

Renée Laiacker
Dr. med.

Von der Charakterisierung eines neuen Antikörpers gegen AT₁-Rezeptoren zu Lokalisations- und Expressionsstudien an Plazentagewebe von Patientinnen mit Präeklampsie

Geboren am 22.01.1976 in Wetzlar
Reifeprüfung am 21.06.1995 in Gießen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995/1996 bis WS 2002/2003
Physikum am 08.09.1997 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium an der Universität Heidelberg
Praktisches Jahr in Bremen in einem Lehrkrankenhaus der Universität Göttingen
Staatsexamen am 13.05.2003 an der Universität Göttingen

Promotionsfach: Frauenheilkunde
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. J. Wacker

Einleitung

Die hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen lassen sich in chronische Hypertonie, Präeklampsie, Propfgestose und transiente Hypertonie unterteilen.

Die Präeklampsie (PE) ist ein schwangerschaftsspezifisches Syndrom, das in der Regel erst nach der 20. Schwangerschaftswoche auftritt. Sie ist definiert durch Hypertonie mit Werten über 140/90mmHg und Proteinurie von über 30mg/dl im Mittelstrahlurin oder dem qualitativen Wert von 1+ in der Urinstix-Methode. Zusätzliche Symptome sind anhaltende Kopfschmerzen, Sehstörungen, Hyperreflexie, Oligurie oder Anurie, starke Ödembildung, Schmerzen im Oberbauch oder abnorme Laborwerte wie Thrombozytopenie, Transaminasenerhöhung und Hyperurikämie. Im Krankheitsverlauf kann es zu Komplikationen wie eklamptischen Anfällen oder zum HELLP-Syndrom kommen.

In den industrialisierten Ländern tritt die PE in 4-10% aller Schwangerschaften auf.

Über die Pathogenese der PE bestehen bislang nur Hypothesen. Dabei werden Veränderungen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), insuffiziente Plazentation mit mangelhafter Trophoblastinvasion und unzureichender Adaptation der Spiralgefäße, ein Mißverhältnis von vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Substanzen, diffuse Endothelschädigung sowie genetische und immunologische Faktoren als Erklärungsmodelle für die Pathogenese der PE herangezogen. In einer neueren Studie wurden stimulierende Autoantikörper gegen den Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT₁-Rezeptor) im Serum von PE-Patientinnen nachgewiesen.

Da das Plazentavolumen und das Risiko, an einer PE zu erkranken, korrelieren und die PE auch bei Molarschwangerschaften auftritt, ist davon auszugehen, daß die Plazenta in der Pathogenese der PE eine zentrale Rolle spielt. Der Trophoblast steht in direktem Kontakt zum mütterlichen Kreislauf und kann somit als Träger von Fremddantigenen für die Bildung der Autoantikörper verantwortlich sein.

Eine Medline-Recherche ergab, daß bisherige Studien über die Expressionsdichte und Lokalisation der AT₁-Rezeptoren an Plazentagewebe von gesunden Schwangeren und schwangeren Frauen mit PE mit Bindungsstudien und radioaktiv markiertem Ang II, jedoch nicht mittels immunhistochemischer Färbungen mit spezifischen AT₁-Rezeptor-Antikörpern quantitativ durchgeführt wurden. Zielsetzung dieser Doktorarbeit war daher, einen neuen Antikörper gegen AT₁-Rezeptoren ausführlich zu charakterisieren und mit diesem gefärbte Plazentaschnitte einer PE-Gruppe und einer Kontrollgruppe mit Hilfe eines semiquantitativen Scores und statistischen Tests zu vergleichen.

Material und Methodik

Drei aus verschiedenen Peptidsequenzen hergestellte Kaninchen-Antikörper gegen den AT₁-Rezeptor wurden mit Hilfe von Positiv- und Negativ-Kontrollen im Western Blot und in der Immunhistochemie charakterisiert. Dafür wurde zunächst im Western Blot die Spezifität der Antikörperbindung nachgewiesen und der Antikörper mit der höchsten Spezifität ausgewählt. Zusätzlich wurde der Titer der Antikörperverdünnung ermittelt. Kontrollen mit Vergleichsgeweben, darunter Nierengewebe als Positivkontrolle und PC12-Zellhomogenat als Negativkontrolle sowie eine Präinkubation mit dem zur Immunisierung der Kaninchen verwendeten Peptid wurden durchgeführt. Ein anderer Antikörper, der ebenfalls an AT₁-Rezeptoren bindet, wurde im Western Blot zum Vergleich eingesetzt. Als Kontrollen wurden die Primär- und/oder Sekundärantikörper durch Pufferlösungen ersetzt sowie eine Kontrolle mit normalem Kaninchen-Serum im Western Blot und in der Immunhistochemie durchgeführt.

Um möglicherweise versteckte Antigene zu detektieren, wurden Andamethoden mit verschiedenen Enzymen und mit der Mikrowelle ausgetestet.

Weitere Vergleichsantikörper (anti-SMA, -Cytokeratin-Cocktail, -LCA und -CD34) wurden hinzugezogen, um in Färbungen an Serienschnitten verschiedene Zelltypen des Plazentagewebes genauer eingrenzen zu können.

Für die Expressions- und Lokalisationsstudie wurden zwei Gruppen zusammengestellt. Die PE-Gruppe beinhaltete 18 Patientinnen, die Blutdruckwerte über 140/90mmHg und eine Proteinurie von 2+ oder 3+ in der Urinstix-Methode aufwiesen. Die 16 Frauen der Kontrollgruppe hatten vor und während der Schwangerschaft normale Blutdruckwerte. Proteinurie und Amnion-Infekt-Syndrom galten als Ausschlußkriterien. In beiden Gruppen wurden nur Patientinnen mit Entbindung per Sectio caesarea aufgenommen, um den Geburtsmodus einheitlich zu halten.

Der semiquantitative Score beruht auf der unterschiedlichen Anfärbung des Plazentagewebes. Dabei wurden sowohl die Lokalisation im Zottenbaum als auch die Strukturen innerhalb der Zotte berücksichtigt. Die Plazenta wurde in die Bereiche Stamm-, Intermediär- und Terminal-Zotten sowie Basal- und Deckplatte und innerhalb der Zotten in die Bereiche Gefäßmuskulatur, Zottenstroma, Trophoblastüberzug und Hofbauerzellen unterteilt. Je nach Färbeintensität wurden die Werte 0 (keine Färbung), 1 (schwache Färbung), 2 (mittelstarke Färbung) und 3 (starke Färbung) zugewiesen.

Die statistische Auswertung erfolgte bei den ordinal skalierten Score-Werten mit Hilfe des U-Tests (Mann-Whitney-Test) mit einem 95% Konfidenzintervall. Für intervall-skalierte Werte wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet.

Ergebnisse

Im Western Blot zeigte sich bei der Inkubation mit den affinitätsgereinigten Antikörpern sowohl im Plazentahomogenat als auch im Nierenhomogenat nur eine deutliche Bande bei 50kD, was dem Molekulargewicht des glykosylierten AT₁-Rezeptors entspricht. Bei dem AT₁-Rezeptor-negativen PC12-Zellhomogenat war keine deutliche Bandenbildung erkennbar. Die normalen Kaninchenserum führten sowohl im Western Blot als auch in der Immunhistochemie zu keiner Färbung, und die Präinkubation mit dem synthetischen Peptid führte zur Reduktion der Färbung bzw. der Bande. Die Kontrollen ohne Primär- und/oder Sekundärantikörper blieben vollständig negativ.

Die immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper gegen AT₁-Rezeptoren ergaben eine punktuelle und spezifische Anfärbung. Besonders stark gefärbt waren die Gefäßmuskulatur in den Plazentazotten, das Zottenstroma, der Trophoblastüberzug und zusätzlich die Basal- und Deckplatte. Die Unterschiede der PE- und der Kontroll-Gruppe waren im Bereich des Trophoblastüberzuges am größten. In allen Abschnitten des

Zottenbaumes, mit nach distal ansteigendem Signifikanzniveau, war die Färbung des Trophoblastüberzuges in der PE-Gruppe gegenüber der normotensiven Gruppe signifikant erhöht. Die perivaskuläre Färbung zeigte im Bereich der Terminalzotten signifikante Unterschiede. Im Bereich der Basal- und Deckplatte sowie in der Färbung des Stromas waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Diskussion

Das RAAS ist an der Regulation des Blutdrucks sowie des Salz- und Wasserhaushalts und zudem an Zellproliferation, Zelldifferenzierung und der Modulation anderer endokriner Achsen beteiligt. Ang II entsteht bei der aufeinanderfolgenden Spaltung durch Renin und ACE aus Angiotensinogen. Neben dem systemischen RAAS existieren zahlreiche lokale Renin-Angiotensin-Systeme (RAS), so auch in der uteroplazentaren Einheit. Es wird angenommen, daß dieses an der Regulation der Durchblutung von Uterus und Plazenta sowie an der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung beteiligt ist.

Während der Schwangerschaft kommt es zu einer Aktivierung des RAAS mit erhöhten Plasmaspiegeln von Renin, Ang II und Aldosteron. Die Aktivierung des RAAS wird mit der physiologischen Adaptation des kardiovaskulären Systems in Verbindung gebracht. Der Blutdruck steigt trotz einer Aktivierung des RAAS in der physiologischen Schwangerschaft nicht an, sondern nimmt bis zum dritten Trimenon immer weiter ab, um dann wieder auf prägravidale Werte anzusteigen. Die Druckantwort auf infundiertes Ang II ist normalerweise vermindert.

In präeklampsischen Schwangerschaften sind die Renin-Konzentration, die Plasma-Renin-Aktivität sowie die Ang II -Konzentration gegenüber den Werten gesunder Schwangerer erniedrigt. Die Ang II -Bindung auf den Thrombozyten im maternalen Kreislauf ist bei PE-Patientinnen verglichen mit gesunden Schwangeren wie die Druckantwort auf Ang II -Infusionen bereits vor dem Beginn von präeklampsischen Symptomen erhöht.

Für diese Doktorarbeit wurden spezifische Antikörper eingesetzt, um die Expressiondichte der AT₁-Rezeptoren in der PE-Gruppe mit der Kontroll-Gruppe zu vergleichen. Mit immunhistochemischen Färbungen läßt sich die Lokalisation der AT₁-Rezeptoren leicht bestimmen. In der Lichtmikroskopie mit histologischer Gegenfärbung bzw. durch immunhistochemische Färbung von Serienschnitten können einzelne Zelltypen und Zellstrukturen voneinander abgegrenzt werden.

Die Expressionsdichte der AT₁-Rezeptoren am Plazentagewebe war im Trophoblastüberzug in der PE-Gruppe signifikant erhöht. Diese vermehrte Expression könnte die Ursache für die Bildung von AT₁-Rezeptor-Autoantikörpern und damit ein Baustein in der Pathogenese der PE sein. Autoantikörper, die an AT₁-Rezeptoren stimulierend wirken, wurden 1999 im Serum von Patientinnen mit Präeklampsie entdeckt. Diese Autoantikörper könnten an den über-exprimierten AT₁-Rezeptoren des Trophoblastüberzuges gebildet werden und im gesamten maternalen Kreislauf stimulierend wirken. Dies könnte zu den bei der PE beobachteten Phänomenen wie Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation, Imbalance von Prostaglandinen und Thromboxanen etc. führen und die bei PE-Patientinnen typische verstärkte Druckantwort beim Ang II -Infusionstest erklären.

Die Ang II -Synthese könnte durch die Stimulation des AT₁-Rezeptors und den dadurch erhöhten Blutdruck reduziert sein, was zu der niedrigen Ang II -Konzentration bei der PE führt. Hohe Ang II -Konzentrationen bewirken normalerweise eine Down-Regulation der AT₁-Rezeptoren, die bei einer PE vermindert stattfinden würde. Die agonistischen AT₁-Rezeptor-Autoantikörper könnten somit das homöostatische Prinzip des RAAS in einen Circulus vitiosus aus erhöhtem Blutdruck und steigender AT₁-Rezeptor-Wirkung verwandeln. In weiteren Studien müssen die Rolle des Trophoblastüberzuges in der Pathogenese der PE und die Ursachen für die Bildung von AT₁-Rezeptor-Autoantikörpern weiter erforscht werden.