

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

**Expression der zytotoxischen Proteine Granzym A, B, K und
Perforin in maternalen Lymphozytensubpopulationen
in der Perinatalperiode**

Eine klinisch-experimentelle Studie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



von

Janna Remmersen aus Hamburg

Rostock 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0035-1

Dekan: Prof. Dr. med. habil. Emil Christian REISINGER

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. Johann Christian VIRCHOW (Direktor der Abteilung für Pneumologie der Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinik Rostock)
2. Prof. Dr. med. habil. Bernd GERBER (Direktor der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock)
3. PD Dr. med. habil. Antje PRASSE (Abteilung für Pneumologie der Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinik Freiburg)

Tag der Verteidigung: 12.01.2010

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Adaptation des mütterlichen Organismus während der Schwangerschaft	1
1.1.1 Allgemeine Veränderungen.....	1
1.1.2 Leukozyten-Subpopulationen in der Schwangerschaft und im Puerperium	2
1.1.3 Die Schwangerschaft als immunologisches Paradoxon.....	5
1.2 Apoptose	7
1.3 Apoptoseinduktion durch den Granula-Exozytose-Weg	8
1.3.1 Synthese und Exozytose der Granzyme	8
1.3.2 Die Perforin-induzierte Apoptose	10
1.3.3 Die Granzym A-induzierte Apoptose	12
1.3.4 Die Granzym B-induzierte Apoptose	14
1.3.5 Die Rolle der Granzyme K, M, und H bei der Apoptoseinduktion.....	15
1.4 Fragestellung	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Studiendesign	18
2.1.1 Charakterisierung der Probandinnen	18
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	18
2.1.3 Ablauf der Studie.....	19
2.1.4 Ethikkommission	20
2.2 Laborbestimmungen	21
2.2.1 Blutentnahme	21
2.2.2 Blutbild und Hormonbestimmungen	21
2.2.3 Durchflusszytometrie.....	22
2.4 Statistik	28
3. ERGEBNISSE	30
3.1 Allgemeine Charakteristika der Frauen und Neugeborenen	30
3.2 Blutbild und Hormone	32
3.2.1 Blutbild	32

3.2.2 Hormone	32
3.3 Lymphozyten-Populationen	37
3.3.1 CD4 ⁺ T-Helferzellen und Zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellen.....	37
3.3.2 NK-Zellen, CD3 ⁻ CD8 ⁺ NK-Zellen und NKT-Zellen.....	37
3.4 Verteilung zytotoxischer Proteine in den Lymphozyten-Populationen... 41	41
3.4.1 CD4 ⁺ T-Helferzellen.....	41
3.4.2 Zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellen.....	41
3.4.3 NK-Zellen	41
3.4.4 CD3 ⁻ CD8 ⁺ NK- Zellen.....	42
3.4.5 NKT-Zellen.....	42
3.5 Zusammenhang zwischen Hormonkonzentrationen im Blut und intra- zellulären zytotoxischen Proteinen in Lymphozyten-Subpopulationen.....	49
4. DISKUSSION	50
4.1 Allgemeine Charakterisierung der Probanden	50
4.2 Charakterisierung der Lymphozyten-Subpopulationen	51
4.3 Expression zytotoxischer Proteine in Lymphozyten-Subpopulationen..	53
5. ZUSAMMENFASSUNG	60
6. LITERATURVERZEICHNIS	61
7. ANHANG.....	70
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	70
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	72
7.3 Tabellenverzeichnis	73
7.4 Curriculum vitae.....	74
7.5 Danksagung.....	76
7.6 Eidesstattliche Erklärung	77
8. THESEN ZUR DISSERTATION	79

1. EINLEITUNG

1.1 Adaptation des mütterlichen Organismus während der Schwangerschaft

1.1.1 Allgemeine Veränderungen

Eine Schwangerschaft verursacht bei den werdenden Müttern eine Vielzahl von körperlichen wie seelischen Veränderungen. So kommt es z.B. zu einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von 12,5 kg, der vor allem zwei Ursachen zugrunde liegen, zum einen das fetale Gewicht, Fruchtwasser und Plazenta und zum anderen die Zunahme des Blutvolumens, der Extrazellularflüssigkeit, des Uterus, der Mammae sowie der mütterlichen Fettspeicher [1]. Das maternale Blutvolumen kann während einer Schwangerschaft um bis zu 40% zunehmen. Hierbei kommt es zu einer stärkeren Vermehrung des Plasmavolumens als des Erythrozytenvolumens, welches sich in erniedrigten Werten für Hämoglobin und Hämatokrit widerspiegeln kann [1, 2]. Die Thrombozytenzahlen fallen progressiv im Verlauf der Schwangerschaft, steigen jedoch im Puerperium wieder an [3]. Die Leukozytenzahlen verändern sich differentiell, und werden im Kapitel 1.1.2 näher behandelt. Ebenfalls können ein Anstieg des Herzminutenvolumens, ein Abfall des peripheren Gefäßwiderstandes sowie ein Absinken des arteriellen Blutdruckes beobachtet werden [4].

Zu den in der Schwangerschaft veränderten Hormonen zählen u.a. Östrogen, Progesteron, hCG (humanes Choriongonadotropin) und hPL (humanes Plazentalaktogen). Das hCG, welches vom Trophoblasten gebildet wird, ist für den Erhalt des Corpus luteum graviditatis verantwortlich und erreicht sein Maximum in der 8.-10.SSW [1, 5]. Das Corpus luteum graviditatis selbst bildet das Gestagen Progesteron mit der Funktion, die Schwangerschaft aufrecht zu erhalten, bis die Plazenta diese Aufgabe übernehmen kann [6]. Das Progesteron bewirkt außerdem die Relaxation glatter Muskulatur im Uterus, fördert die Mammaentwicklung, unterdrückt die Milchsekretion während der Schwangerschaft und nimmt Einfluss auf das maternale Immunsystem [1, 7]. Das hPL (humanes Plazentalaktogen, auch humanes Chorionsomatotropin genannt) ähnelt strukturell dem Somatotropin und wird von den Synzytiotrophoblasten gebildet [8]. Seine Sekretion scheint parallel mit dem Wachstum

der Plazenta zu steigen [9]. Das hPL fördert die Lipolyse, antagonisiert Insulinwirkungen und ist somit für die Energieversorgung des Fetus von Bedeutung [10]. Das Steroidhormon Östrogen wird im Follikel, im Corpus luteum, in der Nebennierenrinde, im Fettgewebe (mit Hilfe der Aromatase) und während einer Schwangerschaft auch in der Plazenta produziert. Östrogene stimulieren während einer Schwangerschaft unter anderem das Uterus- und Brustdrüsenwachstum [1] und steigen, wie Progesteron, im Verlauf kontinuierlich auf ein Vielfaches der Ausgangswerte an [1, 11]. Ein wichtiger Vorläufer des Östrogens ist das DHEAS (Dehydroepiandrosteronsulfat), dessen Konzentration während einer Schwangerschaft stark abfällt [11]. Zusätzlich steigen die Cortisol-, Aldosteron-, ACTH- (Adrenocorticotropes Hormon) und CRH- (Corticotropin Releasing Hormone) Werte [12]. Letztere können von der Plazenta synthetisiert werden und sind somit vermutlich an der gesteigerten Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse beteiligt [12]. Postpartal kommt es zu einer schnellen Normalisierung der Werte der oben genannten Hormone [1, 12].

1.1.2 Leukozyten-Subpopulationen in der Schwangerschaft und im Puerperium

Im Jahre 1964 wurde in einer Studie erstmals die Veränderung der Leukozytenzahlen während der Schwangerschaft erwähnt [13]. In einer Studie von Pitkin et al. wurden im Jahre 1979 diese Veränderungen dann im Detail mittels automatisierter Zellzählung anhand von 23 Probandinnen beschrieben [3]. In den ersten beiden Trimestern einer Schwangerschaft lässt sich eine deutliche Leukozytenvermehrung (Leukozytose) beobachten. Bereits im letzten Schwangerschaftsmonat kommt es jedoch zu einem Absinken der Leukozytenzahlen. Dieser Prozess setzt sich postpartal fort, 6 Wochen nach Geburt sind die Leukozytenzahlen nahezu normalisiert [3] (**Abb. 1-1**). Verursacht wird die Leukozytose während der Schwangerschaft vor allem durch einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten, deren absolute Zahl sich während einer Schwangerschaft nahezu verdoppeln kann [3]. Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen wird der erhöhte Cortisolspiegel während der Schwangerschaft angenommen [3].

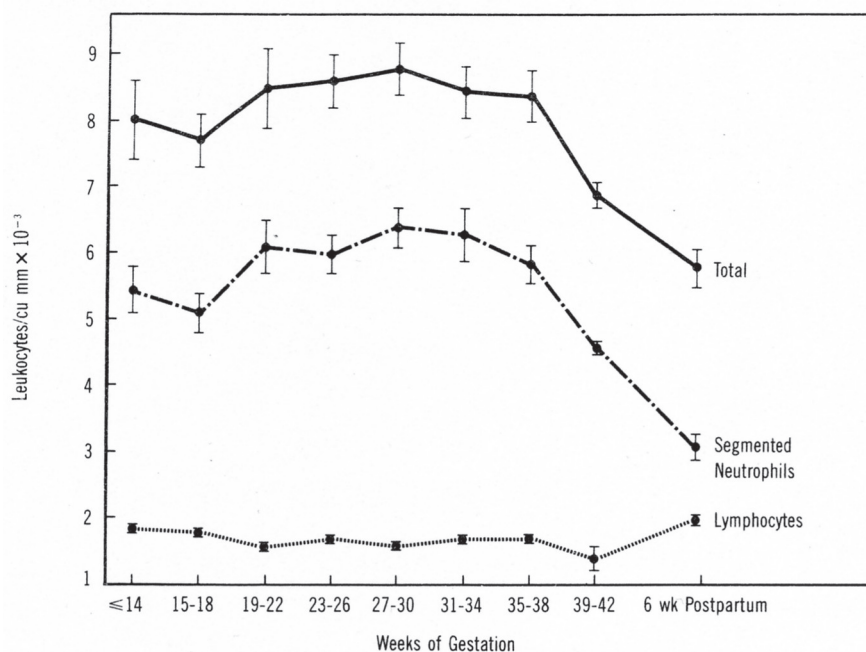


Abb. 1-1: Leukozyten-, Neutrophilen- und Lymphozytenzahlen in der Schwangerschaft

Dargestellt ist die Entwicklung der mittleren Leukozyten-, Neutrophilen- und Lymphozytenzahlen ab der 14. Schwangerschaftswoche bis 6 Wochen post partum. Adaptiert nach Pitkin [3].

In der Studie von Pitkin et al. wurde im letzten Trimenon eine Tendenz zur Monozytose beschrieben [3]. In einer anderen Studie konnten keine Änderungen in der Monozytenzahl bei Schwangeren im Vergleich zu Nicht-Schwangeren festgestellt werden. Es wurde allerdings ein progressiver Anstieg der Monozytenaktivität während der Schwangerschaft verzeichnet, der durch eine gesteigerte Expression der entsprechenden Oberflächenantigene CD11a, CD54 und CD64 zum Ausdruck kam [14]. Ebenfalls konnte eine Aktivitätszunahme der zirkulierenden Granulozyten beobachtet werden, die aber nicht so markant war wie bei den Monozyten [14].

In der Studie von Pitkin et al. wurde die Lymphozytenzahl als weitgehend unverändert während der Schwangerschaft beschrieben [3]. Sechs Wochen post partum kam es zu einem Anstieg der Lymphozytenzahlen [3] (**Abb. 1-1**). Nachteil dieser Studie war jedoch, dass ein direkter Vergleich zu nichtschwangeren Kontrollen fehlte. Auch in der Studie von Watanabe aus dem Jahre 1997 [15] waren die absoluten Lymphozytenzahlen während der Schwangerschaft unverändert, und ein signifikanter Anstieg in den Monaten post partum zu verzeichnen. In letzterer Studie wurden jedoch auch nichtschwangere Kontrollen untersucht. Deren absolute Lymphozytenzahlen (ca. $2,1 \times 10^9$ / Liter Blut) waren signifikant im Vergleich zu den Schwangeren erhöht (ca. $1,8 \times 10^9$ / Liter Blut), jedoch niedriger als die Lympho-

zytenzahlen in den Monaten post partum der Schwangerengruppe (ca. $2,3 \times 10^9$ / Liter Blut) [15]. Somit scheint es in der Schwangerschaft zu einer geringen Erniedrigung, und post partum zu einer geringen Erhöhung der absoluten Lymphozytenzahlen im peripheren Blut zu kommen.

Über die Veränderungen von Lymphozyten-Subpopulationen während der Schwangerschaft finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass bereits die Veränderungen der Gesamt-Lymphozytenzahlen eher marginal sind (siehe oben), so dass die beobachteten Veränderungen der Lymphozyten-Subpopulationen in den verschiedenen Studien im Bereich des statistischen Fehlers liegen könnten. So gibt es Studien, die von einem Abfall [16], einem Anstieg [17] oder unveränderten Zahlen [18] zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen während der Schwangerschaft berichten. In der Studie von Watanabe et al. zeigte sich keinerlei numerische Veränderung der zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen während und nach der Schwangerschaft im Vergleich zu nichtschwangeren Kontrollen [15]. Unterschiedliche Daten liegen auch für die $CD4^+$ T-Helferzellen vor. In einer Studie wurde keine Veränderung [18], in einer anderen ein Absinken [15] der $CD4^+$ T-Helferzellen während der Schwangerschaft beobachtet. Post partum wurde in beiden Studien ein leichter Anstieg der $CD4^+$ T-Helferzellen beschrieben [15, 18]. Auch für die B-Lymphozyten-Zahl während einer Schwangerschaft konnte in verschiedenen Studien keine einheitliche Tendenz festgestellt werden, die B-Lymphozyten-Zahlen sind weitgehend unverändert [15, 18]. Für die natürlichen Killerzellen („NK-Zellen“) ($CD3^-CD16/56^+$) ist die Datenlage in der Literatur relativ einheitlich, wiewohl auch die Veränderungen der NK-Zell-Zahlen als marginal eingestuft werden müssen. In der Frühschwangerschaft wurde ein Anstieg und in der Spätschwangerschaft ein Abfall der Zellzahlen beschrieben. Post partum kommt es wieder zu einem leichten Anstieg der NK-Zell-Zahlen [15, 19, 20]. Für die Natürlichen Killer-T-Zellen („NKT-Zellen“), einer T-Zell-Subpopulation, die über die Oberflächenantigene CD3, CD16 und CD56 verfügt ($CD3^+CD16/56^+$), liegen kaum Daten zur Schwangerschaft vor. Zwei publizierte Studien postulieren einen geringen Anstieg der NKT-Zellzahlen im ersten [20] und im zweiten und dritten Trimenon einer Schwangerschaft [18].

1.1.3 Die Schwangerschaft als immunologisches Paradoxon

Bei einer Organtransplantation erkennt das Immunsystem des Empfängers das Transplantat mit seinen Antigenen als fremd und kann so eine Abstoßungsreaktion induzieren. Während einer Schwangerschaft müsste der Fetus mit seinen zur Hälfte väterlichen Antigenen daher ebenfalls abgestoßen werden. Dies ist jedoch in den meisten Schwangerschaften nicht der Fall. Daher wurde das Konzept der maternal-fetalen Toleranz bereits in den 1950er Jahren von Medawar diskutiert [21]. Er stellte hierzu folgende Hypothesen auf: (1) anatomische Trennung zwischen Fet und Mutter, (2) Unreife des fetalen Gewebes in Bezug auf die Antigenausbildung und (3) immunologische „Trägheit“ (engl. *inertness*) der Mutter [21]. Obwohl keiner dieser Erklärungsversuche gänzlich Bestand hatte, beeinflussten sie die Studien in den nachfolgenden Jahrzehnten nachhaltig. So wurde beobachtet, dass die Plazenta offensichtlich keine zell-impermeable Barriere darstellt, da fetale Zellen während der Schwangerschaft und in einem längeren Zeitraum post partum im mütterlichen Kreislauf sowie maternale Zellen im kindlichen Blut auftraten [22, 23]. Bei 10-30% der schwangeren Frauen bildet das maternale Immunsystem zudem IgG-Antikörper sowie spezifische zytotoxische T-Zellen gegen väterliche HLA (*Human Leukocyte Antigen*) des Feten. Diese können über einen Zeitraum von über 10 Jahren persistieren [24, 25]. Hinweise auf eine Schädigung des Feten hierdurch liegen nicht vor [26]. Nach Tafuri et al. und Jiang et al. deutet dieses daraufhin, dass sich die T-Zell-Aktivität während einer Schwangerschaft verändert. Dies soll dazu beitragen, dass ein Stadium der maternal-fetalen Toleranz erreicht wird [27, 28].

Um sich vor einem Angriff des maternalen Immunsystems zu schützen, bedient sich der heranwachsende Fet einer Vielzahl von Mechanismen. So exprimiert der Trophoblast weder die MHC-(*Major Histocompatibility Complex*)-Moleküle der Klasse II noch die klassischen MHC-Moleküle der Klasse Ia (HLA-A, HLA-B) [29, 30]. Das führt einerseits dazu, dass die zytotoxischen T-Zellen die Trophoblastzellen nicht erkennen können. Andererseits würden die Trophoblastzellen eigentlich durch das Fehlen von MHC-Molekülen der Klasse Ia (HLA-A, HLA-B) Ziel der uterinen (mütterlichen) NK-Zellen werden [31, 32], welche die größte Lymphozyten-Zellpopulation im Uterus darstellen [33]. Dies ist jedoch meistens nicht der Fall: der Trophoblast exprimiert nämlich die MHC-Moleküle HLA-C sowie die nicht-klassischen

MHC-Moleküle der Klasse Ib HLA-E und HLA-G. Die NK-Zellen binden über ihre Rezeptoren an diese MHC-Moleküle und werden dadurch in ihrer Wirkung gehemmt. HLA-G kann zusätzlich zytotoxische T-Zellen binden und inhibieren [34].

Der Trophoblast ist zudem in der Lage, den sogenannten Fas-Liganden (CD95L) (siehe Kap.1.2.) zu exprimieren. Durch Bindung an CD95-exprimierende maternale Lymphozyten kann so deren Apoptose induziert werden [35]. Ein weiterer Mechanismus ist die Expression des Enzyms IDO („Indoleamin-2,3-Dioxygenase“), welches die Aminosäure Tryptophan abbaut. Dadurch wird die maternale T-Zell-Aktivierung inhibiert [36, 37]. Zusätzlich werden von Trophoblasten eine Reihe weiterer Faktoren exprimiert, die eine wichtige Rolle bei der maternal-fetalen Toleranz zu spielen scheinen [38-41].

Obwohl die genannten Mechanismen an der Eliminierung von anti-fetalen Effektor-Zellen mitwirken, lassen Studien darauf schließen, dass während einer Schwangerschaft alloreaktive Lymphozyten im maternalen Immunsystem persistieren können. So zeigte Tafuri et al., dass Mäuse einen Tumor aus väterlichem Gewebe während einer Schwangerschaft tolerierten, ihn nach der Geburt jedoch abstießen [27]. Auffällig ist auch, dass es während einer Schwangerschaft gehäuft zu Remissionen von Autoimmunerkrankungen kommt, und zu Rezidiven post partum [42, 43]. Daher geht man von der Annahme aus, dass zusätzlich zu den oben beschriebenen lokalen Mechanismen weitere systemische Veränderungen im maternalen Immunsystem stattfinden müssen. Eine wichtige Rolle schreibt man hierbei auch den regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^+$) zu, deren Anzahl systemisch im Blut sowie lokal im Uterus während einer Schwangerschaft erhöht ist und post partum wieder abfällt [44-46]. So konnten erniedrigte Werte dieser Zellen bei spontanen Aborten im Vergleich zu induzierten beobachtet werden. Ihr Mitwirken an der maternal-fetalen Toleranz ist daher wahrscheinlich [46, 47].

Des Weiteren kommt es zu einer Verschiebung innerhalb des maternalen Zytokinprofils zugunsten der so genannten T_H2 -Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-10 (welche die humorale Immunantwort fördern), und zu einer geringeren Expression der für die zelluläre Immunantwort wichtigen T_H1 -Zytokine IFN- γ (Interferon- γ), TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) und IL-2. Dadurch scheint sich die Gefahr von Aborten

zu verringern [48-50]. Tierexperimentelle Studien zeigten allerdings, dass IL-4 und IL-10 für eine erfolgreiche Schwangerschaft nicht essentiell sind [51].

Eine Betrachtung der oben beschriebenen Literaturdaten legt die Schlussfolgerung nahe, dass komplexe Immun-Mechanismen eine Aggression des maternalen Immunsystems gegenüber dem Feten verhindern. Hierbei geht es insbesondere um die Inhibition einer durch maternale Zellen induzierten Apoptose der fetalen Zellen, die zur Schädigung bzw. Abstoßung des Feten führen könnten. Die Regulation der Apoptose ist daher von eminenter Bedeutung für die maternal-fetale Toleranz. Diese soll im nächsten Kapitel näher beleuchtet werden.

1.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen („apo“ = „weg“; „ptosis“ = „Fall“) und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst. Die Apoptose, auch der programmierte Zelltod genannt, sorgt im Organismus für ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen der ständig stattfindenden Zellproliferation und dem Eliminieren von schädlichen Zellen (z.B. maligne entarteten oder virusinfizierten) oder überalterten Zellen [52, 53]. Auslöser der Apoptose können zytotoxische Lymphozyten, der Verlust von Zell-Zellkontakten, der Entzug von Wachstumsfaktoren oder Umwelteinflüsse wie z.B. hohe UV- und Röntgenstrahlen sein [54]. Zytomorphologisch kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten, die Zelle verliert den Kontakt zu ihren Nachbarzellen. Die Zellmembran bleibt im Anfangsstadium jedoch unbeschädigt [55]. Weitere Merkmale sind die Kondensation des Chromatins und die Aufspaltung der DNA durch Endonukleasen in 200 Basenpaare große Fragmente sowie in ganzzahlige Vielfache davon. Dadurch entsteht in der Gelelektrophorese das charakteristische Strickleiterphänomen [56]. Phosphatidylserin, welches bei intakten Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ist, wird bei diesem Vorgang externalisiert. In der Spätphase der Apoptose erfolgt die Abschnürung von Teilen der Plasmamembran („*membrane blebbing*“). Aus diesen gehen dann „*apoptotic bodies*“ hervor [55, 57, 58]. Letztere werden anschließend phagozytiert. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es somit zu keiner Entzündung [57].

Apoptose kann von einer Körperzelle selbst ausgelöst werden. Zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen können die Apoptose jedoch auch in verschiedenen Körperzellen von außen induzieren. Letztere Art der Apoptose-Induktion dient unter anderem der Elimination von entarteten oder virusinfizierten Zellen [59]. Zur Initiierung der Apoptose stehen den zytotoxischen Lymphozyten verschiedene Wege zur Verfügung, die jeweils einen Zellkontakt zwischen Effektor- und Zielzelle benötigen [60]. Die zur Apoptose führende Signalkaskade kann zum einen durch so genannte *death*-Rezeptoren ausgelöst werden, einer Subfamilie der TNF-R-Superfamilie. Zu ihnen gehören z.B. Fas (CD95) und TNF-R1, die durch Bindung entsprechender Liganden (Fas-Ligand oder TNF- α) eine Caspasen-Kaskade aktivieren und schließlich mit dem Tod der Zielzelle enden [61]. Dieser Weg spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Immunantwort und der Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten [62]. Eine andere Möglichkeit ist der Granula-Exozytose-Weg, der sich verschiedener Mediatoren, wie Perforin und verschiedener Granzyme, bedient, um den apoptotischen Tod der Zielzelle zu erreichen. Dies kann Caspase-abhängig oder Caspase-unabhängig geschehen [63, 64].

1.3 Apoptoseinduktion durch den Granula-Exozytose-Weg

Der Granula-Exozytose-Weg ist der wichtigste Weg, dessen sich die zytotoxischen Zellen bedienen, um virusinfizierte oder entartete Zellen wirkungsvoll zu eliminieren [65]. Die Granula enthalten neben Perforin verschiedene Granzyme. Letztere sind Serinproteasen, die nach ihrem Speicherort Granzyme („*granule enzyme*“) genannt werden. Beim Menschen sind die Granzyme A, B, H, K und M bekannt, die in T-Lymphozyten, unreifen T-Zellen des Thymus, $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen exprimiert werden [66].

1.3.1 Synthese und Exozytose der Granzyme

Die Granzyme können in drei Subfamilien gemäß ihrer Gen-Loci und Substratspezifitäten (**Tab. 1-1**) eingeteilt werden. Beim Menschen sind die Gene der Granzyme A und K (GrA; GrK) auf dem Chromosom 5 im Bereich 5q11-q12 lokalisiert.

siert [67, 68]. Die Granzym B- und H-Gene (GrB; GrH) sind mit weiteren Serinproteasegenen, wie z.B. für Cathepsin G, auf dem Chromosom 14 in der Region 14q11-q12 zu finden [69]. Das Gen für Granzym M (GrM) ist mit den Genen für die Neutrophile Elastase und für die Proteinase 3 auf dem Chromosom 19p13.3 assoziiert [69].

Alle Granzym-Gene bestehen aus fünf Exons. Das Exon 1 kodiert dabei die „leader“-Sequenz und die Exons 2, 3 und 5 die Aminosäurenreste der katalytischen Triade. Die Granzyme ähneln strukturell der Serinprotease Chymotrypsin und besitzen eine katalytische Triade, die aus einem Histidin-, Aspartat- und Serinrest besteht [69]. Sie werden als inaktive Enzymvorstufen im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und anschließend über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in die zytotoxischen Granula geschleust [70]. Bei diesem Vorgang werden durch die Dipeptidyl Peptidase I (Cathepsin C) zwei aminoternale Aminosäurenreste der Zymogene abgespalten, so dass aktive Granzyme entstehen [71].

Die Aktivität der Granzyme wird durch den sauren pH-Wert von 5,1-5,4 innerhalb der Granula gehemmt [72, 73]. In den Granula kann eine Kernregion von einer äußeren lysosomalen Region unterschieden werden. Die elektronendichte Kernregion enthält zusätzlich zu den Granzymen und Perforin Proteoglykanchondroitinsulfat (Serglycin). Im sauren Milieu der Granula ist das Serglycin durch seine negative Ladung in der Lage, die positiv geladenen Granzyme zu binden [66, 74]. Die Bindung zwischen Serglycin und Perforin ist aufgrund seiner geringeren Alkalität im Vergleich zu den Granzymen labiler [75].

Die Granula der zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen scheinen wahllos in dem Zytoplasma verteilt zu sein, bis es zum Kontakt mit einer Zielzelle über den jeweiligen Antigen-Rezeptor kommt [66]. Der Kontakt zwischen zytotoxischer Zelle und Zielzelle wird als „immunologische Synapse“ bezeichnet [76] (**Abb. 1-3**). Die immunologische Synapse besteht aus zwei Bereichen, der Signaldomäne mit dem Antigenrezeptor und der sekretorischen Domäne, mit der die Membran der Granula fusioniert, um ihren zytotoxischen Inhalt in den synaptischen Spalt zu entleeren [77, 78]. Die Stabilität der Synapse wird durch einen Ring aus Adhäsionsmolekülen wie z.B. ICAM-1 und LFA-1 unterstützt [76, 79]. Nach Zellkontakt löst die Polarisation des „*microtubule-organizing centre*“ (MTOC) die Migration der zytotoxischen Granula

entlang der Mikrotubuli in Richtung immunologischer Synapse und somit der Zielzelle aus (**Abb. 1-2**) [66, 80].

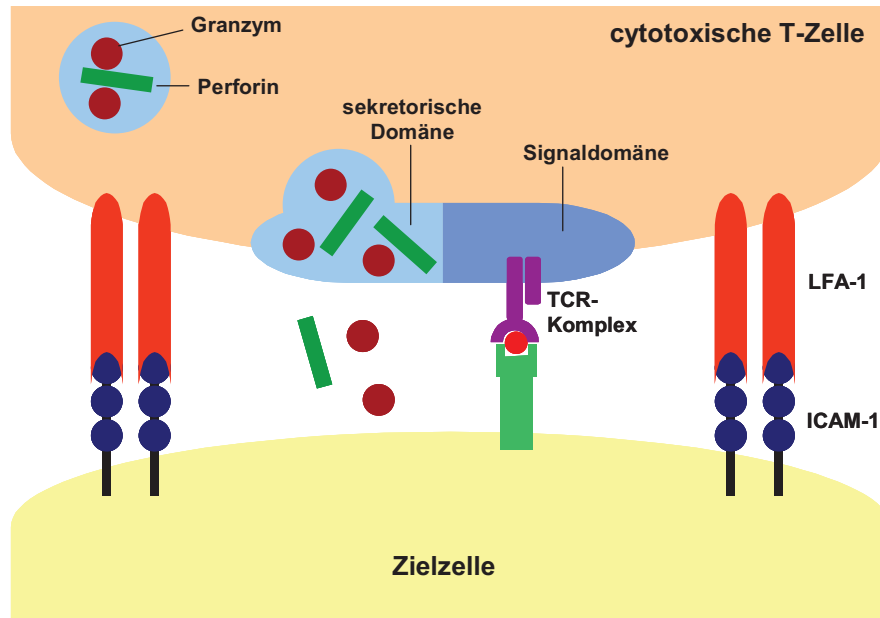


Abb. 1-2: Interaktion von zytotoxischen Zellen mit Zielzellen

Dargestellt ist eine immunologische Synapse zwischen einem zytotoxischen T-Lymphozyten und seiner Zielzelle. (TCR \triangleq T cell receptor; ICAM-1 \triangleq intracellular adhesion molecule; LFA-1 \triangleq leukocyte function-associated antigen 1). Adaptiert nach Bratke [81]

1.3.2 Die Perforin-induzierte Apoptose

Perforin ist ein Protein der zytotoxischen Granula. Sein Genlocus befindet sich auf dem Chromosom 10 in der Region 10q22 [82]. Vergleichbar mit den Granzymen wird Perforin als inaktives Zymogen mit einer „leader sequence“ synthetisiert. Seine Aktivität erlangt es nach Abspaltung der letzten Aminosäuren zusammen mit einer carboxyterminalen Glykangruppe [83]. Nach seiner Sekretion in den synaptischen Spalt integriert es sich in die Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran der Zielzelle, um dort durch Polymerisation Poren auszubilden [84]. Diese Vorgänge sind Ca^{2+} -abhängig [85, 86]. Die Integration des Perforins in die Zellmembran wird durch einen zentralen Bereich seiner Sequenz ermöglicht, der strukturelle Ähnlichkeiten zu der Komplementkomponente C9 aufweist und in der Form einer α -Helix vorliegt [87]. Unterstützt wird dies vermutlich durch die N-terminale Perforinsequenz, die lytische Aktivität besitzen soll [88, 89]. Die letzten carboxyterminal gelegenen 200

Aminosäuren bezeichnen eine „*epidermal growth factor-like Domäne*“ und eine Ca^{2+} -abhängige Membranbindungsdomäne (C2-Domäne) [90]. Kommt es zur Bindung von Calciumionen an diese C2-Domäne, vereinfacht dies die Bindung der C2-Domäne an die Phospholipidmembran. Somit ist die C2-Domäne verantwortlich für die Membranbindung des Perforins [91, 92].

Zum Selbst-Schutz der zytotoxischen Zelle vor Perforin wird Perforin nach seiner Synthese im Endoplasmatischen Retikulum an seinen Inhibitor Calreticulin (**Tab.1-2**), ein Chaperon, gebunden. Dieses wirkt sich stabilisierend auf die Granulamembran aus [93, 94]. Der saure pH-Wert der zytotoxischen Granula führt zur Protonation der Ca^{2+} -bindenden Aspartatreste der C2-Domäne, folglich verlieren diese ihre Fähigkeit, Ca^{2+} -Ionen und damit die Zellmembran zu binden [90, 95]. Ein weiterer Bestandteil der Granula ist das Cathepsin B (Tab.1-2). Dieses wird bei Aktivierung der zytotoxischen Zelle an dessen Zelloberfläche transportiert und inaktiviert dort Perforin durch Spaltung, um auf diesem Wege die Autolyse der zytotoxischen Zelle während der Exozytose zu verhindern [96].

Ursprünglich ging man von der Annahme aus, dass der apoptotische Tod der Zielzelle aufgrund der membranpermeabilisierenden Wirkung des Perforins erfolgt. Das Resultat wäre die osmotische Instabilität und die Zellyse [86]. Aufgrund gewonnener Erkenntnisse um die Beteiligung der Granzyme an der Apoptose, vermutete man die Passage der Granzyme durch Perforin-Poren in das Zytosol der Zielzelle [97, 98]. In mehreren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass Granzyme in Abwesenheit von Perforin endozytiert werden. Zur Apoptose kam es erst, als Perforin ko-inkubiert wurde. Da GrB-Mikroinjektionen ins Zytosol perforin-unabhängig Apoptose auslösen konnten, wurde angenommen, dass der Hauptwirkort des Perforins die Endosomenmembran und weniger die Zellmembran ist und so die Freisetzung der Granzyme ins Zytosol bewirkt [99-102]. Bekannt ist auch, dass endosomolytisch wirkende bakterielle Toxine oder virale Partikel in Kooperation mit Granzymen Apoptose induzieren können [101, 103]. Die perforin-unabhängige Endozytose von GrB ins Zytosol der Zielzellen kann außerdem durch den Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (CI-MPR) vermittelt werden [104].

Einer neueren Hypothese liegt die Annahme zugrunde, dass Perforin für kleine Poren in der Zellmembran der Zielzelle verantwortlich ist, wodurch ein Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle erfolgt. Dieser Ca^{2+} -Einstrom aktiviert wiederum die „*membrane repair response*“, bei der zelleigene Vesikel der Zielzelle (wie Endosomen und Lysosomen) die zerstörte Plasmamembran wieder mit ihren eigenen Membranen verschließen [105-107]. Diese Membranbereiche werden als große Blasen sichtbar. Daraufhin erfolgt vermutlich eine begleitende Endozytose von Granzymen und Perforin aus dem synaptischen Spalt in große Endosomen, mit anschließender perforinvermittelter Freisetzung der Granzyme in das Zytosol [105, 108]. Letztere soll dann die Apoptose der Zielzelle auslösen. Die genaue Wirkungsweise des Perforins ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

1.3.3 Die Granzym A-induzierte Apoptose

Die Granula der zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen enthalten die Serinprotease GrA, die als einziges Granzym *in vivo* als Homodimer vorliegt [109]. Sie wird nach Antigenkontakt in den synaptischen Spalt freigesetzt, um perforinabhängig den Zelltod zu induzieren [110]. Dies geschieht jedoch im Gegensatz zum GrB-vermittelten Zelltod Caspasen-unabhängig und kann auch nicht durch Bcl-2- (*B-cell lymphoma 2*)-Überexprimierung inhibiert werden [111]. Typische morphologische Merkmale der Apoptose, wie z.B. Chromatinkondensation und Kernfragmentierung, können innerhalb weniger Stunden beobachtet werden [111-113]. Für die GrA-induzierte Apoptose sind die Erzeugung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) sowie der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials charakteristisch. Es kommt weder zur Spaltung von Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) noch zu der Freisetzung von Cytochrom c sowie anderer mitochondrialer apoptotischer Mediatoren [114, 115].

Ein wichtiger Angriffsort des GrA ist der sogenannte „SET-Komplex“ (**Abb. 1-3**), der vermutlich eine Rolle bei der Reparatur von DNA spielt [115]. Die Translokation des SET-Komplexes in den Nukleus wird durch die GrA-induzierte Generierung von ROS verursacht [113, 114]. Bisher bekannte Proteine des SET-Komplexes sind das *DNA binding protein* HMG-2 (*high-mobility group protein 2*), das Tumorsuppressorprotein pp32, TREX1 (*three prime repair exonuclease 1*), das *nucleosome assembly protein*

SET, die Endonuklease Ape1 (*apurinic/aprimidinic endonuclease 1*) und die Endonuklease NM23-H1 [113, 116-118]. SET, HMG-2 und Ape1 sind Substrate des GrA. NM23-H1 wird durch die Spaltung ihres Inhibitors SET aktiviert und führt so zu Einzelstrangbrüchen der DNA [117]. Darauf basierend spaltet die Exonuklease TREX1 von diesen Einzelsträngen Nukleotide ab, um den Abbau zu forcieren und einer Reparatur entgegenzuwirken. Im Gegensatz zu NM23-H1 wird TREX1 nicht von SET inhibiert [118]. Zusätzlich verliert die Zielzelle durch Inaktivierung ihrer Endonuklease Ape1 ein wichtiges Enzym der DNA-Reparatur [113]. Die Zerstörung verschiedener Lamine, des Linker-Histons H1 sowie die Spaltung der Core-Histone in kleine Fragmente trägt ebenfalls zur Destabilisierung der Chromatinstruktur bei [112, 119].

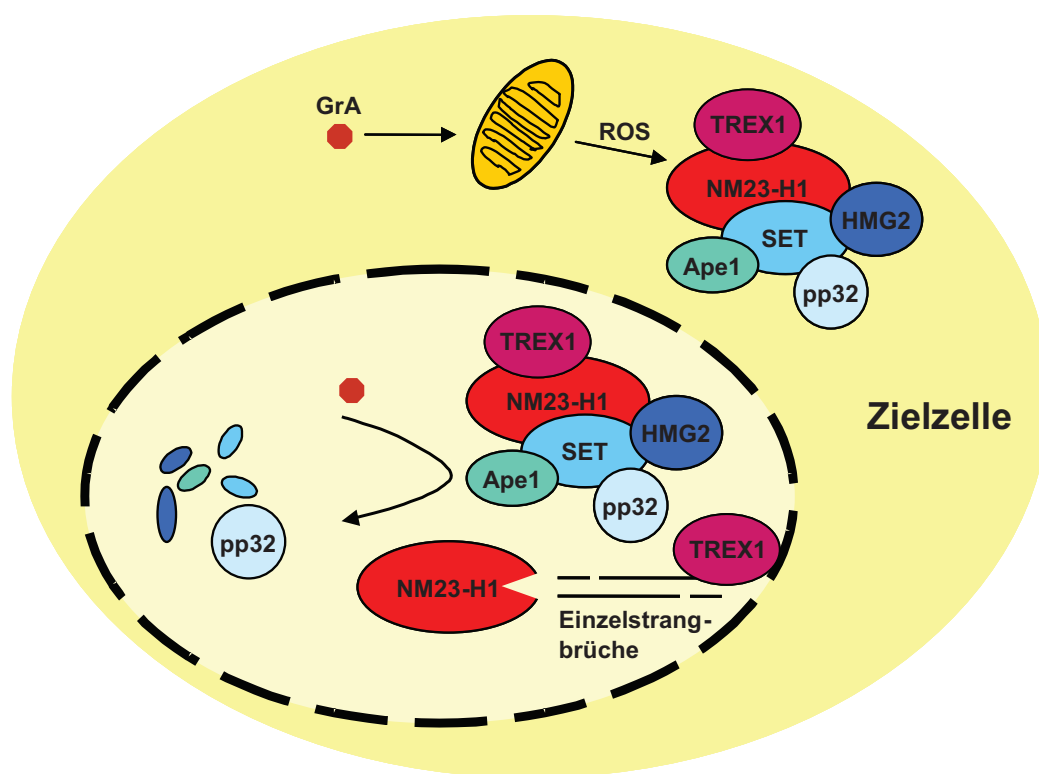


Abb. 1-3: Der Granzym A-vermittelte Zelltod

GrA induziert die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials. Die ROS bewirken die Translokation des SET-Komplexes in den Nukleus, wo GrA die Proteine HMG-2, Ape1 und SET spaltet. Daraufhin kann die Endonuklease NM23-H1 Einzelstrangbrüche der DNA verursachen, welche von der Exonuklease TREX1 weiter abgebaut werden. Adaptiert nach Bratke [81]

1.3.4 Die Granzym B-induzierte Apoptose

GrB ist ein wichtiger Initiator der Apoptose und kann diese sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig einleiten (**Abb. 1-4**). So kommt es bei ersterem zur Aktivierung einer Caspasenkaskade, bei der die Vorstufen der Caspasen 3, 6, 7, 8, 9 und 10 proteolytisch gespalten werden. Diese Caspasenkaskade führt zur Zellyse [120, 121]. Die Aktivierung der Caspase-3 erfolgt dabei in zwei Schritten. GrB spaltet die Procaspase-3 in die Untereinheiten p20 und p10. Erstere wird autokatalytisch weiter in p19 und p17 geteilt, so dass ein aktives Dimer aus p17 und p10 entsteht [122]. Die Caspase-3 inaktiviert unter anderem die Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP), ein DNA-Reparaturenzym, sowie den Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD) (**Abb. 1-4**). Das Resultat ist die DNA-Fragmentierung und Apoptose der Zielzelle [123, 124]. Als weiteres Substrat der Caspase-3 konnte Gelsolin identifiziert werden, das ebenso wie α -Tubulin, ein Substrat von GrB, an dem Erhalt des Zytoskelettes beteiligt ist [125, 126]. Zusätzlich verfügt GrB über die Fähigkeit, ICAD und PARP sowie weitere Caspase-Substrate direkt zu spalten [76].

Bei dem Caspase-unabhängigen-Weg kommt es über die Zerstörung des mitochondrialen Transmembranpotentials zur Freisetzung von Cytochrom c. Hierbei kann man nicht die typische Fragmentierung der DNA und die Externalisation von Phosphatidylserin beobachten, so dass der Zelltod eher einer Nekrose ähnelt [127]. Zur Initiierung dieses mitochondrialen Weges wird Bid durch GrB gespalten. Das daraus resultierende Fragment gtBid interagiert zusammen mit Bax (*Bcl-2-associated X protein*) mit der Mitochondrienmembran und führt so zur Freisetzung von Cytochrom c [128]. *In vivo* kommt es zusätzlich zur Bildung des so genannten Apoptosomes, bestehend aus freiem Cytochrom c, APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) und Procaspase-9 (**Abb. 1-4**). In der Anwesenheit von ATP/dATP kann aus diesem Komplex die aktive Caspase-9 hervorgehen und ihrerseits die Procaspase-3 aktivieren. Folglich ist der mitochondriale Weg in der Lage, das Signal der Caspasenkaskade zu verstärken [129].

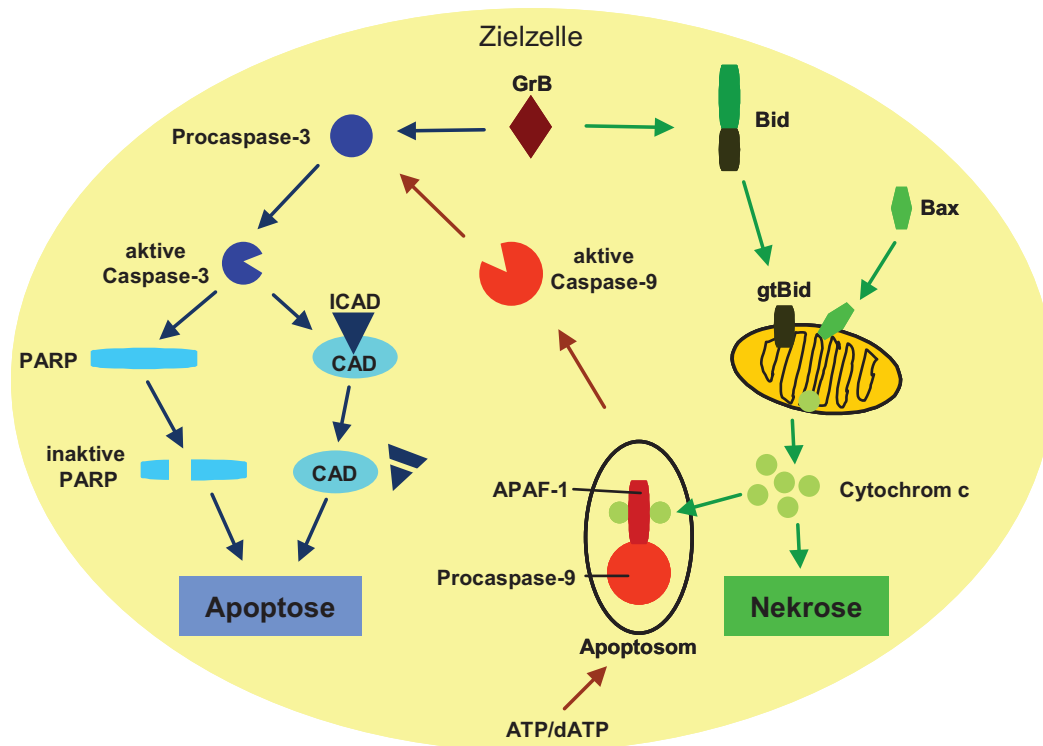


Abb. 1-4: Der Granzym B-vermittelte Zelltod

GrB kann direkt die Procaspase-3 spalten und aktivieren. Diese spaltet die Poly(ADP-Ribose)polymerase und den Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD) mit dem Resultat der DNA-Fragmentierung und Apoptose der Zielzelle. Die GrB-vermittelte Spaltung von Bid führt im Zusammenspiel mit Bax zum Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials und anschließender Freisetzung von Cytochrom c. Durch Inhibition des Caspase-Weges kommt es zum nekrotischen Zelltod der Zielzelle. Freies Cytochrom c bildet mit APAF-1 und der Procaspase-9 das Apoptosome. In Gegenwart von ATP/dATP kann daraus die aktivierte Caspase-9 hervorgehen und ihrerseits die Procaspase-3 aktivieren. Adaptiert nach Bratke [81]

1.3.5 Die Rolle der Granzyme K, M, und H bei der Apoptoseinduktion

Im Gegensatz zu GrA und GrB gibt es derzeit vergleichsweise wenige Studien über die Granzyme K, M, und H. Bekannt ist aber mittlerweile, dass GrK einen caspase-unabhängigen Zelltod der Zielzelle mit den morphologischen Merkmalen Externalisierung von Phosphatidylserin, Chromatinkondensation und Einzelstrangbrüche der DNA induziert [130]. GrK bewirkt die Generierung von ROS sowie den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials [131]. Wie auch bei GrA (vgl. Kap.1.3.2.) sind SET, HMG-2 und Ape1 Substrate für GrK. So wird auch bei GrK durch Spaltung von SET die Aktivität der Endonuklease NM23-H1 freigesetzt, um Einzelstrangbrüche der DNA zu induzieren [130]. Durch die GrK-vermittelte Spaltung von Ape1 verliert dieses seine Funktion als DNA-Reparaturenzym und fördert vermutlich zusätzlich die ROS-Akkumulation [132]. Anders als beim GrA-induzierten

Zelltod, kommt es bei der GrK-induzierten Apoptose zur Spaltung von Bid und daraus resultierender Freisetzung von Cytochrom c ähnlich dem GrB-induzierten Zelltod [131].

Auch GrM und GrH können den Tod von Zielzellen induzieren [133, 134]. Dieses scheint in beiden Fällen caspase-abhängig zu geschehen. In verschiedenen Studien wurde sowohl für den GrM- sowie den GrH-induzierten Zelltod eine DNA-Fragmentierung, die Spaltung von ICAD, die Erzeugung von ROS, der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie die Freisetzung von Cytochrom c beschrieben [134-137]. Als Substrat von GrH konnte zudem Bid identifiziert werden [137]. GrM und GrH scheinen vor allem eine Rolle im NK-Zell-vermittelten Zelltod zu spielen [138, 139]. Außerdem wurde beobachtet, dass GrH ein adenovirales Protein spalten kann, welches wiederum GrB inhibiert, und somit in der Lage ist, die Funktion von GrB wieder herzustellen [140].

1.4 Fragestellung

Die komplexen Immun-Mechanismen, die eine Aggression des maternalen Immunsystems gegenüber dem Feten verhindern, sind bislang wenig verstanden. Die Inhibition einer durch maternale Zellen induzierten Apoptose fetaler Zellen scheint hierbei jedoch eine besondere Rolle zu spielen. Bemerkenswerterweise gibt es zur Expression Apoptose-induzierender Proteine maternaler Lymphozyten-Subpopulationen während und nach der Schwangerschaft bislang keine Literaturdaten. Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, die Expression der wichtigsten zytotoxischen Proteine (Perforin, Granzym A, Granzym B, Granzym K) an zwei Zeitpunkten vor der Geburt als auch an zwei Zeitpunkten nach Geburt in schwangeren Frauen zu untersuchen und diese Expressionsmuster mit einer Kontrollgruppe nichtschwangerer Frauen zu vergleichen. Die Expression der zytotoxischen Proteine sollte systematisch in verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen ($CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, $CD3^-CD8^+$ NK-Zellen) des peripheren Blutes der Schwangeren und Nichtschwangeren charakterisiert werden. Schließlich sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der möglicherweise veränderten Expression dieser Proteine und hormonellen Veränderungen in der Schwangerschaft besteht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

2.1.1 Charakterisierung der Probandinnen

Es handelte sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine prospektiv durchgeführte Studie. Die Rekrutierung der 20 schwangeren Probandinnen erfolgte von April bis August 2004 in der Hebammenpraxis Falmann/Frank/Hübel/Nitschke in Rostock (Doberaner Straße 6, 18057 Rostock). Die Frauen im Alter zwischen 22 und 35 Jahren befanden sich zum Zeitpunkt der Kontaktaufnahme in der 30. Schwangerschaftswoche (SSW). Sie nahmen in der Hebammenpraxis ihren ersten Termin eines geburtsvorbereitenden Kurses wahr.

Bei diesem Treffen wurden die schwangeren Frauen in einem ca. 15-minütigen Gespräch ausführlich über die Studie und ihren geplanten Ablauf informiert. Erteilten die Frauen nach dieser Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis, wurden sie bei Erfüllung der Einschlusskriterien und Nichtzutreffen der Ausschlusskriterien in die Studie aufgenommen. Sie erhielten eine Aufwandsentschädigung von 10 €.

Die Studie sah den Einsatz einer Kontrollgruppe vor. Hierfür wurden Frauen im Alter von 21 bis 34 Jahren aus dem Freundes- und Bekanntenkreis gebeten, an der Studie teilzunehmen. Die Rekrutierung dieser Probandinnen erfolgte im gleichen Zeitraum wie die der schwangeren Frauen. Sie erhielten keine Aufwandsentschädigung.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

An dieser Studie konnten schwangere Frauen im Alter von 20 bis 35 Jahren, die sich in der 30. Schwangerschaftswoche befanden, teilnehmen. Nichtschwangere Frauen konnten im Alter von 20 bis 35 Jahren an dieser Studie teilnehmen.

Ausschlusskriterien waren das Vorliegen von chronischen sowie malignen Erkrankungen ebenso wie eine regelmäßige Medikamenteneinnahme. Die Einnahme

von Kontrazeptiva war kein Ausschluss-Kriterium für die Teilnahme an dieser Studie. Diese Kriterien galten sowohl für die schwangeren als auch für die nichtschwangeren Probandinnen.

2.1.3 Ablauf der Studie

Für die Teilnahme der Probandinnen an der Studie mussten folgende Bedingungen erfüllt werden: 1. die schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie, 2. das Zutreffen der Ein- und Ausschlusskriterien. Des Weiteren waren vier Treffen mit den schwangeren Frauen geplant. Für die Kontaktaufnahme in der Hebammenpraxis war ein Termin vorgesehen, der um die 30.SSW lag. Auf dieses erste Treffen mit den Schwangeren folgten weitere in der 37.SSW, der ersten Woche nach Geburt und der 8. Woche nach Geburt (jeweils in der Häuslichkeit) (**Abb. 2-1**).

Zum Zeitpunkt der Kontaktaufnahme wurden die Frauen um folgende Angaben gebeten: Name, Geburtsdatum, Adresse, Telefonnummer, Körpergröße, Körpergewicht (wurde zu jedem Zeitpunkt abgefragt) und errechneter Geburtstermin. Eine Woche nach der Geburt füllten die Frauen einen Fragebogen aus, aus dem Informationen zur Geburt und zum Neugeborenen entnommen werden konnten: Art und Dauer der Geburt, Auffälligkeiten während der Schwangerschaft oder der Geburt, Geschlecht des Neugeborenen sowie Geburtsgewicht und -größe. Zum letzten Zeitpunkt 8 Wochen nach Geburt gaben die Mütter in einem weiteren Fragebogen Auskunft über eventuell bei ihnen aufgetretene Infektionen bzw. andere Krankheiten und/oder über die regelmäßige Einnahme von Medikamenten während der Studie.

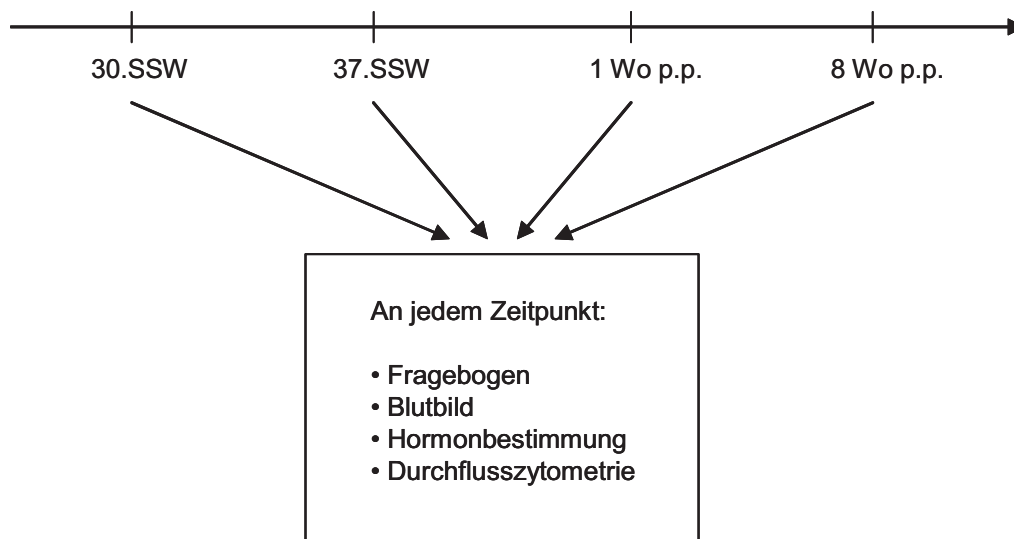


Abb. 2-1: Studiendesign der Schwangerengruppe

Dargestellt sind die 4 Zeitpunkte, an denen die Schwangeren jeweils einen Fragebogen ausfüllten sowie Blutbild-, Hormonbestimmungen und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt wurden.

An jedem der vier Zeitpunkte erfolgte eine Blutentnahme (**Abb. 2-1; siehe Kap. 2.2**). Wie erbeten, meldeten sich alle Frauen nach der Geburt zuverlässig telefonisch, so dass die Einhaltung des dritten Zeitpunktes (1 Woche nach Geburt) gewährleistet war.

Die nichtschwangeren Probandinnen der Kontrollgruppe wurden bei dem einmaligen Treffen zu folgenden Parametern befragt: Name, Geburtsdatum, Körpergröße, Körpergewicht, Medikamenteneinnahme, Vorhandensein von chronischen Erkrankungen, Kontrazeption sowie erster Tag der letzten Menstruation. Des Weiteren erfolgte die Blutentnahme (**siehe Kap. 2.2**).

2.1.4 Ethikkommission

Bei der Ethikkommission der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern wurde die vorliegende Studie beantragt. Die Ethikkommission äußerte keine berufsrechtlichen oder berufsethischen Bedenken gegen die Durchführung dieser Studie.

2.2 Laborbestimmungen

2.2.1 Blutentnahme

Material

- Stauschlauch [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
- Hautdesinfektionsmittel Octeniderm [SCHÜLKE&MAYR, Norderstedt, D]
- Sterile Wattetupfer [HARTMANN, Heidenheim, D]
- Monovette-Kanüle [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
- Monovette EDTA 2,7ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
- Monovette Serum 2,7ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]

Durchführung

Die Blutentnahmen fanden jeweils zwischen 15 und 19 Uhr statt, um eventuelle Unterschiede, hervorgerufen durch die zirkadiane Rhythmik, so gering wie möglich zu halten. Zu jedem der vier Zeitpunkte wurden 3 Röhrchen abgenommen: zwei kleine EDTA-Röhrchen (eines zur Blutbildbestimmung, das andere zur Durchflusszytometrie) und ein kleines Serum-Röhrchen ohne Additiva (zur Hormonbestimmung). Sofort nach der Abnahme wurden die Blutröhrchen bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelegt.

2.2.2 Blutbild und Hormonbestimmungen

Die Blutbild- sowie Hormonbestimmungen wurden im Institut für Klinische Chemie und Labormedizin der Universität Rostock durchgeführt. Das Blutbild wurde mit einem hämatologischen Analysegerät (XE, 2100, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung der Hormone 17β -Estradiol, Progesteron, Cortisol und DHEAS (Dehydroepiandrosteronsulfat) aus dem Serum erfolgte mittels Elektrochemilumineszenz (Elektrochemiluminescence Immunoassay Technology) [Fa. Elecsys, IL, USA].

2.2.3 Durchflusszytometrie

Methode

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem mittels Laserstrahl verschiedene Eigenschaften von Zellen, wie z.B. Größe, Granularität, Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine, untersucht werden können. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt im Gegensatz zu der mikroskopischen Analyse darin, dass mehrere tausend Zellen pro Minute untersucht werden können. Die Zellen laufen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander durch die Messkammer an dem Laserstrahl vorbei. Kreuzt eine Zelle diesen, entsteht verschiedenartiges Streulicht: zum einen das sogenannte Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*), das etwas über die Zellgröße aussagt, zum anderen das Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*), welches ein Indikator für die Granularität der Zelle ist. Anhand dieser Funktion kann zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten differenziert werden.

Zusätzlich kann jede Zelle mit fluoreszierenden Antikörpern markiert werden. Dieses Verfahren nutzt als Grundlage die Antigen-Antikörper-Reaktion. Durch den Laser werden Elektronen der Fluorochrome mit 488 nm angeregt und kehren nach dem Laserimpuls unter Abgabe von Energie auf ihr Ursprungsniveau zurück. Je nach Fluoreszenzfarbstoff werden unterschiedliche Wellenlängen emittiert, wie in der Tabelle 2-1 dargestellt, so dass charakteristische Emissionsspektren entstehen. Diese können zur Identifizierung von Oberflächen-, sowie intrazellulären Antigenen genutzt werden. Gleichzeitig werden die Fluoreszenzintensitäten gemessen. Dadurch kann auf die Menge an zellgebundenen Antikörpern geschlossen werden, welche wiederum proportional zu der Menge an Antigenen ist.

Fluorochrom	Abkürzung	Emissionsmaximum	Emissionsfarbe
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	519 nm	grün
Phycoerythrin	PE	578 nm	gelb-orange
Tandem-Konjugat aus Phycoerythrin und Cyan 5	PE-Cy5	667 nm	rot

Tab. 2-1: Fluorochrome

Dargestellt sind die in dieser Studie verwendeten Fluorochrome mit dem jeweiligen Emissionsmaximum und -farbe.

Durch Zuhilfenahme des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes lassen sich die Lymphozyten in einem Gate von den restlichen Zellen abgrenzen.

Mit Hilfe der verwendeten Software lassen sich weitere Diagramme erstellen, so genannte Dotplots. Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe benennen hierbei die Achsen des Koordinatensystems. So lassen sich z.B. CD3⁺CD8⁺ Zellen (oberer rechter Quadrant) von CD3⁻CD8⁺ Zellen (unterer rechter Quadrant), die jeweils durch Punktwolken repräsentiert werden, abgrenzen (**Abb. 2-2**).

Zusätzlich wurden Histogramme erstellt, um genaue Aussagen über den prozentualen Anteil der intrazellulären zytotoxischen Proteine (GrA, GrB, GrK und Perforin) an der jeweiligen Lymphozytensubpopulation bzw. aller CD3⁺ Zellen zu erhalten. Hierzu wurde eine Markierung zwischen die Granzym- bzw. Perforin-positive und -negative Fraktion gelegt (**Abb. 2-2**). Um unspezifische Bindungen muriner Antikörper-Isotypen an humane Lymphozyten zu evaluieren, wurden letztere mit irrelevanten murinen Antikörpern (IgG1, IgG2a) inkubiert. Die durch diese Antikörper hervorgerufene Färbung lag bei allen Probanden unter 1% der Gesamtlmphozyten (**Abb. 2-2**).

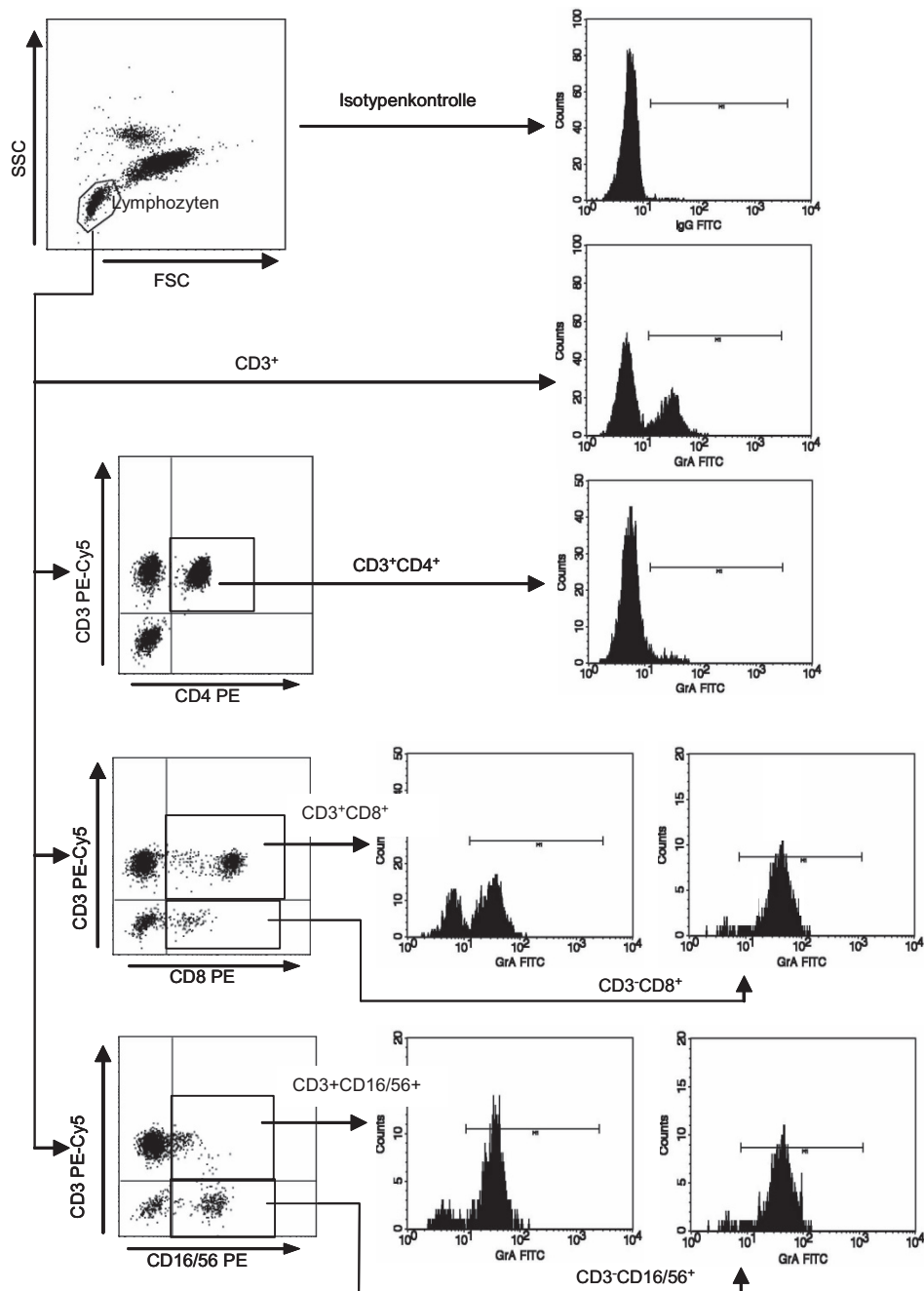


Abb. 2-2: Beispiel einer computergestützten Auswertung anhand von Granzym A

Dargestellt ist die im FSC/SSC-Plot markierte Lymphozytenpopulation. Die Lymphozyten werden nachfolgend in Dot-Plots in ihre Subpopulationen ($CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD16/56^+$, $CD3^+CD16/56^+$) mit Hilfe der Fluorochrom-konjugierten Antikörper eingeteilt. Nach entsprechender Selektion der Lymphozytensubpopulationen sowie aller $CD3^+$ Zellen werden diese in Histogrammen dargestellt, aus denen die Anzahl der GrA positiven Zellen abzulesen ist.

Geräte und Materialien

- FACS Calibur mit Software [BD, Heidelberg, D]
Cell Quest Pro
- Labofuge 400R [HERAEUS, KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Osterode, D]
- Mono-Mixer [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
- Waage [SARTORIUS, Göttingen, D]
- Reaktionsgefäße 50 ml [GREINER BIOONE, Frickenhausen, D]
- Reaktionsgefäße 15 ml [GREINER BIOONE, Frickenhausen, D]
- Pipette RESEARCH 100-1000 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipette RESEARCH 2-20 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipettenspitzen blau 1000 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipettenspitzen gelb 200 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- FACS-Röhrchen 5 ml [BD, Heidelberg]
- FACS-Röhrchen 0,6 ml [BECTON & DICKINSON, Heidelberg, D]
- 96-well Mikrotiterplatte [PHARMACIA DIAGNOSTICS, Freiburg]

Chemikalien und sonstige Reagenzien

- FACS Lysing Solution [BD, Heidelberg]
- PBS [INVITROGEN GMBH, Karlsruhe]
- Paraformaldehyd [SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen]
- Saponin [FLUKA, Taufkirchen]
- Fetales Kälberserum (FCS) [INVITROGEN GMBH, Karlsruhe]
- NaN₃ [SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen]

Lösungen

- Erythrozyten-Lysispuffer: FACS-Lysing Solution mit Aqua dest.
1:10 verdünnt
- Waschpuffer: PBS + 2%FCS + 0,1% NaN₃
- Permeabilisierungspuffer: 0,1% Saponin in Waschpuffer

Antikörper

Antigen	Markierung	Klon	Hersteller
IgG1	FITC	203	Immunotools, Friesoythe
IgG1	PE	DAK-GO1	Dako, Hamburg
IgG1	PE-Cy5	DAK-GO1	Dako, Hamburg
IgG2a	FITC	713	Immunotools, Friesoythe
CD3	PE-Cy5	UCHT1	Dako, Hamburg
CD4	PE	MT310	Dako, Hamburg
CD8	PE	DK25	Dako, Hamburg
CD16	PE	DJ130c	Dako, Hamburg
CD56	PE	C5.9	Dako, Hamburg

Tab. 2-2: Antikörper gegen Oberflächenantigene

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Oberflächenantigene mit Markierung, Klonbezeichnung und Herstellerangabe.

Antigen	Markierung	Klon	Hersteller
Perforin	FITC	δG9	Immunotools, Friesoythe
GrA	FITC	GrA-11	Immunotools, Friesoythe
GrB	FITC	HC4	Immunotools, Friesoythe
GrK	FITC	24C3	Immunotools, Friesoythe

Tab. 2-3: Antikörper gegen intrazelluläre Antigene

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten intrazellulären Antikörper mit Markierung, Klonbezeichnung und Herstellerangabe.

Versuchsdurchführung

2 ml EDTA-Vollblut wurden mit 8 ml Erythrozyten-Lysispuffer gut vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte die Zentrifugation (381 g, 5 min, 20°C) und das Verwerfen des Überstandes. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Daraufhin wurden die Zellen in 8 ml Waschpuffer resuspendiert und eine erneute Zentrifugation (381 g, 5 min, 20°C) durchgeführt. Die Zellpellets wurden in 2 ml PBS aufgelöst. Anschließend wurden 2 ml Paraformaldehyd (4% in PBS) zur Fixierung der Zellen hinzugegeben, gut vermischt und 10 min im Kühlschrank (4 °C) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 4 ml PBS hinzugefügt, vermischt und zentrifugiert (381 g, 5 min, 20°C). Es erfolgte die Spülung mit 5 ml Waschpuffer und die erneute Zentrifugation (381 g, 5 min, 20°C). Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Permeabilisierungspuffer resuspendiert und für 10 min im Kühlschrank (4 °C) inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (381 g, 5 min, 20°C) und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 µl Permeabilisierungspuffer resuspendiert und jeweils 20 µl der Lösung auf die FACS-Röhrchen verteilt.

Auf diese Zellsuspension wurden, wie in Tabelle 2-4 dargestellt, die jeweiligen Oberflächen- und intrazellulären Antikörper gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgten 2 Waschschrirte mit je 300 µl Permeabilisierungspuffer pro FACS-Röhrchen und jeweils folgender Zentrifugation (429 g, 5 min, 20°C). Für die sich anschließende Messung wurden die Zellen in jeweils 150 µl PBS resuspendiert.

Die Ansätze der durchflusszytometrischen Bestimmung gaben Aufschluss über die Granzym- bzw. Perforin-Expression in T-Helferzellen (CD3⁺CD4⁺), zytotoxischen T-Zellen (CD3⁺CD8⁺), NKT-Zellen (CD3⁺CD16/56⁺), NK-Zellen (CD3⁻CD16/56⁺) sowie einer NK-Zell-Untergruppe (CD3⁻CD8⁺) (**Tab. 2-4**).

Ansatz	FITC	PE	PE-Cy5
1	IgG1	IgG1	IgG1
2	IgG2a	IgG1	IgG1
3	GrA	CD4	CD3
4	GrA	CD8	CD3
5	GrA	CD16/56	CD3
6	GrB	CD4	CD3
7	GrB	CD8	CD3
8	GrB	CD16/56	CD3
9	GrK	CD4	CD3
10	GrK	CD8	CD3
11	GrK	CD16/56	CD3
12	Perforin	CD4	CD3
13	Perforin	CD8	CD3
14	Perforin	CD16/56	CD3

Tab. 2-4: Ansätze für die durchflusszytometrische Messung

Dargestellt sind die Ansätze der durchflusszytometrischen Messung mit den jeweiligen FITC-, PE- und PE-Cy5 konjugierten Antikörpern.

2.4 Statistik

Die Auswertung der mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten wurde mit Hilfe des Datenanalyseprogrammes SPSS (*Statistical package for social sciences*) 11.0 bzw. 12.0 durchgeführt [Chicago, IL, USA]. Da die meisten Parameter nicht einer Normalverteilung entsprachen, wurden einheitliche nicht-parametrische Analysen erstellt. Signifikanzen zwischen unabhängigen Stichproben (Kontrollgruppe gegen Schwangerengruppe) wurden mit dem U-Test nach Mann und Whitney ermittelt. Bei abhängigen Proben (innerhalb der Schwangerengruppe) wurden signifikante Unterschiede mit dem Wilcoxon-Test berechnet. Die Korrelation verschiedener Parameter wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman bestimmt.

Als signifikant wurden alle Aussagen bezeichnet, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ aufwiesen.

Für die grafische Darstellung der Daten wurden Boxplots gewählt. Hierbei zeigen die Ränder der Box das 25. Perzentil (unteres Quartil) und das 75. Perzentil (oberes Quartil) an. Die Linie in der Box zeigt das 50. Perzentil (den Medianwert) an. Der Abstand zwischen dem 25. und 75. Perzentil wird Interquartilsabstand genannt, und ist durch die Höhe der Box abgebildet. Die Lage des Medians ist ein Hinweis auf die symmetrische Verteilung der Werte. Die T-Linien, jeweils an dem oberen und unteren Quartil ansetzend, bezeichnen den größten bzw. den kleinsten Wert, der nicht als Ausreißer anzusehen ist. Ausreißer lagen jeweils um mehr als 1,5 Interquartilsabstände von dem 25. bzw. dem 75. Perzentil entfernt. Übersteigt die Entfernung 3 Interquartilsabstände, spricht man von Extremwerten. Auf die Darstellung von Ausreißern und Extremwerten wurde in dieser Studie aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Allgemeine Charakteristika der Frauen und Neugeborenen

An der Studie nahmen 20 nichtschwangere (Kontrollgruppe) und 20 schwangere Frauen teil, die den vorher festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien entsprachen. Alter, Körpergröße und Gewicht der Kontrollprobandinnen sowie der Schwangeren sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt (**Tab. 3-1 und 3-2**). Das Körpergewicht, jedoch nicht die Körpergröße der Schwangerengruppe, war im Vergleich zur Kontrollgruppe an allen vier Zeitpunkten signifikant erhöht ($p < 0,05$). Es bestand kein signifikanter Altersunterschied zwischen der Schwangerengruppe und der Kontrollgruppe ($p > 0,05$).

Nummer	Alter	Größe (cm)	Gewicht (kg)	Zyklustag	orale Kontrazeptiva	vorherige Schwangerschaften
1	30	160	73,0	8	nein	0
2	30	167	85,0	25	nein	0
3	23	164	55,0	17	nein	0
4	26	172	66,0	13	nein	0
5	21	170	51,0	13	ja	0
6	33	171	53,0	3	ja	0
7	25	178	70,0	10	ja	0
8	26	175	65,0	26	ja	0
9	25	177	62,0	12	ja	0
10	34	168	64,5	15	ja	2
11	25	169	55,0	9	nein	1
12	24	170	56,0	14	ja	0
13	24	160	60,0	6	ja	0
14	26	168	49,0	26	nein	0
15	26	168	54,0	33	ja	0
16	25	165	59,0	6	ja	0
17	26	163	54,0	15	nein	0
18	23	167	58,0	32	nein	0
19	26	160	50,0	29	nein	0
20	24	161	53,0	26	nein	0
Mittelwert	26,1	167,7	59,6	16,9		
Median	25,5	168,0	57,0	14,5		

Tab. 3-1: Grunddaten der Kontrollgruppe

Dargestellt sind Alter, Größe, Gewicht und Zyklustag aller 20 Probandinnen der Kontrollgruppe mit den zugehörigen Median- und Mittelwerten. Zudem sind die Einnahme oraler Kontrazeptiva und die Anzahl der vorausgegangenen Schwangerschaften aufgeführt.

In der Schwangerengruppe entbanden 6 der Frauen (30%) per sectionem, und 14 Frauen (70%) per vaginam. Es wurden 4 Mädchen, 15 Jungen und 1 gemischtes Geminipärchen geboren. Die Neugeborenen waren im Median 50 cm (Minimum – Maximum: 47 – 54 cm) groß und hatten ein medianes Geburtsgewicht von 3240 g (Minimum – Maximum: 2230 – 4240 g). Bei 6 Frauen kam es in der Perinatalperiode zu schwangerschafts-spezifischen Begleiterkrankungen (3x postnatale Mastitis, 1x Harnwegsinfekt, 2x vaginale Pilzinfektionen), und bei 4 Frauen zu Komplikationen (3x vorzeitige Wehentätigkeit, 1x HELLP-Syndrom).

Nummer	Alter	Größe (cm)	Gewicht (kg)				vorherige Schwangerschaften
			30. SSW	37. SSW	1. Wo p. p.	8. Wo p. p.	
1	29	165	64,0	70,0	60,0	56,0	0
2	26	165	66,0	71,0	o. A.	63,0	0
3	27	170	65,0	68,3	60,0	55,0	0
4	24	175	85,0	94,0	82,0	74,0	0
5	31	165	79,2	o. A.	80,0	70,0	0
6	34	160	70,0	75,0	67,2	63,0	0
7	35	175	75,0	82,0	72,0	69,0	0
8	33	160	59,0	62,0	57,5	53,0	2
9	28	168	73,0	79,0	77,0	69,0	1
10	27	178	77,0	79,5	73,0	71,0	1
11	34	168	83,0	88,0	78,0	73,5	1
12	32	160	82,0	85,0	78,0	73,0	0
13	26	181	85,0	89,0	83,0	78,0	0
14	24	173	64,0	70,0	65,0	65,0	0
15	22	165	73,0	76,5	68,0	63,5	0
16	29	168	74,8	o. A.	62,3	64,0	1
17	25	170	74,5	76,0	74,0	67,0	0
18	35	170	72,0	77,0	68,0	62,0	0
19	24	173	106,0	108,0	105,0	103,0	0
20	25	167	65,0	67,0	59,0	57,0	0
Mittelwert	28,5	168,8	74,6	78,7	72,1	67,5	
Median	27,5	168,0	73,8	76,8	72,0	66,0	

Tab. 3-2: Grunddaten der Schwangerengruppe

Dargestellt sind Alter, Größe und Gewicht an jedem Zeitpunkt aller 20 Probandinnen der Schwangerengruppe mit den zugehörigen Median- und Mittelwerten (SSW: Schwangerschaftswoche, Wo: Woche, p.p.: post partum). Zudem ist die Anzahl der vorausgegangenen Schwangerschaften aufgeführt.

3.2 Blutbild und Hormone

3.2.1 Blutbild

Während der Schwangerschaft war der Hämoglobinwert im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt, normalisierte sich zum Zeitpunkt 8 Wochen nach der Geburt aber wieder (**Abb. 3-1**). Die Thrombozytenzahl der Schwangeren war an beiden pränatalen Zeitpunkten erniedrigt, zum Zeitpunkt 1 Woche nach der Geburt jedoch signifikant erhöht. Acht Wochen nach der Geburt waren die Thrombozytenzahlen wieder normalisiert (**Abb. 3-1**). Die Leukozytenzahlen der Schwangeren waren sowohl pränatal als auch direkt nach der Geburt im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (**Abb. 3-2**). Acht Wochen nach der Geburt waren die Leukozytenzahlen von der Kontrollgruppe nicht unterscheidbar (**Abb. 3-2**).

3.2.2 Hormone

Die Konzentrationen von 17β -Estradiol sowie Progesteron im maternalen Serum waren pränatal deutlich erhöht, fielen aber bereits 1 Woche nach Geburt auf Normalwerte ab, und waren zum Zeitpunkt 8 Wochen nach der Geburt sogar signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (**Abb. 3-3**). Die Cortisolspiegel zeigten einen ähnlichen Verlauf. Dies war jedoch weniger ausgeprägt als bei 17β -Estradiol und Progesteron (**Abb. 3-4**). Die Konzentrationen von DHEAS im Serum zeigten ein völlig anderes Profil. Die DHEAS-Konzentrationen waren pränatal deutlich erniedrigt, und blieben auch in den 8 Wochen postnatal trotz eines Anstieges weiterhin signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (**Abb. 3-4**).

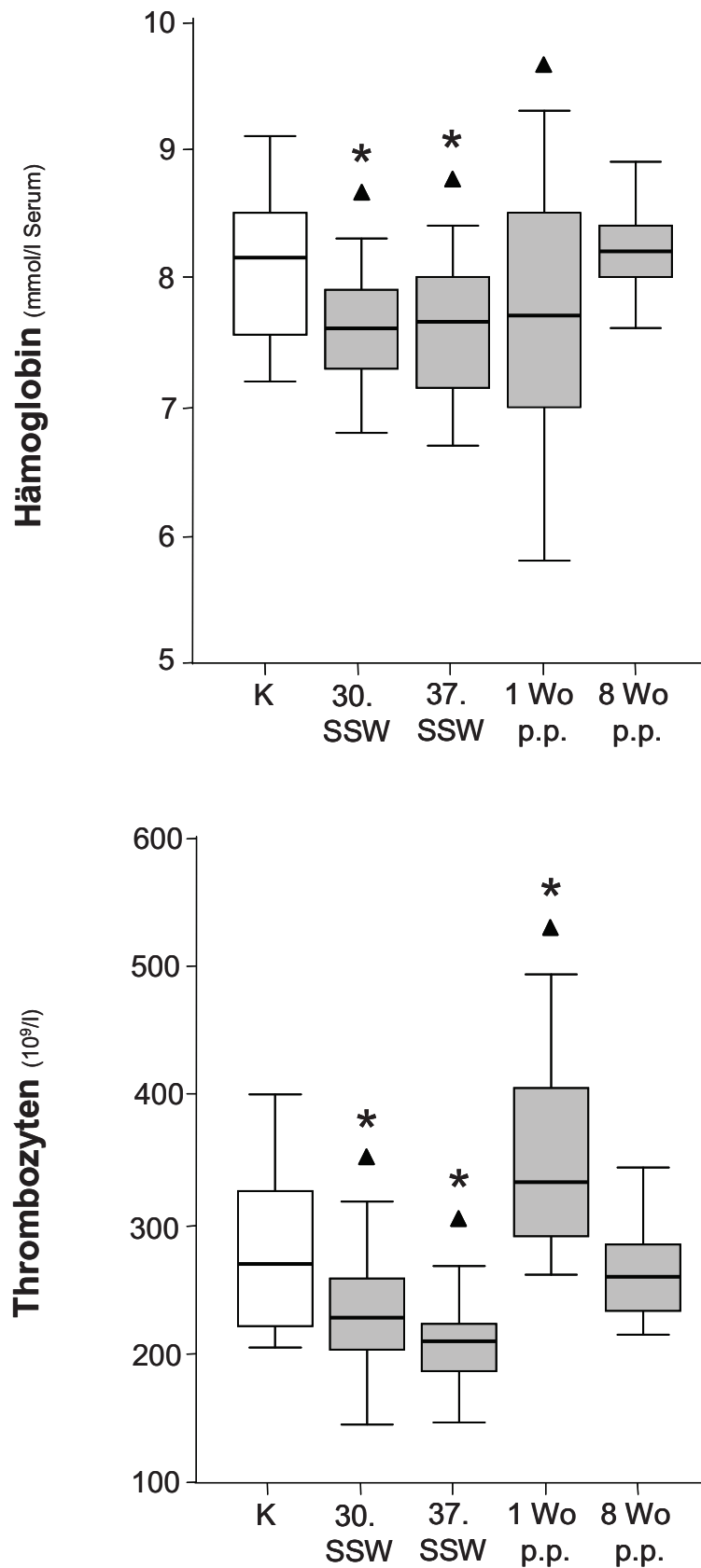
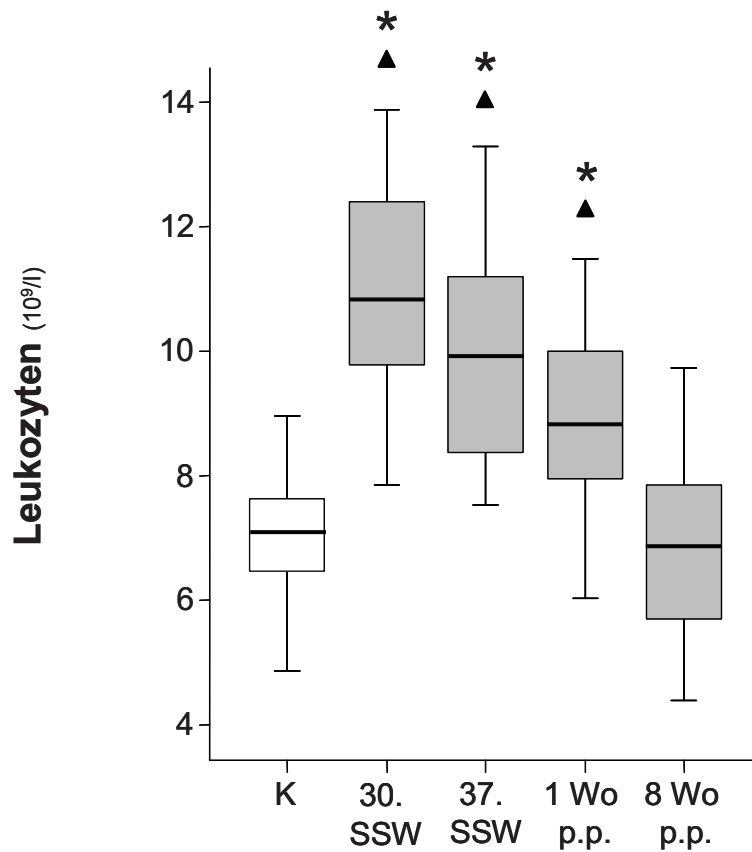


Abb. 3-1: Konzentrationen von Hämoglobin und Thrombozyten im Blut

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

**Abb. 3-2: Konzentrationen von Leukozyten im Blut**

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

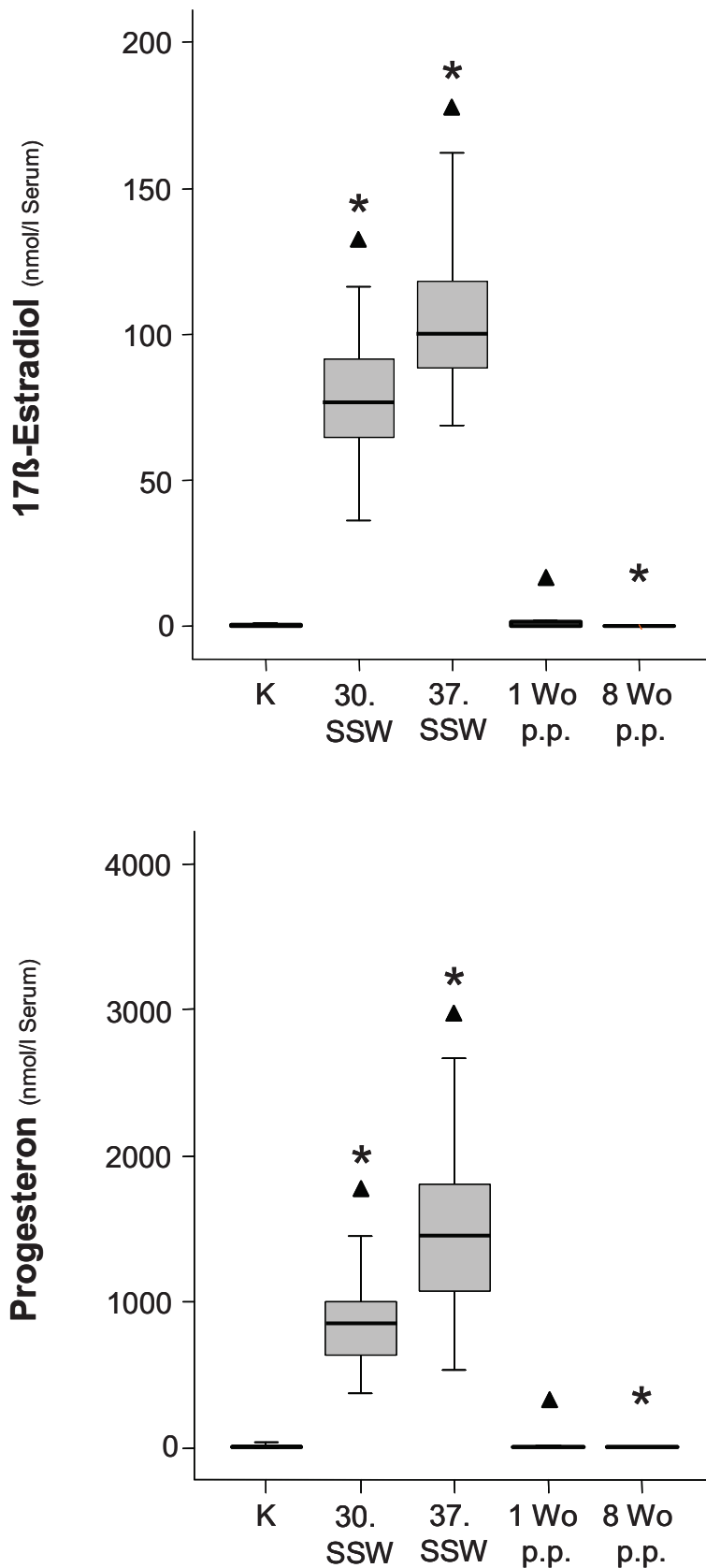


Abb. 3-3: Konzentrationen von 17β-Estradiol und Progesteron im Serum

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

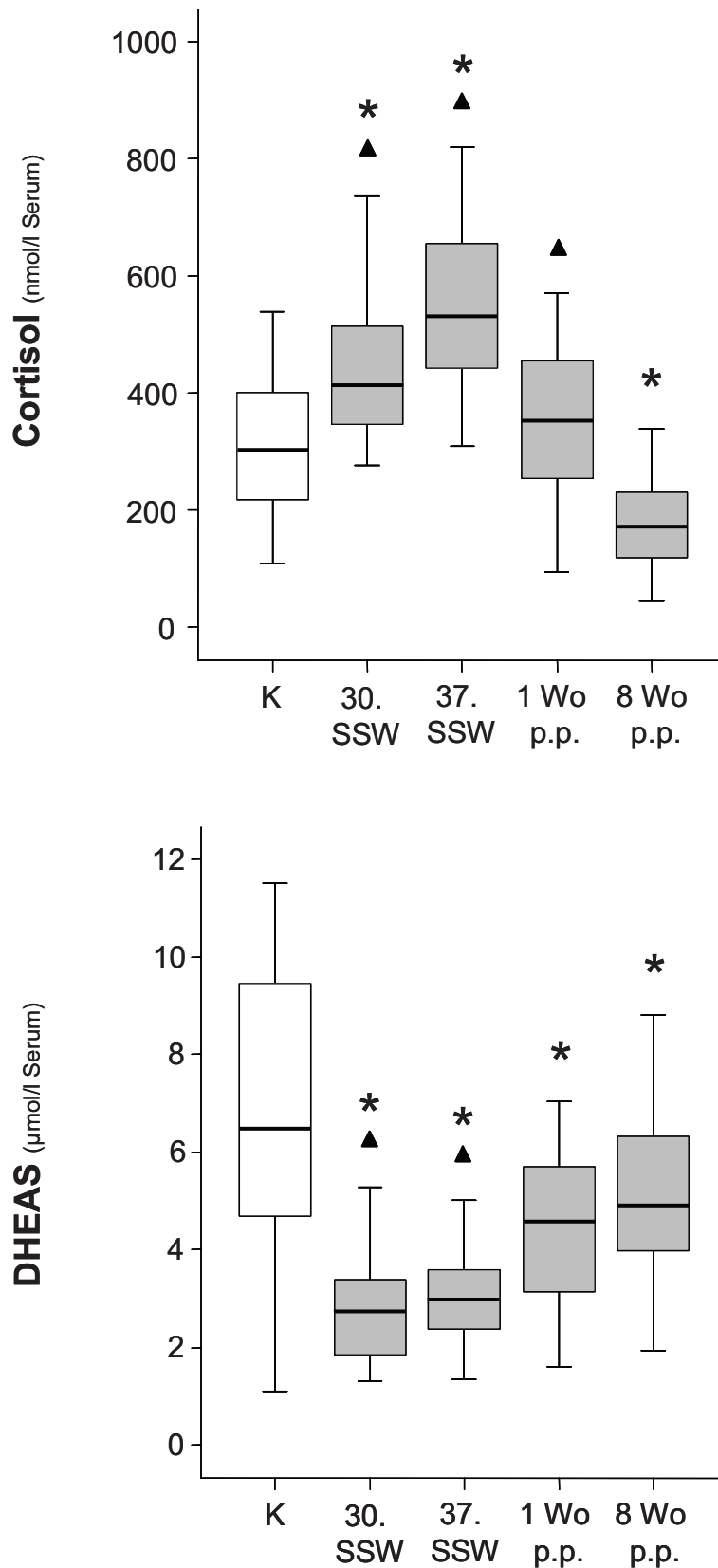


Abb. 3-4: Konzentrationen von Cortisol und DHEAS im Serum

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

3.3 Lymphozyten-Populationen

3.3.1 $CD4^+$ T-Helferzellen und Zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen

Die wichtigsten Zellpopulationen in der Kontrollgruppe bildeten die T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$) und die zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+$), die im Median zusammen mehr als 70% der Gesamt-Lymphozytenzahl darstellten (**Abb. 3-5**). In der Schwangerengruppe waren die medianen Prozentzahlen der T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$) und der zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+$) im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell erhöht, und stellten im Median zusammen mehr als 75% der Gesamt-Lymphozytenzahl dar (**Abb. 3-5**). Signifikant erhöht waren jedoch nur die T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$) in der Postnatalperiode (**Abb. 3-5**).

3.3.2 NK-Zellen, $CD3^-CD8^+$ NK-Zellen und NKT-Zellen

In der Kontrollgruppe waren die NK-Zellen ($CD3^-CD16/56^+$) mit einem Medianwert von über 10% die drittstärkste Population unter den Lymphozyten (**Abb. 3-6**). Die Population der NKT-Zellen ($CD3^+CD16/56^+$) und der $CD3^-CD8^+$ NK-Zellen bildeten im Median weniger als 4% der Gesamt-Lymphozyten (**Abb. 3-6 und 3-7**). In der Schwangerengruppe waren die medianen Prozentzahlen der NK-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe immer tendenziell erniedrigt ($< 10\%$ an allen Zeitpunkten), jedoch nur zum Zeitpunkt 1 Woche nach Geburt signifikant erniedrigt (**Abb. 3-6**). Die Populationen der NKT-Zellen ($CD3^+CD16/56^+$) und der $CD3^-CD8^+$ NK-Zellen zeigten in der Schwangerengruppe keine signifikanten prozentualen Änderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 3-6 und 3-7**).

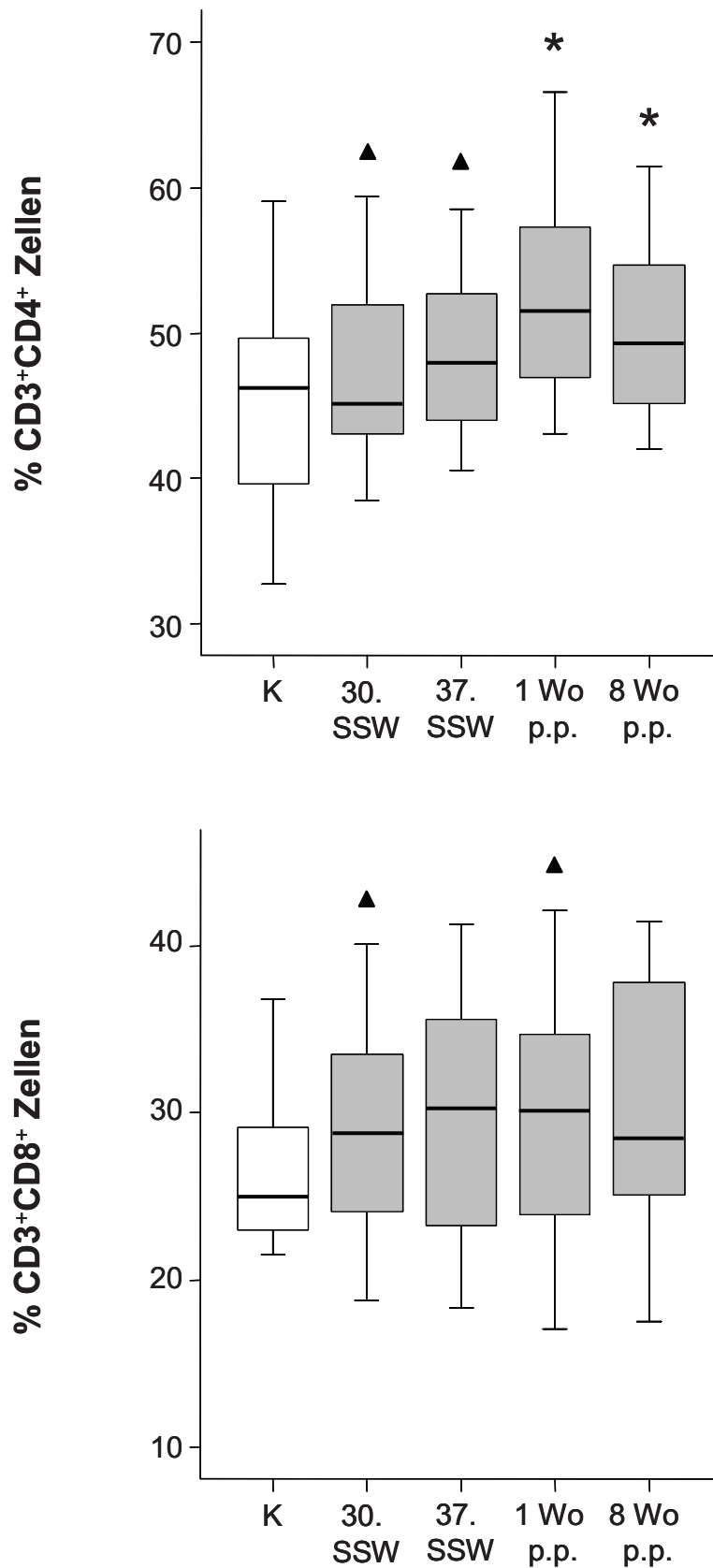


Abb. 3-5: Anteil der CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ Zellen an der Gesamt-Lymphozytenzahl

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

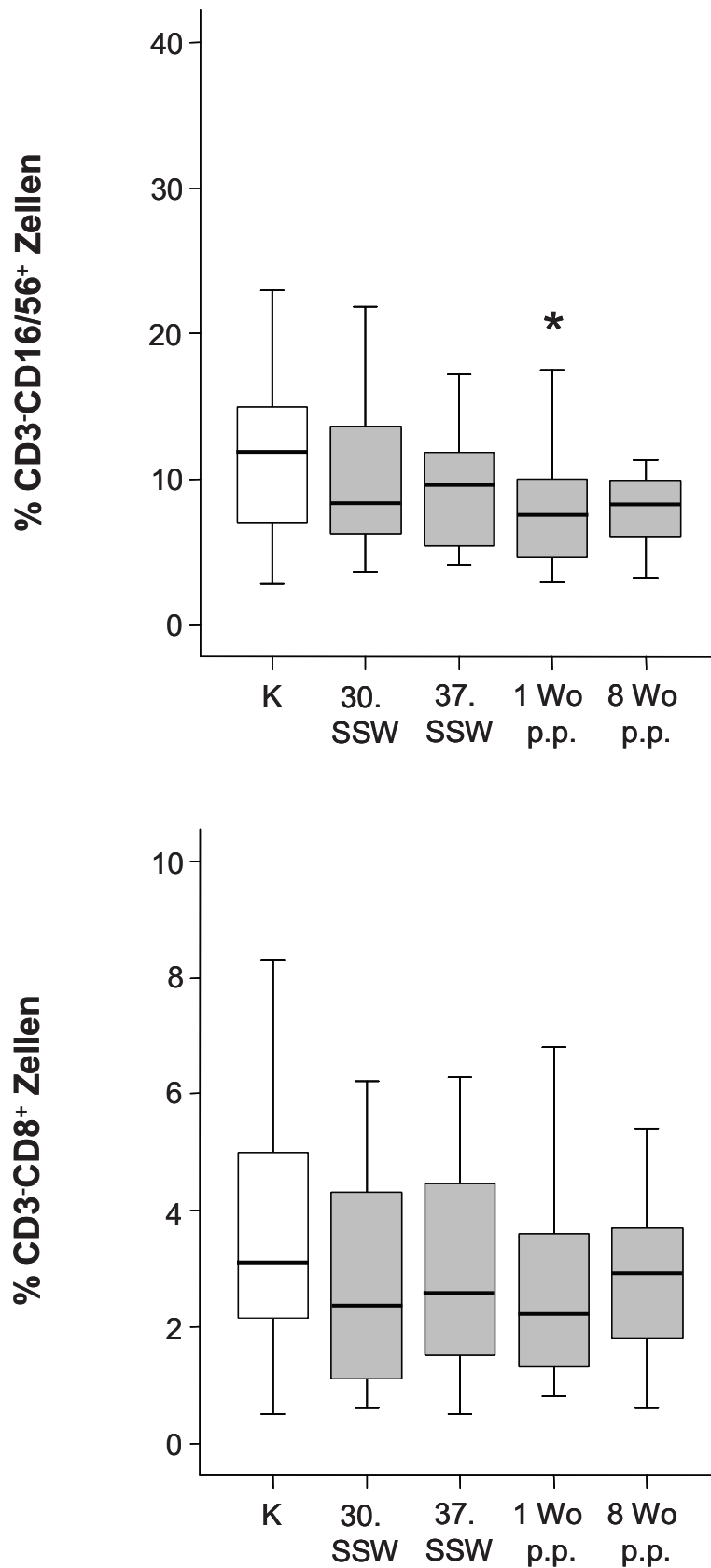


Abb. 3-6: Anteil der CD3⁺CD16/56⁺ und CD3⁺CD8⁺ Zellen an der Gesamt-Lymphozytenzahl

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

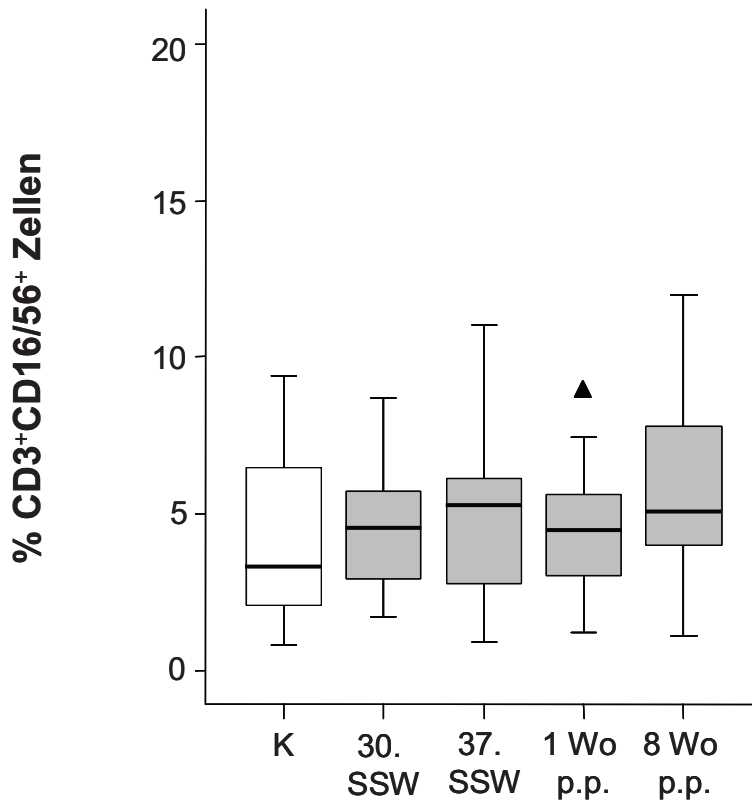


Abb. 3-7: Anteil der CD3⁺CD16/56⁺ Zellen an der Gesamt-Lymphozytenzahl

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

3.4 Verteilung zytotoxischer Proteine in den Lymphozyten-Populationen

3.4.1 $CD4^+$ T-Helferzellen

In der Kontrollgruppe war die Expression der intrazellulären Proteine GrA, GrB, GrK und Perforin in $CD4^+$ T-Helferzellen vergleichsweise gering (< 5% aller T-Helferzellen) (**Abb. 3-8**). Wiewohl signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Schwangerengruppe zu verzeichnen waren, kam es jedoch zu keinem Zeitpunkt in der Schwangerengruppe zu einem Anstieg von > 2% im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 3-8**). Somit waren die schwangerschaftsbedingten Veränderungen trotz der Signifikanzen als marginal einzustufen (**Abb. 3-8**).

3.4.2 Zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen

In den zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen der Kontrollgruppe zeigte sich eine deutliche Expression der intrazellulären Proteine GrA (Median > 35% aller Zellen), GrB (Median > 10% aller Zellen) und GrK (Median > 20% aller Zellen). Dagegen war die Expression von Perforin in den zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen der Kontrollgruppe vergleichsweise gering (Median: 5% aller Zellen) (**Abb. 3-9**). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Expression von GrA und GrK in den zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen der Schwangerengruppe nicht verändert. Dagegen war die mediane Expression von GrB in zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen zu allen Zeitpunkten in der Schwangerengruppe deutlich erhöht (Median > 20%), dies war jedoch nur an 2 Zeitpunkten signifikant (**Abb. 3-9**). Die Perforin-Expression in zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen war in der 37. SSW und in der Postnatalperiode signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Median > 15 %).

3.4.3 NK-Zellen

In den NK-Zellen der Kontrollgruppe war eine sehr starke Expression der intrazellulären Proteine GrA (Median > 90% aller Zellen) und Perforin (Median > 85% aller Zellen) zu verzeichnen. Die Expression von GrB war hingegen etwas geringer

(Median > 70% aller Zellen) (**Abb. 3-10**). In den NK-Zellen der Schwangerengruppe zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Expression von GrA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Innerhalb der Schwangerengruppe war die Expression von GrA im Vergleich zum Zeitpunkt 8 Wochen nach Geburt perinatal jedoch signifikant erniedrigt (**Abb. 3-10**). Die Expression von GrB in NK-Zellen war in der Schwangerengruppe an fast allen Zeitpunkten signifikant erhöht, mit einem Maximum in der 37. SSW (**Abb. 3-10**). Die Perforin-Expression war in den NK-Zellen der Schwangerengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert (**Abb. 3-10**). Auf die GrK-Messung in NK-Zellen wurde in dieser Studie verzichtet, da aufgrund der geringen Expression in diesen Zellen durchflusszytometrisch nicht eindeutig zwischen positiven und negativen Zellen unterschieden werden konnte [141].

3.4.4 $CD3^+CD8^+$ NK- Zellen

Die intrazellulären Proteine GrA, GrB und Perforin waren in den $CD3^+CD8^+$ Zellen der Kontrollgruppe ähnlich stark exprimiert wie in den NK-Zellen (**Abb. 3-11**). In der Schwangerengruppe kam es bei GrA zu keinen signifikanten Änderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 3-11**). Die Expression von GrB war hingegen perinatal signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (**Abb. 3-11**). Perforin wies insgesamt lediglich marginale Schwankungen in der Expression auf (**Abb. 3-11**). Auf die GrK-Messung in $CD3^+CD8^+$ NK-Zellen wurde in dieser Studie verzichtet, da aufgrund der geringen Expression in NK-Zellen durchflusszytometrisch nicht eindeutig zwischen positiven und negativen Zellen unterschieden werden konnte [141].

3.4.5 NKT-Zellen

In der Kontrollgruppe wiesen die NKT-Zellen eine sehr starke Expression des intrazellulären Proteins GrA (Median > 95% aller Zellen) auf. Die Expression von GrB, GrK und Perforin in den NKT-Zellen der Kontrollgruppe war geringer (Median jeweils < 70 % aller Zellen) (**Abb. 3-12**). In der Schwangerengruppe war die

Expression von GrA und GrK in NKT-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert (**Abb. 3-12**). Die mediane GrB-Expression in NKT-Zellen der Schwangerengruppe lag immer über der Kontrollgruppe, dies war jedoch nur zum Zeitpunkt 8 Wochen nach Geburt signifikant (**Abb. 3-12**). Die Perforin-Expression zeigte eine ähnliche Erhöhung, hier bestanden jedoch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sowohl in der 37.SSW als auch zum Zeitpunkt 8 Wochen nach Geburt (**Abb. 3-12**).

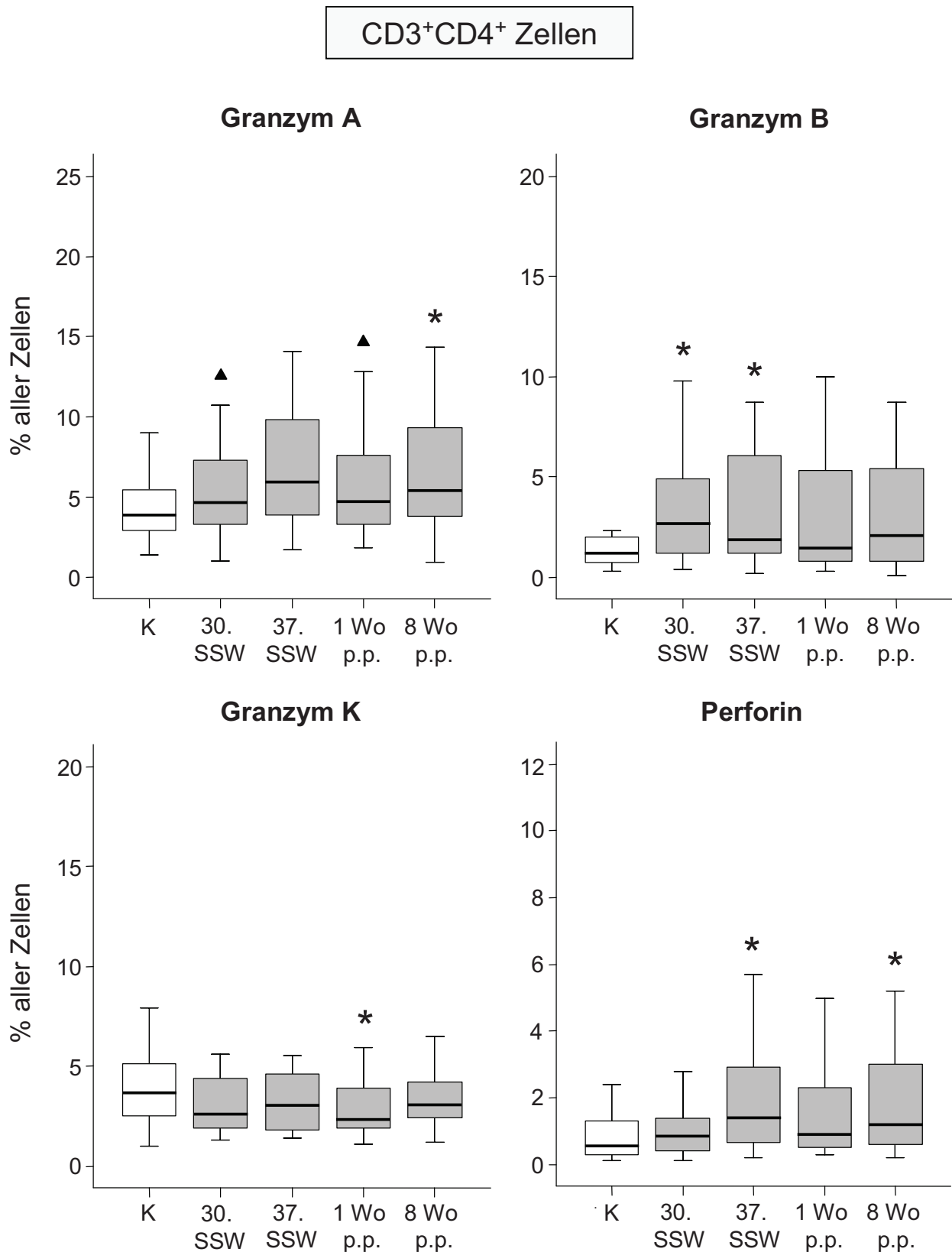


Abb. 3-8: Expression von Granzym A, B, K und Perforin in T-Helferzellen (CD3⁺CD4⁺ Zellen)

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Die Boxplotgraphiken zeigen die Prozentzahl aller Zellen, in denen Granzym A, Granzym B, Granzym K oder Perforin nachweisbar war. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

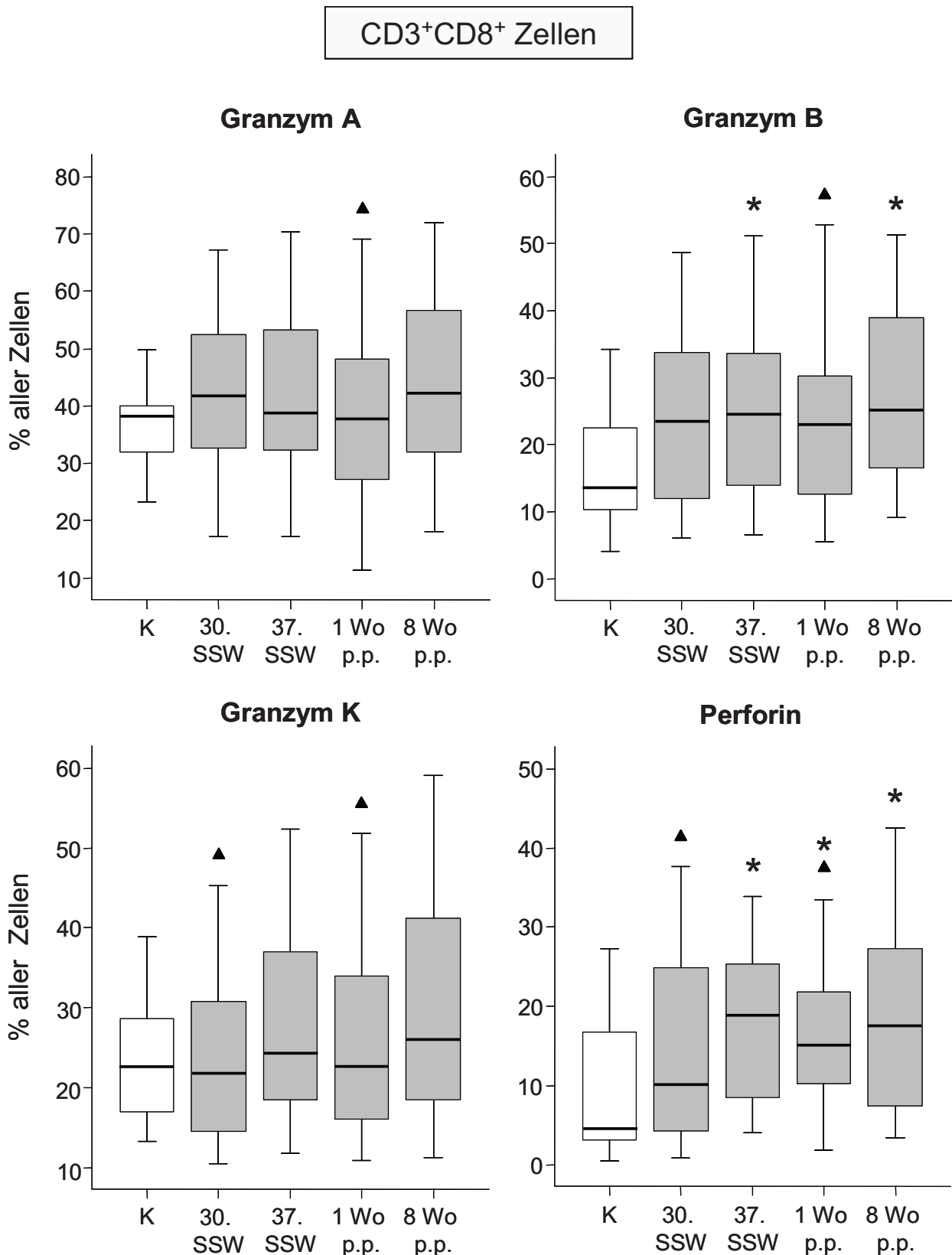


Abb. 3-9: Expression von Granzym A, B, K und Perforin in zytotoxischen T-Zellen (CD3⁺CD8⁺)
 Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Die Boxplotgraphiken zeigen die Prozentzahl aller Zellen, in denen Granzym A, Granzym B, Granzym K oder Perforin nachweisbar war. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

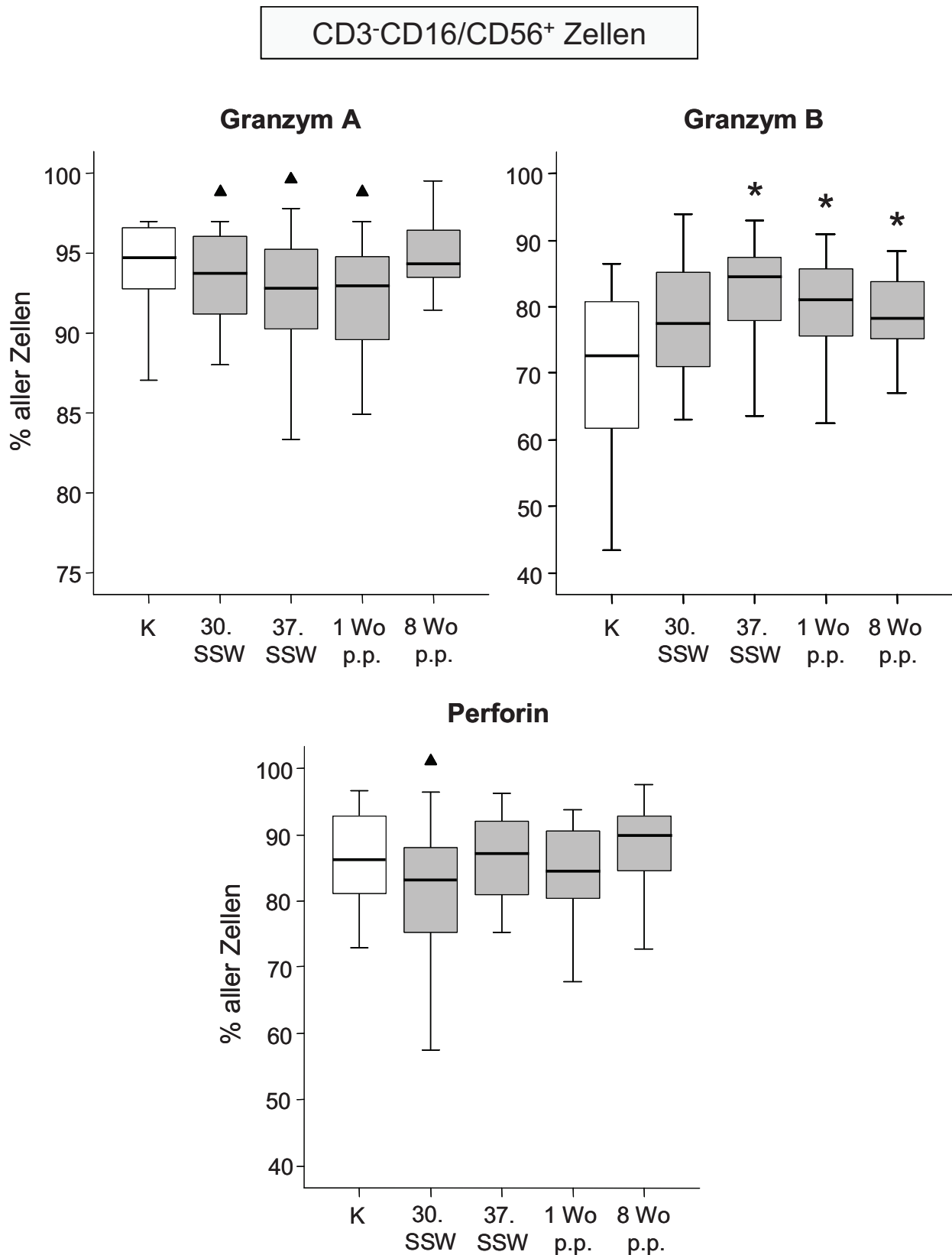


Abb. 3-10: Expression von Granzym A, B und Perforin in NK-Zellen (CD3⁺CD16/56⁺)

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Die Boxplotgraphiken zeigen die Prozentzahl aller Zellen, in denen Granzym A, Granzym B oder Perforin nachweisbar war. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

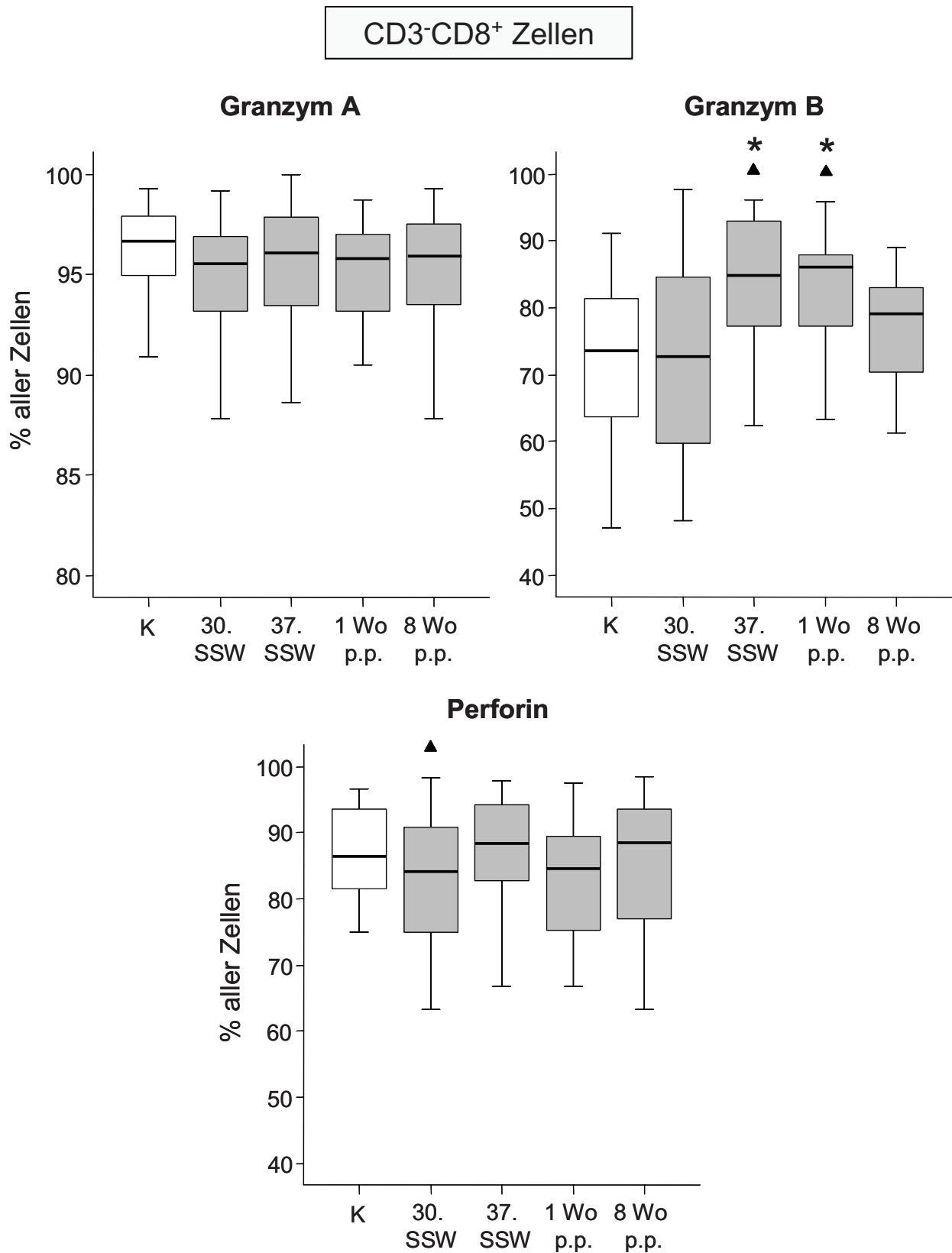


Abb. 3-11: Expression von Granzym A, B und Perforin in CD3⁻CD8⁺ NK-Zellen

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Die Boxplotgraphiken zeigen die Prozentzahl aller Zellen, in denen Granzym A, Granzym B oder Perforin nachweisbar war. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

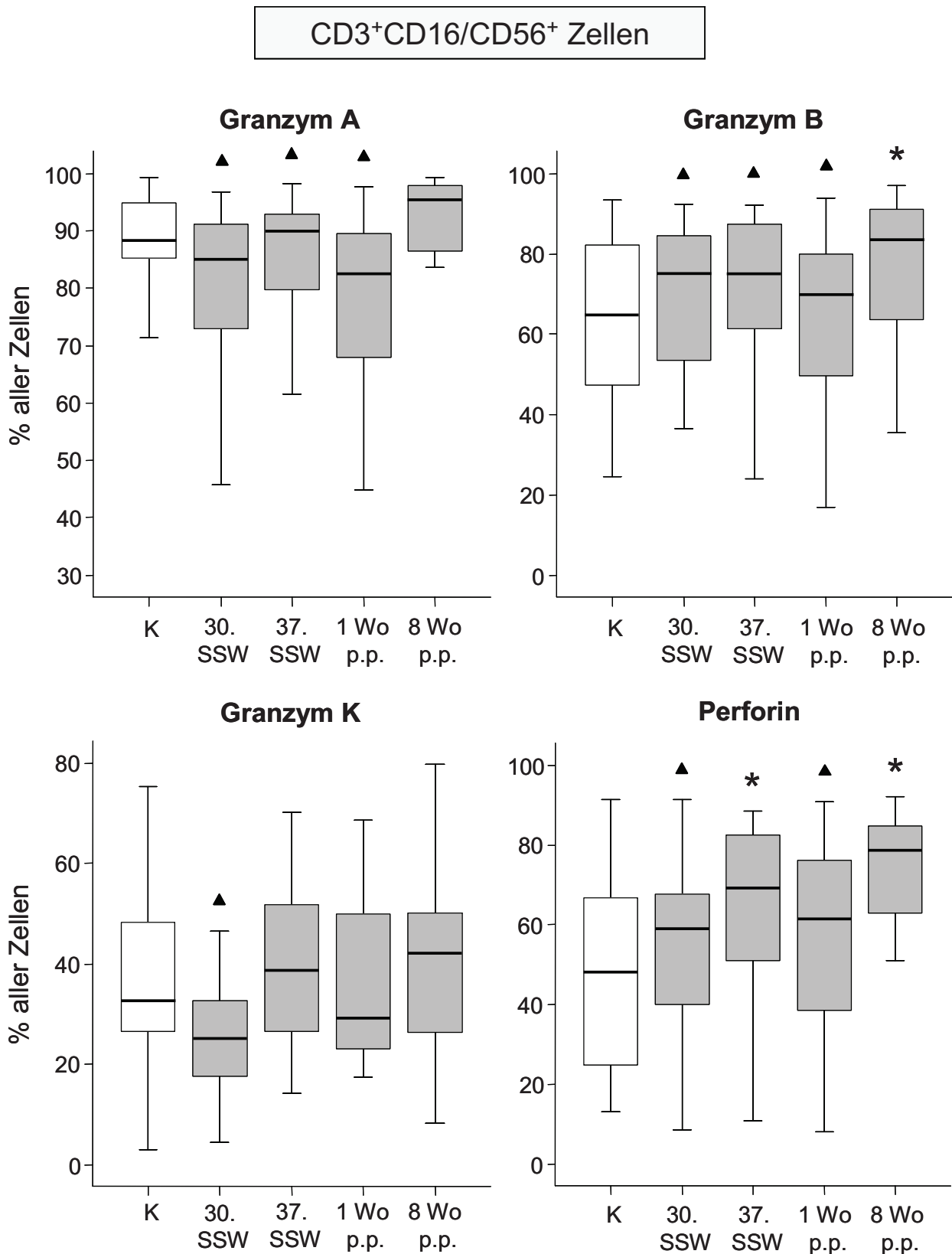


Abb. 3-12: Expression von Granzym A, B, K und Perforin in NKT-Zellen (CD3⁺CD16/56⁺)

Dargestellt sind die Kontrollgruppe (K) sowie die Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (SSW: Schwangerschaftswoche, p.p.: post partum). Die Boxplotgraphiken zeigen die Prozentzahl aller Zellen, in denen Granzym A, Granzym B, Granzym K oder Perforin nachweisbar war. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen (*), signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 8 Wochen p.p. sind mit einem schwarzen Dreieck (▲) gekennzeichnet.

3.5 Zusammenhang zwischen Hormonkonzentrationen im Blut und intrazellulären zytotoxischen Proteinen in Lymphozyten-Subpopulationen

Nachfolgend wurde untersucht, ob zwischen den veränderten Konzentrationen der Hormone Östrogen, Progesteron, Cortisol und DHEAS im maternalen Serum und den intrazellulären Proteinen GrA, GrB, GrK und Perforin der einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen ein Zusammenhang besteht. Zu diesem Zwecke wurden systematisch die einzelnen Parameter mittels der Korrelationsanalyse nach Spearman auf Signifikanz untersucht. Diese Analysen zeigten keine signifikanten Korrelationen zwischen den einzelnen Hormonkonzentrationen und den einzelnen zytotoxischen Proteinen (Daten nicht gezeigt). Zudem fiel auf, dass sich die Hormonkonzentrationen zwischen der Prä- und Postnatalperiode sehr stark unterschieden, derweil die Expression der zytotoxischen Proteine in Lymphozyten einen eher harmonischen Verlauf zeigte, der sich über die gesamte Prä- und Postnatalperiode erstreckte. Somit fand sich kein Hinweis darauf, dass die beobachteten Veränderungen der zytotoxischen Proteine in Lymphozyten direkt durch die Konzentrationen der Hormone Östrogen, Progesteron, Cortisol und DHEAS beeinflusst werden.

4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Dissertation war die erstmalige Charakterisierung der Expression zytotoxischer, Apoptose-induzierender Proteine (GrA, GrB, GrK, Perforin) in maternalen Lymphozyten-Subpopulationen in der Perinatalperiode. Hierzu lagen bislang keine Literaturdaten vor. Es zeigte sich, dass die Expression von GrA und GrK in maternalen Lymphozyten in der Perinatalperiode weitgehend normal ist. Hingegen fand sich ein charakteristischer perinataler Anstieg der Expression von GrB und Perforin in bestimmten maternalen Lymphozyten-Subpopulationen, insbesondere in zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Somit weisen die Ergebnisse dieser Studie erstmals auf spezifische Veränderungen zytotoxischer Eigenschaften maternaler Lymphozyten in der Perinatalperiode hin.

4.1 Allgemeine Charakterisierung der Probanden

In der vorliegenden Studie wurden bei Müttern in der Perinatalperiode Hormonkonzentrationen, die Konzentrationen der Zellen des peripheren Blutes und die Lymphozyten-Subpopulationen systematisch gemessen. Des Weiteren wurde erstmals die Expression zytotoxischer Proteine in diversen maternalen Lymphozyten-Subpopulationen charakterisiert. Eine gleiche Anzahl nichtschwangerer Frauen wurde parallel als Kontrollgruppe untersucht, und den gleichen Untersuchungen unterzogen. Zwischen der Schwangerengruppe und der nichtschwangeren Kontrollgruppe gab es keine Unterschiede bezüglich der Körpergröße, des Alters, Art und Zeitpunkt der Blutentnahme sowie der Verarbeitung der Blutproben. Lediglich das Körpergewicht war in der Schwangerengruppe zu allen Zeitpunkten (30.SSW, 37.SSW, 1 Woche p.p. und 8 Wochen p.p.) signifikant erhöht. Somit bestand bis auf das Körpergewicht eine gute Vergleichbarkeit der beiden untersuchten Gruppen.

Die für eine Aufrechterhaltung der Schwangerschaft wichtigen Hormone 17 β -Estradiol und Progesteron wiesen pränatal eine deutliche Erhöhung in der Schwangerengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Postpartal konnte ein starker Abfall und eine Normalisierung dieser Hormonkonzentrationen beobachtet werden. Die Cortisolspiegel zeigten einen ähnlichen Verlauf. Der Östrogen-Vorläufer

DHEAS zeigte hingegen pränatal deutlich erniedrigte Werte. Diese beobachteten hormonellen Veränderungen stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien sehr gut überein [1, 11, 12].

Die Leukozytenzahlen der Schwangerengruppe waren pränatal als auch direkt nach der Geburt im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht. Erst 2 Monate nach Geburt waren die Leukozytenzahlen normalisiert. Dieser Verlauf, der vor allem auf einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten beruht, stimmt mit den Literaturdaten sehr gut überein [3, 17]. Der Verlauf der Gesamt-Lymphozytenzahlen wurde in unserer Studie nicht spezifisch analysiert. Es liegen jedoch überzeugende Literaturdaten vor, die nur eine marginale Veränderung der Lymphozytenzahlen während der Schwangerschaft (ca. $1,8 \times 10^9$ / Liter Blut) und in der Postpartal-Periode (ca. $2,3 \times 10^9$ / Liter Blut) im Vergleich zu nichtschwangeren Kontrollen (ca. $2,1 \times 10^9$ / Liter Blut) zeigen [15]. Daher war ein spezifisches Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, die möglichen Veränderungen von Lymphozyten-Subpopulationen genauer zu beleuchten.

4.2 Charakterisierung der Lymphozyten-Subpopulationen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Lymphozyten-Subpopulationen quantifiziert und charakterisiert: $CD4^+$ T-Helferzellen, $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen ($CD3^-CD16/CD56^+$), NKT-Zellen ($CD3^+CD16/CD56^+$) sowie die NK-Zell-Untergruppe der $CD3^-CD8^+$ Zellen. Der Anteil der $CD4^+$ T-Helferzellen lag in der Kontrollgruppe im Median bei 47% der Gesamt-Lymphozytenzahl. Ergebnisse von Watanabe et al. und Kühnert et al. konnten damit bestätigt werden [15, 18]. In der vorliegenden Studie waren die $CD4^+$ T-Helferzellen während der Schwangerschaft im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert. Dies stimmt mit bereits publizierten Studien überein, die weitgehend unveränderte $CD4^+$ T-Helferzellen während einer Schwangerschaft im Vergleich zu nichtschwangeren Kontrollen zeigten [15, 18]. In beiden zitierten Studien [15, 18] ließ sich jedoch ein leichter Anstieg der $CD4^+$ T-Helferzellen postpartal beobachten. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Es wurde ein leichter Anstieg der $CD4^+$ T-Helferzellen postpartal beobachtet, dies war an beiden Zeitpunkten (1 Woche p.p. und 8 Wochen p.p) signifikant.

In der Kontrollgruppe stellten die CD8⁺ T-Zellen im Median etwa 25% der Gesamt-Lymphozytenzahl dar. Vergleichbare Daten publizierten auch Watanabe et al. und Kühnert et al. in ihren Studien [15, 18]. Ähnlich den Ergebnissen von Luppi et al. [17] konnte in der vorliegenden Studie eine tendenzielle Erhöhung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen während der Schwangerschaft im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Auch in der Postnatalperiode waren die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe tendentiell erhöht. Zu keinem Zeitpunkt waren jedoch signifikante Veränderungen zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Dies stimmt mit den Untersuchungen von Watanabe et al. überein, die weder prä- noch postpartal signifikante Veränderungen in der CD8⁺ T-Zellzahl zeigten [15].

Der Anteil der NK-Zellen an der Gesamt-Lymphozytenzahl betrug in der vorliegenden Studie im Median 12%, dieses Ergebnis ist mit den Studien von Watanabe et al. und Kühnert et al. vergleichbar [15, 18]. Die NK-Zellen der Schwangerengruppe zeigten in der vorliegenden Studie zu allen vier Zeitpunkten erniedrigte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses war jedoch nur zum Zeitpunkt eine Woche nach Geburt signifikant. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit mehreren Studien, die einen Abfall der NK-Zellen in der Spätschwangerschaft beschreiben [15, 19]. Im Gegensatz zur Studie von Watanabe et al. [15] konnten wir allerdings keinen signifikanten Anstieg der NK-Zellen postpartal beobachten. Es muss jedoch erwähnt werden, dass in der vorliegende Studie die Prozentzahlen, bei Watanabe et al. hingegen die Absolutzahlen betrachtet wurden. Es ist denkbar, dass im Rahmen des Gesamtanstieges der Lymphozytenzahlen post partum ein Anstieg der absoluten NK-Zell-Zahlen, nicht jedoch ein prozentualer Anstieg der NK-Zellen zu verzeichnen ist.

In der Kontrollgruppe stellten die NKT-Zellen einen Anteil von etwa 4% an der Gesamt-Lymphozytenzahl dar. Übereinstimmend fanden Kühnert et al. einen Anteil von etwa 5% NKT-Zellen an der Gesamt-Lymphozytenzahl bei nichtschwangeren Frauen [18]. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ließen sich sowohl während als auch nach der Schwangerschaft tendentiell erhöhte Werte beobachten, die jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert waren. Im Gegensatz hierzu beschrieben Kühnert et al. einen signifikanten Anstieg der NKT-Prozentzahlen im zweiten und dritten Trimenon, und eine Normalisierung der NKT-Prozentzahlen bereits eine

Woche nach Geburt [18]. Zu dem numerischen Verhalten der $CD3^+CD8^+$ NK-Zellen in der Perinatalperiode lagen bislang keine Literaturdaten vor. In der vorliegenden Studie fand sich eine tendenzielle Erniedrigung dieser Lymphozyten-Subpopulation in der Perinatalperiode (im Vergleich zur Kontrollgruppe), dies war jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie und den Literaturdaten feststellen, dass sich im letzten Trimenon der Schwangerschaft keine signifikanten numerischen Veränderungen in den Lymphozyten-Subpopulationen finden. Eine Ausnahme bilden möglicherweise NK-Zellen, die im letzten Trimenon der Schwangerschaft geringfügig erniedrigt sind. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erniedrigte NK-Zellzahl und die dadurch mögliche Reduktion der Zytotoxizität eine Rolle in der maternal-fetalen Toleranz spielen [15]. Dies ist jedoch bislang nicht bewiesen worden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und die Literaturdaten weisen darauf hin, dass es nach der Geburt vor allem zu einem Anstieg der $CD4^+$ T-Helferzellen im maternalen Kreislauf kommt. Die zytotoxischen Zellen ($CD3^+CD8^+$ Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen) scheinen hingegen postnatal keinen signifikanten numerischen Veränderungen zu unterliegen.

4.3 Expression zytotoxischer Proteine in Lymphozyten-Subpopulationen

In der vorliegenden Studie wurden erstmals zytotoxische, Apoptose-induzierende Proteine (GrA, GrB, GrK, Perforin) in maternalen Lymphozyten-Subpopulationen in der Perinatalperiode untersucht. Übereinstimmend mit den Literaturdaten fand sich bei Kontrollprobanden nur eine geringe Expression der zytotoxischen Proteine (GrA, GrB, GrK, Perforin) in $CD4^+$ T-Helferzellen (< 10%), eine mittlere Expression in zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen (10 - 40%) und eine hohe Expression in NK-Zellen und NKT-Zellen (40 - 95%) [142, 143]. Diese Daten passen zu dem Konzept, dass vor allem zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen Apoptose durch die oben genannten zytotoxischen Proteine induzieren können. Als generelles Phänomen wurde zusätzlich festgestellt, dass GrA in allen Subpopulationen stärker exprimiert

wird als GrB, GrK und Perforin. Auch dies stimmt mit den Literaturdaten überein [142, 143].

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Studie war der signifikante Anstieg der GrB-Expression in zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und in NK-Zellen in der Perinatalperiode. Auch die Expression von GrB in NKT-Zellen war in der Perinatalperiode tendentiell erhöht, dies war jedoch nur zum Zeitpunkt 8 Wochen nach Geburt signifikant. Somit scheint es in der Perinatalperiode zu einer erhöhten GrB-Expression in allen relevanten maternalen zytotoxischen Lymphozyten-Subpopulationen zu kommen. Bemerkenswert ist, dass dieser Anstieg sowohl Wochen vor der Geburt als auch in den Wochen nach der Geburt zu finden ist. Dies spricht gegen die Annahme, dass dieser Anstieg direkt hormonell bedingt ist. Auch fand sich keine Korrelation der GrB-Expressionen mit den untersuchten Hormonkonzentrationen.

Die Perforin-Expression zeigte in den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen sowie in den NKT-Zellen ein ähnliches Expressionsmuster wie GrB: es ließ sich ein signifikanter Anstieg sowohl pränatal als auch postpartal beobachten. Auch fand sich keine Korrelation der Perforinexpression mit den jeweiligen Hormonkonzentrationen. Im Gegensatz zu GrB war jedoch in NK-Zellen kein signifikanter Anstieg der Perforin-Expression (im Vergleich zur Kontrollgruppe) zu verzeichnen.

Welche Bedeutung könnten diese Veränderungen der Expression von GrB und Perforin in maternalen zytotoxischen Zellen haben? Die Serinprotease GrB und das porenformende Protein Perforin sind gemeinsam an der Apoptose-Induktion von Zielzellen beteiligt. Während einer Schwangerschaft wird aber eine Reihe von komplexen Immun-Mechanismen aktiviert, um die Aggression des maternalen Immunsystems gegenüber dem Feten, der auch paternale Antigene besitzt, zu verhindern. Im Zuge dessen scheint es zu einer Inhibition einer durch maternale Zellen induzierten Apoptose fetaler Zellen zu kommen. Wie aber lässt sich dann die erhöhte GrB- bzw. Perforinexpression in der Perinatalperiode erklären, die normalerweise zu einer Zerstörung fetaler Zielzellen führen würden?

Denkbar hierzu sind zwei Hypothesen:

Hypothese A. Die GrB- und Perforin-Expression würde normalerweise deutlich höhere Werte aufweisen als in dieser Studie beschrieben, da das maternale Immunsystem die Antigene des Feten als fremd erkennt, und zytotoxische Mechanismen in Gang setzt. Dies könnte durch inhibitorische Mechanismen verhindert werden. Somit wäre also der beobachtete signifikante Anstieg der GrB- und Perforin-Expression nur Ausdruck der Veränderungen, die nicht durch die inhibitorischen Mechanismen verhindert werden konnten. In diesem Szenario wäre es denkbar, dass bei fehlender Inhibition eine sehr starke GrB- und Perforin-Expression zu beobachten wäre, die zu einer signifikanten Schädigung des Feten führen würde. Dies könnte in der Pathogenese von Aborten eine Rolle spielen.

Hypothese B. Das maternale Immunsystem erkennt den Feten mit seinen zur Hälfte paternalen Antigenen als fremd, und exprimiert vermehrt und ungehindert GrB- und Perforin. In diesem Szenario würde der beobachtete signifikante Anstieg der GrB- und Perforin-Expression die natürliche, nicht-inhibierte Reaktion auf fremdantigen-beladene Zielzellen darstellen. Durch schwangerschafts-spezifische Mechanismen könnte jedoch eine Exozytose bzw. Aktivierung dieser Proteine und damit die Apoptose fetaler Zellen verhindert werden. Auch dieser Mechanismus könnte in der Pathogenese von Aborten eine Rolle spielen: eine verminderte Inhibition der Freisetzung bzw. Aktivierung der zytotoxischen Proteine könnte zur Schädigung des Feten führen. Ein Faktor, der hierbei eine Rolle spielen könnte, ist der *Progesterone-induced blocking factor* (PIBF). Lymphozyten bilden in Anwesenheit von Progesteron PIBF, der die Degranulation von NK-Zellen inhibiert. Im Blut gesunder Schwangerer ist die PIBF-Expression im Vergleich zu Schwangeren mit drohendem Abort erhöht [144].

Aufgrund der bislang zu diesem Thema sehr spärlichen Literatur kann hier keine endgültige Beurteilung oder Gewichtung der beiden Hypothesen erfolgen. Die einzigen beiden Publikationen, die sich mit der Regulation eines lymphozytären zytotoxischen Proteins im peripheren Blut von Schwangeren beschäftigten (es handelte sich um Perforin), hatten methodische Schwächen, die einen Vergleich mit der vorliegenden Arbeit nicht zulassen [145, 146]. In der Studie von Rukavina et al.

wurde die Perforin-Expression bei nichtschwangeren Frauen und schwangeren Frauen (im ersten Trimenon und zum Zeitpunkt der Geburt) [145], bei Gulan et al. bei Schwangeren im ersten Trimenon (sowohl auffällige als auch unauffällige Schwangerschaften) bestimmt [146]. In beiden Studien wurde die Perforin-Expression mittels Durchflusszytometrie in Blutlymphozyten gemessen, es wurde jedoch lediglich eine Doppelmarkierung der Zellen vorgenommen (z.B. Perforin⁺CD56⁺ oder Perforin⁺CD16⁺), die eine genaue Zuordnung zu bestimmten Lymphozyten-Subpopulationen nicht ermöglicht [145, 146]. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Dissertation mittels 3-Farben-Durchflusszytometrie spezifische Lymphozyten-Subpopulationen (wie die Perforin⁺CD3⁻CD16/56⁺ NK-Zellen) genau identifiziert. Somit ist ein Vergleich der publizierten Daten mit den in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten nicht möglich.

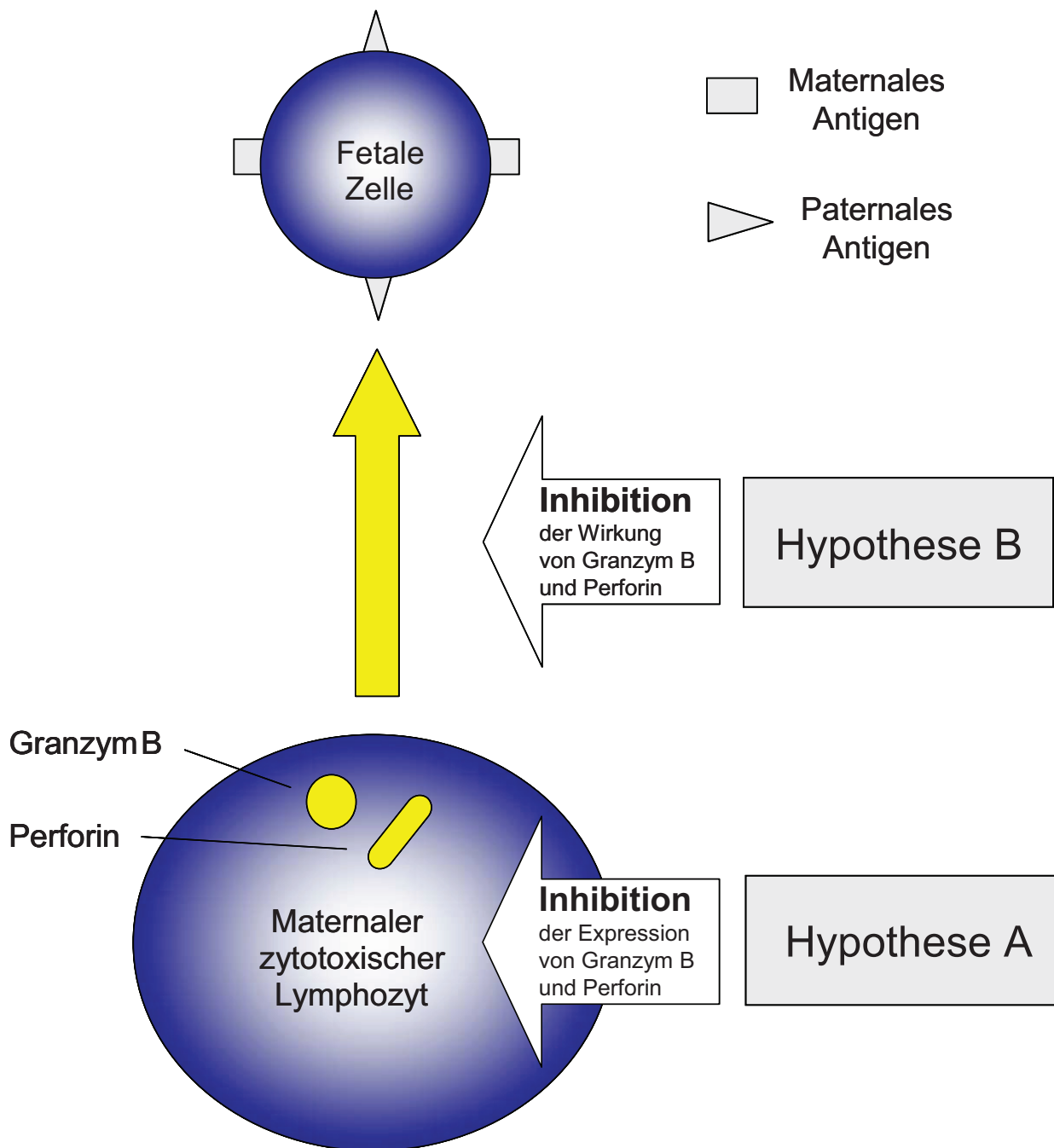


Abb. 4-1: Hypothesen zur maternalen GrB- und Perforin-Expression

Der maternale zytotoxische Lymphozyt erkennt den Feten mit seinen paternalen Antigenen als fremd. Bei der Hypothese A supprimieren inhibitorische Mechanismen einen sonst viel stärker ausfallenden Anstieg der GrB- und Perforin-Expression. Bei der Hypothese B verhindern schwangerschafts-spezifische Mechanismen die Exozytose bzw. Aktivierung der zytotoxischen Proteine GrB und Perforin und somit eine Apoptose fetaler Zellen.

Die Untersuchung der zytotoxischen Proteine in maternalen Lymphozyten-Subpopulationen von Frauen mit Abort oder drohendem Abort könnte hier möglicherweise wichtige Einblicke geben. Es wäre zu untersuchen, ob bei Abort oder drohendem Abort eine im Vergleich zu normalen Schwangeren veränderte GrB-Expression oder Perforin-Expression in maternalen Lymphozyten zu finden ist. Würde Hypothese A zutreffen, müsste bei Abort oder drohendem Abort eine massiv erhöhte GrB- oder Perforin-Expression in maternalen zytotoxischen Lymphozyten zu finden sein. Würde Hypothese B zutreffen, dann müsste die GrB- oder Perforin-Expression in maternalen zytotoxischen Lymphozyten bei Abort oder drohendem Abort unverändert sein. Eine klinische Studie zur Untersuchung der Expression von GrB und Perforin in maternalen Lymphozyten-Subpopulationen bei Frauen mit Abort oder drohendem Abort sollte daher durchgeführt werden. Die vorliegende Promotionsarbeit bildet nicht nur die Rationale für eine derartige Studie, sondern liefert durch die Beschreibung gesunder Schwangerer ohne Abortgeschehen auch „Normalwerte“, mit denen die Daten bei Abort oder drohendem Abort verglichen werden können.

Ein weiteres Diskussionsthema, das sich aus den vorliegenden Ergebnissen ergibt, ist die Frage nach der Ursache, warum nur die Expression von GrB und Perforin, nicht jedoch die Expression von GrA und GrK in der Perinatalperiode in maternalen zytotoxischen Lymphozyten verändert ist. Sowohl GrA als auch GrK können wie GrB Apoptose auslösen. Es gibt jedoch Hinweise in der Literatur, die auf eine unterschiedliche Expression dieser Proteine in der Lymphozyten-Differenzierung deuten. Ein Beispiel dafür sind die CD8⁺ T-Zellen. Diese CD8⁺ T-Zellen können nach Antigen-Kontakt sowohl zu Effektorzellen (CD27⁻/CD28⁻) als auch zu Memory-Zellen (CD27⁺/CD28⁺) ausreifen. Es gibt eine Reihe von Studien, die darauf hinweisen, dass GrA und GrK vor allem in Memory-Zellen exprimiert werden, GrB und Perforin hingegen vor allem in Effektorzellen exprimiert werden [141, 147-150]. Dies würde in Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie die Vermutung nahe legen, dass in der Perinatalperiode vor allem die Effektorzellen aktiviert sind, und somit auch die entsprechenden Proteine (GrB und Perforin) verstärkt exprimiert werden. In der vorliegenden Studie wurden die Subpopulationen der CD8⁺ T-Zellen nicht untersucht (unter anderem mittels Analyse der Expression von CD27 und CD28), daher kann diese Frage anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet

werden. Ziel nachfolgender Studien müsste es daher sein, auch die Differenzierung zytotoxischer Zellen zu untersuchen, um die Ursachen der differentiellen Expression zytotoxischer Proteine in der Perinatalperiode zu erforschen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegende Promotionsarbeit erstmals einen charakteristischen Anstieg der Expression von GrB und Perforin in zytotoxischen maternalen Lymphozytensubpopulationen in der Perinatalperiode beschrieben hat. Es wurden zwei Hypothesen zu der Frage aufgestellt, wie sich dieser Anstieg in das Konzept der maternal-fetalen Toleranz einfügen könnte: einerseits könnte eine Suppression eines sonst sehr viel stärkeren Anstiegs von GrB und Perforin bei gesunden Schwangeren vorliegen, andererseits könnten die zellulären Effekte von GrB und Perforin bei gesunden Schwangeren inhibiert sein. Weitere Studien, insbesondere die Untersuchung Schwangerer mit drohendem Abort, sind notwendig, um die Bedeutung der Expression von GrB und Perforin in maternalen zytotoxischen Zellen besser zu verstehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die komplexen Immun-Mechanismen, die eine Aggression des maternalen Immunsystems gegenüber dem Feten (mit seinen paternalen Fremdartigenen) verhindern, sind bislang unzureichend geklärt. Die Inhibition einer durch maternale Lymphozyten induzierten Apoptose fetaler Zellen scheint hierbei eine besondere Rolle zu spielen. Bemerkenswerterweise gibt es zur Expression Apoptose-induzierender Proteine maternaler Lymphozyten-Subpopulationen während und nach der Schwangerschaft bislang keine Literaturdaten. In der vorliegenden Dissertation wurde erstmals die Expression der wichtigsten zytotoxischen Proteine (Perforin, Granzym A, Granzym B, Granzym K) an zwei Zeitpunkten vor der Geburt als auch an zwei Zeitpunkten nach Geburt in schwangeren Frauen zu untersucht und dieses Expressionsmuster mit einer Kontrollgruppe nichtschwangerer Frauen verglichen. Die Expression der zytotoxischen Proteine wurde systematisch in verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen ($CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, $CD3^-CD8^+$ NK-Zellen) des peripheren Blutes von 20 Schwangeren und 20 Nichtschwangeren charakterisiert. Es zeigte sich, dass die Expression von Granzym A und Granzym K in maternalen Lymphozyten in der Perinatalperiode weitgehend normal ist. Hingegen fand sich ein charakteristischer perinataler Anstieg der Expression von Granzym B und Perforin in bestimmten maternalen Lymphozyten-subpopulationen, insbesondere in zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen. Es wurden zwei Hypothesen zu der Frage aufgestellt, wie sich dieser Anstieg in das Konzept der maternal-fetalen Toleranz einfügen könnte: einerseits könnte eine Suppression eines sonst sehr viel stärkeren Anstiegs von Granzym B und Perforin bei gesunden Schwangeren vorliegen, andererseits könnten die zellulären Effekte von Granzym B und Perforin bei gesunden Schwangeren inhibiert sein. Weitere Studien, insbesondere die Untersuchung Schwangerer mit drohendem Abort, sind notwendig, um die Bedeutung der Expression von Granzym B und Perforin in maternalen zytotoxischen Zellen besser zu verstehen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Hytten, F.E. and I. Leitch, *The physiology of human pregnancy*. Blackwell Scientific Publications, 1971.
2. Sibai, B.M. and A. Frangieh, *Maternal adaptation to pregnancy*. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1995. **7**(6): p. 420-6.
3. Pitkin, R.M. and D.L. Witte, *Platelet and leukocyte counts in pregnancy*. *Jama*, 1979. **242**(24): p. 2696-8.
4. Duvekot, J.J. and L.L. Peeters, *Maternal cardiovascular hemodynamic adaptation to pregnancy*. *Obstet Gynecol Surv*, 1994. **49**(12 Suppl): p. S1-14.
5. Braunstein, G.D., et al., *Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy*. *Am J Obstet Gynecol*, 1976. **126**(6): p. 678-81.
6. Csapo, A.I., et al., *The significance of the human corpus luteum in pregnancy maintenance. I. Preliminary studies*. *Am J Obstet Gynecol*, 1972. **112**(8): p. 1061-7.
7. Turkington, R.W. and R.L. Hill, *Lactose synthetase: progesterone inhibition of the induction of alpha-lactalbumin*. *Science*, 1969. **163**(874): p. 1458-60.
8. Josimovich, J.B. and J.A. Maclaren, *Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone*. *Endocrinology*, 1962. **71**: p. 209-20.
9. Josimovich, J.B., et al., *Placental lactogen in maternal serum as an index of fetal health*. *Obstet Gynecol*, 1970. **36**(2): p. 244-50.
10. Hytten, F.E. and G. Chamberlain, *Clinical Physiology in Obstetrics*. Blackwell Scientific Publications, 1991.
11. O'Leary, P., et al., *Longitudinal assessment of changes in reproductive hormones during normal pregnancy*. *Clin Chem*, 1991. **37**(5): p. 667-72.
12. Lindsay, J.R. and L.K. Nieman, *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy: challenges in disease detection and treatment*. *Endocr Rev*, 2005. **26**(6): p. 775-99.
13. Efrati, P., et al., *Leukocytes of Normal Pregnant Women*. *Obstet Gynecol*, 1964. **23**: p. 429-32.
14. Luppi, P., et al., *Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women*. *J Leukoc Biol*, 2002. **72**(5): p. 874-84.
15. Watanabe, M., et al., *Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy*. *Am J Reprod Immunol*, 1997. **37**(5): p. 368-77.
16. Matthiesen, L., et al., *Lymphocyte subsets and autoantibodies in pregnancies complicated by placental disorders*. *Am J Reprod Immunol*, 1995. **33**(1): p. 31-9.
17. Luppi, P., et al., *Normal pregnancy is associated with peripheral leukocyte activation*. *Am J Reprod Immunol*, 2002. **47**(2): p. 72-81.
18. Kuhnert, M., et al., *Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1998. **76**(2): p. 147-51.

19. Hidaka, Y., et al., *Changes in natural killer cell activity in normal pregnant and postpartum women: increases in the first trimester and postpartum period and decrease in late pregnancy*. J Reprod Immunol, 1991. **20**(1): p. 73-83.
20. Shi, Y., et al., *Interferon-gamma expression in natural killer cells and natural killer T cells is suppressed in early pregnancy*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(5): p. 389-94.
21. Medawar, P.B., *Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates*. Symposia of the Society for Experimental Biology, 1953. **7**: p. 320-328.
22. Bianchi, D.W., et al., *Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 705-8.
23. Invernizzi, P., et al., *Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy*. Hum Genet, 2002. **110**(6): p. 587-91.
24. van Kampen, C.A., et al., *Pregnancy can induce long-persisting primed CTLs specific for inherited paternal HLA antigens*. Hum Immunol, 2001. **62**(3): p. 201-7.
25. Suci-Foca, N., et al., *Anti-idiotypic antibodies to anti-HLA receptors induced by pregnancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(3): p. 830-4.
26. van Kampen, C.A., et al., *Kinetics of the pregnancy-induced humoral and cellular immune response against the paternal HLA class I antigens of the child*. Hum Immunol, 2002. **63**(6): p. 452-8.
27. Tafuri, A., et al., *T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy*. Science, 1995. **270**(5236): p. 630-3.
28. Jiang, S.P. and M.S. Vacchio, *Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft"*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3086-90.
29. Mattsson, R., *The non-expression of MHC class II in trophoblast cells*. Am J Reprod Immunol, 1998. **40**(6): p. 383-4.
30. Trowsdale, J. and A.G. Betz, *Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 241-6.
31. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
32. Ljunggren, H.G., et al., *The RMA-S lymphoma mutant; consequences of a peptide loading defect on immunological recognition and graft rejection*. Int J Cancer Suppl, 1991. **6**: p. 38-44.
33. Nishikawa, K., et al., *Accumulation of CD16-CD56+ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua*. Int Immunol, 1991. **3**(8): p. 743-50.
34. Guleria, I. and M.H. Sayegh, *Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3345-51.
35. Mor, G., et al., *Fas-fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease*. Am J Reprod Immunol, 1998. **40**(2): p. 89-94.
36. Munn, D.H., et al., *Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism*. Science, 1998. **281**(5380): p. 1191-3.

37. Mellor, A.L., et al., *Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3771-6.
38. Piccinni, M.P., et al., *Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1020-4.
39. Guleria, I., et al., *A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 231-7.
40. Jin, L.P., et al., *Blockade of CD80 and CD86 at the time of implantation inhibits maternal rejection to the allogeneic fetus in abortion-prone matings*. J Reprod Immunol, 2005. **65**(2): p. 133-46.
41. Holmes, C.H. and K.L. Simpson, *Complement and pregnancy: new insights into the immunobiology of the fetomaternal relationship*. Baillieres Clin Obstet Gynaecol, 1992. **6**(3): p. 439-60.
42. Beagley, K.W. and C.M. Gockel, *Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **38**(1): p. 13-22.
43. Mattsson, R., et al., *Maintained pregnancy levels of oestrogen afford complete protection from post-partum exacerbation of collagen-induced arthritis*. Clin Exp Immunol, 1991. **85**(1): p. 41-7.
44. Somerset, D.A., et al., *Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset*. Immunology, 2004. **112**(1): p. 38-43.
45. Heikkinen, J., et al., *Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(2): p. 373-8.
46. Sasaki, Y., et al., *Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(5): p. 347-53.
47. Aluvihare, V.R., M. Kallikourdis, and A.G. Betz, *Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 266-71.
48. Luppi, P., *How immune mechanism are affected by pregnancy*. Vaccine, 2003. **21**(24): p. 3352-7.
49. Piccinni, M.P., et al., *Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones*. J Immunol, 1995. **155**(1): p. 128-33.
50. Piccinni, M.P., *T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss*. Reprod Biomed Online, 2006. **13**(6): p. 840-4.
51. Svensson, L., et al., *The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice*. J Reprod Immunol, 2001. **51**(1): p. 3-7.
52. Trapani, J.A. and M.J. Smyth, *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 735-47.
53. Russell, J.H. and T.J. Ley, *Lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 323-70.

54. Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D., *Der Experimentator – Immunologie*, 1. Auflage, Elsevier GmbH, München. 2004.
55. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
56. Wyllie, A.H., G.J. Beattie, and A.D. Hargreaves, *Chromatin changes in apoptosis*. Histochem J, 1981. **13**(4): p. 681-92.
57. Savill, J., et al., *Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis*. Immunol Today, 1993. **14**(3): p. 131-6.
58. Duvall, E., A.H. Wyllie, and R.G. Morris, *Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis)*. Immunology, 1985. **56**(2): p. 351-8.
59. Trapani, J.A., V.R. Sutton, and M.J. Smyth, *CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections*. Immunol Today, 1999. **20**(8): p. 351-6.
60. Trapani, J.A., *Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes*. Int Rev Cytol, 1998. **182**: p. 111-92.
61. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1449-56.
62. Van Parijs, L. and A.K. Abbas, *Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(3): p. 355-61.
63. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 401-9.
64. Sarin, A., et al., *Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases*. Immunity, 1997. **6**(2): p. 209-15.
65. Kagi, D., et al., *Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice*. Nature, 1994. **369**(6475): p. 31-7.
66. Trapani, J.A., *Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases*. Genome Biol, 2001. **2**(12): p. REVIEWS3014.
67. Fink, T.M., et al., *The human granzyme A (HFSP, CTLA3) gene maps to 5q11-q12 and defines a new locus of the serine protease superfamily*. Genomics, 1993. **18**(2): p. 401-3.
68. Baker, E., et al., *The genes encoding NK cell granule serine proteases, human tryptase-2 (TRYP2) and human granzyme A (HFSP), both map to chromosome 5q11-q12 and define a new locus for cytotoxic lymphocyte granule tryptases*. Immunogenetics, 1994. **40**(3): p. 235-7.
69. Smyth, M.J., M.D. O'Connor, and J.A. Trapani, *Granzymes: a variety of serine protease specificities encoded by genetically distinct subfamilies*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(5): p. 555-62.
70. Griffiths, G.M. and S. Isaaz, *Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor*. J Cell Biol, 1993. **120**(4): p. 885-96.

71. McGuire, M.J., P.E. Lipsky, and D.L. Thiele, *Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I*. J Biol Chem, 1993. **268**(4): p. 2458-67.
72. Masson, D., et al., *Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH*. Biochemistry, 1990. **29**(51): p. 11229-35.
73. Burkhardt, J.K., et al., *The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2327-40.
74. Schmidt, R.E., et al., *Specific release of proteoglycans from human natural killer cells during target lysis*. Nature, 1985. **318**(6043): p. 289-91.
75. Metkar, S.S., et al., *Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation*. Immunity, 2002. **16**(3): p. 417-28.
76. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 361-70.
77. Stinchcombe, J.C., et al., *The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 751-61.
78. Bossi, G., et al., *The secretory synapse: the secrets of a serial killer*. Immunol Rev, 2002. **189**: p. 152-60.
79. Trambas, C.M. and G.M. Griffiths, *Delivering the kiss of death*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 399-403.
80. Kupfer, A. and G. Dennert, *Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells*. J Immunol, 1984. **133**(5): p. 2762-6.
81. Bratke, K., *Zur Bedeutung cytotoxischer Effektorproteine an der Pathogenese des Asthma bronchiale*. Dissertation, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, 2005.
82. Fink, T.M., et al., *Human perforin (PRF1) maps to 10q22, a region that is syntenic with mouse chromosome 10*. Genomics, 1992. **13**(4): p. 1300-2.
83. Uellner, R., et al., *Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain*. Embo J, 1997. **16**(24): p. 7287-96.
84. Masson, D. and J. Tschopp, *Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes*. J Biol Chem, 1985. **260**(16): p. 9069-72.
85. Blumenthal, R., et al., *Liposomes as targets for granule cytotoxicity from cytotoxic large granular lymphocyte tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(17): p. 5551-5.
86. Podack, E.R., J.D. Young, and Z.A. Cohn, *Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8629-33.
87. Lichtenheld, M.G., et al., *Structure and function of human perforin*. Nature, 1988. **335**(6189): p. 448-51.

88. Natarajan, K. and J.A. Cowan, *Solution structure of a synthetic lytic peptide: the perforin amino terminus*. Chem Biol, 1998. **5**(3): p. 147-54.
89. Persechini, P.M., et al., *Channel-forming activity of the perforin N-terminus and a putative alpha-helical region homologous with complement C9*. Biochemistry, 1992. **31**(21): p. 5017-21.
90. Bolitho, P., et al., *Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 339-47.
91. Voskoboinik, I., et al., *Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8426-34.
92. Nalefski, E.A. and J.J. Falke, *Location of the membrane-docking face on the Ca²⁺-activated C2 domain of cytosolic phospholipase A2*. Biochemistry, 1998. **37**(51): p. 17642-50.
93. Fraser, S.A., et al., *Perforin lytic activity is controlled by calreticulin*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4150-5.
94. Dupuis, M., et al., *The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes*. J Exp Med, 1993. **177**(1): p. 1-7.
95. Kuta, A.E., C.R. Reynolds, and P.A. Henkart, *Mechanism of lysis by large granular lymphocyte granule cytotoxin: generation of a stable cytotoxin-RBC intermediate*. J Immunol, 1989. **142**(12): p. 4378-84.
96. Balaji, K.N., et al., *Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation*. J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 493-503.
97. Trapani, J.A. and M.J. Smyth, *Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation*. Immunol Cell Biol, 1993. **71** (Pt 3): p. 201-8.
98. Russell, J.H., *Internal disintegration model of cytotoxic lymphocyte-induced target damage*. Immunol Rev, 1983. **72**: p. 97-118.
99. Trapani, J.A., et al., *Localization of granzyme B in the nucleus. A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4127-33.
100. Pinkoski, M.J., et al., *Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis*. Blood, 1998. **92**(3): p. 1044-54.
101. Froelich, C.J., et al., *New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29073-9.
102. Shi, L., et al., *Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization*. J Exp Med, 1997. **185**(5): p. 855-66.
103. Browne, K.A., et al., *Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8604-15.

104. Motyka, B., et al., *Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis*. Cell, 2000. **103**(3): p. 491-500.
105. Keefe, D., et al., *Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis*. Immunity, 2005. **23**(3): p. 249-62.
106. McNeil, P.L. and R.A. Steinhardt, *Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 697-731.
107. Reddy, A., E.V. Caler, and N.W. Andrews, *Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes*. Cell, 2001. **106**(2): p. 157-69.
108. Shi, L., et al., *Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5456-61.
109. Masson, D., M. Zamai, and J. Tschopp, *Identification of granzyme A isolated from cytotoxic T-lymphocyte-granules as one of the proteases encoded by CTL-specific genes*. FEBS Lett, 1986. **208**(1): p. 84-8.
110. Nakajima, H., H.L. Park, and P.A. Henkart, *Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin*. J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 1037-46.
111. Beresford, P.J., et al., *Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation*. Immunity, 1999. **10**(5): p. 585-94.
112. Zhang, D., et al., *Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5746-51.
113. Fan, Z., et al., *Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 145-53.
114. Martinvalet, D., P. Zhu, and J. Lieberman, *Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 355-70.
115. Lieberman, J. and Z. Fan, *Nuclear war: the granzyme A-bomb*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(5): p. 553-9.
116. Fan, Z., et al., *HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(8): p. 2810-20.
117. Fan, Z., et al., *Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor*. Cell, 2003. **112**(5): p. 659-72.
118. Chowdhury, D., et al., *The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death*. Mol Cell, 2006. **23**(1): p. 133-42.
119. Zhang, D., et al., *Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3683-90.

120. Lord, S.J., et al., *Granzyme B: a natural born killer*. Immunol Rev, 2003. **193**: p. 31-8.
121. Darmon, A.J., D.W. Nicholson, and R.C. Bleackley, *Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B*. Nature, 1995. **377**(6548): p. 446-8.
122. Martin, S.J., et al., *The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism*. Embo J, 1996. **15**(10): p. 2407-16.
123. Nicholson, D.W., et al., *Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 37-43.
124. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
125. Goping, I.S., et al., *Identification of {alpha}-tubulin as a granzyme B substrate during CTL-mediated apoptosis*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 5): p. 858-65.
126. Kothakota, S., et al., *Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis*. Science, 1997. **278**(5336): p. 294-8.
127. Heibein, J.A., et al., *Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\psi_m$) and cytochrome c release are caspase independent*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4683-93.
128. Heibein, J.A., et al., *Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1391-402.
129. Bleackley, R.C. and J.A. Heibein, *Enzymatic control of apoptosis*. Nat Prod Rep, 2001. **18**(4): p. 431-40.
130. Zhao, T., et al., *Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein SET to induce single-stranded DNA nicks of target cells*. Cell Death Differ, 2007. **14**(3): p. 489-99.
131. Zhao, T., et al., *Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 12104-11.
132. Guo, Y., et al., *Granzyme K degrades the redox/DNA repair enzyme Ape1 to trigger oxidative stress of target cells leading to cytotoxicity*. Mol Immunol, 2008.
133. Kelly, J.M., et al., *Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22236-42.
134. Fellows, E., et al., *Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program*. Blood, 2007. **110**(2): p. 544-52.
135. Lu, H., et al., *Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 1171-8.

136. Hua, G., Q. Zhang, and Z. Fan, *Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20553-60.
137. Hou, Q., et al., *Granzyme H induces apoptosis of target tumor cells characterized by DNA fragmentation and Bid-dependent mitochondrial damage*. Mol Immunol, 2008. **45**(4): p. 1044-55.
138. Suck, G., et al., *KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity*. Exp Hematol, 2005. **33**(10): p. 1160-71.
139. Edwards, K.M., et al., *The human cytotoxic T cell granule serine protease granzyme H has chymotrypsin-like (chymase) activity and is taken up into cytoplasmic vesicles reminiscent of granzyme B-containing endosomes*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30468-73.
140. Andrade, F., et al., *Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition*. Embo J, 2007. **26**(8): p. 2148-57.
141. Bratke, K., et al., *Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood*. Eur J Immunol, 2005. **35**(9): p. 2608-16.
142. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2840-8.
143. Bade, B., *Differentielle Expression humaner Granzyme in Lymphozyten aus dem peripheren Blut*. Dissertation, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, 2004.
144. Faust, Z., et al., *Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells*. Am J Reprod Immunol, 1999. **42**(2): p. 71-5.
145. Rukavina, D., et al., *Down-regulated expression of perforin-positive/CD16+ cells in the peripheral blood lymphocytes in the first trimester of pregnancy and up-regulation at the end of pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 1997. **38**(3): p. 189-96.
146. Gulan, G., et al., *Perforin-expressing lymphocytes in peripheral blood and decidua of human first-trimester pathological pregnancies*. Am J Reprod Immunol, 1997. **38**(1): p. 9-18.
147. Takata, H. and M. Takiguchi, *Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4330-40.
148. Tomiyama, H., et al., *Phenotypic classification of human CD8+ T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(4): p. 999-1010.
149. Hamann, D., et al., *Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1407-18.
150. Tomiyama, H., T. Matsuda, and M. Takiguchi, *Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5538-50.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
APAF-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
Ape1	<i>apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>
ATP/dATP	Adenosintriphosphat / Deoxyadenosintriphosphat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
Bzw.	Beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CRH	Corticotropin releasing hormone
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>fluorescence activated cell scan</i>
Fas	<i>fatty acid synthetase</i>
FSC	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gewichtskraft
Gr	Granzym
hCG	humanes Choriongonadotropin
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HMG-2	<i>high-mobility group protein 2</i>
hPL	humanes Plazentalaktogen
ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IDO	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
INF	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

Kap.	Kapitel
K	Kontrollgruppe
LFA-1	<i>leukocyte function-associated antigen 1</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTOC	<i>microtubule-organizing centre</i>
NaN ₃	Natriumazid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
p	Signifikanz
PARP	Poly(ADP-Ribose)polymerase
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Tandem-Konjugat aus Phycoerythrin und Cyan 5
p.p.	post partum
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
SPSS	Statistical package for social sciences
SSC	<i>side scatter</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TREX1	<i>three prime repair exonuclease 1</i>
vgl.	Vergleiche
z.B.	zum Beispiel

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Leukozyten-, Neutrophilen- und Lymphozytenzahlen in der Schwangerschaft.....	3
Abb. 1-2:	Interaktion von zytotoxischen Zellen mit Zielzellen	10
Abb. 1-3:	Der Granzym A-vermittelte Zelltod	13
Abb. 1-4:	Der Granzym B-vermittelte Zelltod	15
Abb. 2-1:	Studiendesign der Schwangerengruppe	20
Abb. 2-2:	Beispiel einer computergestützten Auswertung anhand von Granzym A	24
Abb. 3-1:	Konzentrationen von Hämoglobin und Thrombozyten im Blut	33
Abb. 3-2:	Konzentrationen von Leukozyten im Blut	34
Abb. 3-3:	Konzentrationen von 17 β -Estradiol und Progesteron im Serum	35
Abb. 3-4:	Konzentrationen von Cortisol und DHEAS im Serum.....	36
Abb. 3-5:	Anteil der CD3 ⁺ CD4 ⁺ und CD3 ⁺ CD8 ⁺ Zellen an der Gesamt-Lymphozytenzahl	38
Abb. 3-6:	Anteil der CD3 ⁻ CD16/56 ⁺ und CD3 ⁻ CD8 ⁺ Zellen an der Gesamt-Lymphozytenzahl	39
Abb. 3-7:	Anteil der CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ Zellen an der Gesamt-Lymphozytenzahl....	40
Abb. 3-8:	Expression von Granzym A, B, K und Perforin in T-Helferzellen (CD3 ⁺ CD4 ⁺ Zellen).....	44
Abb. 3-9:	Expression von Granzym A, B, K und Perforin in zytotoxischen T-Zellen (CD3 ⁺ CD8 ⁺).....	45
Abb. 3-10:	Expression von Granzym A, B und Perforin in NK-Zellen (CD3 ⁻ CD16/56 ⁺)	46
Abb. 3-11:	Expression von Granzym A, B und Perforin in CD3 ⁻ CD8 ⁺ NK-Zellen..	47
Abb. 3-12:	Expression von Granzym A, B, K und Perforin in NKT-Zellen (CD3 ⁺ CD16/56 ⁺).....	48
Abb. 4-1:	Hypothesen zur maternalen GrB- und Perforin-Expression	57

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Fluorochrome.....	23
Tab. 2-2:	Antikörper gegen Oberflächenantigene	26
Tab. 2-3:	Antikörper gegen intrazelluläre Antigene	26
Tab. 2-4:	Ansätze für die durchflusszytometrische Messung	28
Tab. 3-1:	Grunddaten der Kontrollgruppe.....	30
Tab. 3-2:	Grunddaten der Schwangerengruppe.....	31

7.4 Curriculum vitae

7.5 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Virchow für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die Bereitstellung der notwendigen Arbeitsmittel.

Bei Herrn PD Dr. med. Marek Lommatzsch möchte ich mich besonders herzlich für die intensive Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit sowie für die vielfachen Anregungen bedanken. Seiner Frau Mandy Lommatzsch danke ich für ihre große Geduld und ihr Verständnis.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Kai Bratke für die anschauliche Einführung in das Verfahren der Durchflusszytometrie sowie für das kritische Durchsehen der Texte. Interessante Gespräche mit ihm eröffneten mir weitere Denkansätze für meine Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Probandinnen sowie den Mitarbeiterinnen der Hebammenpraxis Rostock, ohne deren Bereitschaft mich zu unterstützen, diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden für ihre Unterstützung in jeglicher Form.

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Aurich, im Februar 2009

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

**Expression der zytotoxischen Proteine Granzym A, B, K und
Perforin in maternalen Lymphozytensubpopulationen
in der Perinatalperiode**

Eine klinisch-experimentelle Studie

**THESEN ZUR
DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



von

Janna Remmersen aus Hamburg

Rostock 2009

8. THESEN ZUR DISSERTATION

1. Während einer Schwangerschaft unterliegt das maternale Immunsystem einer Vielzahl von Veränderungen. Ursache hierfür sind unter anderem die paternalen Fremd-Antigene des Feten. Komplexe Immun-Mechanismen sorgen für den Schutz des Feten vor einer Aggression durch das maternale Immunsystem. Sie werden unter dem Konzept der so genannten maternal-fetalen Toleranz subsumiert.
2. Diese maternal-fetale Toleranz wird durch verschiedene, teils noch ungeklärte Mechanismen erreicht. Die Inhibition einer durch maternale Lymphozyten induzierten Apoptose fetaler Zellen scheint hierbei eine besondere Rolle zu spielen.
3. Lymphozyten enthalten in ihren Granula verschiedene Apoptose-induzierende Effektormoleküle wie das porenformende Protein Perforin sowie die Granzyme, eine Familie von Serinproteasen. Diese Effektormoleküle lösen über mehrere alternative Strategien den programmierten Zelltod (Apoptose) aus. Zu den Zielzellen der Lymphozyten bzw. der Effektormoleküle gehören unter anderem virusinfizierte und körperfremde Zellen.
4. Zur Expression Apoptose-induzierender Proteine maternaler Lymphozyten-Subpopulationen während und nach der Schwangerschaft gibt es bislang keine Literaturdaten. Ziel der vorliegenden Dissertation war daher die erstmalige Charakterisierung der Expression zytotoxischer, Apoptose-induzierender Proteine (Granzym A, Granzym B, Granzym K, Perforin) in maternalen Lymphozyten-Subpopulationen in der Perinatalperiode.
5. In dieser Studie wurden 20 schwangere Frauen (prospektiv an jeweils 2 Zeitpunkten vor und nach Geburt) und 20 nichtschwangere Frauen untersucht. An jedem Zeitpunkt wurde der Anteil verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen (T-Helferzellen, Zytotoxische T-Zellen, NKT-Zellen, NK-Zellen) an der Gesamt-Lymphozytenzahl sowie die Expression zytotoxischer Proteine in der jeweiligen Lymphozyten-Subpopulationen durchflusszytometrisch gemessen.

6. Es zeigte sich, dass die Expression von Granzym A und K in maternalen Lymphozyten in der Perinatalperiode weitgehend normal ist. Hingegen fand sich ein charakteristischer perinataler Anstieg der Expression von Granzym B und Perforin in bestimmten maternalen Lymphozyten-Subpopulationen, insbesondere in zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen.
7. Die erhöhte Granzym B- und Perforin-Expression wies keine Korrelation mit den untersuchten Hormonkonzentrationen von Östrogen, Progesteron, DHEAS und Cortisol auf. Es fiel zudem auf, dass die Granzym B- und Perforin-Expression sowohl pränatal als auch postnatal erhöht war, wiewohl die Hormonkonzentrationen an diesen Zeitpunkten deutliche Unterschiede aufwiesen. Somit fand sich kein Anhalt für einen direkten Einfluss von Östrogen, Progesteron, DHEAS und Cortisol auf die Granzym B- und Perforin-Expression.
8. Es wurden zwei Hypothesen zu der Frage aufgestellt, wie sich dieser Anstieg der Granzym B- und Perforin-Expression in das Konzept der maternal-fetalen Toleranz einfügen könnte: einerseits könnte eine Suppression eines sonst sehr viel stärkeren Anstiegs von Granzym B und Perforin bei gesunden Schwangeren vorliegen, andererseits könnten die zellulären Effekte von Granzym B und Perforin bei gesunden Schwangeren inhibiert sein.
9. Die Untersuchung zytotoxischer Proteine in Lymphozyten-Subpopulationen von Frauen mit Abort oder drohendem Abort könnte hier möglicherweise wichtige Einblicke geben. Es wäre zu untersuchen, ob bei Abort oder drohendem Abort eine im Vergleich zu normalen Schwangeren veränderte Granzym B-Expression oder Perforin-Expression in maternalen Lymphozyten zu finden ist.
10. Die vorliegende Promotionsarbeit bildet nicht nur die Rationale für eine derartige Studie, sondern liefert durch die Beschreibung gesunder Schwangerer ohne Abortgeschehen auch „Normalwerte“, mit denen die Expression bei Abort oder drohendem Abort verglichen werden können.