiert.

3.1 Material

3.1.1 Probengewinnung

Als Probenmaterial wurden Plasmaproben genutzt. Die Blutentnahmen wurden nach Zustimmung der Ethikkommission der Ärztekammer und nach Aufklärung, Information und Zustimmung der Patientinnen vorgenommen. An der Probengewinnung beteiligten sich neben der Universitätsfrauenklinik Rostock ebenfalls die 2003 noch eigenständige Frauenklinik des Südstadt Klinikums und die Frauenklinik Schwerin (Helios Kliniken Schwerin).
Die erste Probenentnahme (t1) erfolgte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beim HELLP-Syndrom. Nur Patientinnen mit HELLP-typischen klinischen und laborchemischen Veränderungen wurden in die Studie einbezogen. Von einem HELLP-Syndrom wurde ausgegangen bei (I) einer Thrombozytenzahl unter 130000/µl (Referenzbereich 150000 - 450000/µl), (II) ALAT oder ASAT größer als 65 U/l (Referenzbereiche 0 - 34 U/l (ALAT), 0 - 31 U/l (ASAT)) und (III) einem Haptoglobin-Wert kleiner als 0,136 g/l (Referenzbereich 0,3 - 2,0 g/l) oder ein Hämatokrit unter 36% (Referenzbereich 36 - 46%) und Hämoglobin unter 7,5 mmol/l (Referenzbereich 7,5 - 9,9 mmol/l) als Zeichen einer Hämolyse.

Die Proben der gesunden Schwangeren zum Zeitpunkt t1 wurden während Routinevorstellungen im dritten Trimenon entnommen. Die Kontrollproben wurden nach vergleichbaren Werten bezüglich Alter, Schwangerschaftswoche und Body Mass Index (BMI) vor der Schwangerschaft ausgesucht. Schwangere mit Infektionen, Diabetes mellitus und Nikotin-Abusus wurden ausgeschlossen.

Von beiden Patientenkollektiven wurde mindestens sechs Wochen (durchschnittlich 6,5 Monate) nach der Entbindung zum Zeitpunkt t2 erneut Blut abgenommen. Zu diesem Zeitpunkt haben alle Frauen noch voll gestillt.

Sämtliche Blutentnahmen erfolgten aus venösem Blut des Vorderarmes unter standardisierten Bedingungen in Lithium-Heparin Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zu 7 ml. Zur schonenden Trennung von Blutzellen und Plasma wurde das Blut direkt nach der Probengewinnung 15 Minuten bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und durch 0,2 μm Filter sterilfiltriert. Sobald sich der Spritzendruck erhöhte (verbliebene Thrombozyten im Plasma verstopfen die Filtermembran) wurde der Filter gewechselt. Die Plasmaproben wurden daraufhin aliquotiert und bei - 80 °C asserviert.

3.1.2 Vergleichsgruppen

Für die Proteomanalyse konnten sieben Plasmaproben von HELLP-Patientinnen (I) und sechs von gesunden Schwangeren (III) zum Zeitpunkt t1 gewonnen werden. Zum Zeitpunkt t2 wurde erneut Blut von sieben post-HELLP-Patientinnen (II) und sechs gesunden Müttern (IV) abgenommen. Somit ergeben sich 26 verschiedene Plasmaproben für die Proteomanalyse (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Versuchsgruppen für die Proteomanalysen.

		HELLP		Gesund
Präpartal	I	7	III	6
Postpartal	II	7	IV	6

I	HELLP-Patientinnen	III	Gesunde Schwangere
II	Post-HELLP-Patientinnen	IV	Gesunde Mütter

In die ELISA-Messungen wurden insgesamt 33 Proben einbezogen, neun HELLP-Patientinnen (I), sieben post-HELLP-Patientinnen (II), zehn gesunde Schwangere (III) und sieben gesunde Mütter (IV), (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Versuchsgruppen für den ELISA-Test.

		HELLP		Gesund
Präpartal	I	9	III	10
Postpartal	II	7	IV	7

In den folgenden beiden Tabellen (Tabellen 3 und 4) sind sowohl die klinisch relevanten, als auch die laborchemischen Parameter aller einbezogenen HELLP-Patientinnen dargestellt.

Tabelle 3: Patienteninformationen und klinische Parameter der HELLP-Patientinnen.

Patienten	Alter (Jahre)	Art der Geburt	Schwanger-schafts-woche	Manifestation	Anamnese	Gluco-kortikoid-gabe	Fetal-entwicklung in APGAR
HELLP 1	36	Sectio	36 + 2	HELLP	33. SSW: Hypertension 35. SSW: rechter Oberbauchschmerz, Hypertension, Proteinurie, Kopfschmerz	+	9 I 9 I 9
HELLP 2	23	Sectio	36 + 2	HELLP	36. SSW: Proteinurie, Ödeme	-	6 I 9 I 9
HELLP 3	23	Vaginal	35 + 1	HELLP postpartal	31. SSW: Hypertension, Proteinurie, Ödeme	+	9 I 9 I 9
HELLP 4	23	Sectio	38 + 5	HELLP	37. SSW: rechter Oberbauchschmerz, Ödeme, Erbrechen	-	9 I 10 I 10
HELLP 5	40	Sectio, Totgeburt	22 + 0	HELLP	21. SSW: Hypertension, Ödeme, Proteinurie, Kopfschmerz 21+7 SSW: Plasmapherese	+	nicht messbar
HELLP 6	24	Sectio	39 + 0	HELLP postpartal	38. SSW: Hypertension, Proteinurie, rechter Oberbauchschmerz	-	9 I 9 I 10
HELLP 7	29	Sectio	32 + 4	HELLP	32. SSW: Hypertension, rechter Oberbauch-schmerz, Proteinurie, Kopfschmerz, Erbrechen	+	5 I 6 I 10
HELLP 8	32	Sectio	31 + 0	HELLP	30. SSW: Hypertension, Proteinurie, rechter Oberbauchschmerz, Erbrechen	+	3 I 7 I 8
HELLP 9	24	Sectio	35 + 5	HELLP	30. SSW: Ödeme, 34. SSW: Hypertension, 35. SSW: rechter Oberbauchschmerz	-	9 I 7 I 7

Tabelle 4: Laborparameter der HELLP-Patientinnen.						
Patient	Haptoglobin[a)]	Hämoglobin[b)]	Hämatokrit[c)]	ALAT[d)]	ASAT[e)]	Thrombozyten[f)]
HELLP 1	0,058	5,8	0,28	171	144	39
HELLP 2	0,136	7,1	0,35	77	65	128
HELLP 3	[g)]	4,9	0,24	144	178	82
HELLP 4	[g)]	6,5	0,30	496	193	31
HELLP 5	0,058	7,5	0,36	65	46,8	39
HELLP 6	[g)]	7,2	0,35	228	247	39
HELLP 7	[g)]	5,6	0,25	1073	1117	34
HELLP 8	[g)]	6,8	0,32	594	284	88
HELLP 9	[g)]	6,9	0,33	90	91	164

a) g/l; Referenzwert: 0,3 - 2,0

b) mmol/l; Referenzwert: 7,5 - 9,9

c) Referenzwert: 0,36 - 0,46

d) U/l; Referenzwert: 0 - 34

e) U/l; Referenzwert: 0 - 31

f) 10^9/l; Referenzwert: 150 - 450

g) nicht bestimmt

3.1.3 Chemikalien für die 2D-Gelelektrophorese

Die verwendeten Chemikalien wurden von den in Tabelle 5 aufgeführten Firmen bezogen.

Tabelle 5: Chemikalien für die 2D-Gelelektrophorese.

Proteinbestimmung	
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	
Harnstoff	ICN Biomedicals, Ohio, USA
CHAPS	Serva, Heidelberg, Deutschland
IPG-Puffer	Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Complete mit EDTA	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Immobiline™ DryStrips, pH 4-7	Amersham Biosciences/GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Dry Strip Cover Fluid	Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg, Deutschland

SDS-PAGE (2. Dimension)	
Acrylamid-Stammlösung, rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
N,N,N′,N′-Tetramethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Low melting Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fixierung und Färbung	
Essigsäure	J. T. Baker
Coomassie Brillant Blue G250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.1.4 Geräte für die 2D-Gelelektrophorese

Die verwendeten Instrumente stammen von den in Tabelle 6 aufgeführten Firmen.

Tabelle 6: Geräte für die 2D-Gelelktrophorese.

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	
IPGphor Strip Holder	Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
IPGphor IEF-System	Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
SDS-PAGE (2. Dimension)	
HOEFER DALT-Elektrophoresekammer mit Zubehör	Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
HOEFER DALT-System Multiple Gel Caster mit Zubehör	Amersham Biosciences/GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Umax Mirage II Scanner	Umax Data Systems, Willich, Deutschland

3.1.5 Chemikalien zum Picken, In-Gel-Verdau und für die Massenspektrometrie

Die verwendeten Chemikalien wurden von den in Tabelle 7 aufgelisteten Firmen bezogen.

Tabelle 7: Chemikalien zum Picken, In-Gel-Verdau und für die Massenspektrometrie.

Trypsin	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Peptide Calibration Standard	Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland
α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure	Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ferulasäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.1.6 Geräte zum Picken, In-Gel-Verdau und für die Massenspektrometrie

Die verwendeten Instrumente stammen von den in Tabelle 8 aufgeführten Firmen.

Tabelle 8: Geräte zum Picken, In-Gel-Verdau und für die Massenspektrometrie.

Flexys Proteomics Picker	Genomic Solutions, Ann Arbor, Michigan, USA
Mikrotiterplatten	Genomic Solutions, Ann Arbor, Michigan, USA
Masterblocks und Abdeckplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
MALDI-Targets AnchorChip™ 600/384	Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland
Reflex III MALDI-ToF-Massenspektrometer	Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland

Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Racks und weiteres Laborzubehör stammen von den Firmen BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Gilson (Bad Camberg, Deutschland), VWR International (Darmstadt, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.1.7 ELISA

Für den ELISA-Test wurde das in Tabelle 9 aufgelistete Zubehör verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Materialien für den ELISA-Test.

ELISA Kit, PHASE™ RANGE, Serum Amyloid A	Tridelta Development Ltd., Maynooth, Irland
Multiskan® Plus Instrument	MTX Lab Systems, USA

3.1.8 Software und Datenbanken

1. Proteobase, Interne Datenbank des Proteom-Zentrums Rostock
2. Phoretix 2D Advanced Version 6.01, Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, UK
3. BioTools-Software, Version 2.2, Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland
4. Mascot, Version 2.04, Matrix, Science, London, UK
5. SWALL, UniProt Release 4.4, bestehend aus SwissProt Release 46.4 + TrEMBL Release 29.4
6. Statistische Analysen, SigmaStat, Version 3.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA
7. Macromizer GUI-Software, Version 1.0, GSG Mess- und Analysengeräte, Bruchsal, Deutschland/Comet, Flamatt, Schweiz
8. Software „R“, http://www.r-project.org

3.2 Methoden

3.2.1 2-D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) trennt Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und nach ihren Molekulargewichten auf. Zuerst erfolgt eine isoelektrische Fokussierung und anschließend eine SDS-Gelelektrophorese.

Der gesamte Versuchsablauf ist durch laborinterne SOPs (standard operation procedures) vereinheitlicht, wodurch ablaufbedingte Abweichungen und Fehler minimiert werden. Die Methodik dieser Arbeit baut auf viele Voruntersuchungen bezüglich der Gelelektrophorese von Plasmaproben auf, die im Proteom-Zentrum Rostock vorgenommen wurden [195].

Proteinbestimmung

Die Messung der Proteinkonzentrationen für die 2D-Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Bradford mit einem Bio-Rad Protein Assay. Als Vergleichsprotein wurde dabei Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Bei der Proteinbestimmung nach Bradford nutzt man die Gegebenheit, dass sich bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine das Absorptionsmaximum der Farbe verschiebt (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung [24].
Plasmaproteine liegen in einer Konzentration von 65 - 80 g/l im Blutplasma vor [184]. Während der Schwangerschaft kommt es durch die Zunahme des Plasmavolumens um 40% zu einem Abfall der Gesamtprotein-Konzentration. In der Mitte der Schwangerschaft liegt die Gesamtprotein-Konzentration durch diesen Verdünnungseffekt rund 10 g/l unter dem Mittelwert Nichtschwangerer [87].
Es ergab sich für die gesunden Schwangeren eine mittlere Proteinkonzentration von 67 g/l, die postpartal auf einen mittleren Wert von 84 g/l (gesunde Mütter) anstiegen. Die mittlere Proteinkonzentration der HELLP-Gruppe betrug 52 g/l, postpartal stiegen diese Werte auf 91 g/l an.
Aus diesen Proteinkonzentrationen wurde die Probenmenge in ml errechnet, die aufgetragen werden muss, um bei jedem Gellauf von einer Gesamtproteinmenge von 900 µg pro Gel auszugehen.

Probenpräparation

Ein Probenpuffer sollte so viele Proteine wie möglich in Lösung bringen, ihre Aggregation verhindern und sie in ihre Untereinheiten aufspalten. Zusätzlich sollten Proteasen inaktiviert werden. Da der erste Schritt die isoelektrische Fokussierung ist, müssen die Proteine ihre Eigenladung behalten [173].
In dieser Arbeit wurde ein mit dem nichtionischen Detergenz CHAPS modifizierter PBS-Puffer (100 µl) verwendet, zu welchem die errechneten Milliliter der Plasmaproben, die Proteaseinhibitoren PMSF (4 µl) und Complete™ (16 µl), sowie Harnstoff (237,6 mg) und DTT (22 µl) zur Denaturierung der Proteine hinzugefügt wurden.
Nach 30minütigem Rühren des Gemisches wurden Ampholin (pH 2-4), IPG-Puffer (pH 4-7) und eine Spur Bromphenolblau zum Sichtbarmachen der Probe hinzugegeben.

Isoelektrische Fokussierung

Wenn an ein Gemisch aus zwitterionschen Verbindungen (Ampholyte) ein elektrisches Feld angelegt wird, bildet sich ein pH-Gradient. Dabei bildet sich das elektische Feld zwischen der Anode (niedriger pH-Wert) und der Kathode (hoher pH-Wert). Jede zwitterionische Verbindung, zu denen Proteine gehören, wandert zu ihrem isoelektrischen Punkt. An diesem Punkt beträgt die Nettoladung des Moleküls null, das Molekül kommt dort zum Liegen. Das Protein wird also an seinem isoelektrischen Punkt konzentriert beziehungsweise fokussiert. Da jedes Protein einen typischen isoelektrischen Punkt besitzt, kann man auf diese Weise Proteingemische auftrennen.
Das Plasmaprotein-Gemisch wurde in einem IPGphor-System auf 18 cm langen, linearen Immobiline™-Streifen (pH 4–7) aufgetrennt, der ersten Dimension entsprechend. Die IPG-Streifen wurden über Nacht in 350 µl Rehydratisierungspuffer (8 M Harnstoff, 2% CHAPS, 0,5% IPG-Puffer pH 4–7, 16 mM DTT) in einer Quellkassette rehydratisiert. Zur isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden 900 µg Probenprotein pro Gel nach der Cuploading-Methode aufgetragen. Dabei wird die solubilisierte Plasmaprobe über ein Cup, das an der Anode plaziert wird, auf den rehydratisierten IPG-Streifen aufgetragen. Während der IEF laufen die Plasmaproteine in den IPG-Streifen und werden dort nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die elektrische Spannung wurde dabei entsprechend des gewählten Fokussierungsprogrammes schrittweise erhöht (1 h bei 150 V, 1 h bei 300 V, 1 h bei 600 V, 1 h bei 1000 V, 1 h bei 2000 V und 10,5 h bei 8000 V).

Equilibrierung

Die fokussierten Gelstreifen wurden in je 10 ml Equilibrierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% Glycerol, 2% SDS, Bromphenolblau) geschwenkt. In zwei Schritten (zu je 20 min) wurden 10 mg/ml DTT und 40 mg/ml Iodacetamid hinzugefügt. DTT dient zur Reduktion der Cystein-Brücken, Iodacetamid zur Alkierung und somit zur Blockierung der nun freien SH-Gruppen der Cysteine zur Vermeidung einer Rückreaktion (zu S-S).

SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) wird auch als zweite Dimension bezeichnet. Die meisten Proteine bilden mit dem Detergenz SDS (Sodium dodecylsulfate) einen negativ geladenen SDS-Protein-Komplex mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis. Die Proteine werden durch das SDS denaturiert, die Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen) werden zerstört. Die SDS-Protein-Komplexe wandern entsprechend ihrer Ladung im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Radius und nach ihrem Molekulargewicht auf.
Für die zweite Dimension wurde ein Hofer-Dalt-System verwendet. Es wurden homogene 13,5%ige SDS-Gele generiert. Die equilibrierten IPG-Streifen wurden mit bromphenolblau-angefärbter 1%iger Agarose auf dem SDS-Gel fixiert. Als Lauf-Puffer wurde ein Tris-Glycin-SDS-Puffer verwendet.
Um Abweichungen zu minimieren, die durch verschiedene Gelläufe bedingt sind, wurden von jeder Probe drei Gele angefertigt, nach Möglichkeit während desselben Gellaufes. Die Gelelektrophorese wurde über Nacht bei einer Spannung von 100 Volt durchgeführt.

Fixierung, Färbung und Digitalisierung

Vor dem Färben wurden die Proteine im Gel fixiert. Dazu wurden die Gele 2 h lang in einer Fixierlösung aus 50% Ethanol, 10% Essigsäure und 40% Wasser geschwenkt. Anschließend wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G250 über Nacht gefärbt [155]. Dabei bindet der Farbstoff in saurem Milieu an freie geladene Aminogruppen der Proteine. Entfärbt wurde mit Wasser.

Die gefärbten Gele wurden bei 16 bit Graustufe mit einem Umax Mirage II Scanner eingescannt und als Tif-Bilder elektronisch gespeichert.

Gelanalyse

Als erstes erfolgte eine visuelle Analyse aller generierten Gele innerhalb und zwischen den verschiedenen Gruppen, bei der alle Gelbereiche systematisch miteinander verglichen wurden.
Für die elektronische Gelanalyse wurde die Software Phoretix 2D Advanced Version 6.01 verwendet. Zunächst wurde eine Spotdetektion durchgeführt, bei der die Spots automatisch detektiert wurden. Aufgrund einer gewissen Unschärfe mit sowohl falsch positiven, als auch falsch negativen Spots wurde dieses Ergebnis stets manuell nachbearbeitet.
Für die differentielle Gelanalyse wurde aus jeder Vergleichsgruppe ein Gel zum Referenzgel erklärt und anschließend mit den Gelen der eigenen, als auch der anderen Gruppen verglichen (gematched). Dabei werden die detektierten Spotformationen aus dem Referenzgel den entsprechenden Formationen aus dem Vergleichsgel zugeordnet. Auf diese Weise konnten differentiell exprimierte Gelbereiche erkannt werden.
Anschließend wurden in densitometrischen Analysen die verschiedenen differentiell exprimierten Gelbereiche mit den entsprechenden Gelbereichen in den Kontrollgelen verglichen, wie es bereits Just et al. [92] beschrieben haben. Von jeder Probe wurden mindestens zwei Gele berücksichtigt. Insgesamt wurden 39 Gele in die densitometrische Analyse einbezogen, 19 Gele von HELLP-Patientinnen (I) und 20 Gele aus der Kontrollgruppe (III). Die ausgewählten Gelbereiche (A-F), bestehend aus differentiell exprimierten Gelbereichen in den verschiedenen Gruppen, wurden in allen Gelen miteinander verglichen. Da sich die Gele in ihrer Gesamt-Färbeintensität voneinander unterscheiden, wurde von normalisierten Spotvolumina ausgegangen. Bei der Normalisierung wird die Gesamt-Färbeintensität der Gele einander angepasst. Somit ist eine quantitative Spotanalyse möglich, um Expressionsunterschiede zu ermitteln.

Statistik

In der anschließenden statistischen Analyse wurde der T-Test für zwei unabhängige Stichproben verwendet. Ein Unterschied wurde als signifikant erklärt, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Es wurde mit den normalisierten Spotvolumina gerechnet. Normalisierte Volumina sich entsprechender Spots wurden in Box-und-Whisker-Plots dargestellt.

3.2.2 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie (MS) werden Molekülmassen von Ionen im Hochvakuum bestimmt. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor.
Mit gepulstem Laserlicht wird der Analyt von einer festen Matrix desorbiert und ionisiert. Diese Methode wird MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) genannt. Die MALDI-MS nutzt die Gegebenheit, dass eine schlecht absorbierende Verbindung bei wesentlich niedrigeren Energiedichten durch Einstrahlung eines Laserpulses ionisiert wird, wenn sie in einem Gemisch mit einer stark absorbierenden Verbindung - der Matrix - vorliegt [95,96].
Die Probe wird mit einem Überschuss der Matrixsubstanz vermischt, wodurch der Analyt in die kristalline Matrix eingebunden wird, es bilden sich Kokristalle. Das Matrixkristall mit den eingelagerten Probenmolekülen wird auf einen Probenträger aufgebracht und bestrahlt. Die Matrix hat hierbei mehrere Funktionen, erstens absorbiert sie den Hauptteil der Energie aus dem Laserpuls und schützt so die Probe vor photolytischer Zersetzung. Zweitens überträgt sie die zur Desorption notwendige Energie auf die Probenmoleküle. Drittens kommt es zum Protonentransfer zwischen Matrix und Analyt, wodurch letzterer positiv aufgeladen wird. Viertens reduziert die Matrix Wechselwirkungen der Probenmoleküle untereinander sowie mit der Metalloberfläche des Probenträgers und erleichtert somit die Desorption [19]. Die Auswahl der Matrix ist abhängig von der Einstrahlwellenlänge des Lasers und den Analytmolekülen.
Während des Ionisationsprozesses werden sowohl die ionisierten Matrixmoleküle, als auch die eingebauten Proteinionen explosionsartig freigesetzt. Die MALDI-Massenspektrometrie wird als sanfte Ionisierungsmethode bezeichnet, da mit ihr große, thermisch labile Moleküle wie Proteine unfragmentiert ionisiert und intakt nachgewiesen werden können.
Nach der Freisetzung werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und daraufhin im Analysator nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt. Massenspektrometer werden nach den verwendeten Analysatoren unterschieden. MALDI-Massenspektrometer sind meist Flugzeit-Massenspektrometer (time of flight, ToF). Bei diesem Modell wird die Gegebenheit genutzt, dass die Ionen beim Eintritt in den Analysator alle die gleiche Energie haben. Die Geschwindigkeit eines Ions hängt von seiner Masse und seiner Ladung ab, mathematisch ausgedrückt von dem Quotienten aus Masse und Ladung (m/z). Ionen mit kleinerer Masse erreichen eine höhere Geschwindigkeit, genauso wie ein zweifach positiv geladenes Ion im Vergleich zum gleichen Ion mit nur einer positiven Ladung. Daher erreichen leichte Ionen den Detektor eher als schwere Ionen. Aus der Ionenflugzeit zwischen Quelle und Detektor lässt sich direkt die Masse des Analyten berechnen [173].

Probenvorbereitung zum massenspektrometrischen Peptidmassen-Fingerabdruck

Unbekannte Proteine können massenspektrometrisch durch einen Peptidmassen-Fingerabdruck (peptide mass fingerprint) charakterisiert werden. Dazu wird das Protein mit bestimmten Proteasen, beispielsweise mit Trypsin, verdaut, woraufhin die Molekulargewichte der entstandenen Peptide massenspektrometrisch bestimmt werden. Die erhaltenen experimentellen Daten werden mit bestimmten Datenbanken abgeglichen. So können Proteinspots in 2D-Gelen identifiziert werden.

Die interessierenden Proteinspots wurden mit einem Spot-Picker aus den Gelen herausgelöst. Dabei werden die Koordinaten der Spots aus dem Gelimage der Spotdetektion (gespeichert in der Proteobase) mit einem von der Kamera des Pickers gemachten Bild verglichen und eventuelle Verzerrungen ausgeglichen. Kleine Spotvolumina wurden manuell aus dem Gel gepickt.
Für die Zerlegung der Proteine in den gepickten Spots wurde eine salzarme Prozedur angewendet [60,156]. Hierfür wurden die gepickten Spots mit 30% Acetonitril in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (100 µl) und mit 50% Acetonitril in 10 mM Ammoniumbicarbonat (100 µl) gewaschen, durch die Zugabe von 100 µl Acetonitril geschrumpft und mit dem Speedvac Evaporator getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden mit 5 µl einer Trypsin-Lösung (10 ng/µl in 3 mM Tris–HCl, pH 8,5) wieder aufgequollen und für 5-8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl einer Extraktions-Lösung (0,3% TFA, 50% Acetonitril, 5 mM n-Octyl-ß-D-Glucopyranosid) hinzugegeben und die Proben bei Raumtemperatur 30-60 Minuten gerührt. Danach wurden die Peptidextrakte in 96er Mikrotiterplatten zentrifugiert.

MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Zur Identifizierung mittels der MALDI-ToF-Massenspektrometrie wird die Probe auf einem Probenteller (Target) mit einer Matrix kokristallisiert. Dafür wurden AnchorChip™-Targets 600/384 µm (siehe Kapitel 3.1.6., Tabelle 8, Seite 33) mit CHCA (α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure) als Matrix verwendet [157]. Die MALDI-MS-Analysen wurden mit einem Reflex-III-MALDI-ToF-Massenspektrometer (siehe Kapitel 3.1.6., Tabelle 8, Seite 33) durchgeführt. Dieses war mit einer SCOUT-Quelle ausgerüstet und arbeitete mit verzögerter Extraktion im positiven Reflektor-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 25 kV. Zur Desorption wurde ein Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm eingesetzt. Die automatischen Messungen wurden extern mit einem kommerziell erhältlichen

Massenkalibrations-Standard (siehe Kapitel 3.1.5., Tabelle 7, Seite 33) kalibriert. Manuelle Messungen wurden intern anhand der Trypsin-Autoproteolyseprodukte (842,51 Da; 1045,56 Da; 2211,11 Da; 2807,39 Da) kalibriert. Die Spektren wurden in einem Massenbereich von 700-4500 Da aufgenommen.

Proteinidentifikation

Die erhaltenen Spektren wurden mit Hilfe der BioTools Software (siehe Kapitel 3.1.8., Seite 34) analysiert. Peptid-Ionensignale wurden anhand vorgegebener Parameter exakten Massen zugewiesen, Peaks anhand ihrer charakteristischen Eigenschaften, beispielsweise ihrer Isotopenverteilung, erkannt. Weiterhin wurden Spektren manuell nachbearbeitet und intern nachkalibriert.

Durch diese massenspektrometrische Analyse erhält man die Massen der enzymatisch erzeugten Peptide eines interessierenden Proteins. Diese experimentell ermittelten Daten wurden nun mit einer Liste von Peptidmassen verglichen, welche der Computer durch theoretische Spaltung aller Proteine, die in der Datenbank enthalten sind, berechnet hat [19]. Die Datenbankrecherche wurde mit Hilfe der Mascot Software (siehe Kapitel 3.1.8., Seite 34) durchgeführt. Bei dem Vergleich der gemessenen Werte mit den theoretisch generierten Werten wurde eine Abweichung von 80 ppm toleriert, sowie nicht vollständig verdaute Proteine einbezogen, indem Peptide mit maximal zwei nicht hydrolysierten Tyrosin-Schnittstellen (missed cleavage sites) berücksichtigt wurden. Zur Recherche wurde die SWALL-Datenbank (siehe Kapitel 3.1.8., Seite 34) genutzt. Alle Suchergebnisse wurden auf Glaubwürdigkeit und mögliches Vorkommen in den verwendeten Proben überprüft. Die Proteine wurden mit den SwissProt Accession-Nummern bezeichnet.

3.2.3 ELISA

Für die quantitative Analyse von Serum Amyloid A (SAA) wurde ein ELISA-Test (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, siehe Kapitel 3.1.7., Tabelle 9, Seite 33) verwendet. Für einen ELISA-Test benötigt man zwei Antikörper, welche spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden.
Bei diesem kommerziell erhältlichen ELISA sind die Böden der Mikrotiterplatten mit einem monoklonalen Antikörper gegen SAA beschichtet (coating-Antikörper). Freies SAA aus den Proben respektive aus den Standards wird einerseits von diesen immobilisierten Antikörpern gebunden. Andererseits erfolgt eine weitere Bindung zu biotinylierten Antikörpern (detection-Antikörper), die zusammen mit der Probe hinzugegeben werden. Nach einer Inkubationszeit werden ungebundene Partikel aus den Wellplates durch Waschen entfernt, so dass Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe zurückbleiben.
Daraufhin erfolgt die Färbung, indem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase hinzugefügt und inkubiert wird. Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (Streptomyces avidinii) und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Streptavidin und Avidin besitzen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin. Es bildet sich ein Avidin-Biotin-Enzymkonjugat. Als Substrat für die Peroxidase wird nun ein Chromogen hinzugegeben, in diesem Fall TMB (Tetramethylbenzidin). Dieses bildet ein blaues Endprodukt, was im Photometer verfolgt werden kann. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Farbstoffes und damit auch zu der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

Zuerst wurden die Plasmaproben (10 µl) mit einem Verdünnungspuffer 1:500 verdünnt. Fünfzig Mikroliter einer Lösung von biotinyliertem SAA-Antikörper und Verdünnungspuffer (1:100), sowie die gleiche Menge der verdünnten Plasmaprobe respektive des Standarts wurden zusammen in vorgegebene Mikrotiterplatten pipettiert und dort eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Nach vier Waschschritten wurden je 100 µl der Streptavidin-Peroxidase hinzugefügt und bei Raumtemperatur 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach erneuten vier Waschschritten wurden jeweils 100 µl TMB-Substrat hinzugegeben und nochmals 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde eine mitgelieferte Stopplösung (50 µl) hinzugegeben und anschließend die Absorption bei 450 nm mit einem Multiskan® Plus-Gerät (siehe Kapitel 3.1.7., Tabelle 9, Seite 33) gemessen. Von jeder Plasma- und Standartprobe wurden zwei Proben einbezogen, alle Messungen wurden doppelt durchgeführt.

Für die statistische Analyse wurde der Kruskal-Wallis-Test hinzugezogen. Es handelt sich dabei um einen statistischen Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben (Gruppen) hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable unterscheiden. Ein Unterschied wurde als signifikant erklärt, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Die SAA-Konzentrationen der verschiedenen Versuchsgruppen wurden in Box-und-Whisker-Plots dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientengut

Von den einbezogenen neun HELLP-Patientinnen waren acht Erstgebärende. Der Altersdurchschnitt lag bei 28,2 Jahren, der Median betrug 24 Jahre. Das HELLP-Syndrom entwickelte sich durchschnittlich in der 33. Schwangerschaftswoche, im Median in der 35. Schwangerschaftswoche.

Eine Patientin zeigte einen besonders schweren Verlauf, der trotz einer präpartalen Plasmapherese mit einer Totgeburt in der 22. Schwangerschaftswoche endete. Zwei Patientinnen (23%) entwickelten ein postpartales HELLP-Syndrom. Rechtsseitige Oberbauchschmerzen gaben sechs von neun Patientinnen (67%) an. Bei sieben von neun Patientinnen (78%) wurde ein Bluthochdruck, bei neun von neun Patientinnen eine Proteinurie beziehungsweise Ödeme (100%) festgestellt. Drei von neun HELLP-Patientinnen klagten über Übelkeit (34%), ebensoviele gaben Kopfschmerzen an. Somit ist das verwendete Patientengut als repräsentativ für das HELLP-Syndrom zu betrachten [71,139,191].

Als Nebenerkrankungen waren bei der Mehrheit der Patientinnen (fünf von neun) Allergien bekannt, als häufigste (vier von neun) eine Allergie auf Nickel. In der gesunden Vergleichsgruppe waren bei der Hälfte der Frauen Allergien bekannt (drei von sechs), in zwei Fällen eine Penicillin-Allergie, in einem Fall eine Allergie auf Tierhaare und Birkenpollen.

Bei einer Patientin (HELLP 1) war bereits vor der Schwangerschaft eine Hypertonie bekannt, weswegen sie bereits mit einem Betablocker eingestellt war. Eine Patientin (HELLP 7) blieb postpartal hyperton, so dass mit einer Ebrantil-Therapie begonnen wurde.

Bei der Vorstellung zum Zeitpunkt t2 berichteten alle Frauen über einen erfreulichen, unkomplizierten Verlauf. Alle lebend geborenen Kinder entwickelten sich trotz teilweiser initialer Anpassungsstörungen zeit- und perzentilengerecht.

4.2 Proteomprofil des Plasmas von HELLP-Patientinnen

Entspechend der eingangs formulierten Fragestellung konnte für das HELLP-Syndrom ein HELLP-typisches Referenzgel generiert werden. Dieses Gel bezieht alle identifizierten Plasmaproteine von HELLP-Patientinnen und gesunden Schwangeren vor und nach der Geburt ein (siehe Abbildung 1).

In jedem Gel konnten etwa 550 Proteinspots mit einer kolloidalen Coomassie-Färbung detektiert werden. Das entspricht etwa der Anzahl aus vorbeschriebenen Plasmauntersuchungen [7]. Die Intensität der Proteinspots ist sowohl innerhalb, als auch zwischen den vier Gruppen sehr ähnlich. Somit sind wichtige Voraussetzungen für den Vergleich der verschiedenen Gruppen und die Suche nach krankheitsbedingten Veränderungen gegeben.

Um einen allgemeinen Eindruck von Plasmaproteinen während der Schwangerschaft und insbesondere beim HELLP-Syndrom zu bekommen, wurden 102 Proteine mittels massenspektrometrischem Peptidmassen-Fingerabdruck identifiziert (siehe Tabelle 10).

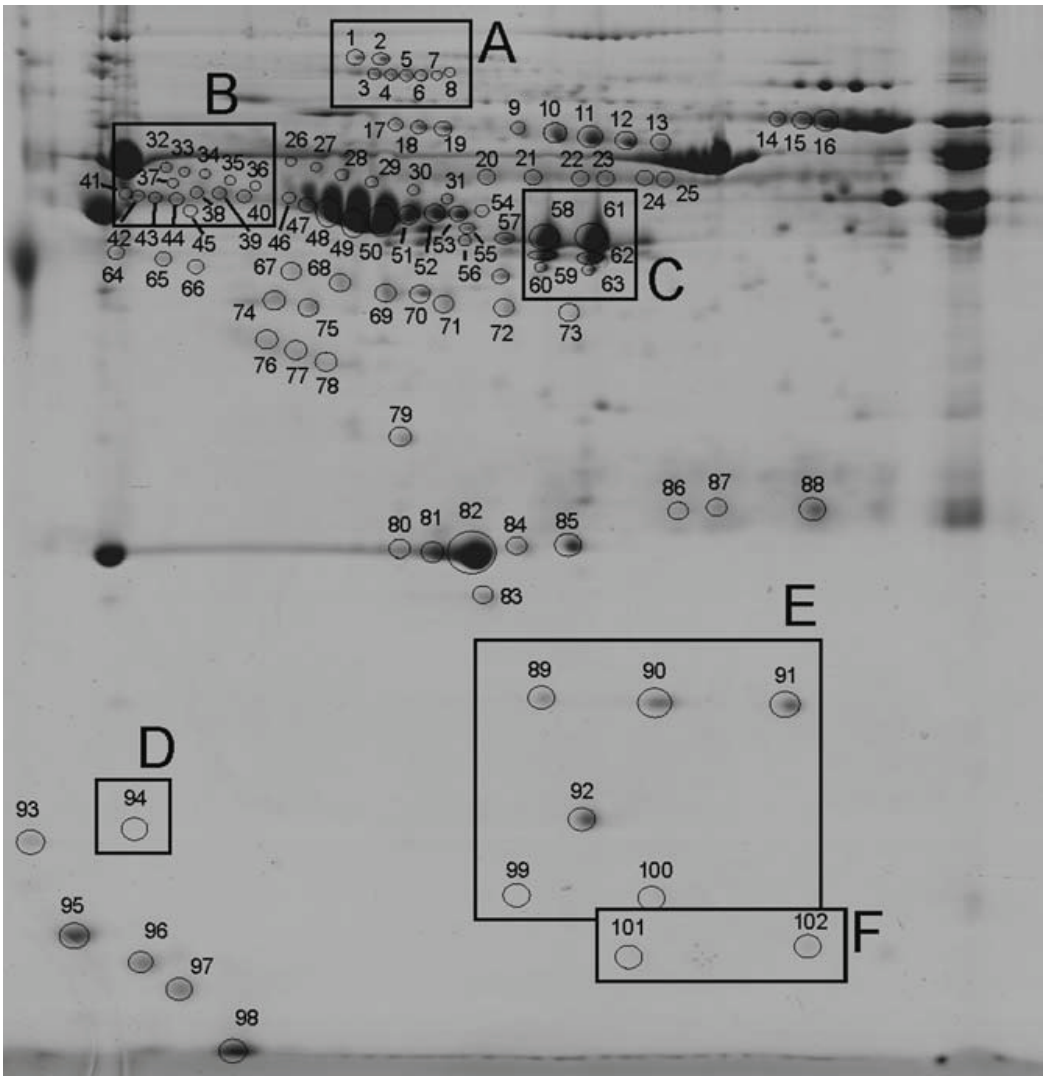


Abbildung 1: **Referenzgel für das HELLP-Syndrom.**

Dieses Gel stellt alle identifizierten Proteinspots dar und bezieht somit alle in dieser Arbeit nachgewiesenen Veränderungen der Proteinexpression bei HELLP-Patientinnen ein. Es handelt sich um ein 2D-Gel (pH 4-7), gefärbt mit kolloidalem Coomassie. Die eingefügten Rechtecke A - F umrahmen die Gelbereiche, in denen differentiell exprimierte Proteine gefunden wurden.

Tabelle 10: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine.

Spotnummer [a)]	Proteinnamen [b)]	Accession-Nummer [c)]
1	α1-Antitrypsin	P01009
2	α1-Antitrypsin	P01009
3	Inter-α-Trypsin Inhibitor H4	Q14624
4	Inter-α-Trypsin Inhibitor H4	Q14624
5	Inter-α-Trypsin Inhibitor H4	Q14624
6	Inter-α-Trypsin Inhibitor H4	Q14624
7	Inter-α-Trypsin Inhibitor H4	Q14624
8	Inter-α-Trypsin Inhibitor H4	Q14624
9	Hämopexin (β-1B-Glykoprotein)	P02790
10	Hämopexin (β-1B-Glykoprotein)	P02790
11	Hämopexin (β-1B-Glykoprotein)	P02790
12	Hämopexin (β-1B-Glykoprotein)	P02790
13	Hämopexin (β-1B-Glykoprotein)	P02790
14	Serotransferrin (Transferrin)	P02787
15	Serotransferrin (Transferrin)	P02787
16	Serotransferrin (Transferrin)	P02787
17	α-1B-Glykoprotein	P04217
18	α-1B-Glykoprotein	P04217
19	α-1B-Glykoprotein	P04217
20	IgA 1C	P01876
21	IgA 1C	P01876
22	IgA 1C	P01876
23	IgA 1C	P01876
24	IgA 1C	P01876
25	IgA 1C	P01876
26	Angiotensinogen	P01019
27	Angiotensinogen	P01019
28	Angiotensinogen	P01019
29	Angiotensinogen	P01019
30	Angiotensinogen	P01019
31	Antithrombin III	P01008
32	Kininogen 1	P01042
33	Kininogen 1	P01042
34	Kininogen 1	P01042
35	Kininogen 1	P01042
36	Kininogen 1	P01042
37	Kininogen 1	P01042
38	Kininogen 1	P01042
39	Kininogen 1	P01042
40	Kininogen 1	P01042
41	α2-hs-Glykoprotein	P02765
42	α2-hs-Glykoprotein	P02765
43	α2-hs-Glykoprotein	P02765
44	α2-hs-Glykoprotein	P02765
45	α2-hs-Glykoprotein	P02765
46	α1-Antitrypsin	P01009
47	α1-Antitrypsin	P01009
48	α1-Antitrypsin	P01009
49	α1-Antitrypsin	P01009
50	α1-Antitrypsin	P01009
51	α1-Antitrypsin	P01009
52	α1-Antitrypsin und Vitamin D-bindendes Protein	P01009, P02774
53	Vitamin D-bindendes Protein	P02774

54	Vitamin D-bindendes Protein	P02774
55	Vitamin D-bindendes Protein	P02774
56	Vitamin D-bindendes Protein	P02774
57	Fibrinogen γ	P02679
58	Fibrinogen γ	P02679
59	Fibrinogen γ	P02679
60	Fibrinogen γ	P02679
61	Fibrinogen γ	P02679
62	Fibrinogen γ	P02679
63	Fibrinogen γ	P02679
64	Leuzin-reiches α2-Glykoprotein	P02750
65	Leuzin-reiches α2-Glykoprotein	P02750
66	Leuzin-reiches α2-Glykoprotein	P02750
67	Haptoglobin β	P00738
68	Haptoglobin β	P00738
69	Apolipoprotein AIV	P06727
70	Apolipoprotein AIV	P06727
71	Haptoglobin β	P00738
72	Haptoglobin β	P00738
73	Haptoglobin β	P00738
74	Zink-α2-Glykoprotein	P25311
75	Zink-α2-Glykoprotein	P25311
76	Apolipoprotein J Clusterin	P10909
77	Apolipoprotein J Clusterin	P10909
78	Apolipoprotein J Clusterin	P10909
79	α1-Mikroglobulin	P02760
80	Apolipoprotein AI	P02647
81	Apolipoprotein AI	P02647
82	Apolipoprotein AI	P02647
83	Plasma Retinol-bindendes Protein	P02753
84	Apolipoprotein AI	P02647
85	Apolipoprotein AI	P02647
86	Serum Albumin	P02768
87	Serum Albumin	P02768
88	Serum Albumin	P02768
89	Haptoglobin α2	P00738
90	Haptoglobin α2	P00738
91	Haptoglobin α2	P00738
92	Transthyretin	P02766
93	Transthyretin	P02766
94	Transthyretin	P02766
95	Vitronektin (Fragment)	P04004
96	Vitronektin (Fragment)	P04004
97	Apolipoprotein CII und CIII	P02652, P02656
98	Apolipoprotein AII	P02652
99	Haptoglobin α1	P00737
100	Haptoglobin α1	P00737
101	Serum Amyloid A	P02735
102	Serum Amyloid A	P02735

a) Spotnummern beziehen sich auf Abbildung 1

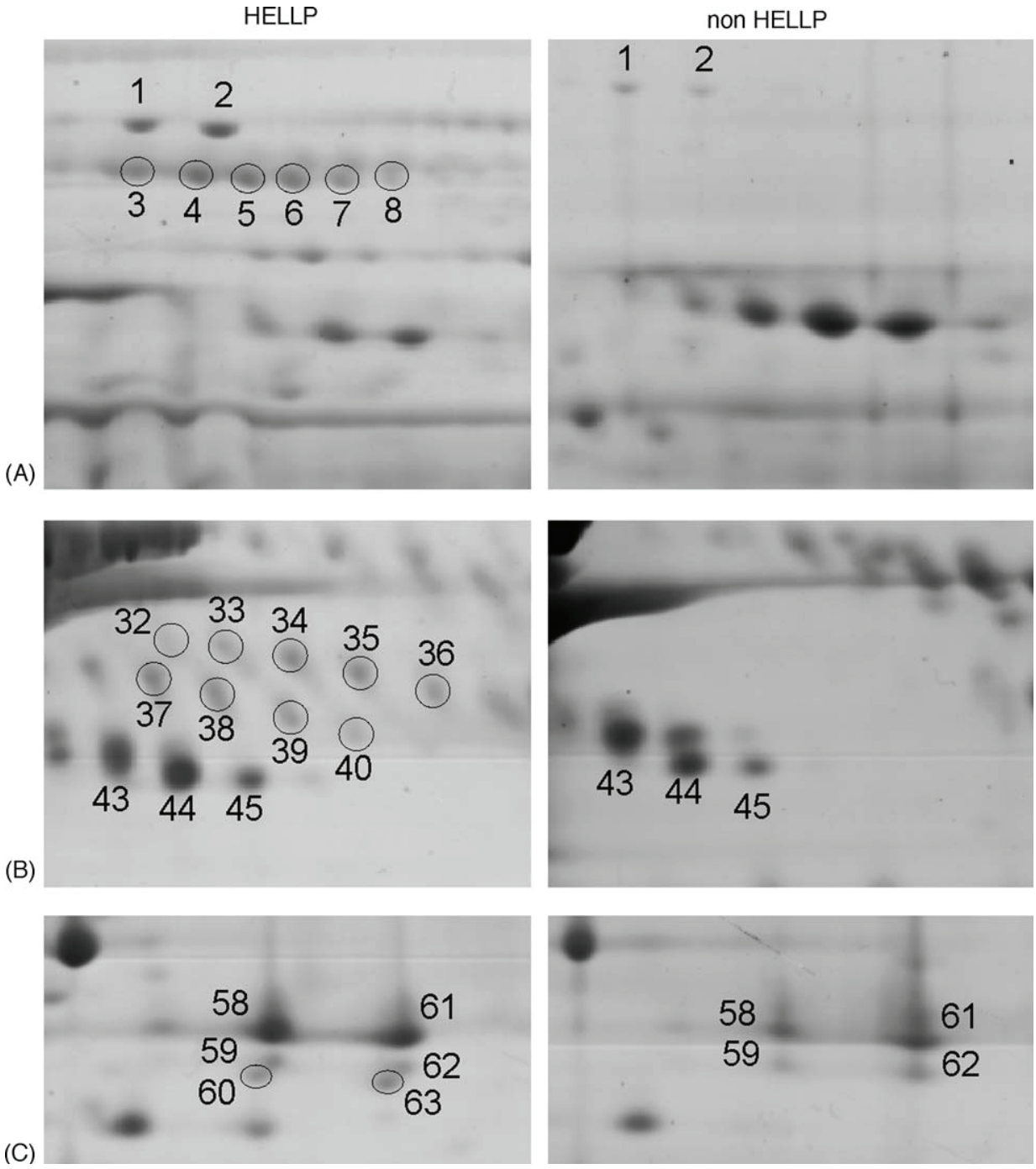
b) Die Datenbankrecherche ergab bei sämtlichen Proteinen Vorläuferproteine (precursor)

c) SwissProt Accession-Nummern

Die Proteinspots aus der HELLP-Gruppe (I) und der Gruppe gesunder Schwangerer (III) wurden unabhängig voneinander analysiert. Die Identifizierung bestätigte, dass Spots, welche in den Gruppen I und III zum gleichen Ort wandern, den gleichen Proteinen entsprechen.
Erste Auffälligkeiten waren Expressions-Unterschiede beim qualitativen Vergleich zwischen den Gruppen Schwangerer (I: HELLP und III: gesunde Schwangere) und Mütter (II: post-HELLP und IV: gesunde Mütter). Fibrinogen gamma (Spots 58 - 63) und Angiotensinogen (Spots 26 - 30) zeigten unterschiedliche Expressionen. Beide Proteine sind während der Schwangerschaft höher exprimiert und scheinen somit schwangerschafts-assoziierte Veränderungen zu sein.

4.3 Differentielle Proteinexpressionen beim HELLP-Syndrom

Es konnten weitere Expressions-Unterschiede beim Vergleich von HELLP-Gelen mit Gelen gesunder Schwangerer gefunden werden. Diese Unterschiede (siehe Abbildung 2) sind als HELLP-bedingte Unterschiede anzusehen, da sie in der post-HELLP-Gruppe nicht detektierbar waren.
Es fanden sich sowohl Proteinspots, welche verstärkt beim HELLP-Syndrom exprimiert waren, als auch Spots, die geringer exprimiert waren im Vergleich zu gesunden Schwangeren (siehe Tabellen 11 und 12).
Proteinspots mit einer höheren Expression in der HELLP-Gruppe wurden identifiziert als Inter-alpha-Trypsin Inhibitor (Spots 3 - 8), Kininogen 1 (Spots 32 - 40), Fibrinogen gamma (Spots 58 - 63) und Transthyretin (Spot 94). Proteinspots mit einer geringeren Expression beim HELLP-Syndrom wurden als α-Ketten vom Haptoglobin Allel 2 (Spots 89 - 91) und Allel 1 (Spots 99 und 100) identifiziert.
Der auffälligste Unterschied fand sich in der HELLP-Gruppe im Molekularbereich von circa 12 kDa. Hier stellten sich stark überexprimierte Spots (101 und 102) dar. Diese Spots waren in fünf von sieben HELLP-Gelen (I) zu sehen (siehe Tabelle 12). In allen anderen Gruppen, post-HELLP (II), gesunde Schwangere (III) und gesunde Mütter (IV) waren diese Spots nicht zu detektieren. Der massenspektrometrische Peptidmassen-Fingerabdruck identifizierte diese Spots als Serum Amyloid A (siehe Bereich F in Abbildungen 1 und 2).


HELLP
non HELLP
(A)
1
2
3
4
5
6
7
8
1
2
(B)
32
33
34
35
36
37
38
39
40
43
44
45
43
44
45
(C)
58
59
60
61
62
63
58
59
61
62

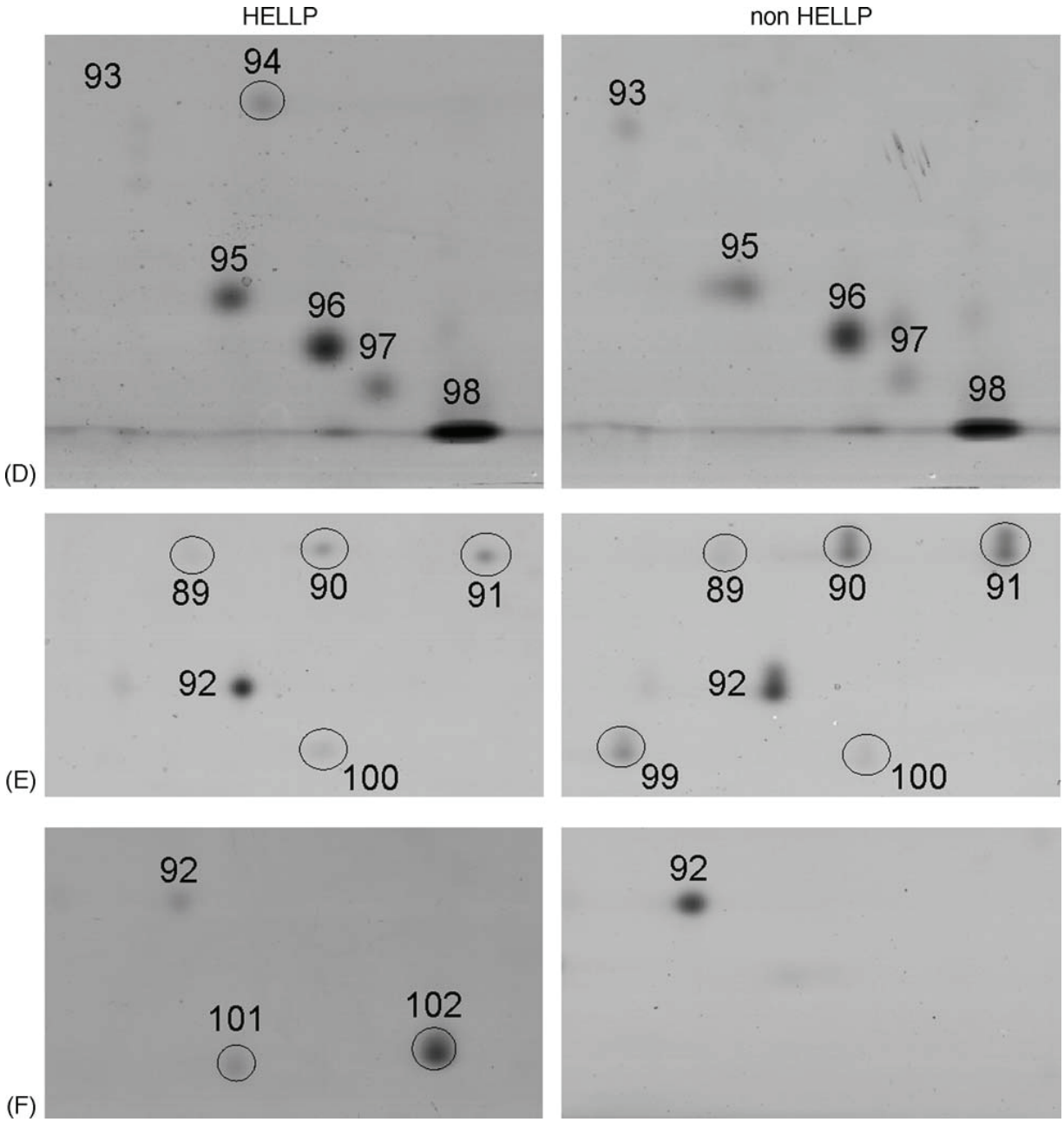


Abbildung 2: **Differentiell exprimierte Gelbereiche (A - F) zwischen HELLP-Patientinnen und gesunden Schwangeren (non HELLP).** Differentiell ausgeprägte Proteinspots sind umrandet. Die Spotnummern sind identisch mit denen aus Abbildung 1 sowie aus den Tabellen 10 und 11. Die Bezeichnung der Gelbereiche wurde in den Abbildungen 1 und 3 beibehalten.

Tabelle 11: Differentiell exprimierte Proteine (analog zu Abbildung 2) zwischen HELLP-Patientinnen und gesunden Schwangeren.

Spotnummern [a)]	Proteinnamen	Accession-Nummer [b)]	Gelbereich [c)]
3 – 8	Inter-α-Trypsin Inhibitor H4	Q14624	A
32 – 40	Kininogen 1	P01042	B
58 – 63	Fibrinogen γ	P02679	C
94	Transthyretin	P02766	D
89 – 91	Haptoglobin α2	P00737	E
99 + 100	Haptoglobin α1	P00737	E
26 - 30	Angiotensinogen	P01019	-
101 + 102	Serum Amyloid A	P02735	F

a) Spotnummern beziehen sich auf die Abbildungen 1 und 2

b) SwissProt Accession-Nummern

c) Gelbereiche bezeichnet wie in Abbildungen 1 - 3

Tabelle 12: Expressionsunterschiede qualitativ und quantitativ in allen Vergleichsgruppen. Angegeben wird jeweils die Anzahl der Gele, in denen die entsprechenden Proteinspots nachweisbar sind, bezogen auf alle aus der Gruppe einbezogenen Gele.

Protein	I	II	III	IV
Inter-α-Trypsin Inhibitor H4	6/6 *	3/7	3/5 *	1/6
Kininogen 1	2/7	0/7	0/6	0/6
Fibrinogen γ	7/7 **	7/7	6/6 **	6/6
Transthyretin	6/7	4/7	4/6	3/6
Haptoglobine	7/7 ***	7/7	6/6	6/6
Angiotensinogen	7/7	3/7	6/6	2/6
Serum Amyloid A	5/7 ****	0/7	0/6	0/6

I HELLP-Patientinnen III Gesunde Schwangere

II Post-HELLP-Patientinnen IV Gesunde Mütter

* Ein Gel in diesem Bereich nicht beurteilbar

** In den Gruppen I+III qualitativ stärker exprimiert im Vergleich zu den Gruppen II+IV, zusätzlich in Gruppe I stärker exprimiert als in Gruppe III

*** In der Gruppe I qualitativ schwächer exprimiert im Vergleich zu den Gruppen II+III+IV

**** In Gruppe I qualitativ stark überexprimiert im Vergleich zu den Gruppen II+III+IV

Es wurden densitometrische Analysen aller differentiell exprimierten Proteine angefertigt (siehe Abbildung 3). Somit konnten die Unterschiede quantifiziert und statistisch ausgewertet werden.

Signifikante Unterschiede in der Proteinexpression beim HELLP-Syndrom ergaben der Bereich A (Inter-α-Trypsin Inhibitor, $p = 0{,}009$), Bereich B (Kininogen 1, $p = 0{,}003$), Bereich C (Fibrinogen gamma, $p < 0{,}001$), Bereich D (Transthyretin, $p = 0{,}009$), Bereich E (Haptoglobin α 1 und 2, $p < 0{,}0019$) und der Bereich F (Serum Amyloid A, $p < 0{,}001$). Die Expressionsunterschiede beim Angiotensinogen waren nicht signifikant.

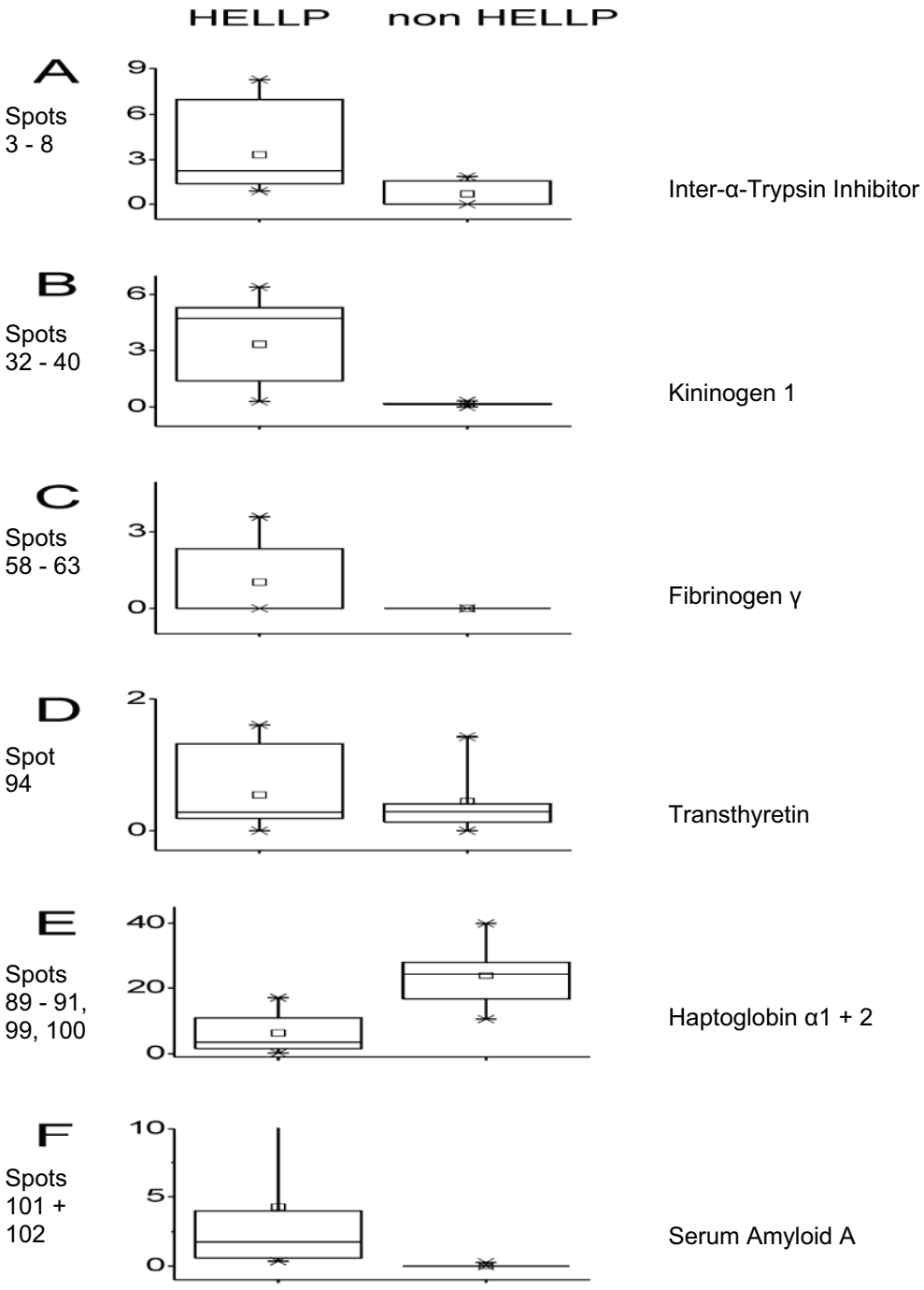


Abbildung 3: **Densitometrische Analyse der Spotvolumina der differenten Gelbereiche (A - F) zwischen der HELLP- und der non HELLP-Gruppe.** Die signifikanten Expressionsunterschiede sind als Box-und-Whisker-Plots dargestellt. Die 25. bis 75. Perzentile werden als Box dargestellt, die strichförmigen Verlängerungen bezeichnen die 5. bis 95. Perzentile. Die horizontale Linie in der Box stellt die 50. Perzentile, das kleine Quadrat den Mittelwert dar. Die Minima und Maxima sind als Minuszeichen (-), die 1. und 99. Perzentile als Kreuzchen (x) dargestellt.

4.4 Quantitative Analyse von Serum Amyloid A

Um zu überprüfen, ob die bei der 2D-Gelelektrophorese nachgewiesene Überexpression von Serum Amyloid A (SAA) validiert und bei weiteren Patientinnen nachvollzogen werden kann, wurden die Plasma-Konzentrationen von Serum Amyloid A mit einem ELISA-Test bestimmt. Der ELISA erlaubte es uns, die initiale Probenanzahl zu erhöhen, so dass wir die in der Zwischenzeit gesammelten Proben einbeziehen konnten. Es wurden zwei zusätzliche HELLP-Plasmaproben (somit n = 9 in Gruppe I), vier weitere Plasmaproben von gesunden Schwangeren (ergibt n = 10 in Gruppe III) sowie eine Plasmaprobe einer gesunden Mutter (n = 7 in Gruppe IV) hinzugefügt (siehe Tabelle 2, Seite 29). Sämtliche in der 2D-Gelelektrophorese analysierten Proben wurden auch in diesen Test einbezogen.

Der ELISA ergab, dass die durchschnittliche Plasma-Konzentration von SAA beim HELLP-Syndrom (I) 3,3-fach höher ist im Vergleich zu gesunden Schwangeren (III). Die durchschnittliche Plasma-Konzentration in Gruppe I lag bei 7,41 mg/l (3,57 - 10,26 mg/l), während sie in Gruppe III 2,28 mg/l (1,68 - 3,09 mg/l) betrug (siehe Abbildung 4).

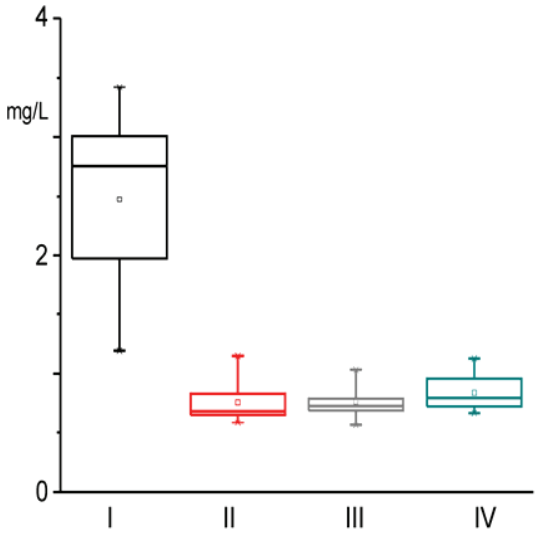


Abbildung 4: **Dargestellt sind die Konzentrationen des Serum Amyloid A in den vier Gruppen.**
In der HELLP-Gruppe (I, 18 Messungen) wurde eine signifikant erhöhte Serum Amyloid A-Konzentration ($p < 0,001$) gemessen im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen post-HELLP (II, 14 Messungen), gesunde Schwangere (III, 20 Messungen) und gesunde Mütter (IV, 14 Messungen). Alle Proben wurden doppelt gemessen. (Weiteres zur Legende siehe Abbildung 3, Seite 54.)

Die höchste SAA-Konzentration in der Gruppe der gesunden Schwangeren (III) liegt unter der niedrigsten SAA-Konzentration in der HELLP-Gruppe (I). Die statistische Auswertung bestätigte den signifikanten Unterschied mit einem p-Wert kleiner als 0,001.

Die SAA-Konzentrationen waren in den Gruppen der Mütter (II und IV) ebenfalls allesamt niedriger als in der HELLP-Gruppe. Die durchschnittliche SAA-Konzentration im Plasma beträgt bei post-HELLP-Patientinnen (II) 2,28 mg/l (1,77 - 3,45 mg/l) und bei den gesunden Müttern (IV) 2,61 mg/l (2,13 - 3,39 mg/l). Auch hier bestätigte die statistische Auswertung signifikant erhöhte SAA-Konzentrationen im Plasma von HELLP-Patientinnen (I) im Vergleich zur post-HELLP-Gruppe (II, $p < 0,05$) und zur Gruppe gesunder Mütter (IV, $p < 0,05$).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es möglich, zwischen den SAA-Konzentrationen der HELLP-Gruppe und denen von allen anderen Gruppen eine Trennungslinie zu ziehen, bei der es keine Überlappungen gibt. Obwohl die Probenanzahl noch limitiert ist, kann ein Grenzwert bei 3,51 mg/l zur Unterscheidung zwischen HELLP und non HELLP festgelegt werden. Plasmaproben mit einer SAA-Konzentration über 3,51 mg/l können klar als HELLP-Proben (I) identifiziert werden, während SAA-Konzentrationen unter 3,51 mg/l den non HELLP-Gruppen (II,III,IV) zugeordnet werden können.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle ausgewählter Proteinfaktoren in der Schwangerschaft sowie für die Diagnose des HELLP-Syndroms

Die Untersuchungen von Plasmaproben mit Hilfe proteinanalytischer Verfahren ergaben signifikante Proteinunterschiede zwischen HELLP-Patientinnen und gesunden Probanden. Einige dieser differenten Proteine können als Akute-Phase-Proteine zusammengefasst werden. Es wurde gezeigt, dass sowohl positive Akute-Phase-Proteine (Serum Amyloid A, Fibrinogen gamma), als auch negative Akute-Phase-Proteine (Inter-α-Trypsin Inhibitor H4, Transthyretin) beim HELLP-Syndrom vermehrt gebildet werden.

Als Akute-Phase-Proteine (APP) bezeichnet man eine Gruppe von etwa 30 unterschiedlichen, biochemisch und funktionell nicht miteinander verwandten Proteinen, die bereits etwa 90 Minuten nach Einsetzen einer Entzündungsreaktion in erhöhter (positive APP) oder erniedrigter (negative APP) Konzentration im Plasma vorliegen. Die Gesamtheit aller Akute-Phase-Proteine ergibt ein charakteristisches Proteinprofil.

Die Akute-Phase-Proteine greifen regulierend in die Immunantwort ein. Sie wirken als Mediatoren und Inhibitoren der Entzündung, sorgen für den Abtransport von Entzündungsprodukten und sind an der Wiederherstellung des Gewebes beteiligt. Viele dieser Proteine wirken antiproteolytisch und besitzen wahrscheinlich die Aufgabe, den entzündlichen Prozess lokal zu beschränken und einen Einbruch in den Gefäßraum mit daraus folgender systemischer Ausbreitung der Entzündung zu verhüten [88]. Akute-Phase-Proteine stammen hauptsächlich aus der Leber, wobei jeder Hepatozyt zur Synthese befähigt ist. Erhöhte Plasma-Konzentrationen bestimmter Akute-Phase-Proteine sind diagnostisch relevant für die Unterscheidung entzündlicher Erkrankungen von Funktionsstörungen mit ähnlichem Krankheitsbild und haben auch prognostische Bedeutung. Bei vielen Erkrankungen verlaufen Syntheseanstieg von Akute-Phase-Proteinen und Grad des entzündlichen Prozesses parallel.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass Kininogen beim HELLP-Syndrom vermehrt exprimiert wird und vermutlich das Kinin-Kallikrein-System im Verlauf des HELLP-Syndroms eine Rolle spielt.

Sowohl die oben aufgeführten Akute-Phase-Proteine, als auch das Kininogen wurden bisher nicht im Zusammenhang mit dem HELLP-Syndrom beschrieben.
Als Drittes wurden beim HELLP-Syndrom erniedrigte Haptoglobin-Konzentrationen gemessen. Dieser Umstand ist bekannt und kann somit als positive Kontrolle der Messungen angesehen werden.
Im Folgenden wird auf die Bedeutung der differentiell exprimierten Proteine gesondert eingegangen.

5.1.1 Haptoglobin

Haptoglobin ist ein Transport- und Akute-Phase-Protein des Blutplasmas und gehört zur Gruppe der α-Globuline. Seine Aufgabe ist die Bindung und der Transport von Hämoglobin, um es dem Abbau im Retikuloendothelialen System (RES) zuzuführen. Somit werden der Eisenverlust und eine zusätzliche Nierenbelastung während der Hämolyse verhindert.
Die Konzentration von Haptoglobin im Blut liegt zwischen 0,5 und 2,5 g/l. Die Synthese erfolgt in der Leber. Haptoglobin ist der empfindlichste zur Verfügung stehende Marker einer Hämolyse. Durch seine relativ kurze Halbwertszeit ist das Haptoglobin bei einer Hämolyse bereits erniedrigt, wenn andere Hämolysemarker (Kalium, LDH, indirektes Bilirubin) noch im Normbereich sind. Somit wird es beim HELLP-Syndrom als früher Hämolysemarker bestimmt. In 85 bis 97% der HELLP-Patientinnen ist das Haptoglobin signifikant reduziert, allerdings erst im symptomatischen Stadium [223].
Die Bestätigung der verminderten Haptoglobin-Expression in der HELLP-Gruppe kann als positive Kontrolle der Messungen angesehen werden.
Haptoglobin besteht aus vier Polypeptidketten, zwei leichten (α1 und α2) und zwei schweren (β). Diese sind über Disulfidbrücken kovalent aneinander gebunden. Die α- und die β-Kette werden über ein gemeinsames Gen auf dem Chromosom 16 kodiert. Beim Menschen gibt es verschiedene Haptoglobin-Varianten, die sich aus den drei häufigsten Allelen der α-Kette ergeben (Hpα1S, Hpα1F und Hpα2) [140]. Die β-Ketten sind bei allen Varianten identisch. Es können abhängig von der α-Kette verschiedene Phänotypen von Haptoglobin unterschieden werden. Als häufigste Phänotypen sind hier das Hp 1-1, Hp 2-1 und Hp 2-2 zu nennen. Von Allison und Blumberg ist die Verteilung dieser Phänotypen folgendermaßen beschrieben worden: Hp 1-1 weisen 11% der Bevölkerung auf, während Hp 2-1 bei 54% und Hp 2-2 bei 32% der Bevölkerung nachgewiesen wurden [5].

In dieser Studie wurde unter den einbezogenen HELLP-Patientinnen bei einer von sieben Patientinnen (14%) ein Hp 1-1- und in jeweils drei von sieben Patientinnen (43%) ein Hp 2-1- beziehungsweise ein Hp 2-2-Phänotyp nachgewiesen. Somit entsprechen die HELLP-Patientinnen in ihren Haptoglobin-Phänotypen etwa der üblichen Verteilung.
An dieser Stelle ist anzumerken, dass genetische Polymorphismen des Haptoglobins beim Menschen mit einigen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören Autoimmunerkrankungen, psychiatrische und kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Diabetes und HIV [50,82,115]. Ein Hinweis für solcherart Assoziation zeigt sich in dem Patientengut dieser Studie nicht.
Weiterhin ist der Einfluss von Haptoglobin auf die Angiogenese und die Modulation der Immunantwort beschrieben worden [115,121]. Ob dieser Einfluss auch beim HELLP-Syndrom relevant ist, wäre eine interessante Fragestellung weiterer Untersuchungen.

5.1.2 Fibrinogen

Auch Fibrinogen ist ein Akute-Phase-Protein, welches in der Leber gebildet wird. Fibrinogen ist ein Glykoprotein, das ein Heterohexamer aus zweimal drei verschiedenen Ketten (α, β und γ) bildet. Zwei Heterotrimere sind mit Disulfidbrücken miteinander verbunden. Mit einer Plasmakonzentration von etwa 3 g/l ist Fibrinogen eines der höchst abundanten Plasmaproteine. Fibrinogen fördert unter anderem die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und hat dadurch Einfluss auf die Blutdruckregulation [31]. Bei der Blutgerinnung wird Fibrinogen durch das Enzym Thrombin und Kalzium in Fibrin umgewandelt. Es ist somit wesentlich an der Thrombenbildung, der Plättchenaggregation und der Modulation der Endothelfunktion beteiligt.
Während der Schwangerschaft erhöht sich die Plasmakonzentration des Fibrinogens um 100% [29]. Diese Konzentrationszunahme von Nicht-Schwangerschaft (t2) zu Schwangerschaft (t1) konnte in unseren Experimenten nachvollzogen werden (siehe Tabelle 12, Seite 52). Weiterhin wird Fibrinogen als entscheidender Faktor bei der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft beschrieben [90].

Fibrinogen bindet an spezifische Rezeptoren der Thrombozyten. Hawiger et al. zeigten, dass vor allem die gamma-Kette für die Bindung am Plättchenrezeptor bedeutsam ist [78]. Fibrinogen gamma wurde in dieser Arbeit als signifikant erhöht beim HELLP-Syndrom nachgewiesen. Ob dies in einem kausalen Zusammenhang mit der Gerinnungsaktivierung und der Ablagerung von

Fibrinthromben beim HELLP-Syndrom steht, kann durch diese Arbeit nicht belegt werden. Interessant ist jedoch der topografische Zusammenhang zwischen Bildungsort des Fibrinogens und dem Hauptschädigungsort des HELLP-Syndroms. Hier könnten weitere Studien zur Pathophysiologie des HELLP-Syndroms ansetzen.

Es sind 19 verschiedene Mutationen der gamma-Kette beim Menschen beschrieben worden, bisher jedoch keine im Zusammenhang mit HELLP [40]. Auch sind Mutationen der Fibrinogen gamma-Kette nicht in Zusammenhang mit gravierenden Blutungskomplikationen beschrieben.
Daher wäre es interessant, die Spot-Aggregate von Fibrinogen gamma (Spots 58 - 63) genauer zu analysieren in Bezug auf Sequenzunterschiede und mögliche posttranslationale Modifikationen.

Neben seiner bedeutenden Rolle in der Hämostase spielt Fibrinogen bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine Rolle. Hierzu gehören Infektionen, Wundheilung, Tumorprogression und Arteriosklerose. Studien postulieren Fibrinogen als kardiovaskulären Risikofaktor, worauf im Folgenden nochmals zurückgekommen wird [31].

5.1.3 Inter-α-Trypsin Inhibitor

Inter-α-Trypsin Inhibitor ist ein Plasmaprotein, dessen physiologische Funktion derzeit noch nicht abschließend geklärt ist. Man vermutet, dass es in die Akute-Phase-Reaktion involviert ist.
Es wird zum großen Teil in der Leber sythetisiert, in die Zirkulation sezerniert und es wurde im Urin nachgewiesen [201]. Inter-α-Trypsin Inhibitor kommt in einer Konzentration von 500 mg/l im Plasma vor. Da es nur für maximal 5% der Trypsin-Inhibierung verantwortlich ist und Trypsin normalerweise nicht im Plasma vorkommt, wird es auch nur als Inter-α-Inhibitor (IαI) bezeichnet.
Inter-α-Inhibitor-Moleküle bestehen aus einer leichten Kette, die auch als Bikunin bezeichnet wird, und verschiedenen schweren Ketten (H1 - 4). An das Bikunin sind die schweren Ketten kovalent gebunden [180].
Inter-α-Inhibitor ist ein Protease-Inhibitor mit weitem Wirkungsgebiet, jedoch relativ schwacher Wirkung auf Proteasen [163]. Die antiproteolytische Aktivität der Inter-α-Inhibitor-Familie beruht auf dem Bikunin [180]. Zielproteasen sind Trypsin, Chymotrypsin, Neutrophile Elastase, Plasmin, Kathepsin G, Granzyme K und Akrosin. Bikunin wurde immunhistochemisch in verschiedenen Organen wie Leber, Nieren, Haut, Gallenblase, Bronchialmukus, Gehirn, Mukosa von Magen, Darm und Appendix nachgewiesen [62].

Die schweren Ketten können sich untereinander kovalent binden, wobei Hyaluronsäure entsteht. Diese Reaktion wird durch TSG-6 (Tumor necrosis factor stimulated gene 6) vermittelt [91]. Die Bildung von TSG-6 wiederum wird durch inflammatorische Mediatoren stimuliert.
Das TSG-6-Molekül besitzt eine Bindungsstelle zu Hyaluronsäure, einem wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix. TSG-6 bindet somit auch an die Hyaluronsäure der schweren Ketten des Inter-α-Inhibitors und führt auf diese Weise zu einer Stabilisierung der extrazellulären Matrix. Man vermutet, dass durch diese Hyaluron-vernetzten Komplexe die Hyaluronsäure gegen den Abbau durch Sauerstoffradikale geschützt wird und den zerstörenden Effekt der aktivierten neutrophilen Granulozyten eindämmt. Bei inflammatorischen Prozessen im arthritischen Knorpel und in Kumulus-Zellen bei der Ovulation sind diese Komplexe nachgewiesen worden [63]. Daher werden Inter-α-Inhibitoren als antiinflammatorische Substanzen betrachtet [104].
Opal et al. wiesen in einer großen Studie nach, dass Inter-α-Inhibitor-Proteine bei schwerer Sepsis signifikant erniedrigt sind, was wiederum ihre antiinflammatorische Wirkung nahelegt [159].

TSG-6 bindet auch an das Bikunin und erhöht somit seine Antiplasmin-Aktivität. Eine verminderte Plasmin-Aktivität führt zu einer verminderten Fibrinolyse [141]. Bikunin inhibiert weiterhin Faktor Xa und Plasma-Kallikrein, was in den folgenden Ausführungen noch von Bedeutung sein wird [145].
Für Bikunin wurden nicht allein antiproteolytische, sondern auch antiinflammatorische Effekte nachgewiesen (siehe Tabelle 13). Studien postulieren eine Bikunin-abhängige Suppression der Lipopolysaccharid-induzierten Zytokinsynthese, indem Bikunin in die Signaltransduktion eingreift. Bikunin verhindert den Kalziumeinstrom in die Zelle, indem es an den LPS-Rezeptor bindet und somit die Signaltransduktion blockiert. An dessen Ende steht die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, welche die Zytokinexpression stimulieren. Somit wird die Zytokinexpression vermindert und der Inflammation entgegengewirkt [104].

Tabelle 13: Eigenschaften von Bikunin nach Fries et al. [62].

Eigenschaften von Bikunin
Bestandteil der Proteinkomplexe zur Stabilisierung der extrazellulären Matrix
Inhibitor der LPS-induzierten Neutrophilen-Stimulation
Wachstumsfaktor für Endothelzellen
Inhibitor der Kontraktion glatter Muskelzellen
Plasmin Inhibitor
Faktor Xa Inhibitor
Kallikrein Inhibitor
Inhibitor der Formation von Kalziumoxalat-Kristallen

Daveau et al. beschreiben bei Entzündungsreaktionen eine gleichzeitige Synthese von positiven und negativen Akute-Phase-Proteinen von Inter-α-Inhibitoren [47]. Dabei weisen sie nach, dass die schweren Ketten H3 bei Inflammation vermehrt, und H2 und Bikunin vermindert gebildet werden. Auf das H1-Gen schien die Inflammation keinen Effekt zu haben. Das H4 war zu dem Zeitpunkt dieser Studie noch nicht beschrieben. Was für eine Rolle Inter-α-Inhibitor H4 in der Entzündungsreaktion spielt, ist bislang ungeklärt.

5.1.4 Kininogen

Aus Kininogen wird Kinin unter der Wirkung von Kallikrein gebildet. Kinine sind biologisch aktive Peptide (Bradykinin und Kallidin), die zu den Gewebshormonen zählen. Das Kinin-Kallikrein-System spielt eine Rolle bei Entzündung, Blutdruckkontrolle, Gerinnung und Schmerz. Es wurde 1909 von Abelous und Bardier entdeckt, als sie feststellten, dass eine Injektion mit Urin (mit hohem Kiningehalt) zu einer Hypotonie führte [2].
Das Kinin-Kallikrein-System besteht aus einer Reihe großer Proteine (hoch- und niedermolekulares Kininogen), einigen kleinen Peptiden (Bradykinin und Kallidin) und einer Gruppe von Enzymen, welche die Substanzen aktivieren und deaktivieren (Kallikreine, Carboxypeptidasen, Angiotensin-Converting-Enzym, neutrale Endopeptidase).
Sowohl das hochmolekulare Kininogen (HMW-Kininogen), als auch das niedermolekulare Kininogen (LMW-Kininogen) werden in der Leber synthetisiert. Sie werden durch alternatives Spleißen gebildet. LMW-Kininogen kann auch lokal von zahlreichen Geweben unter der Wirkung von Gewebekallikrein gebildet werden.

Kininogene bestehen aus drei Anteilen: einer schweren Kette (gleich bei HMW- und LMW-Kininogenen), dem Bradykininteil als Bindeglied und einer leichten Kette, die sich zwischen HMW- und LMW-Kininogenen unterscheidet. Die Kininogene sind eingeteilt in verschiedene Domainen (1 - 6), von denen jede mit einer bestimmten Funktion verbunden ist. Im Gegensatz zum LMW-Kininogen besitzt das HMW-Kininogen eine zusätzliche sechste Domaine.
Kininogene binden an Endothelzellen und Thrombozyten. Auf diese Weise verhindern sie die Bindung von Thrombin, einem der potentesten Thrombozytenaktivatoren, und damit die Thrombin-induzierte Aktivierung dieser Zellen. Somit wirken Kininogene antiadhäsiv.
Über die sechste Domaine wirkt HMW-Kininogen zusätzlich antikoagulatorisch.

Aus HMW-Kininogen wird das Nonapeptid Bradykinin, aus LMW-Kininogen das Dekapeptid Kallidin synthetisiert. Bradykinin und Kallidin sind Vasodilatatoren. Beide wirken hauptsächlich über den Typ 2 Bradykinin(B2)-Rezeptor, während ihre Carboxypeptidase-Metaboliten Des-Arg9-Bradykinin und Des-Arg10-Kallidin in erster Linie über den B1-Rezeptor wirken [30].
Bradykinin und Kallidin bewirken über G-Protein-gekoppelte B2- oder B1-Rezeptoren eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration und die Freisetzung von Mediatoren. Bradykinin ist ein potenter Endothel-abhängiger Vasodilatator über die Freisetzung von Stickstoffoxid und EDHF [30].
Weiterhin sind Bradykinin und Kallidin in die Entzündungsreaktion involviert, indem sie die Gefäßpermeabilität erhöhen, die Nozizeptoren stimulieren und Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel Arachidonsäure-Metaboliten freisetzen [197].
Im Blutgerinnungssystem stimulieren Bradykinin und Kallidin selektiv die Sekretion des Gewebs-Plasminogenaktivators (tPA) [36]. Sie wirken also vasodilatatorisch, proinflammatorisch und profibrinolytisch.

Im kardiovaskulären System spielt das Kinin-Kallikrein-System eine Rolle bei der Feinregulation der glatten Gefäßmuskulatur und damit bei der lokalen Blutdruckregulation. Dabei wirkt es kardioprotektiv, das heißt es schützt vor arterieller Hypertension und Myokardischämien [131].
Die Inaktivierung der Kinine erfolgt über die Abspaltung C-terminaler Dipeptide mittels der Peptidyl-Dipeptidase, einem Enzym, welches mit dem Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems identisch ist. Der kardioprotektive Effekt der ACE-Hemmer, etablierte Medikamente in der Hypertonie-Behandlung, werden unter anderem mit der erhöhten Bradykinin-Konzentration erklärt.

In dieser Arbeit wurden signifikant erhöhte Konzentrationen von Kininogen 1 beim HELLP-Syndrom nachgewiesen. Das LMW-Kininogen ist ein 66 kDa schweres β-Globulin mit einer Plasmakonzentration von 160 mg/l und einem isoelektrischen Punkt von 4,7. HMW-Kininogen ist ein 120 kDa schweres α-Globulin mit einer Plasmakonzentration von 80 mg/l und einem isoelektrischen Punkt von 4,3 [36]. Der in dieser Arbeit nachgewiesene Kininogen 1 precursor (72 kDa) ist ein Vorläufer des LMW-Kininogens, von welchem es zwei Isoformen gibt, Kininogen 1 und 2.
Bereits in den 1980er Jahren wurden erhöhte Kininogen-Konzentrationen im Plasma von Präeklampsie-Patientinnen beschrieben [43]. Im Zusammenhang mit dem HELLP-Syndrom gab es bisher keine derartigen Publikationen.

Wann kommt es zu dieser Überexpression des Kininogens? Es gibt zwei Möglichkeiten dieser vermehrten Kininogen-Produktion: primär oder sekundär, als auslösender oder direkt mit dem auslösenden Prozess des HELLP-Syndroms verbundener Mechanismus oder als sekundäre Reaktion auf diese Veränderungen. Bei letzterem würde es möglicherweise als gegenregulatorische Reaktion auf die Hypertonie, Thrombozytenaggregation, Inflammation und die disseminierte intravasale Koagulopathie beim HELLP-Syndrom gebildet werden.
Auch eine primäre Konzentrationserhöhung von Kininogen durch die verminderte Umwandlung von Kininogen in Bradykinin und Kallidin wäre denkbar. Dies könnte zum Beispiel durch einen Enzymdefekt bedingt sein. Dadurch käme es zu einem Ungleichgewicht in der Blutdruck-, Entzündungs- und Gerinnungsregulation zugunsten einer vermehrten Vasokonstriktion, Inflammation und Koagulation. Das Enzym Kallikrein ist für diese Umwandlung verantwortlich.
In der Literatur sind verminderte Kallikrein-Konzentrationen im Urin von Präeklampsie-Patientinnen beschrieben worden. Bereits 1976 wiesen Elebute et al. nach, dass die Kallikrein-Konzentration im Urin bei Präeklampsie signifikant unter das Level Nichtschwangerer fällt [53]. Khedun et al. konnten diese Befunde spezifizieren, indem sie eine verminderte Aktivität von Gewebekallikrein in präeklamptischen Schwangeren im Vergleich zu normotensiven Schwangeren nachwiesen [98]. Bezüglich des HELLP-Syndroms gibt es keine Studien dieser Art.
Genetische Untersuchungen des Gewebekallikreins zeigten einen Polymorphismus der Promoterregion des Gewebekallikrein-Gens KLK 1, welcher möglicherweise assoziiert ist mit einer Hypertension [231]. Für die Präeklampsie respektive das HELLP-Syndrom sind keine derartigen Studien publiziert. Die genetische Untersuchung des Gewebekallikrein-Gens bei Präeklampsie- und HELLP-Patientinnen und der anschließende Vergleich mit normotensiven, gesunden Schwangeren wäre jedoch ein vielversprechender Ansatz.

Forteza et al. wiesen nach, dass Bikunin, die leichte Kette des Inter-α-Inhibitors (siehe Kapitel 5.1.3., Tabelle 13, Seite 61), die Aktivität des Gewebekallikreins signifikant inhibiert [59]. Das wurde in einer durch bronchoalveoläre Lavage gewonnenen Flüssigkeit bei Asthmatikern nachgewiesen, und zwar nur nach Allergenstimulation und nicht unter reizlosen Bedingungen. Bikunin ist ein potenter Proteaseinhibitor, dessen Gewebekallikrein-Inhibierung durch das TSG-6 potenziert wird. Es setzt freies und damit aktives Bikunin bei der Komplexbildung mit den schweren Ketten des Inter-α-Inhibitors frei. Forteza et al. postulieren, dass TSG-6 eine protektive Rolle im Bronchialepithel spielt, indem es Proteasen in den Atemwegen inhibiert.

Übertragen auf das HELLP-Syndrom könnte das bedeuten, dass als Gegenreaktion auf die Inflammation antiinflammatorische Proteine wie TSG-6 und Inter-α-Inhibitor (siehe Kapitel 5.1.3., Seite 60) vermehrt gebildet werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch bei gesunden Schwangeren im Vergleich zu gesunden Müttern vermehrt Inter-α-Inhibitor gebildet wird.

TSG-6 bildet nun Komplexe mit den schweren Ketten des Inter-α-Inhibitors. Bikunin wird freigesetzt, um die antiinflammatorischen Effekte zu verstärken. Soweit könnte es auch bei einer gesunden Schwangerschaft ablaufen.

Beim HELLP-Syndrom als Komplikation der Präeklampsie liegt im Vergleich zu einer gesunden Schwangerschaft eine verstärkte inflammatorische Situation vor [49,172,193]. Hier wird als Gegenregulation die Inter-α-Inhibitor-Bildung massiv gesteigert, was in dieser Arbeit belegt wurde. Es werden auch vermehrt TSG-6 und somit Bikunin-freisetzende TSG-6-HC-Komplexe gebildet. Nun kommt neben der antiinflammatorischen Wirkung von Bikunin auch die antiproteolytische Wirkung zum Tragen: die Hemmung der Aktivität des Gewebekallikreins. Diese Wirkung des Bikunins wird nur nach Allergenstimulation, wenn das Immunsystem stark aktiviert ist, beschrieben [59]. Eine starke Aktivierung des Immunsystems liegt auch beim HELLP-Syndrom vor. Auch Morishita et al. wiesen nach, dass die antiproteolytische Aktivität des Bikunins konzentrationsabhängig ist [145].

Durch die verminderte Aktivität des Gewebekallikreins kommt es zur Überexpression von Kininogen. Bradykinin und Kallidin werden vermindert gebildet und es resultiert ein Ungleichgewicht in der Blutdruck-, Entzündungs- und Gerinnungsregulation zugunsten einer vermehrten Vasokonstriktion, Inflammation und Koagulation - Mechanismen, die beim HELLP-Syndrom und bei der Präeklampsie eine entscheidende Rolle spielen.

Wenn man von der Richtigkeit dieser Hypothese ausgeht, ist anzunehmen, dass ein gewisser Umschlagspunkt in der Inflammationssituation erreicht werden muss, um durch die zuvor beschriebenen Mechanismen das klinische Bild einer Präeklampsie respektive eines HELLP-Syndroms auszulösen.

Die Leberbeteiligung beim HELLP-Syndrom ist somit allerdings noch nicht erklärbar.

Die Präeklampsie als dekompensierte und generalisierte inflammatorische Antwort des mütterlichen Organismus auf die Schwangerschaft wird von vielen Autoren postuliert [172,193]. Diese Dekompensation des Immunsystems ist entweder auf einen zu starken Stimulus oder eine überschießende mütterliche Reaktion zurückzuführen. Redman et al. gehen davon aus, dass es keinen speziellen Auslöser für diese Erkrankung gibt. Vielmehr sei die Präeklampsie als extremes Ende einer Vielzahl von mütterlichen Anpassungsmechanismen während der Schwangerschaft zu betrachten [172].

5.1.5 Zusammenspiel Kinin-Kallikrein-System und Renin-Angiotensin-System

AbdAlla et al. haben eine Heterodimerisation von einerseits AT1-Rezeptoren des Vasokonstriktors Angiotensin I und andererseits B2-Rezeptoren des Vasodilatators Bradykinin entdeckt. Diese heterodimeren AT1-B2-Rezeptoren sind bei der Präeklampsie signifikant überexprimiert [1].
Mit der vermehrten Expression der AT1-B2-Rezeptoren wurde auch eine erhöhte Ansprechbarkeit von Angiotensin II beobachtet, was zu einer vermehrten Vasokonstriktion führt. AT1-Rezeptoren sind normalerweise Monomere, die durch oxidativen Stress, wie er auch im Rahmen einer normalen Schwangerschaft auftritt, inaktiviert werden. Die AT1-B2-Rezeptoren jedoch werden durch oxidativen Stress nicht inaktiviert. Somit ist möglicherweise die vermehrte Ansprechbarkeit von Angiotensin II bei der Präeklampsie erklärbar.
Shen et al. wiesen jüngst an Mäusezellen nach, dass die Transkription des B2-Rezeptor-Gens direkt durch den AT1-Rezeptor reguliert wird. Angiotensin II induziert somit die Expression des B2-Rezeptors [190].

Wenn man diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen würde – was abzuwarten ist – so wäre die Frage, warum Angiotensin II, welches sowohl bei gesunden als auch bei präeklamptischen Schwangeren gebildet wird, bei der Präeklampsie zur vermehrten Bildung von B2-Rezeptoren führen sollte.

Neben Angiotensin II gibt es weitere Stimuli, welche die Rezeptorexpression erhöhen. Dazu gehören zum Beispiel proinflammatorische Zytokine wie TNFα [72], Ischämie [209] und Östrogene [148]. All diese Faktoren könnten bei der Präeklampsie und beim HELLP-Syndrom eine Rolle spielen: wie zuvor ausgeführt (siehe Kapitel 5.1.4., Seite 65) glauben viele Autoren, dass sich während einer gesunden Schwangerschaft ein inflammatorischer Zustand entwickelt, der sich bei einer Präeklampsie verstärkt [172,193]. Weiterhin spielt die inadäquate Trophoblastinvasion mit daraus resultierender plazentarer Hypoxie bei der Präeklampsie eine Rolle (siehe Kapitel 2.1.2., Seite 13) [17,168]. Und schließlich wird während der Schwangerschaft zunehmend Östrogen von der Plazenta gebildet, bis zu einem Peak vor der Entbindung [148].

Zusätzlich steuert die erhöhte Ansprechbarkeit auf Angiotensin II möglicherweise zu einem erhöhten oxidativen Stress bei, indem es die vaskuläre NADPH-Oxidase stimuliert [161]. Auf diese Weise werden Superoxid-Anionen gebildet, welche eine Endotheldysfunktion bewirken - einem Pathomechanismus, wie er bei der Präeklampsie und dem HELLP-Syndrom beobachtet wird (siehe Kapitel 2.1.3., Seite 19).

Als neue Komponente des Renin-Angiotensin-Systems wird in der Literatur das Angiotensin-(1-7) beschrieben, welches die Wirkung von Angiotensin II antagonisiert [182]. Über die Freisetzung von Stickstoffoxid, Bradykinin und Prostazyklin wirkt es vasodilatatorisch und antiproliferativ. Weiterhin hat Angiotensin-(1-7) antiangiogenetische Effekte [129].
Merrill et al. haben erniedrigte Angiotensin-(1-7)-Konzentrationen bei Präeklampsie im Vergleich zu erhöhten Konzentrationen bei gesunden Schwangeren gemessen und als Erklärungsansatz für die arterielle Hypertension bei der Präeklampsie diskutiert [138].
Weiterhin wurde ein neues Angiotensin-Converting-Enzym-Homolog, das ACE2, beschrieben [52]. ACE2 ist eine Carboxypeptidase, welche Angiotensin-(1-7) bildet und gleichzeitig Angiotensin II inaktiviert [216].

Valdés et al. fanden eine gleiche Expression von Angiotensin-(1-7) und ACE2 in Plazentaschnitten von gesunden und präeklamptischen Schwangeren. Sie wiesen Angiotensin-(1-7) und ACE2 im Synzytiotrophoblasten, Zytotrophoblasten, in Deziduazellen, glatten Muskelzellen der Villi, sowie im arteriellen und venösen umbilikalen Endothel nach [213]. Ausschließlich im Endothel der Umbilikalarterien fand sich in der Präeklampsie-Gruppe eine erhöhte Expression von ACE2. Aufgrund der uteroplazentaren Lokalisation von Angiotensin-(1-7) und ACE2 in der Schwangerschaft diskutierten sie eine autokrine Funktion von Angiotensin-(1-7) in Bezug auf die vasoaktive Regulation im Rahmen der Plazentation.
Eine lokale Wirkung des Angiotensins-(1-7) könnte einen Erklärungsansatz für die plazentare Hypoxie bieten, welche als initiales Ereignis bei der Präeklampsie beschrieben wird [17,168]. Die inadäquate Umwandlung der dezidualen und myometranen Segmente der Spiralarterien in Niederdruckgefäße könnte durch den antiangiogenetischen Effekt des Angiotensin-(1-7) bedingt sein, woraus eine Beeinträchtigung der uteroplazentaren Durchblutung resultieren würde. Auf die systemische Vasoregulation scheint es jedoch keinen wesentlichen Einfluss zu haben. Hier dominiert der Angiotensin II-Effekt, verstärkt durch die vermehrte Expression der AT1-B2-Rezeptoren bei Präeklampsie.

In dieser Arbeit fanden sich in der differentiellen Gelanalyse die als Angiotensinogen identifizierten Spots in der Gruppe der gesunden Schwangeren erhöht exprimiert. Das entspricht bisherigen Erkenntnissen, bei denen erhöhte Konzentrationen von Angiotensin I, II und Aldosteron bei gesunden Schwangeren im dritten Trimenon gemessen wurden.
Im Vergleich dazu werden die Konzentrationen von Angiotensin I, II und Aldosteron bei Patientinnen mit Präeklampsie als signifikant erniedrigt beschrieben [114]. Dies wiederum können die Untersuchungen dieser Arbeit nicht bestätigen. Im Vergleich zu den nicht-schwangeren Kontrollgruppen (II, IV) ist das Angiotensinogen sowohl in der HELLP-Gruppe (I) als auch in der Gruppe der gesunden Schwangeren (III) erhöht exprimiert (siehe Tabellen 11 und 12, Seite 52). Die densitometrische Auswertung allerdings ergab keine signifikant erhöhte Expression von Angiotensinogen in der HELLP-Gruppe im Vergleich zu gesunden Schwangeren.

5.1.6 Transthyretin

Transthyretin ist ein Transportprotein im Blutplasma. Es wird vorwiegend in der Leber synthetisiert. Nachzuweisen ist es vor allem im Plexus choroideus, aber auch in der Leber.
Transthyretin erhält als Transportprotein die physiologischen Konzentrationen von Retinol (Vitamin A), Retinol-bindendem Protein und Thyroidhormonen im Blutplasma aufrecht [55].
Bei chronisch aktiven Entzündungen ist Transthyretin vermindert. Daher wird es auch als negatives Akute-Phase-Protein bezeichnet.
Weiterhin steht es im Zusammenhang mit Amyloidosen. Den Amyloidosen liegen Störungen der Proteinfaltung zugrunde, die dazu führen, dass sich lösliche Proteine infolge einer Konformationsänderung als unlösliche fibrilläre Aggregate ablagern. Dies kann extrazellulär oder intrazellulär, systemisch oder lokalisiert erfolgen. Bis heute sind mehr als 20 amyloidogene Proteine bekannt [186].
Transthyretin ist bereits in physiologischer Form leicht amyloidogen und bedingt im Alter die senile systemische Amyloidose. Darüber hinaus können genetisch veränderte Varianten des Transthyretins zu erblichen Amyloidosen führen, nur etwa 10% der Transthyretin-Mutationen scheinen nicht amyloidogen zu sein. Für die angeborene Amyloidose wird häufig auch der Begriff „Familiäre Amyloid Polyneuropathie" (FAP) verwendet. Bislang sind mehr als 80 Mutationen bekannt, eine der häufigsten ist die Val30Met-Mutation [10].
Die Ablagerungen erfolgen größtenteils in den peripheren Nerven und/oder im Herzen und führen dort zu Neuropathien respektive Kardiomyopathien [183].

Es wurde nachgewiesen, dass der Blutfluss in peripheren Geweben von Amyloidose-Patienten vermindert ist. Es gibt Hinweise dafür, dass dieser Effekt teilweise durch eine verminderte Produktion von Stickstoffoxid, auch als EDRF (endothelium-derived relaxing factor) bezeichnet, bedingt ist [11].
Wie eingangs ausgeführt (siehe Kapitel 2.1.3., Seite 19), wird auch bei der Präeklampsie eine verminderte Produktion oder Aktivität endothelabhängiger Vasodilatatoren wie zum Beispiel Stickstoffoxid als Ursache der verminderten endothelabhängigen Gefäßrelaxation diskutiert.

Um diesem Hinweis nachzugehen wäre es interessant, beim HELLP-Syndrom respektive bei der Präeklampsie genetische Analysen des Transthyretins anzufertigen.

Vascotto et al. wiesen kürzlich bereits im zweiten Trimenon signifikant erhöhte Transthyretin-Monomere in der Amnionflüssigkeit von Schwangeren nach, die später eine Präeklampsie entwickelten. Transthyretin liegt normalerweise als Homotetramer vor. Da die Monomere des Transthyretins oxidierte Formen sind, vermuten sie, dass der erhöhte oxidative Stress bei der Präeklampsie dafür verantwortlich ist [214].

5.1.7 Serum Amyloid A

Eine signifikant erhöhte Serum Amyloid A-Expression beim HELLP-Syndrom wurde mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese festgestellt und mit einem ELISA-Test validiert und quantifiziert. Im ELISA-Test wurden bei allen HELLP-Patientinnen erhöhte SAA-Konzentrationen gemessen. Auch bei jenen, welche in der Gelelektrophorese keine überexprimierten Spots zeigten. Das ist möglicherweise auf eine geringere Nachweissensitivität der 2D-Gelelektrophorese im Vergleich zum ELISA-Test zurückzuführen.

Das Molekulargewicht von Serum Amyloid A liegt bei 12 kDa. Parallel zu dieser Arbeit wurden in unserer Arbeitsgruppe massenspektrometrische Untersuchungen von HELLP-Plasma angefertigt. Auch dabei war der auffälligste Unterschied ein Peak bei 11,8 kDa, der in der Mehrzahl der HELLP-Spektren im Gegensatz zu denen der Kontrollgruppe detektiert werden konnte [106].

Kürzlich wurden erhöhte SAA-Konzentrationen im Plasma von präeklamptischen Schwangeren nachgewiesen [54]. Bei der Präeklampsie lag die Serum Amyloid A-Konzentration bei durchschnittlich 28,2 ng/l (7,2 - 135 ng/l) im Vergleich zu 7,8 ng/l (4,65 - 24,6 ng/l) bei gesunden Schwangeren.
In dieser Arbeit wurde eine durchschnittliche Plasma-Konzentration von Serum Amyloid A beim HELLP-Syndrom von 7,41 mg/l (3,57 - 10,26 mg/l) im Vergleich zu 2,28 mg/l (1,68 - 3,09 mg/l) bei gesunden Schwangeren gemessen. Die durchschnittliche Plasma-Konzentration beim HELLP-Syndrom ist 3,3-fach höher als bei gesunden Schwangeren. Die angegebenen Konzentrationsangaben dieser Arbeit korrelieren mit den Literaturangaben. Der Referenzwert von SAA im Plasma liegt bei Werten bis 1 mg/l, bei Entzündungen steigt die SAA-Konzentration innerhalb von wenigen Stunden auf Werte bis 2000 mg/l [65,224].

Serum Amyloid bezeichnet eine Familie von Apolipoproteinen, die von verschiedenen Genen mit einer hohen Allelvariation gebildet werden [130]. Beim Menschen gibt es vier Gene für Serum Amyloid A (SAA 1 - 4), die auf dem Chromosom 11 liegen [116,187]. Serum Amyloid A1 ist die am häufigsten exprimierte Isoform. Auch in dieser Arbeit zeigte sich das Serum Amyloid A1 als die am häufigsten detektierte Isoform.

Serum Amyloid A ist ein Akute-Phase-Protein. Seine Konzentration im Blut kann sich bis zu 1000-fach erhöhen als Reaktion auf Trauma, Infektion, Inflammation und Neoplasie [211]. Die Bildung wird durch Zytokine wie Interleukin 1 und 6 sowie TNF induziert [170]. Da es Hinweise gibt, dass die SAA-Konzentration mit dem Ausmaß des zerstörten Gewebes korreliert, wurde SAA als Aktivitäts- und Verlaufsmarker unter laufender Therapie bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen diskutiert [130].
Interessanterweise ist Serum Amyloid A aber auch ein Marker für low-grade-Inflammation und kann ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen vorhersagen [23,45]. Es wurde in arteriosklerotischen Läsionen der Gefäßwand, Makrophagen und glatten Muskelzellen nachgewiesen [137,228].
Bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie bei der Rheumatoiden Arthritis oder dem Familiären Mittelmeerfieber wurde eine kontinuierliche Serum Amyloid A-Erhöhung mit der Entwicklung einer sekundären reaktiven AA-Amyloidose in Verbindung gebracht. Bei der AA-Amyloidose kommt es zur Ablagerung von Fibrillen, die sich von Serum Amyloid A ableiten. Diese Fibrillenablagerung, zum Beispiel in den Nieren, Nebennieren, Milz, Leber und im Magen-Darm-Trakt, kann die Organfunktion beeinträchtigen [196].

Es ist bisher keine Amyloidose in Zusammenhang mit dem HELLP-Syndrom beschrieben worden.

Die Funktionen von Serum Amyloid A sind vielfältig. Serum Amyloid A selbst führt zur Thrombozytenadhäsion, während ein von Serum Amyloid A abgeleitetes Peptid diese Thrombozytenadhäsion inhibiert [212]. Weiterhin bindet es an neutrophile Granulozyten und verhindert dadurch eine überschießende oxidative Reaktion bei Stimulation der Neutrophilen [123]. Serum Amyloid A induziert die Migration, Adhäsion und Gewebsinfiltration von Monozyten und Leukozyten [18]. Somit ist es in die Schlüsselmechanismen der Inflammation einbezogen.
Serum Amyloid A ist weiterhin in den Fettstoffwechsel involviert, indem es bei Inflammation das Apolipoprotein 1 im HDL-Komplex ersetzt. Durch Bindung an HDL-Cholesterol bewirkt Serum Amyloid A einen HDL-Transfer von den Hepatozyten zu den Makrophagen [101]. Somit scheint sich bei Inflammation die ursprünglich antiatherogene Wirkung des HDL-Cholesterols in Anwesenheit von SAA in eine proatherogene Wirkung umzuwandeln [13].

SAA wird größtenteils in der Leber gebildet und ins Plasma sezerniert. Neben der Leber wird es auch in extrahepatischen Geweben, unter anderem in der Plazenta, gebildet. In Endothelzellen und Lymphozyten wurde ebenfalls eine SAA-Expression beobachtet [210].
Kovacevic et al. haben gezeigt, dass sowohl invasive Trophoblastzellen im ersten Trimenon, als auch maligne Trophoblast-ähnliche Chorionkarzinom-Zellen - welche beide fetalen Ursprungs sind - Serum Amyloid A exprimieren [105]. Somit spielt Serum Amyloid A wahrscheinlich schon bei der frühen Fetalentwicklung eine Rolle. Ob es dabei eine protektive Rolle spielt, indem es die Zytokinbalance aufrechterhält, oder ob es im Gegenteil die fetale Entwicklung beeinträchtigt bei bestehendem Zytokinungleichgewicht ist noch nicht geklärt.
Um die Hypothese einer erhöhten Serum Amyloid A-Expression in Plazenten von HELLP-Patientinnen zu testen, wurden im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock Paraffin-gebettete Plazentaschnitte immunhistochemisch untersucht. Zwischen HELLP-Patientinnen und gesunden Kontrollpersonen konnten keine Unterschiede in der Serum Amyloid A-Expression der Plazenta nachgewiesen werden [nicht publizierte Daten].
Wenn die Plazenta als Ort der vermehrten Bildung von Serum Amyloid A beim HELLP-Syndrom ausgeschlossen wird, ist es wahrscheinlich, dass die Leber als Hauptbildungsort von Serum Amyloid A und gleichzeitig Hauptschädigungsort beim HELLP-Syndrom vermehrt Serum Amyloid A produziert. Somit kommt Serum Amyloid A als ein Marker für das HELLP-Syndrom in Frage.
Denn bisherige Marker der Leberbeteiligung beim HELLP-Syndrom (ALAT und ASAT) sind Indikatoren der Leberzell-Zerstörung. ALAT und ASAT sind intrazelluläre Enzyme von

Hepatozyten, die bei der Zerstörung der Zellen in die Blutbahn freigesetzt werden. Im Gegensatz dazu ist Serum Amyloid A ein Protein, welches nach der Produktion regulär ins Blutplasma sezerniert wird. Es hat somit prinzipiell das Potential zu einem frühen Marker beim HELLP-Syndrom. Zu bedenken ist die geringe Spezifität, die Inflammationsproteine als Marker in ihrer klinischen Anwendbarkeit limitiert. Diese Spezifität wird durch die Kombination mehrerer Marker in Sinne von Marker-Signaturen erhöht. Um einen aussagekräftigen und treffsicheren Test zu entwickeln, gewinnen Marker-Signaturen zunehmend an Bedeutung.

Beim Ovarialkarzinom wird Serum Amyloid A als Marker diskutiert, auch beim Lungen- und Nierenzellkarzinom wird Serum Amyloid vermehrt exprimiert [44,147]. In der Kardiologie wird Serum Amyloid A als Inflammationsmarker bei der Entstehung von vulnerablen Plaques durch einen chronisch aktiven, inflammatorischen Prozess diskutiert. Die Serum Amyloid A-Konzentration korreliert mit der Instabilität der Plaques [124]. Blum et al. postulieren Serum Amyloid A als Marker einer hochgradig instabilen Angina pectoris und möglicherweise als prädiktiven Marker für Restenosen nach Angioplastie [23].

Es gibt eine Reihe epidemiologischer Studien, die belegen, dass eine Präeklampsie mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im späteren Leben einhergeht [74,77,176,198,225]. Weiterhin wird als Risikofaktor für die Entwicklung einer Präeklampsie ein erhöhter BMI (BMI > 30) in der Vor- oder Frühschwangerschaft beschrieben, was sonst als klassischer kardiovaskulärer Risikofaktor gilt. Ein erhöhter BMI vor der Schwangerschaft ist weiterhin mit einer erhöhten Mortalität nach einer hypertensiven Schwangerschaftserkrankung assoziiert [181]. Eine positive Familienanamnese bezüglich arterieller Hypertonie und Hypercholesterinämie ist ebenfalls assoziiert mit einem erhöhten Risiko an einer Präeklampsie zu erkranken [177]. Es scheint also pathogenetische Zusammenhänge zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen zu geben.

Es wird diskutiert, ob die physiologischen Veränderungen während der Schwangerschaft als „Stress-Test“ für den mütterlichen Metabolismus und die vaskuläre Funktion angesehen werden kann. Somit treten zuvor präklinische Risikofaktoren wie metabolische Störungen oder endotheliale Dysfunktion unter der metabolischen und vaskulären Stress-Situation der Schwangerschaft erstmals zutage [166].

Lampinen et al. wiesen eine verminderte vaskuläre Dilatation bei Patientinnen selbst mehrere Jahre nach einer Präeklampsie nach [113]. Allerdings konnte kein Hinweis für eine Arteriosklerose und damit verbundener verminderter Compliance der Arterienwände bei Status nach Präeklampsie im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Entwicklung einer manifesten Arteriosklerose aus einer verminderten Vasodilatation ist möglicherweise eine Frage der Zeit. Insofern wäre die Weiterführung dieser Longitudinalstudie interessant.
Eine solche Hypothese kann diese Arbeit für das HELLP-Syndrom allerdings nicht stützen, da in der post-HELLP-Gruppe keine erhöhten Konzentrationen von Serum Amyloid A gemessen wurden. Trotzdem ist ein Anstieg zu einem späteren Zeitpunkt nicht auszuschließen.

Für das HELLP-Syndrom ist die Studienlage bezüglich erhöhter Inzidenzen für kardiovaskuläre Erkrankungen weniger ausführlich als für die Präeklampsie.
Zwar gelten sowohl Fibrinogen, als auch Serum Amyloid A, welche in dieser Arbeit beide beim HELLP-Syndrom vermehrt exprimiert wurden, als kardiovaskuläre Risikofaktoren [23,31,124]. Auch ist die Inzidenz einer medikamentös eingestellten Hypertonie bei Patientinnen nach einem HELLP-Syndrom dreimal höher als in der gleichaltrigen Vergleichsgruppe [162].
Während allerdings ein erhöhter BMI mit einem erhöhten Risiko für eine Präeklampsie assoziiert ist, haben Übergewicht oder Adipositas keinen Einfluss auf das Risiko an einem HELLP-Syndrom zu erkranken [118].
Womöglich unterscheiden sich die pathophysiologischen Mechanismen bei der Präeklampsie von denen beim HELLP-Syndrom stärker als bisher vermutet, beziehungsweise es gibt beim HELLP-Syndrom einen zusätzlichen Mechanismus, welcher bei der Präeklampsie nicht zum Tragen kommt.

Wie zuvor beschrieben spielt das Serum Amyloid A bei andauernder low-grade-Inflammation eine Rolle beim Wechsel der ursprünglich antiatherogenen in eine proatherogene Wirkung des HDL-Cholesterols [13]. Insofern wären hier longitudinale Studien zur Konzentrationsmessung von Serum Amyloid A präpartal, peri- und postpartal bei Präeklampsie- und HELLP-Patientinnen äußerst interessant.

5.2 Neue Ansätze für massenspektrometrie-basierte, multiparametrische Diagnoseverfahren für das HELLP-Syndrom

Die bisherigen Studien haben gezeigt, dass einzelne Marker keine klare Vorhersage einer Präeklampsie oder eines HELLP-Syndroms erlauben [120,122]. Um die Aussagekraft einzelner Marker zu erhöhen ist die Kombination mit anderen Markern und damit die Entwicklung von Marker-Signaturen sinnvoll [80].

Ein solcher Ansatz wurde von unserer Arbeitsgruppe auf der Grundlage eines massenspektrometrie-basierten, multiparametrischen Diagnoseverfahrens für das HELLP-Syndrom vorgestellt [106]. Es wurden Proteinprofile von Plasmaproben von HELLP-Patientinnen und gesunden Schwangeren vor und nach der Entbindung miteinander verglichen. Die Proteinprofile wurden aus unfraktionierten Plasmaproben in einer schnellen und reproduzierbaren Messung mit einem MALDI-ToF-Massenspektrometer, welches mit einem Kryodetektor ausgestattet war, generiert. Dies ermöglichte eine äusserst sensitive Messung bis in einen hohen Massenbereich hinein (siehe Abbildung 5).

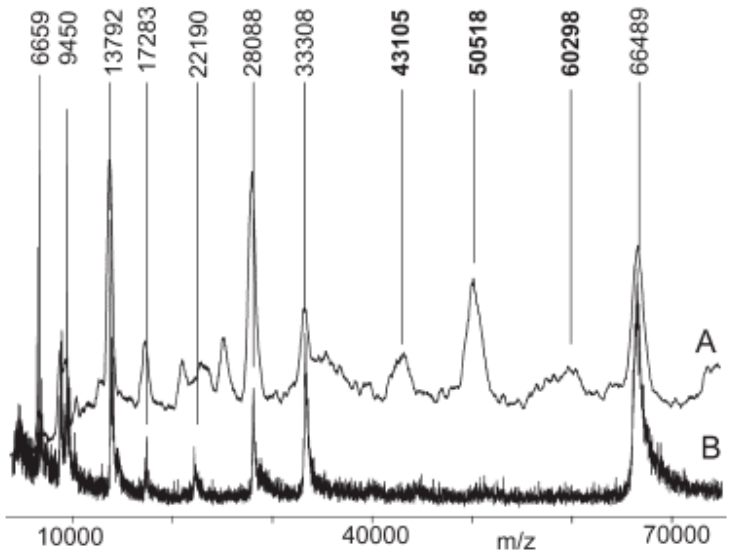


Abbildung 5: **Vergleich zweier MALDI-ToF-Massenspektren von Plasmaproben.**
Die Proben stammen von derselben Patientin (post-HELLP). Der Unterschied besteht in den Detektoren, mit denen das Massenspektrometer ausgerüstet ist. (A) Kryodetektor. (B) Vielkanalplatte (Multichannel Plate). Messbereich Massen/Ladungsverhältnis von 5000 - 70000. Die fettgedruckten Massen gehören zu Ionensignalen, welche im Kryodetektor-Massenspektrum klar, im Vielkanalplatten-Massenspektrum jedoch kaum oder gar nicht detektierbar waren. Als Matrix wurde Ferulasäure verwendet.

Es wurden Proteinpeaks von zehn Ionensignalen (9,5; 11,8; 14,0; 28,1; 43,4; 50,5; 60,1; 66,6; 74,5 und 79,8 kDa) ausgewählt und einer statistischen Analyse unterzogen.
Der auffälligste Unterschied zwischen dem Großteil der HELLP-Spektren und den non HELLP-Spektren war ein Ionensignal bei 11,8 kDa (p-Wert = 0,0000365), höchst wahrscheinlich Serum Amyloid A entsprechend. Weitere signifikante Unterschiede zwischen HELLP- und non HELLP-Gruppe zeigten sich bei 14,0; 28,1; 50,5 und 74,5 kDa (siehe Abbildung 6).

Diese Daten wurden einem Testverfahren unterzogen, welches die Plasmaproben aufgrund definierter Veränderungen im Proteinprofil entweder in die HELLP-Gruppe (n = 8) oder in die non HELLP-Gruppe (n = 22) einordnen sollte. Die genannten Veränderungen wurden auf Grundlage der generierten Massenspektren definiert.
Dieser Test ergab eine Sensitivität von 87,5% und eine Spezifität von 100%. Der positive Vorhersagewert für dieses Screening-Verfahren lag bei 100%, während der negative Vorhersagewert bei 95,6% lag (siehe Tabelle 14).

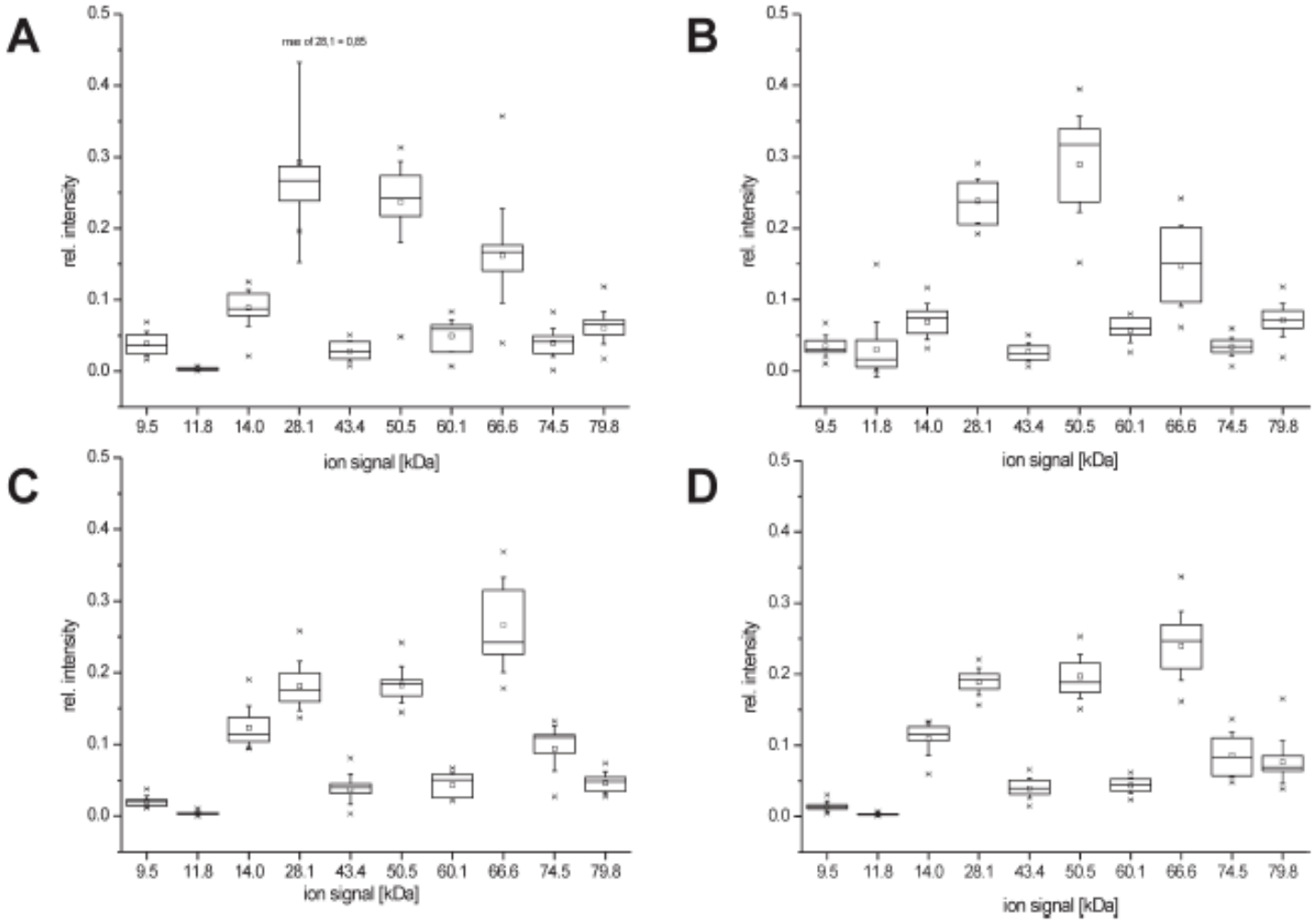


Abbildung 6: **Verteilungen der Proteinpeaks von zehn ausgewählten Ionensignalen der Kryodetektor-Massenspektren von Plasmaproben, dargestellt als Box-und-Whisker-Plots.** Die Plasmaproben stammen von gesunden Schwangeren (A) vor und (C) nach der Entbindung, sowie von HELLP-Patientinnen (B) vor und (D) nach der Entbindung. Angegeben sind die Molekularmassen der ausgewählten Ionensignale in kDa. (Weiteres zur Legende siehe Abbildung 3, Seite 54.)

Tabelle 14: Diagnostisches Potential eines Testverfahrens, basierend auf Ionensignalen von Kryodetektor-Massenspektren. Gemessen wurden Plasmaproben von HELLP-Patientinnen und gesunden Schwangeren vor und nach der Entbindung (siehe Abbildung 6).

Gruppen	Anzahl / % [a)]	
	Nur Schwangere	Schwangere und Nicht-Schwangere Personen
Insgesamt	15 / 100	30 / 100
HELLP	6 / 40	8 / 27
Non HELLP	9 / 60	22 / 73
Richtig Positive	5 / -	7 / -
Sensitivität	- / 83,3	- / 87,5
Falsch Positive	0 / -	0 / -
Richtig Negative	9 / -	22 / -
Spezifität	- / 100	- / 100
Falsch Negative	1 / -	1 / -
Positiver Vorhersagewert	- / 100	- / 100
Negativer Vorhersagewert	- / 90	- / 95,6

[a)] bezogen auf die Probenanzahl

Diese Studie belegt, dass die Erstellung von Plasmaprofilen mit massenspektrometrischen Verfahren diagnostische Tests erlaubt. Aufgrund ihrer einfachen und schnellen Durchführbarkeit könnten sie zukunftsweisend für die klinische Anwendbarkeit sein.

Es wurden mehrere charakteristische Ionensignale der Proteinprofile einbezogen, zugunsten einer höheren diagnostischen Voraussagbarkeit. Damit ist diese Studie beispielhaft für die Entwicklung weg vom einzelnen Marker in Richtung Marker-Signaturen.

Natürlich kann es sich aufgrund der begrenzten Probenanzahl um eine rein explorative Studie handeln, deren Ergebnisse in großen Studien geprüft werden sollten.

5.3 Grenzen dieser Arbeit und Ausblick

Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob für das HELLP-Syndrom ein krankheitsspezifisches Proteinprofil beschrieben werden kann. Erstmalig wurde ein Proteomics-Ansatz zur Untersuchung des HELLP-Syndroms gewählt. Tatsächlich konnte ein Proteinprofil generiert werden, welches typische Proteinveränderungen beim HELLP-Syndrom zusammenfasst. Es wurden sechs Proteine nachgewiesen, welche sich signifikant beim HELLP-Syndrom unterscheiden im Vergleich zu einer gesunden Schwangerschaft: Inter-α-Inhibitor, Kininogen, Fibrinogen gamma, Transthyretin, Haptoglobin und Serum Amyloid A. Fünf dieser Proteine wurden damit erstmals in Zusammenhang mit dem HELLP-Syndrom beschrieben.
Der auffälligste Unterschied war die klare Überexpression einer Spotgruppe im Bereich von 12 kDa in der Mehrzahl der HELLP-Gele, welche als Serum Amyloid A (SAA) identifiziert wurde. Die Überexpression wurde anschließend in einem ELISA-Test gegen humanes SAA validiert und quantifiziert.

Mit diesen Ergebnissen ist es nun möglich, die klinische Anwendbarkeit von SAA als einen Marker von einer HELLP-spezifischen Marker-Signatur zu prüfen.

Die Quantifizierung der Überexpression von Inter-α-Inhibitor, Kininogen , Fibrinogen gamma und Transthyretin ist erforderlich, um diese als weitere Komponenten einer HELLP-spezifischen Marker-Signatur zu prüfen. Eine so generierte Marker-Signatur könnte daraufhin auf ihren klinischen und präklinischen Vorhersagewert für das HELLP-Syndrom getestet werden.
Da das HELLP-Syndrom allgemein als Komplikation der Präeklampsie angesehen wird, sollte in weiteren Studien ebenfalls eine Präeklampsie-Gruppe einbezogen werden.

Aufgrund der kleinen Fallzahl ist die Aussagekraft der vorliegenden Daten begrenzt. Dadurch ist die statistische Wertigkeit eingeschränkt. Aus diesem Grund können die Ergebnisse der Experimente allein explorativen Charakter haben.

Die Fallzahl ist aufgrund der aufwendigen Methodik, welche eine komplette Proteinanalyse in etwa 80 2D-Gelen mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung von über einhundert Proteinspots umfasst, bewusst so gewählt worden. Bei den hier untersuchten Plasmaproben wurde als erster Schritt das gesamte Proteinmuster analysiert. Daraus ergaben sich die obengenannten Proteine, welche sich beim HELLP-Syndrom vom Proteinmuster gesunder Schwangerer unterscheiden.

Diese Proteinunterschiede sollten nun in einem zweiten Schritt validiert und quantifiziert werden. Aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit und ökonomischen Effizienz bietet sich hierfür ein ELISA-Test an. Dieser lässt eine hohe Probenanzahl zu. Bei dem hervorstechendsten Proteinunterschied wurde bereits eine Quantifizierung des Ergebnisses mit einem ELISA-Test durchgeführt.

In einem weiteren Schritt gilt es, diese Ergebnisse in großen Studien mit entsprechenden Fallzahlen zu validieren.

Weiterhin können auf Basis der vorliegenden Daten von der bearbeiteten allgemeinen Fragestellung nun spezielle Fragestellungen für zukünftige Arbeiten formuliert werden:

1. Haptoglobin:
Welchen Einfluss hat das Haptoglobin auf die Angiogenese und die Modulation der Immunantwort beim HELLP-Syndrom?
2. Fibrinogen gamma:
Sind Sequenzunterschiede des Fibrinogens, möglicherweise beruhend auf posttranslationalen Modifikationen, bei HELLP-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Schwangeren nachweisbar?
Fibrinogen ist für die Bindung am Plättchenrezeptor bedeutsam. Gibt es einen kausalen Zusammenhang zwischen erhöhten Fibrinogen-Konzentrationen und der Gerinnungsaktivierung sowie der Ablagerung von Fibrinthromben beim HELLP-Syndrom?
3. Inter-α-Inhibitor:
Welche Komponenten der Inter-α-Inhibitor-Proteine wirken antiinflammatorisch: Bikunin allein, die schweren Ketten oder Bikunin in Verbindung mit den schweren Ketten? Weiterhin ist fraglich, ob die Proteine direkt ihre Wirkung entfalten oder ob sie dafür an Zellen gebunden sein müssen.
Was für eine Rolle spielt Inter-α-Inhibitor H4 in der Entzündungsreaktion?
4. Kininogen 1:
Gibt es genetische Unterschiede des Gewebekallikreins bei Präeklampsie- und HELLP-Patientinnen im Vergleich zu normotensiven, gesunden Schwangeren?
5. Transthyretin:
Können genetische Differenzen des Transthyretins beim HELLP-Syndrom respektive bei der Präeklampsie nachgewiesen werden?
6. Serum Amyloid A:
Um den Zusammenhang zwischen hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zu untersuchen, wäre zu prüfen ob eine Überexpression von Serum Amyloid A im Blutplasma ebenfalls Jahre prä- und postpartal gemessen werden kann.

Mit Hilfe dieser Fragestellungen gelingt es möglicherweise, sich schrittweise dem HELLP-Syndrom in seiner Pathophysiologie und Diagnostik anzunähern. Ziel ist es, HELLP-spezifische Proteinprofile im Sinne von Marker-Signaturen zu entwickeln und auf deren klinische respektive präklinische Voraussagewerte zu prüfen.

6 Literaturverzeichnis

1. AbdAlla S, Lother H, elMassiery A, Quitterer U. Increased AT1 receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. Nat Med 7(2001): 1003-1009.
2. Abelous JE, Bardier E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. CR Soc Biol 66(1909): 511-520.
3. Alexander BT, Rinewalt AN, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Endothelin type A receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure. Hypertension 37(2001): 485–489.
4. Allaire A, Ballenger K, Wells S, McMahon M, Lessey B. Placental apoptosis in preeclampsia. Obstet Gynecol 96(2000): 271-276.
5. Allison AC, Blumberg BS. The genetically determined serum haptoglobins in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1(1953): 239-243.
6. Amorim MMR, Santos LC, Faúndes A. Corticosteroid therapy for prevention of respiratory distress syndrome in severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 180(1999): 1283-1288.
7. Anderson NL, Anderson NG. A two-dimensional gel database of human plasma proteins. Electrophoresis 12(1991): 883–906.
8. Anderson NL, Anderson NG. The Human Plasma Proteome – History, character, and diagnostic prospects. Mol Cell Proteomics 1(2002): 845–867.
9. Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. Mol Cell Proteomics 3(2004): 311-326.
10. Ando Y, Nakamura M, Araki S. Transthyretin-Related Familial Amyloidotic Polyneuropathy. Arch Neurol 62(2005): 1057-1062.
11. Ando Y, Yamashitan T, Tanaka Y, Tashima K, Yonehara T, Gotoh T, Sakashita N, Uchino M, Ando M. Role of nitric oxide in the peripheral vessels of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) type I. J Auton Nerv Syst 50(1994): 79-85.
12. Arngrimsson R, Hayward C, Nadaud S, Baldursdóttir A, Walker JJ, Liston WA, Bjarnadóttir RI, Brock DJ, Geirsson RT, Connor JM, Soubrier F. Evidence for a familial pregnancyinduced hypertensive locus in the eNOSgene region. Am J Hum Genet 61(1997): 354-362.

13. Artl A, Marsche G, Lestavel S, Sattler W, Malle E. Role of serum amyloid A during metabolism of acutephase HDL by macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(2000): 763–772.
14. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science 281(1998): 1305-1308.
15. Axt R, Kordina AC, Meyberg R, Reitnauer K, Mink D, Schmidt W. Immunhistochemical evaluation of apoptosis in placentae from normal and growth-restricted pregnancies. Clin Exp Obstet Gynecol 26(1999): 195–198.
16. Axt R, Meyberg R, Mink D, Wasemann C, Reitnauer K, Schmidt W. Immunhistochemical detection of apoptosis in the human term and post-term placenta. Clin Exp Obstet Gynecol 26(1999): 56–59.
17. Axt-Fliedner R, Schroer A, Diedrich K. Molekulare Mechanismen der Präeklampsie. Der Gynäkologe 37(2004): 132–139.
18. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med 180(1994): 203–209.
19. Bantscheff M, Glocker MO. MALDI-Massenspektrometrie in der Proteomforschung. BIOspektrum 7(2001): 250-252.
20. Barton JR, Riely CA, Adamec TA, Shanklin DR, Khoury AD, Sibai BM. Hepatic histopathologic condition does not correlate with laboratory abnormalities in HELLP-syndrome. Am J Obstet Gynecol 167(1992): 1538-1543.
21. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. J Clin Endocrinol Metab 86(2001): 2505–2512.
22. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol 17(1999): 121-127.
23. Blum A, Kaplan G, Vardinon N, Yust I, Burke M, Laniado S, Miller H. Serum amyloid type A may be a predictor of restenosis. Clin Cardiol 21(1998): 655-658.
24. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal Biochem 72(1976): 248-254.

25. Braems G, vanRenterghem N, Roelens K, van den Broecke R, Weyers S, Temmerman M. Antiphospholipid syndrome during pregnancy: Associated with early onset of HELLP syndrome and liver infarctions. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 123(2005): 255-257.
26. Brenner B, Lanir N, Thaler I. HELLP syndrome associated with factor V R506Q mutation. Br J Haematol 92(1996): 999–1001.
27. O'Brien WF. The prediction of preeclampsia. Clin Obstet Gynecol 35(1992): 351-364.
28. Brosens JA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. Obstet Gynecol Annu 1(1972): 177-191.
29. vanBuul EJ, Steegers EA, Jongsma HW, Eskes TK, Thomas CM, Hein PR. Haematological and biochemical profile of uncomplicated pregnancy in nulliparous women; a longitudinal study. Neth J Med 46(1995): 73-85.
30. Campbell DJ. The renin–angiotensin and the kallikrein–kinin systems. Int J Biochem Cell Biol 35(2003): 784–791.
31. Canseco-Avila LM, Jerjes-Sánchez C, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, Guzmán-Ramírez D. Fibrinogen. Cardiovascular risk factor or marker? Arch Cardiol Mex 76 Suppl 4(2006): 158-172. Artikel auf Spanisch.
32. Cavkaytar S, Ugurlu EN, Karaer A, Tapisiz OL, Danisman N. Are clinical symptoms more predictive than laboratory parameters for adverse maternal outcome in HELLP syndrome? Acta Obstet Gynecol Scand 86(2007): 648-651.
33. Chesley LC, Annitto JE, Cosgrove RA. The familial factor in toxemia of pregnancy. Obstet Gynecol 32(1968): 303–311.
34. Chikosi AB, Moodley J, Pegoraro RJ, Lanning PA, Rom L. 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in black South African women with pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 106(1999): 1219–1220.
35. Clark BA, Halvorson L, Sachs B, Epstein FH. Plasma endothelin levels in preeclampsia: elevation and correlation with uric acid levels and renal impairment. Am J Obstet Gynecol 166(1992): 962–968.
36. Colman RW, Schmaier AH. Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes: Blood 90(1997): 3819-3843.
37. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M. World Health Organization Systematic Review of Screening Tests for Preeclampsia. Obstet Gynecol 104(2004): 1367-1391.

38. Conrad KP. Possible mechanisms for changes in renal hemodynamics during pregnancy: studies from animal models. Am J Kidney Dis 9(1987): 253–259.
39. Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. FASEB J 7(1993): 566–571.
40. Côté HC, Lord ST, Pratt KP. γ-Chain Dysfibrinogenemias: Molecular Structure-Function Relationships of Naturally Occurring Mutations in the g Chain of Human Fibrinogen. Blood 92(1998): 2195-2212.
41. Cox BE, Word RA, Rosenfeld CR. Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy, J Clin Endocrinol Metab 81(1996): 49–58.
42. Crews JK, Herrington JN, Granger JP, Khalil RA. Decreased endothelium-dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. Hypertension 35(2000): 367–372.
43. Czokalo M, Jaworski S, Buluk K, Rudzinski A. Plasma kininogenesis and fibrinolysis in the pathogenesis of EPH gestosis. Zentralbl Gynakol 110(1988): 1345-1353.
44. Dai S, Wang X, Liu L, Liu J, Wu S, Huang L, Xiao X, He D. Discovery and identification of Serum Amyloid A protein elevated in lung cancer serum. Sci China C Life Sci 50(2007): 305-311.
45. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated metaanalyses. BMJ 321(2000): 199-204.
46. Danielson LA, Conrad KP. Acute blockade of nitric oxide synthase inhibits renal vasodilation and hyperfiltration during pregnancy in chronically instrumented conscious rats. J Clin Invest 96(1995): 482–490.
47. Daveau M, Rouet P, Scotte M, Faye L, Hiron M, Lebreton JP, Salier JP. Human inter-a-inhibitor family in inflammation: simultaneous synthesis of positive and negative acute-phase proteins. Biochem J 292(1993): 485-492.
48. Dekker GA, Robillard PY, Hulsey TC. Immune maladaptation in the etiology of preeclampsia: a review of corroborative epidemiologic studies. Obstet Gynecol Surv 53(1998): 377-382.
49. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. Am J Obstet Gynecol 179(1998): 1359-1375.

50. Delanghe JR, Langlois MR, Boelaert JR, VanAcker J, VanWanzeele F, VanDerGroen G, Hemmer R, Verhofstede C, DeBuyzere M, DeBacquer D, Arendt V, Plum J. Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection. Aids 12(1998): 1027-1032.
51. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 175(1996): 902–905.
52. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. Circ Res 87(2000): e1-e9.
53. Elebute OA, Mills IH. Urinary kallikrein in normal and hypertensive pregnancies. Perspect Nephrol Hypertens 5(1976): 329-338.
54. Engin-Ustün Y, Ustün Y, Karabulut AB, Ozkaplan E, Meydanli MM, Kafkasli A. Serum amyloid A levels are increased in pre-eclampsia. Gynecol Obstet Invest 64(2007): 117-120.
55. Episkopou V, Maeda S, Nishiguchi S, Shimada K, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Robertson EJ. Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone. Proc Nat Acad Sci 90(1993): 2375-2379.
56. DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. Am J Pathol 155(1999): 293-301.
57. Fitzgerald DJ, Rocki W, Murray R, Mayo G, Fitzgerald GA. Thromboxane A2 synthesis in pregnancy-induced hypertension. Lancet 335(1990): 751–754.
58. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Zecchi Orlandini S. Aponecrosis: Morphological and Biochemical Exploration of a Syncretic Process of Cell Death Sharing Apoptosis and Necrosis. J Cell Physiol 182(2000): 41–49.
59. Forteza R, Casalino-Matsuda SM, Monzon ME, Fries E, Rugg MS, Milner CM, Day AJ. TSG-6 Potentiates the Antitissue Kallikrein Activity of Inter-α-inhibitor through Bikunin Release. Am J Respir Cell Mol Biol 36(2007): 20–31.
60. Fountoulakis M, Langen H. Identification of Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Mass Spectrometry Following In-Gel Digestion in Low-Salt, Nonvolatile Buffer and Simplified Peptide Recovery. Anal Biochem 250(1997): 153-156.

61. Friedman SA, deGroot CJ, Taylor RN, Golditch BD, Roberts JM. Plasma cellular fibronectin as a measure of endothelial involvement in preeclampsia and intrauterine growth retardation. Am J Obstet Gynecol 170(1994): 838–841.
62. Fries E, Blom AM. Bikunin - not just a plasma proteinase inhibitor. Int J Biochem Cell Biol 32(2000): 125–137.
63. Fries E, Kaczmarczyk A. Inter-α-inhibitor, hyaluronan and inflammation. Acta Biochim Pol 50(2003): 735–742.
64. Fung ET, Wright GL, Dalmasso EA. Proteomic strategies for biomarker identification: progress and challenges. Curr Opin Mol Ther 2(2000): 643-650.
65. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 340(1999): 448-454.
66. Giardina JB, Green GM, Rinewalt AN, Granger JP, Khalil RA. Role of endothelin B receptors in enhancing endothelium-dependent nitric oxide-mediated vascular relaxation during high salt diet. Hypertension 37(2001): 516–523.
67. Glocker MO, Guthke R, Kekow J, Thiesen HJ. Rheumatoid arthritis, a complex multifactorial disease: on the way toward individualized medicine. Med Res Rev 26(2006): 63-87.
68. Glocker MO, Ringel B, Götze L, Lorenz P, Wandschneider S, Fehring V, Damm B, Bantscheff M, Ibrahim SM, Löhr M, Thiesen HJ. Klinische Proteomforschung. Laborwelt (2000): 7-12.
69. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, Cappucci G, Paladini D, Martinelli P, Montanaro S, Pavone G, DiMinno G. Factor V Leiden, C >T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. Thromb Haemost 77(1997): 1052–1054.
70. Gupta AK, Gebhardt S, Hillermann R, Holzgreve W, Hahn S. Analysis of plasma elastase levels in early and late onset preeclampsia. Arch Gynecol Obstet 273(2006): 239-242.
71. Haddad B, Barton JR, Livingston JC, Chahine R, Sibai BM. Risk factors for adverse maternal outcomes among women with HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome. Am J Obstet Gynecol 183(2000): 444-448.
72. Haddad B, Fox AJ, Rousell J, Burgess G, McIntyre P, Barnes PJ, Chung KF. Post-Transcriptional Regulation of Bradykinin B1 and B2 Receptor Gene Expression in Human Lung Fibroblasts by Tumor Necrosis Factor-a: Modulation by Dexamethasone. Mol Pharmacol 57(2000): 1123–1131.

73. Halim A, Kanayama N, ElMaradny E, Maehara K, Bhuiyan AB, Terao T. Correlated plasma elastase and sera cytotoxicity in eclampsia A possible role of endothelin-1 induced neutrophil activation in preeclampsia-eclampsia. Am J Hypertension 9(1996): 33-38.
74. Hannaford P, Ferry S, Hirsch S. Cardiovascular sequelae of toxaemia of pregnancy. Heart 77(1997): 154–158.
75. Harirah H, Donia SE, Hsu CD. Serum Soluble Fas in the Syndrome of Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelets. Obstet Gynecol 98(2001): 295-298.
76. Haskard DO. Adhesive proteins. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DT, Tuddenhorn EG. (eds) Haemostasis and thrombosis. Longman, Singapore (1994): 233–257.
77. Haukkamaa L, Salminen M, Laivuori H, Leinonen H, Hiilesmaa V, Kaaja R. Risk for subsequent coronary artery disease after preeclampsia. Am J Cardiol 15(2004): 805–808.
78. Hawiger J, Timmons S, Kloczewiak M, Strong DD, Doolittle RF. γ and α chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors. Proc Nat Acad Sci 79(1982): 2068-2071.
79. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology 115(2005): 1-20.
80. Heitner (Finke) JC, Koy C, Kreutzer M, Gerber B, Reimer T, Glocker MO. Differentiation of HELLP patients from healthy pregnant women by proteome analysis – On the way towards a clinical marker set. J Chrom B 840(2006): 10-19.
81. Higgins JR, Kaiser T, Moses EK, North R, Brennecke SP. Prothrombin G20210A mutation: is it associated with pre-eclampsia? Gynecol Obstet Invest 50(2000): 254–257.
82. Hochberg I, Roguin A, Nikolsky E, Chanderashekhar PV, Cohen S, Levy AP. Haptoglobin phenotype and coronary artery collaterals in diabetic patients. Atherosclerosis 161(2002): 441–446.
83. Holzgreve W, Ghezzi F, DiNaro E, Ganshirt D, Maymon E, Hahn S. Disturbed feto-maternal cell traffic in preeclampsia. Obstet Gynecol 91(1998): 669–672.
84. Hsu CD, Harirah H, Basherra H, Mor G. Serum soluble Fas levels in preeclampsia. Obstet Gynecol 97(2001): 530-532.

85. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JCP, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. Histochem Cell Biol 110(1998): 495–508.
86. Huppertz B, Kingdom JCP. Apoptosis in the trophoblast –role of apoptosis in placental morphogenesis. J Soc Gynecol Investig 11(2004): 353-362.
87. Hytten FE, Lind T. Diagnostische Indizes in der Schwangerschaft. Medikon Verlag. 2.Aufl.(1984): 412-417.
88. Ibelgaufts H. Akute-Phase-Reaktion. Lexikon Zytokine. Medikon Verlag. 1.Aufl.(1992): 25-27.
89. Isler CM, Rinehart BK, Terrone DA, May WL, Magann EF, Martin JNJr. The importance of parity to major maternal morbidity in the eclamptic mother with HELLP syndrome. Hypertens Pregnancy 22(2003): 287-294.
90. Iwaki T, Castellino FJ. Maternal fibrinogen is necessary for embryonic development. Curr Drug Targets 6(2005): 535-539.
91. Jessen TE, Ødum L. Role of tumor necrosis factor stimulated gene 6 (TSG-6) in the coupling of inter-α-trypsin inhibitor to hyaluronan in human follicular fluid. Reproduction 125(2003): 27–31.
92. Just T, Gafumbegete E, Gramberg J, Prüfer I, Mikkat S, Ringel B, Pau HW, Glocker MO. Differential proteome analysis of tonsils from children with chronic tonsillitis or with hyperplasia reveals disease-associated protein expression differences. Anal Bioanal Chem 384(2006): 1134-1144.
93. Kadyrov M, Kingdom JCP, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol 194(2006): 557–563.
94. Kaiser T, Brennecke SP, Moses EK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms are not a risk factor for pre-eclampsia/eclampsia in Australian women. Gynaecol Obstet Invest 50(2000): 100–102.
95. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. Anal Chem 57(1985): 2935-2939.
96. Karas M, Hillenkamp F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. Anal Chem 60 (1988): 2299-2301.

97. Katz L, DeAmorim MM, Figueiroa JN, Esilva JE. Postpartum dexamethasone for women with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) syndrome: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. Am J Obstet Gynecol (2008, im Druck).

98. Khedun SM, Naicker T, Moodley J. Tissue kallikrein activity in pregnancy. Aust N Z J Obstet Gynaecol 40(2000): 451-454.

99. Kilpatrick DC. HLA-dependent TNF secretory response may provide an immunogenetic link between preeclampsia and type 1 diabetes mellitus. Dis Markers 13(1996): 43-47.

100. Kim HY, Sohn YS, Lim JH, Kim EH, Kwon JY, Park YW, Kim YH. Neonatal outcome after preterm delivery in HELLP syndrome. Yonsei Med J 47(2006): 393-398.

101. Kisilevsky R, Subrahmanyan L. Serum amyloid A changes high density lipoprotein's cellular affinity. A clue to serum amyloid A's principal function. Lab Invest 66(1992): 778–785.

102. Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. Br J Obstet Gynecol 105(1998): 632-640.

103. Knock GA, Sullivan MHF, McCarthy A, Elder MG, Polak JM, Wharton J. Angiotensin II (AT-1) vascular binding sites in human placentae from normal-term, preeclamptic and growth retarded pregnancies, J Pharmacol Exp Ther 271(1994): 1007–1015.

104. Kobayashi H. Endogenous anti-inflammatory substances, inter-a-inhibitor and bikunin. Biol Chem 387(2006): 1545–1549.

105. Kovacevic A, Hammer A, Sundl M, Pfister B, Hrzenjak A, Ray A, Ray BK, Sattler W, Malle E. Expression of serum amyloid A transcripts in human trophoblast and fetal-derived trophoblast-like choriocarcinoma cells. FEBS Letters 580(2006): 161–167.

106. Koy C, Heitner (Finke) JC, Woisch R, Kreutzer M, Serrano-Fernandez P, Gohlke R, Reimer T, Glocker MO. Cryodetector mass spectrometry profiling of plasma samples for HELLP diagnosis: An exploratory study. Proteomics 5(2005): 3079-3087.

107. Krauss T, Augustin HG, Osmers R, Meden H, Unterhalt M, Kuhn W. Activated protein C resistance and factor V Leiden in patients with hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets syndrome. Obstet Gynecol 92(1998): 457-460.

108. Krauss T, Emons G, Kuhn W, Augustin HG. Predictive value of routine circulating soluble endothelial cell adhesion molecule measurements during pregnancy. Clin Chem 48(2002): 1418-1425.

109. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. N Engl J Med 340(1999): 9–13.
110. Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 170(1994): 1752–1759.
111. Lachmeijer AM, Arngrimsson R, Bastiaans EJ, Pals G, TenKate LP, DeVries JI, Kostense PJ, Aarnoudse JG, Dekker GA. Mutations in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels, and vitamin status in women with a history of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 184(2001): 394–402.
112. Laivuori H, Kaaja R, Ylikorkala O, Hiltunen T, Kontula K. 677 C→T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and preeclampsia. Obstet Gynecol 96(2000): 277–280.
113. Lampinen KH, Rönnback M, Kaaja RJ, Groop PH. Impaired vascular dilatation in women with a history of pre-eclampsia. J Hypertens 24(2006): 751–756.
114. Langer B, Grima M, Coquard C, Bader AM, Schlaeder G, Imbs JL. Plasma Active Renin, Angiotensin I, and Angiotensin II During Pregnancy and in Preeclampsia. Obstet Gynecol 91(1998): 196-202.
115. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. Clin Chem 42(1996): 1589–1600.
116. Larson MA, Wei SH, Weber A, Weber AT, McDonald TL. Induction of human mammaryassociated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide. Biochem Biophys Res Commun 301(2003): 1030–1037.
117. Laskowska M, Laskowska K, Leszczynska-Gorzelak B, Oleszczuk J. Evaluation of the maternal and umbilical vein serum sFas/sFasL system in pregnancies complicated by preeclampsia with intrauterine growth retardation. Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol 126(2006): 155–159.
118. Leeners B, Rath W, Kuse S, Irawan C, Imthurn B, Neumaier-Wagner P. BMI: new aspects of a classical risk factor for hypertensive disorders in pregnancy. Clin Sci (Lond) 111(2006): 81-86.
119. Leguizamón GF, Zeff NP, Fernández A. Hypertension and the pregnancy complicated by diabetes. Curr Diab Rep 6(2006): 297-304.

120. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia. N Engl J Med 355(2006): 992-1005.
121. Lim SK, Ferraro B, Moore K, Halliwell B. Role of haptoglobin in free hemoglobin metabolism. Redox Rep 6(2001): 219–227.
122. Lindheimer MD, Umans JG. Explaining and Predicting Preeclampsia. N Engl J Med 355(2006): 1056-1058.
123. Linke RP, Bock V, Valet G, Rothe G. Inhibition of the oxidative burst response of N formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid A protein. Biochem Biophys Res Commun 176(1991): 1100–1105.
124. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A. The Prognostic Value of C-Reactive Protein and Serum Amyloid A Protein in Severe Unstable Angina. N Engl J Med 331(1994): 417-424.
125. Livingston JC, Barton JR, Park V, Haddad B, Phillips O, Sibai BM. Maternal and fetal inherited thrombophilias are not related to the development of severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 185(2001): 153–157.
126. Livingston JC, Maxwell BD. Preeclampsia: theories and speculations. Wien Klin Wochenschr 115(2003): 145–148.
127. Lorenz P, Bantscheff M, Ibrahim SM, Thiesen HJ, Glocker MO. Proteome analysis of diseased joints from mice suffering from collagen-induced arthritis. Clin Chem Lab Med 41(2003): 1622-1632.
128. Lottspeich F. Proteomanalyse- ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen. Angew Chemie 111(1999): 2630-2647.
129. Machado RDP, Santos RAS, Andrade SP. Mechanisms of angiotensin-(1–7)-induced inhibition of angiogenesis. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 280(2001): R994–R1000.
130. Malle E, DeBeer FC. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. Eur J Clin Invest 26(1996): 427–435.
131. Marcondes S, Antunes E. The plasma and tissue kininogen-kallikrein-kinin system: role in the cardiovascular system. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents 3(2005): 33-44.
132. Marsden PA, Brenner BM. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. Am J Physiol Cell Physiol 262(1992): 854–861.

133. Martin JN, Blake PG, Perry KG, McCaul JF, Hess LW, Martin RW. The natural history of HELLP-syndrome: Patterns of disease progression and regression. Am J Obstet Gynecol 164(1991): 1500-1513.
134. Martin JN, Files JC, Blake PG, Perry KG, Morrison JC, Norman PH. Postpartum plasma exchange for atypical preeclampsia-eclampsia as HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets) syndrome. Am J Obstet Gynecol 172(1995): 1107-1127.
135. Matz RL, VanOverloop B, Gairard A. Hypotensive effect of endothelin-1 in nitric oxide-deprived, hypertensive pregnant rats. Am J Hypertens 14(2001): 585–591.
136. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J Clin Invest 111(2003): 649-658.
137. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: Implications for serum amyloid A function. Proc Natl Acad Sci USA 91(1994): 3186-3190.
138. Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. Endocrine 18(2002): 239-245.
139. Mihu D, Costin N, Mihu CM, Seicean A, Ciortea R. HELLP Syndrome - a Multisystemic Disorder. J Gastrointestin Liver Dis 16(2007): 419-424.
140. Mikkat S, Koy C, Ulbrich M, Ringel B, Glocker MO. Mass spectrometric protein structure characterization reveals cause of migration differences of haptoglobin α chains in two-dimensional gel electrophoresis. Proteomics 4(2004): 3921–3932.
141. Milner CM, Day AJ. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. J Cell Science 116(2003): 1863-1873.
142. Mimuro S, Lahoud R, Beutler L, Trudinger B. Changes of resistance to activated protein C in the course of pregnancy and prevalence of factor V mutation. Aust NZ J Obstet Gynaecol 38(1998): 200–204.
143. Minakami H, Idei S, Koike T, Tamada T, Yasuda Y, Hirota N. Active lupus and preeclampsia: A life threatening combination. J Rheumatol 21(1994): 1562-1563.
144. Minakami H, Oka N, Sato T, Tamada T, Yasuda Y, Hirota N. Preeclampsia: A microvesicular fat disease of the liver? Am J Obstet Gynecol 159(1988): 1043-1047.

145. Morishita H, Yamakawa T, Matsusue T, Kusuyama T, Sameshima-Aruga R, Hirose J, Nii A, Miura T, Isaji M, Horisawa-Nakano R, Nagase Y, Kanamori T, Nobuhara M, Tanaka R, Koyama S, Naotsuka M. Novel factor Xa and plasma kallikrein inhibitory activities of the second Kunitz-type inhibitory domain of urinary trypsin inhibitor. Thromb Res 73(1994): 193-204.

146. Morris NH, Eaton BM, Dekker G. Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 103(1996): 4–15.

147. Moshkovskii SA, Serebryakova MV, Kuteykin-Teplyakov KB, Tikhonova OV, Goufman EI, Zgoda VG, Taranets IN, Makarov OV, Archakov AI. Ovarian cancer marker of 11.7 kDa detected by proteomics is a serum amyloid A1. Proteomics 5(2005): 3790–3797.

148. Murone C, Chai SY, Müller-Esterl W, Mendelsohn FAO, Clements J. Localization of Bradykinin B2 Receptors in the Endometrium and Myometrium of Rat Uterus and the Effects of Estrogen and Progesterone. Endocrinology 140(1999): 3372–3382.

149. Mutlu-Turkoglu U, Aykac-Toker G, Ibrahimoglu L, Ademoglu E, Uysal M. Plasma nitric oxide metabolites and lipid peroxide levels in preeclamptic pregnant women before and after delivery. Gynecol Obstet Invest 48(1999): 247–250.

150. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 88(1997): 355-365.

151. Nagy B, Toth T, Rigo J, Karadi I, Romics L, Papp Z. Detection of factor V Leiden mutation in severe pre-eclamptic Hungarian women. Clin Genet 53(1998): 478–481.

152. Neale D, Demasio K, Illuzi J, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Maternal serum of women with pre-eclampsia reduces trophoblast cell viability: evidence for an increased sensitivity to Fas-mediated apoptosis. J Mat Fet Neonat Med 13(2003): 39-44.

153. Neale D, Mor G. The role of Fas mediated apoptosis in preeclampsia. J Perinat Med 33(2005): 471–477.

154. Nelson DM. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. Placenta 17(1996): 387–391.

155. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9(1988): 255-262.

156. Nordhoff E, Egelhofer V, Giavalisco P, Eickhoff H, Horn M, Przewieslik T, Theiss D, Schneider U, Lehrach H, Gobom J. Large-gel two-dimensional electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry: an analytical challenge for studying complex protein mixtures. Electrophoresis 22(2001): 2844-2855.
157. Nordhoff E, Schürenberg M, Thiele G, Lübbert C, Kloeppel KD, Theiss D, Lehrach H, Gobom J. Sample preparation protocols for MALDI-MS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports. Int J Mass Spectrom 226(2003): 163-180.
158. Nova A, Sibai BM, Barton JR, Mercer BM, Mitchell MD. Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 165(1991): 724–727.
159. Opal SM, Lim YP, Siryaporn E, Moldawer LL, Pribble JP, Palardy JE, Souza S. Longitudinal studies of inter-alpha inhibitor proteins in severely septic patients: A potential clinical marker and mediator of severe sepsis. Crit Care Med 35(2007): 87-392.
160. Oshaughnessy KM, Fu B, Ferraro F, Lewis I, Downing S, Morris NH. Factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in an East Anglian preeclampsia cohort. Hypertension 33(1999): 1338–1341.
161. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: Enhancement by angiotensin II. Proc Natl Acad Sci USA 94(1997): 14483–14488.
162. VanPampus MG, Wolf H, Mayruhu G, Treffers PE, Bleker OP. Long-term follow-up in patients with a history of (H)ELLP syndrome. Hypertens Pregnancy 20(2001): 15-23.
163. Potempa J, Kwon K, Chawla R, Travis J. Inter-a-trypsin Inhibitor - Inhibition spectrum of native and derived forms. J Biol Chem 264(1989): 15109–15114.
164. Powers RW, Minich LA, Lykins DL, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate, and susceptibility to preeclampsia. J Soc Gynecol Invest 6(1999): 74–79.
165. Rajkovic A, Mahomed K, Rozen R, Malinow MR, King IB, Williams MA. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T polymorphism, plasma folate, vitamin B(12) concentrations, and risk of preeclampsia among black African women from Zimbabwe. Mol Genet Metab 69(2000): 33–39.
166. Ramsay JE, Greer I, Sattar N. Obesity and reproduction. BMJ 333(2006): 1159-1162.
167. Rath W. Das HELLP-Syndrom - eine interdisziplinäre Herausforderung. Dt Ärztebl 95(1998): 2997-3002.

168. Rath W. Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen. Der Gynäkologe 32(1999): 432-442.
169. Rath W, Faridi A, Dudenhausen JW. HELLP Syndrome. J Perinat Med 28(2000): 249-260.
170. Raynes JG, Eagling S, McAdam KPWJ. Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cells: differential regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. Clin Exp Immunol 83(1991): 448-491.
171. Rebelo I, Carvalho-Guerra F, Pereira-Leite L, Quintanilha A. Comparative study of lactoferrin and other blood markers of inflammatory stress between preeclamptic and normal pregnancies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 64(1996): 167–173.
172. Redman CWG, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. Am J Obstet Gynecol 180(1999): 499-506.
173. Rehm H. Proteinbiochemie/Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag. 5.Auflage(2005).
174. Reister F, Heyl W, Kaufmann P, Rath W. Die gestörte Trophoblastinvasion bei Präeklampsie - eine Übersicht über neue Erkenntnisse zur Ätiologie. Geburtsh Frauenheilk 58(1998): 625-631.
175. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. Am J Obstet Gynecol 161(1989): 1200–1204.
176. Rodie VA, Freeman DJ, Sattar N, Greer IA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease: metabolic syndrome of pregnancy? Atherosclerosis 175(2004): 189–202.
177. Roes EM, Sieben R, Raijmakers MT, Peters WH, Steegers EA. Severe preeclampsia is associated with a positive family history of hypertension and hypercholesterolemia. Hypertens Pregnancy 24(2005): 259-271.
178. Sacks GP, Studena K, Sargent IL, Redman CW. CD11b expression on circulating neutrophils in pre-eclampsia. Clin Sci (Lond) 93(1997): 187–189.
179. Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. Am J Obstet Gynecol 179(1998): 80–86.
180. Salier JP, Rouet P, Raguenez G, Daveau M. The inter-α-inhibitor family: from structure to regulation. Biochem J 315(1996): 1–9.

181. Samuels-Kalow ME, Phil M, Funai EF, Buhimschi C, Norwitz E, Perrin M, Calderon-Margalit R, Deutsch L, Paltiel O, Friedlander Y, Manor O, Harlap S. Prepregnancy body mass index, hypertensive disorders of pregnancy, and long-term maternal mortality. Am J Obstet Gynecol 197(2007): 490.e1-490.e6.
182. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1–7): an update. Regul Peptides 91(2000): 45–62.
183. Saraiva MJM. Transthyretin Mutations in Hyperthyroxinemia and Amyloid Diseases. Hum Muta 17(2001): 493-503.
184. Schmidt RF, Thews G, Lang F. Blutplasma. Physiologie des Menschen. Springer-Verlag. 28.Aufl.(2000): 412-417.
185. Schneider H. Liver pathology within the scope of HELLP syndrome. Arch Gynecol Obstet 255(1994): 245-254.
186. Schönland SO. Fortschritte in der Diagnostik und Therapie der Amyloidosen. Dt Ärzteblatt 103(2006): 2237-2244.
187. Sellar GC, Jordan SA, Bickmore WA, Fantes JA, VanHeyningen V, Whitehead AS. The human serum amyloid A protein (SAA) superfamily gene cluster: mapping to chromosome 11p15.1 by physical and genetic linkage analysis. Genomics 19(1994): 221–227.
188. Serrano NC, Casas JP, Díaz LA, Páez C, Mesa CM, Cifuentes R, Monterrosa A, Bautista A, Hawe E, Hingorani AD, Vallance P, López-Jaramillo P. Endothelial NO Synthase Genotype and Risk of Preeclampsia. Hypertension 44(2004): 702-707.
189. Shaamash AH, Elsnosy ED, Makhlouf AM, Zakhari MM, Ibrahim OA, El-dien HM. Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. Int J Gynaecol Obstet 68(2000): 207–214.
190. Shen B, Harrison-Bernard LM, Fuller AJ, Vanderpool V, Saifudeen Z, El-Dahr SS. The Bradykinin B2 Receptor Gene Is a Target of Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling. J Am Soc Nephrol 18(2007): 1140–1149.
191. Sibai BM. Diagnosis, Controversies, and Management of the Syndrome of Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count. Obstet Gynecol 103(2004): 981-991.
192. Sibai BM. Imitators of severe preeclampsia. Obstet Gynecol 109(2007): 956-966.
193. Sibai BM. Preeclampsia: An inflammatory syndrome? Am J Obstet Gynecol 191(2004): 1061-1062.

194. Sibai BM, Caritis S, Hauth J. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. What we have learned about preeclampsia. Semin Perinatol 27(2003): 239-246.

195. Sinz A, Bantscheff M, Mikkat S, Ringel B, Drynda S, Kekow J, Thiesen HJ, Glocker MO. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactiv arthritis or osteoarthritis. Electrophoresis 23(2002): 3445- 3456.

196. Sipe JD. Amyloidosis. Annu Rev Biochem 61(1992): 947-975.

197. Skidgel RA, Alhenc-Gelas F, Campbell WB. Regulation of Cardiovascular Signaling by Kinins and Product of Similar Converting Enzyme System. Am J Physiol Heart Circ Physiol 284(2003): 1886–1891.

198. Smith GC, Pell JP, Walsh D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. Lancet 357(2001): 2002–2006.

199. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol 177(1997): 1395–1401.

200. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. Am J Obstet Gynecol 177(1997): 57–65.

201. Söberg EM, Fries E. Biosynthesis of Bikunin (Urinary Trypsin Inhibitor) in Rat Hepatocytes. Arch Biochem Biophys 295(1992): 217–222.

202. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, Kubo T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. J Med Genet 34(1997): 525–526.

203. Steinborn A, Rebmann V, Scharf A, Sohn C, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-DR levels in the maternal circulation of normal and pathologic pregnancy. Am J Obstet Gynecol 188(2003): 473-479.

204. Strand S, Strand D, Seufert R, Mann A, Lotz J, Blessing M, Lahn M, Wunsch A, Broering DC, Hahn U, Grischke EM, Rogiers X, Otto G, Gores GJ, Galle PR. Placenta-derived CD95 ligand causes liver damage in hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count syndrome. Gastroenterology 126(2004): 849-858.

205. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time of flight mass spectrometry. R Com in Mass Spectrometry 8(1988): 151-153.

206. Thuong DLT, Tieulié N, Costedoat N, Andreu MR, Wechsler B, Vauthier-Brouzes D, Aumaître O, Piette JC. The HELLP syndrome in the antiphospholipid syndrome: retrospective study of 16 cases in 15 women. Ann Rheum Dis 64(2005): 273-278.

207. Toft JH, Lian IA, Tarca AL, Erez O, Espinoza J, Eide IP, Bjørge L, Draghici S, Romero R, Austgulen R. Whole-genome microarray and targeted analysis of angiogenesis-regulating gene expression (ENG, FLT1, VEGF, PlGF) in placentas from pre-eclamptic and small-for-gestational-age pregnancies. J Matern Fetal Neonatal Med 21(2008): 267-273.

208. Tranquilli AL, Giannubilo SR, Tedeschi E, Bezzeccheri V, Suzuki H, Menegazzi M. Placental expression of nitric oxide synthase during HELLP syndrome: the correlation with maternal-fetal Doppler velocimetry. Acta Obstet Gynecol Scand 84(2005): 849-853.

209. Tschöpe C, Heringer-Walther S, Koch M, Spillmann F, Wendorf M, Hauke D, Bader M, Schultheiss HP, Walther T. Myocardial bradykinin B2-receptor expression at different time points after induction of myocardial infarction. J Hypertens 18(2000): 223-228.

210. Urieli-Shoval S, Cohen P, Eisenberg S, Matzner Y. Widespread Expression of Serum Amyloid A in Histologically Normal Human Tissues: Predominant Localization to the Epithelium. J Histochem Cytochem 46(1998): 1377-1384.

211. Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. Curr Opin Hematol 7(2000): 64-69.

212. Urieli-Shoval S, Shubinsky G, Linke RP, Fridkin M, Tabi I, Matzner Y. Adhesion of human platelets to serum amyloid A. Blood 99(2002): 1224-1229.

213. Valdés G, Neves LAA, Anton L, Corthorn J, Chacón C, Germain AM, Merrill DC, Ferrario CM, Sarao R, Penninger J, Brosnihan KB. Distribution of Angiotensin-(1-7) and ACE2 in Human Placentas of Normal and Pathological Pregnancies. Placenta 27(2006): 200-207.

214. Vascotto C, Salzano AM, D'Ambrosio C, Fruscalzo A, Marchesoni D, DiLoreto C, Scaloni A, Tell G, Quadrifoglio F. Oxidized Transthyretin in Amniotic Fluid as an Early Marker of Preeclampsia. J Prot Res 6(2007): 160-170.

215. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim K, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. Nat Med 12(2006): 642-649.

216. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-converting Enzyme-related Carboxypeptidase. J Biol Chem 277(2002): 14838-14843.

217. Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 102(1995): 20–25.

218. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. J Clin Invest 103(1999): 945–952.

219. Walsh SW. Maternal placental interaction of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. Semin Reprod Endocrinol 16(1998): 93-104.

220. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 266(1994): 2535–2541.

221. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S, Berrebi S, Sasaki M, Corvol P, Lifton RP, Lalouel JM. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. Nat Genet 4(1993): 59-61.

222. Weinstein L. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 142(1982): 159-167.

223. Wilke G, Rath W, Schutz E, Armstrong VW, Kuhn W. Haptoglobin as a sensitive marker of hemolysis in HELLP-syndrome. Int J Gynecol Obstet. 39(1992): 29-34.

224. Wilkins J, Gallimore JR, Tennent GA, Hawkins PN, Limburg PC, VanRijswijk MH, Moore EG, Pepys MB. Rapid Automated Enzyme Immunoassay of Serum Amyloid A. Clin Chem 40(1994): 1284-1290.

225. Wilson BJ, Watson MS, Prescott GJ, Sunderland S, Campbell DM, Hannaford P. Hypertensive diseases in pregnancy and risk of hypertension and stroke in later life: result from cohort study. BMJ 326(2003): 845–851.

226. Wolf G, Wenzel U, Stahl RA, Hüneke B. Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft in: Medizinische Klinik. Urban & Vogel Verlag. 2.Aufl.(2001): 78–86.

227. Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 169(1993): 1316–1320.
228. Yamada T, Kakihara T, Kamishima T, Fukuda T, Kawai T. Both acute phase and constitutive serum amyloid A are present in atherosclerotic lesions. Pathol Int 46(1996): 797-800.
229. Ylikorkala O, Pekonen F, Viinikka L. Renal prostacyclin and thromboxane in normotensive and preeclamptic pregnant women and their infants. J Clin Endocrinol Metab 63(1986): 1307–1312.
230. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. Circ Res 73(1993): 205–209.
231. Yu H, Song Q, Freedman BI, Chao J, Chao L, Rich SS, Bowden DW. Association of the tissue kallikrein gene promoter with ESRD and hypertension. Kidney Int 61(2002): 1030-1039.
232. Zeeman GG, Dekker GA. Pathogenesis of preeclampsia. Clin Obstet Gynecol 35(1992): 317-333.
233. Zhang LJ, Yang M, Ding YL. Bcl-2, TGFbeta1, and apoptosis in placenta tissues in patients with hypertensive disorder complicating pregnancy. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 32(2007): 883-889.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alanin-Aminotransferase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BMI	Body Mass Index
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio)-1-Propan Sulfonat
CHCA	α-Cyano-4-Hydroxy-Cinnamic Acid
CT	Computertomografie
2-DE	2-Dimensional Gel Electrophoresis
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HELLP	Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count
IEF	Isoelektrische Fokussierung
iv	Intravenös
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
m/z	Mass To Charge Ratio
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
SAA	Serum Amyloid A
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SSW	Schwangerschaftswoche
TFA	Trifluoroacetic Acid
TMB	Tetramethylbenzidin
ToF-MS	Time-of-Flight Mass Spectrometry

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Referenzgel für das HELLP-Syndrom.	46
Abb. 2	Differentiell exprimierte Gelbereiche (A - F).	50
Abb. 3	Densitometrische Analyse der Spotvolumina (Box-und-Whisker-Plot).	54
Abb. 4	Konzentrationen des Serum Amyloid A (Box-und-Whisker-Plot).	55
Abb. 5	Vergleich zweier MALDI-ToF-Massenspektren von Plasmaproben.	74
Abb. 6	Verteilungen der Proteinpeaks (Box-und-Whisker-Plot).	76

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Versuchsgruppen für die Proteomanalysen.	29
Tab. 2	Versuchsgruppen für den ELISA-Test.	29
Tab. 3	Patienteninformationen und klinische Parameter der HELLP-Patientinnen.	30
Tab. 4	Laborparameter der HELLP-Patientinnen.	31
Tab. 5	Chemikalien für die 2D-Gelelektrophorese.	31
Tab. 6	Geräte für die 2D-Gelelktrophorese.	32
Tab. 7	Chemikalien zum Picken, In-Gel-Verdau und für die Massenspektrometrie.	33
Tab. 8	Geräte zum Picken, In-Gel-Verdau und für die Massenspektrometrie.	33
Tab. 9	Verwendete Materialien für den ELISA-Test.	33
Tab. 10	Massenspektrometrisch identifizierte Proteine.	47
Tab. 11	Differentiell exprimierte Proteine.	52
Tab. 12	Expressionsunterschiede qualitativ und quantitativ.	52
Tab. 13	Eigenschaften von Bikunin.	61
Tab. 14	Diagnostisches Potential eines Testverfahrens.	77

7.4 Curriculum vitae

Name	Juliane Christine Finke, geborene Heitner
Geburtsdatum	12. Oktober 1980
Geburtsort	Rostock, Deutschland
Sprachkenntnisse	Englisch, Französisch, Spanisch, Latein
Seit 10.12.2008	Assistenzärztin, Klinik für Wiederherstellungschirurgie, UniversitätsSpital Zürich (CH), Prof.Dr. Giovanoli
26.11.2008	Promotionsverteidigung an der Universität Rostock
08.11.2008	Basisexamen Chirurgie (FMCH)
09/2007 - 09.12.2008	Assistenzärztin, Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Kantonsspitäler Frauenfeld und Münsterlingen (CH), Dr. Wedler
08/2006 - 08/2007	Assistenzärztin, Chirurgische Klinik, Kantonsspital Frauenfeld (CH), Dr. Oehy
06/2006	Drittes Staatsexamen und Approbation, Universität Rostock (D)
01/2006 - 02/2006	Unterassistentin, Klinik für Viszeralchirurgie, UniversitätsSpital Zürich (CH), Prof.Dr. Clavien
12/2005	Unterassistentin, Klinik für Wiederherstellungschirurgie, UniversitätsSpital Zürich (CH), Dr. Künzi
08/2005 - 11/2005	Unterassistentin, Medizinische Klinik Spital Zimmerberg, Horgen (CH), Dr. Federspiel
04/2005 - 07/2005	PJ Universitäts-Frauenklinik, Rostock (D), Prof.Dr. Gerber
03/2005	Zweites Staatsexamen
08/2004 - 02/2005	Forschungssemester, Proteom-Zentrum Rostock (D), Prof.Dr. Glocker
02/2004	Famulatur Gynäkologie, Universität Rostock (D), Prof.Dr. Briese
08 - 09/2003	Famulatur Neurologie, Universität Montpellier (F), Prof.Dr. Touchon
02/2003	Famulatur Kardiologie, Universität Dresden (D), Prof.Dr. Strasser
09/2002	Erstes Staatsexamen
09/2001	Physikum
03 + 08/2000	Praktika Chirurgie + Innere Medizin, KES, Wien (A)
10/1999	Studienbeginn Humanmedizin, Universität Rostock (D)
07/1999	Abitur am Goethegymnasium Rostock (D)

7.5 Publikationen und Kongressteilnahmen

Finke JC, Guggenheim M, Wedler V. Verbrennungen bei älteren Patienten - ein Verlaufsbericht. Schweizerisches Medizin Forum. *In Press*

Heitner JC, Koy C, Kreutzer M, Gerber B, Reimer T, Glocker MO. Differentiation of HELLP patients from healthy pregnant women by proteome analysis – On the way towards a clinical marker set. Journal of Chromatography B 2006;840: 10-19.

Koy C, **Heitner JC**, Woisch R, Kreutzer M, Serrano-Fernandez P, Gohlke R, Reimer T, Glocker MO. Cryodetector mass spectrometry profiling of plasma samples for HELLP diagnosis: An exploratory study. Proteomics 2005;5: 3079-87.

Heitner JC, Koy C, Kreutzer M, Gerber B, Reimer T, Glocker MO. Differentiation of HELLP patients from healthy pregnant women by proteome analysis – On the way towards a clinical marker. Proceedings of the Swiss Proteomics Society 2005; ISBN: 2–9700405–1–4. (Abstract)

Vortrag, 44. Kongress der Schweizerischen Gesellschaft für Plastische, Rekonstruktive und Ästhetische Chirurgie (SGPRAC), Lausanne (CH), 2008

Vortrag, 26. Jahrestagung der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Verbrennungsbehandlungen (DAV), Engelberg (CH), 2008

Vortrag, Symposium Hypertonie in der Schwangerschaft der Deutschen Sektion der “International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy“, Leipzig (D), 2005

Poster, 5. Kongress der Swiss Proteomics Society, Zürich (CH), 2005

Poster, 121. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Hannover (D), 2005

Poster , 38. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Rostock (D), 2005

Poster, 4. Kongress der Swiss Proteomics Society, Bern (CH), 2004

7.6 Thesen

1. Die Proteomanalyse als umfassende Darstellung von Proteinen und Peptiden in Körperflüssigkeiten erlaubt die Erstellung eines Proteinmusters, welches idealerweise für eine Erkrankung oder einen Zustand charakteristisch ist.

2. In dieser Arbeit wurde erstmals ein Proteomics-Ansatz zur Untersuchung des HELLP-Syndroms gewählt. Das HELLP-Syndrom stellt eine schwere Verlaufsform der Präeklampsie dar, dessen Pathogenese bisher ungeklärt ist.

3. Fragestellungen dieser Arbeit waren:
   I. Gibt es ein krankheitsspezifisches Proteinprofil von HELLP-Patientinnen?
   II. Wie können mögliche Unterschiede charakterisiert und quantifiziert werden?
   III. Können diese Ergebnisse diagnostisch, therapeutisch oder prognostisch angewendet werden?

4. Plasmaproben von HELLP-Patientinnen wurden mit denen gesunder Schwangerer verglichen. Von beiden Gruppen wurde zu zwei Zeitpunkten Blut entnommen, einmal zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des HELLP-Syndroms respektive kurz vor der Entbindung (t1) und mindestens sechs Wochen nach der Entbindung (t2).
   Daraus ergaben sich vier Vergleichsgruppen: HELLP (I, n=7), post-HELLP (II, n=7), gesunde Schwangere (III, n=6) und gesunde Mütter (IV, n=6).

5. Diese Plasmaproben wurden mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese in ihre einzelnen Proteinbestandteile aufgetrennt. In der Gelanalyse konnten differentiell exprimierte Gelbereiche zwischen HELLP- und Vergleichsproben detektiert werden.

6. Aus diesen Unterschieden wurde ein Referenzgel generiert, welches ein HELLP-typisches Proteinprofil darstellt.

7. Es wurde eine densitometrische Analyse der differentiell exprimierten Gelbereiche vorgenommen. Die so erhaltenen Daten wurden statistisch ausgewertet. Expressionsunterschiede von sechs Proteinen konnten zwischen der HELLP- und der Vergleichsgruppe als signifikant bestätigt werden.

8. Mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie wurden Proteinspots identifiziert. Folgende Proteine wurden als signifikant über- oder unterexprimiert beim HELLP-Syndrom nachgewiesen: Inter-α-Inhibitor H4, Kininogen 1, Fibrinogen γ, Transthyretin, Haptoglobin und Serum Amyloid A.

9. Der auffälligste Unterschied war eine klare Überexpression von Serum Amyloid A beim HELLP-Syndrom.

10. Diese Überexpression wurde mit einem ELISA-Test gegen humanes SAA validiert und quantifiziert. Dabei wurde die Anzahl der Proben wie folgt erhöht: HELLP (I, n=9), post-HELLP (II, n=7), gesunde Schwangere (III, n=10) und gesunde Mütter (IV, n=7).

11. Es konnte eine signifikante Überexpression von SAA in der HELLP-Gruppe bestätigt werden. Die SAA-Werte in der HELLP-Gruppe lagen ausnahmslos über 3,51 mg/l, während sämtliche SAA-Werte der Kontrollgruppen kleiner als 3,51 mg/l waren. Somit konnte eine klare Trennungslinie zwischen der pathologischen und der physiologischen Gruppe gezogen werden.

12. Mit diesen Ergebnissen ist es nun möglich, die klinische Anwendbarkeit von SAA als einen Marker von einer HELLP-spezifischen Marker-Signatur zu prüfen.

13. Die Quantifizierung der Überexpression von Inter-α-Inhibitor H4, Kininogen 1, Fibrinogen γ und Transthyretin ist erforderlich, um diese als weitere Komponenten einer HELLP-spezifischen Marker-Signatur zu prüfen. Eine so generierte Marker-Signatur könnte daraufhin auf ihren klinischen und präklinischen Vorhersagewert für das HELLP-Syndrom getestet werden.

14. Aufgrund der kleinen Fallzahl ist die Aussagekraft der vorliegenden Daten begrenzt. Dadurch ist die statistische Wertigkeit eingeschränkt. Aus diesem Grund können die Ergebnisse der Experimente allein explorativen Charakter haben und sollten in großen Studien validiert werden.

7.7 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den genutzten Werken entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Winterthur, im Mai 2008 Juliane C. Finke

7.8 Danksagung

Ich möchte hiermit Prof. Dr. med. B. Gerber und Prof. Dr. med. V. Briese für die Vergabe des Promotionsthemas und die freundliche Unterstützung bei der Bearbeitung danken.
Besonders danke ich PD Dr. med. T. Reimer für die intensive Unterstützung, insbesondere bei der Entwicklung des Themas, sowie für entscheidende Hilfestellungen bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. O. Glocker für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, sowohl für wertvolle Anregungen in der Entwicklung der Methodik, der intensiven Betreuung während der Durchführung und Auswertung der Experimente, als auch in der Fertigstellung der Promotion, sowie bei Vorstellungen der Arbeit auf Kongressen und bei Publikationen.
Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. C. Koy, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, für ihre Unterstützung bedanken, für die geduldige Beantwortung zahlreicher Fragen, sowie für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.
Weiterhin danke ich Frau M. Sieb für die Einarbeitung und die wertvollen Hilfestellungen bei der Durchführung und Dokumentation der Experimente, sowie Herrn M. Kreutzer für die Unterstützung bei der sinnvollen Auswertung und Darstellung der elektronischen Daten.
Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. U. Jeschke, Frau Dr. rer. nat. C. Bergemann und Frau Dr. rer. nat. D.-U. Richter für ihre freundliche Unterstützung besonders in der Anfangsphase.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich stets gefördert und gefordert hat, und meinem Mann Burkhard Finke, der mir in allen Lebenslagen unterstützend zur Seite steht.