

Untersuchungen zur Assoziation von Polymorphismen in Exon 2, 3 und 8 des HLA-G-Gens mit idiopathischen habituellen Aborten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Anna Katrin Schnürch
aus Düsseldorf

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Katrin van der Ven
2. Gutachter: Professor Dr. med. Natalija Novak

Tag der Mündlichen Prüfung: 5. Oktober 2011

Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin
Zentrum für Gynäkologie und Geburtshilfe
Universitätsklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. med. Hans van der Ven

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung.....	5
1.1 HLA-Komplex	5
1.1.1 Das HLA-System des Menschen.....	5
1.1.2 Struktur und Polymorphismus des menschlichen MHC	5
1.1.3 HLA-Klasse II	8
1.1.4 Funktion der HLA-Moleküle.....	8
1.1.5 Sonderform HLA-G.....	9
Polymorphismen in codierenden Regionen	11
Polymorphismen in nicht-codierenden Regionen	12
1.2 Allgemeine immunologische Aspekte der Schwangerschaft.....	13
1.2.1 Nicht-zelluläre Faktoren	14
1.2.2 Zelluläre Faktoren.....	16
1.3 HLA in der Schwangerschaft	19
1.3.1 Morphologische Grundlagen	19
1.3.2 HLA-Status der Plazenta	19
1.3.3 Funktion von HLA-G in der Schwangerschaft	20
1.3.4 HLA-G und habitueller Abort	23
1.4 Der habituelle Abort	25
1.4.1 Definition	25
1.5.2 Epidemiologie	25
1.5.3 Ätiologie	26
2 Fragestellung	32
3 Material und Methoden	33
3.1 Patientengut	33
3.2 DNA-Extraktion	34
3.3 14-BP-Insertions/Deletionspolymorphismus (Exon 8)	35
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	35
3.3.2 PCR-Ansatz.....	36
3.3.3 Primer	37
3.3.4 PCR-Programm	38
3.3.5 Visualisierung der Amplifikation mittels Gelelektrophorese und Typisierung	38
3.4 Sequenzierung von Exon 2 und 3	39
3.4.1 Schritt 1: Amplifikation	41
3.4.2 Schritt 2: Aufreinigung der PCR-Produkte	43

3.4.3 Schritt 3: Sequenzierung.....	44
4 Ergebnisse.....	48
4.1 Ergebnisse der Insertions-Deletionsanalyse (Exon 8).....	48
4.1.1 Überblick	48
4.1.2 Beschreibung.....	49
4.2 Ergebnisse der Sequenzierung von Exon 2 und 3	50
4.2.1 Überblick	50
4.2.2 Beschreibung.....	59
5 Diskussion.....	63
5.1 Exon 8	63
5.2 Exon 2 und 3	64
6 Zusammenfassung.....	67
7 Anhang.....	68
7.1 Materialien, Geräte und Stammlösungen	68
8 Literaturverzeichnis	71
9 Danksagung	86

1 EINLEITUNG

1.1 HLA-KOMPLEX

1.1.1 DAS HLA-SYSTEM DES MENSCHEN

Die Entdeckung des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl.: major histocompatibility complex, MHC) hängt eng mit Untersuchungen zur Gewebetransplantation zusammen. Je höher der Grad der Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger ist, desto langsamer erfolgt die Abstoßung des Transplantats. Vor rund 70 Jahren fand Peter A. Gorer heraus, dass dieses Abstoßungsmuster den Mendelschen Gesetzen zur Vererbung folgt und von mehreren Genen kontrolliert wird (Gorer, 1936). Jean Dausset beobachtete die Agglutination väterlicher Leukozyten durch das Serum von Multiparae (Dausset, 1954) und definierte schließlich das erste humane Leukozytenantigen als Mac-2, heute HLA-A2 (Dausset, 1958).

Die Funktion der humanen Leukozytenantigene geht jedoch weit über den Bereich der Transplantation hinaus. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung von Selbst und Nicht-Selbst im Rahmen des adaptiven Immunsystems; so obliegt ihnen z.B. die Präsentationprozessierter Antigene, welche unerlässlich ist für die nachfolgende antigenspezifische zelluläre Immunantwort. Eine Abwehrreaktion wird aber auch auf direktem Wege durch die Antigen-Eigenschaften der HLA-Moleküle ausgelöst.

Um verschiedene Peptidfragmente binden zu können, existieren auch die HLA-Moleküle in jedem menschlichen Organismus in diversen Varianten. Dies wird durch die Codierung der HLA-Merkmale durch mehrere polymorphe Gene auf einem Chromosomenabschnitt gewährleistet, der als Major Histocompatibility Complex (MHC) bezeichnet wird.

1.1.2 STRUKTUR UND POLYMORPHISMUS DES MENSCHLICHEN MHC

Die Gene des HLA-Systems sind in einem Komplex auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert (6p21.1 – 6p21.3); der Abschnitt umfasst etwa 3.500 bis 4.000 Kilobasenpaare (Campbell, 1993). Unterschieden werden die HLA-Genloci im engeren Sinne, HLA-Klassen I und II, sowie eine heterogene Gruppe von Genen, bezeichnet als Klasse III. Zu dieser Gruppe gehören auf der einen Seite Gene, deren Produkte Funktionen im Rahmen der körpereigenen Abwehr besitzen (z.B. die Komplementfaktoren C2, C4A, C4B, Faktor B, Tumornekrosefaktoren TNF- α und TNF- β , Hitzeschockproteine). Auf der anderen Seite finden sich hier aber auch die codierenden Regionen für nicht an immunologischen Abläufen beteiligte Proteine (z.B. die Steroid-21-Hydroxylasen CYP21A/B, Valyl-tRNA-Synthetase).

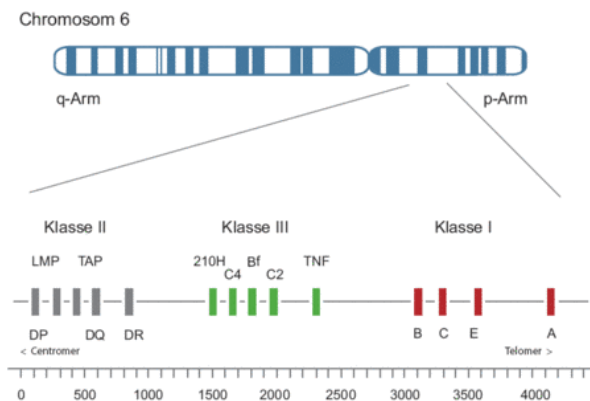


ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE GENKARTE DES MENSCHLICHEN MHC AUF CHROMOSOM 6
(05.10.2008: WWW.MEDIZINISCHE-GENETIK.DE/INDEX.PHP?ID=1475)

Telomerwärts liegen die Gene der HLA-Klasse I, während sich zentromerisch die HLA-Klasse II-Gene finden. Hierzu gehören u.a. die polymorphen Gene HLA-DQA1 und -DQB1, die für die α - und β -Proteinketten des HLA-DQ-Merkmals codieren. Es schließt sich der Bereich der HLA-DR-Gene an, unter denen das nicht-polymorphe HLA-DRA-Gen für die α -Kette aller HLA-DR-Merkmale codiert, während das polymorphe HLA-DRB1-Gen Vorlage für die variable β -Kette ist.

1.1.2.1 HLA-KLASSE-I-GENE

Im Bereich der HLA-Klasse-I-Gene finden sich funktionelle und nicht exprimierte Gene. Drei Genloci dienen als Vorlagen für die klassischen, serologisch definierten Spezifitäten: HLA-A, -B, -C. In diesen Bereichen finden sich viele Polymorphismen. Auch die Produkte der Genloci HLA-E, -F, -G sind funktionell aktiv, weisen jedoch als sog. nicht-klassische HLA-Klasse-I-Moleküle einige Unterschiede zu den klassischen HLA-Molekülen auf. So wird HLA-E auf nahezu allen Körperzellen exprimiert und scheint eine Rolle bei der Aktivitätsregulation Natürlicher Killerzellen zu spielen. HLA-F konnte ebenso wie HLA-G auf extravillösen Trophoblastzellen nachgewiesen werden, doch während die Funktion von HLA-G im Bereich der maternalen Toleranz gegenüber dem semiallogenen Feten liegt, sind die Aufgaben von HLA-F noch unbekannt. Von HLA-G sind membrangebundene und lösliche Formen bekannt. Weitere Genorte (HLA-H, -J, -K, -L, -N, -S, -X und -Z) imponieren als Pseudogene, bisher ohne nachweisbare Genprodukte.

Das einzelne Gen der Klasse I besteht typischerweise aus acht Exons, die durch nicht-codierende Introns voneinander getrennt sind. Dieser Aufbau spiegelt sich in den einzelnen Domänen des HLA-Klasse-I-Moleküls wider (s.u.).

1.1.2.2 HLA-KLASSE I-MOLEKÜLE

HLA-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die hauptsächlich an der Zelloberfläche exprimiert werden. Aufgrund ihrer Struktur werden sie zur Superfamilie der Immunglobuline gezählt. Die Unterscheidung von Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen geht auf die unterschiedliche Struktur und Funktion der HLA-Moleküle zurück.

Moleküle der Gruppe HLA-I bestehen aus einer schweren, polymorphen α -Kette (ca. 45 kDa) und einer leichten, nicht polymorphen Kette (ca. 11,5 kDa), dem β_2 -Mikroglobulin. Das Gen für das β_2 -Mikroglobulin liegt außerhalb des eigentlichen MHC, beim Menschen auf Chromosom 15. Die glykosylierte α -Kette setzt sich aus drei extrazellulären Domänen (α_1 , α_2 und α_3 mit jeweils etwa 90 Aminosäuren), einer Transmembranregion und einem cytosolischen Anteil zusammen. Die Röntgenkristallanalyse zeigt, dass die N-terminal gelegenen Domänen α_1 und α_2 eine Grube bilden, begrenzt durch α -Helix-Strukturen und antiparallele β -Faltblattabschnitte. Diese Grube dient der Antigen-Bindung (Bjorkman, 1987); hypervariable Regionen der beiden Domänen sorgen für eine Vielzahl verschiedenartiger Bindungsstellen. Im Übergangsbereich zwischen der α_1 - und der α_2 -Domäne befindet sich der N-gebundene Kohlenhydratanteil. Die miteinander assoziierten Moleküle α_3 und β_2 bilden eine die funktionell wichtige Konformation stabilisierende Plattform.

Die klassischen HLA-Klasse-I-Proteine werden ubiquitär im Gewebe exprimiert, während dies nicht für die nicht-klassischen Formen gilt (außer HLA-E).

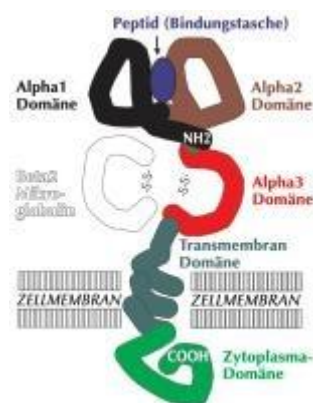


ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES HLA-KLASSE-I-MOLEKÜLS (AUS DEM JOURNAL FÜR REPRODUKTIONSMEDIZIN UND ENDOKRINOLOGIE: JUCH H UND DOHR G, 2004; 1 (3): 165-170)

1.1.3 HLA-KLASSE II

Zu dieser Klasse gehören auf genomischer Ebene HLA-DP, -DQ und -DR, welche zum Teil hochgradig polymorph sind. Eine besondere Eigenschaft der HLA-DR-Region ist, dass die Zahl der DRB-Gene auf einem Chromosom nicht konstant, sondern vom entsprechenden Haplotyp abhängig ist.

Weitere Genorte der HLA-Klasse-II-Region werden als DMA und DMB sowie DOA und DOB bezeichnet.

Klasse-II-Moleküle sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Kette, wobei jede Kette ihrerseits aus zwei extrazellulären, einer transmembranösen und einer cytosolischen C-terminalen Domäne besteht. Die schwere α -Kette (ca. 33-35 kDa) besteht aus etwa 230 Aminosäuren, die leichte β -Kette hat ein Molekulargewicht von ca. 29 kDa. Die Gewichtsunterschiede erklären sich durch Unterschiede in der Glykosylierung. Die N-terminalen α_1 - und β_1 -Domänen bilden eine den HLA-Klasse-I-Molekülen ähnliche, jedoch geringfügig größere und zu beiden Seiten hin offene Peptidbindende Grube (Brown, 1993). Auch hier sorgen variable Aminosäure-Muster für eine größere Anzahl an unterschiedlichen Bindungsstellen.

1.1.4 FUNKTION DER HLA-MOLEKÜLE

Zentrale Aufgabe der HLA-Moleküle beider Klassen ist die Präsentation von antigenen Proteinfragmenten, welche die Reifung und Funktion von T-Lymphozyten steuert. Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle unterscheiden sich hinsichtlich der Art der präsentierten Peptide und in ihrem Expressionsmuster, doch das Interaktionsprinzip ist dasselbe: T-Zell-Rezeptor (TCR), HLA-Molekül und das präsentierte Peptidfragment bilden einen ternären Komplex, wodurch T-Lymphozyten nicht nur das prozessierte Antigen erkennen, sondern gleichzeitig zwischen Selbst- (autologen) und Nicht-Selbst- (allogenen) HLA-Molekülen unterscheiden können. HLA-Klasse-I-Moleküle werden dabei von CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen erkannt, wobei das namensgebende CD8-Oberflächenantigen der T-Zell-Subpopulation spezifisch an die α_3 -Domäne des HLA-I-Moleküles bindet und so die Komplexbildung zusätzlich stabilisiert. HLA-Klasse-II-Moleküle hingegen interagieren mit CD4-positiven T-Helferzellen, wobei das CD4-Oberflächenantigen dieser T-Zell-Subpopulation das β_2 -Mikroglobulin der HLA-II-Moleküle erkennt.

1.1.5 SONDERFORM HLA-G

HLA-G wurde vor ungefähr 25 Jahren zum ersten Mal beschrieben, doch seine Bedeutung ist bis heute nicht eindeutig erforscht. Es ist wie HLA-E und HLA-F ein nicht-klassisches MHC-Klasse-I-Molekül, dessen Aufbau zunächst den klassischen Klasse-I-Molekülen entspricht (s.o.). Als Expressionsorte konnten bisher nur wenige Gewebe sicher bestimmt werden: Epithelzellen des Thymus, extravillöser Zytotrophoblast und andere Zellen fetalen Ursprungs innerhalb der fetoplazentaren Einheit (Kovats, 1990; Mallet, 1999; McMaster, 1995). Vermutet wird außerdem die Expression in einigen Tumoren, die nicht trophoblastenartig differenziert sind, in Zellen des Auges sowie auf Immunzellen wie Leukozyten und mononukleären Phagozyten (Amiot, 1998; Mallet, 1999; Moreau, 1999; Pangault, 1999; Shukla, 1990; Yang, 1996).

HLA-G existiert in einer membrangebundenen und einer löslichen Form; von der membrangebundenen Variante (mHLA-G) gibt es wiederum verschieden strukturierte Formen: das β_2m -assoziierte Dimer, das β_2m -assoziierte Monomer und beide Formen auch ohne das β_2 -Mikroglobulin (Ishitani, 1992).

HLA-G unterscheidet sich in einigen wichtigen Eigenschaften von den klassischen Klasse-I-Molekülen:

- Eine einzige Promotorregion
- Atypisches Splicingmuster mit Expression von sechs Isoformen, darunter zwei lösliche
- Verkürzte intracytoplasmatische Domäne
- Eingeschränkte Gewebeexpression
- Wenige Polymorphismen

1.1.5.1 PROMOTORREGION

HLA-G hat eine einzige Promotorregion im sog. 5'-URR-Bereich des Gens, der ein durch IFN aktivierbares Responsives Element sowie X2- und Y-Boxen fehlen; weiterhin findet sich eine modifizierte Enhancer-A-Regulationssequenz (Solier C, 2001). Infolgedessen kann HLA-G nach bisherigen Erkenntnissen nicht mit den Mediatoren IRF1, NF- κ B und dem Class-II-Transaktivator CIITA interagieren.

1.1.5.2 ALTERNATIVES SPLICING UND ISOFORMEN

Die grundsätzliche Organisation der HLA-G-Gene und –Expression ist ähnlich wie bei den klassischen Klasse-I-Proteinen. Jedoch existieren mindestens sechs Isoformen von HLA-G (HLA-G1 bis HLA-G6), die durch alternatives Splicing entstehen:

- HLA-G1 ist den anderen Klasse-I-Molekülen sehr ähnlich: es stellt ein vollständiges Transkript mit allen α -Domänen dar und wird vermutlich als einzige der Isoformen an der Zelloberfläche exprimiert, während die anderen Varianten im Endoplasmatischen Retikulum verbleiben (Bainbridge, 2000; Bainbridge, 2001; Hutter, 2002; Mallet, 2000).
- HLA-G2 zeichnet sich durch das Fehlen der α_2 -Domäne aus, was auf eine Entfernung des Exon 3 während des Spleiß-Vorganges zurückzuführen ist. Es kann in der Folge kein β_2m binden und bildet Homodimere, die eher den Klasse-II-Molekülen ähneln (Audus, 2002; Ishitani, 1992).
- HLA-G1 und HLA-G2 existieren auch in einer löslichen Form (sHLA-G1/2 bzw. HLA-G5/6). Ursache hierfür ist ein Spleißfehler, bei dem Intron 4 zunächst in der mRNA verbleibt, jedoch ein Stopp-Codon vor den Abschnitten enthält, die die Transmembran- und Intrazellulär-Domänen codieren. Verbliebene Reste von Intron 4 resultieren in einem Zusatz von 21 Aminosäuren an der α_3 -Domäne von sHLA-G1 und sHLA-G2 (Fujii, 1994).
- HLA-G3 entsteht durch Heraussplices von Exon 3 und 4 und besteht somit nur aus zwei α_1 -Domänen.
- HLA-G4 ist aufgebaut aus einer α_1 - und einer α_2 -Domäne, nachdem Exon 4 aus der mRNA entfernt wurde.

Die mRNA aller Isoformen ist in der Plazenta der Früh- und Spät-Schwangerschaft und in gezüchteten Trophoblasten nachweisbar (Hiby, 1999).

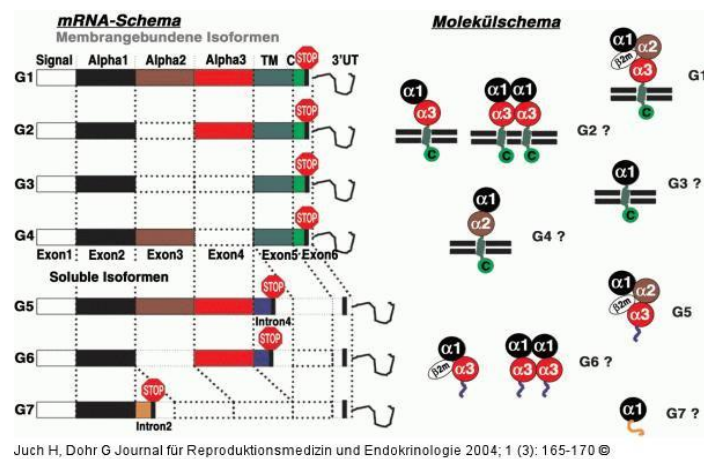


ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER HLA-G-ISOFORMEN (AUS DEM JOURNAL FÜR REPRODUKTIONSMEDIZIN UND ENDOKRINOLOGIE: JUCH H UND DOHR G, 2004; 1 (3): 165-170)

1.1.5.3 VERKÜRZTE INTRACYTOPLASMATISCHE DOMÄNE

Ein terminierendes Codon in Exon 6 führt zu einem verkürzten cytoplasmatischen Anteil, der um 19 Aminosäuren kürzer ist als die entsprechenden Abschnitte von HLA-A, HLA-B und HLA-C (Geraghty, 1987). Diese strukturelle Variation taucht bei keinem anderen Klasse-I-Molekül auf. Die Funktion liegt möglicherweise in einer besonderen intrazellulären Verarbeitung nach Endozytose, was zu den spezifischen Effekten von HLA-G führen könnte (Davis, 1997; Park, 2001).

1.1.5.4 WENIGE POLYMORPHISMEN

Im Gegensatz zu den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen zeigt die Gensequenz von HLA-G nur eine geringe Anzahl von Polymorphismen (Hiby, 1999). Bisher sind nur vier Formen von HLA-G beschrieben, die sich auch auf Aminosäure-Ebene unterscheiden: G*1011, G*0103, G*0104 und G*105N (Le Bouteiller, 1999; Ober, 1997; Van der Ven, 2000). Des Weiteren richten einige Wissenschaftler ihr Augenmerk auf die 5'URR-Promotorregion und die 3'UTR (Exon 8), in welchen Polymorphismen vorbeschrieben sind.

POLYMORPHISMEN IN CODIERENDEN REGIONEN

Auf DNA-Ebene lassen sich unter Einbezug von Exon 2, Exon 3, Exon 4 sowie der 5'URR- und der 3'UT-Region bisher über 15 HLA-G-Allele unterscheiden, die in verschiedenen

Publikationen beschrieben wurden (Hviid, 2002; Kirszenbaum, 1999). Jedoch sind lediglich zwei Polymorphismen in Exon 2, ein Polymorphismus in Exon 3 und ein Polymorphismus in Exon 4 bekannt, die auf Proteinebene zu unterschiedlichen Genprodukten führen, während die anderen bisher entdeckten SNPs sog. silente Mutationen sind.

Die auffälligste Veränderung des HLA-G-Proteins entsteht bei Vorliegen des Allels G*105N, des sog. Null-Allels, bei welchem die erste Base des Codons 130 (Exon 3) bzw. die dritte Base des Codons 129 wegfällt, wodurch sich eine Verschiebung des Leserahmens mit Entstehung eines Stopp-Codons ergibt (Hviid, 1997; Ober, 1996) (s. Kap. 1.3.3). Bisher kann keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, inwieweit die o.g. Polymorphismen in den codierenden Regionen des HLA-G-Gens Einfluss auf die Funktion des Moleküls haben (Hviid, 2006).

POLYMORPHISMEN IN NICHT-CODIERENDEN REGIONEN

In verschiedenen Studien wurden Polymorphismen in den nicht-codierenden Bereichen 5'URR (Promotor) und 3'UTR (Exon 8) identifiziert, die möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der Expression von HLA-G spielen (Harrison, 1993; Hiby, 1999; Hviid, 1999; Hviid, 2004b; Ober, 2003). In der Promotorregion wurden bereits einige Polymorphismen gefunden, von denen der C-G-Polymorphismus an Position -725 einer Studie von Ober et al. zufolge mit habituellen Aborten assoziiert ist (Ober, 2003). Ein weiterer SNP liegt an Position -201 des Promotors und damit im Bereich des Enhancer A, einer mit NF- κ B2 interagierenden Regulationseinheit; sein eventueller regulatorischer Einfluss auf die Interaktion des Enhancers mit NF- κ B2 und auf die Expression von HLA-G konnte jedoch bisher nicht geklärt werden (Hviid, 1999; Solier, 2001).

Im 3'-wärts liegenden nicht-translatierten Abschnitt des Exon 8 beschrieben Harrison et al. als erste einen 14-bp-Insertions/Deletionspolymorphismus ab Position 3741 (Harrison, 1993), welcher auf DNA- und Transskript-Ebene vorhanden ist. In der kaukasischen Bevölkerung sind die Frequenzen der beiden Varianten beinahe gleich (14-bp-Insertion: ca. 45%, 14-bp-Deletion: ca. 55%). Hviid et al. beschrieben eine geringere Konzentration von 14-bp-positiver mRNA im direkten Vergleich mit der 14-bp-negativen mRNA in Trophoblastzellen heterozygoter Schwangerer (Hviid, 2003), was zu vorangegangenen Untersuchungsergebnissen anderer Autoren passt (Fujii, 1994; Hiby, 1999). Des Weiteren wurden in 14-bp-positiven Proben zusätzliche mRNA-Formen detektiert, die in rein 14-bp-negativen Kontrollen nicht auftraten: mRNA-Isoformen, denen die ersten 92 Basenpaare des Exon 8 fehlen (Hviid, 2003). Eine mögliche Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass die 14-bp-Insertion eine Signalsequenz für bestimmte Splicing-Vorgänge darstellt. Es bleibt jedoch weiterhin unklar, ob der 14-bp-Polymorphismus selbst ursächlich für die differierenden mRNA-Level ist oder ob z.B. ein Kopplungsungleichgewicht mit der Promotorregion vorliegt (Hviid, 2006).

Verschiedene Studien lassen eine Assoziation zwischen dem 14-bp-Polymorphismus des Exon 8 und der Menge an löslichem HLA-G vermuten. So konnten sowohl Hviid et al. als auch Rizzo et al. in Serumproben von homozygoten 14-bp-positiven Frauen und Männern kein sHLA-G1

nachweisen (Hviid, 2004b; Rizzo, 2005a). Weitergehende Erforschungen eines Zusammenhangs zwischen HLA-G-Allelen und Sekretionslevel der löslichen HLA-G-Isoformen brachten jedoch widersprüchliche Ergebnisse hervor; hier sind weitere Untersuchungen mit einheitlicher Methodik vonnöten (Hviid, 2006).

1.2 ALLGEMEINE IMMUNOLOGISCHE ASPEKTE DER SCHWANGERSCHAFT

Da der Fetus nicht nur maternales, sondern auch paternales Genmaterial enthält und entsprechende Alloantigene ausbildet, wird er im Allgemeinen als Semi-Allotransplantat bezeichnet (Medawar, 1953). Diverse Annahmen hinsichtlich der Grundlagen der mütterlichen Akzeptanz des fetalen „Fremdlings“ wurden im Laufe der Jahre aufgestellt und wieder verworfen. Hierzu zählen die Vermutungen Medawars, fetaler und maternaler Blutkreislauf existierten separat und ohne Verbindung, die Plazenta besitze keine Antigen-Eigenschaften und das mütterliche Immunsystem verhalte sich während der Gravidität starr. Alle drei Hypothesen konnten widerlegt werden.

Chaouat und Mitarbeiter (1983) sowie Wegmann (1988) verglichen Trophoblastzellen mit Tumorzellen, die vom maternalen Immunsystem nicht als schädigend erkannt werden; Clark und Mitarbeiter (1999) postulierten ein Wirt-Parasit-Verhältnis zwischen Mutter und Fetus. Auch diese beiden Annahmen wurden bald wieder verworfen.

Mütterlicher und fetaler Blutkreislauf sind nicht vollständig voneinander getrennt: es finden sich sowohl kindliche Zellen im mütterlichen als auch mütterliche Zellen im kindlichen Organismus (Bianchi, 1994; Lo, 1996). Plazenta und Fetus besitzen Antigen-Eigenschaften: die Expression von HLA-Molekülen auf fetalen Zellen und Trophoblast wurde nachgewiesen (Jones, 2002). Das maternale Immunsystem verhält sich während der Schwangerschaft nicht starr: im Blut der Mutter wurden alloreaktive Zellen gefunden, und an der feto-maternalen Grenze findet eine aktive Regulation der alloreaktiven Immunantworten der Mutter statt.

Welche Mechanismen sind es, die eine Abstoßung des Fetus verhindern? Wie und wodurch wird das mütterliche Immunsystem angepasst? Was geschieht an der feto-maternalen Grenzzone? Diese Fragen sind längst nicht zufriedenstellend beantwortet. Jedoch stehen in Teilbereichen der Schwangerschaftsimmunologie einzelne Untersuchungsergebnisse zur Verfügung, die im Folgenden kurz erläutert werden.

1.2.1 NICHT-ZELLULÄRE FAKTOREN

1.2.1.1 ALLOANTIKÖRPER

An ihrer Oberfläche exprimieren Trophoblastzellen HLA-Moleküle, die vom maternalen Immunsystem als Alloantigene erkannt werden. Die darauf folgenden Reaktionen der mütterlichen Immunzellen unterscheiden sich von denen bei einer Erkennung „echten“ Fremdmaterials und sind scheinbar essentiell für die Entwicklung der maternalen Immuntoleranz. Zu diesen Schutzmechanismen gehört die Ausbildung verschiedener Alloantikörper (APCA, Ab2, MLR-Bf), die zwar gegen das paternale HLA gerichtet sind, aber nicht zur Zerstörung der das fremde HLA tragenden Zellen führen, sondern im Gegenteil diese vor cytotoxischen Reaktionen maternaler Immunzellen schützen (Ito, 1999; McIntyre, 1989; Pandey, 2003). Die Abwesenheit oder verminderte Produktion solcher Alloantikörper kann folgerichtig zu einer Abstoßung des Feten führen. Vergleiche des Auftretens einiger bekannter Alloantikörper im Serum schwangerer Frauen mit und ohne habituelle Aborte (letztere mit unklarer Genese) zeigten deutliche Unterschiede: APCA (anti-paternal cytotoxic antibodies) waren nur in 10% (Regan et al., 1991) bzw. 8,5% (Agrawal, 2002) bei Frauen mit habituellen Aborten nachweisbar, während 32% bzw. 33-46% der normal fertilen Frauen diese Gruppe von Antikörpern aufwies. Ähnliches gilt für Ab2 (anti-anti-HLA antibodies): 30% der fertilen schwangeren Frauen waren positiv für Ab2, jedoch keine der Frauen mit habituellen Aborten (Ito, 1999; Pandey, 2003).

Dem Alloantikörper MLR-Bf (mixed lymphocyte reaction-blocking factor) wurde in mehreren Studien ebenfalls eine fetoprotektive Wirkung zugeschrieben. Tamura et al. (1998) zeigten eine Positivität für MLR-Bf bei 82,4% der fertilen Frauen und bei lediglich 10% der Frauen mit habituellen Aborten. Zudem scheinen die Konzentrationen von MLR-Bf im ersten Trimester der Schwangerschaft am höchsten zu sein (Agrawal et al., 2002). Einige andere Studien widersprachen hingegen dem postulierten Zusammenhang zwischen MLR-Bf und erfolgreich verlaufender Schwangerschaft (Daher, 1997; Jablonowska, 2001).

1.2.1.2 INDOLAMIN-2,3-DIOXYGENASE (IDO)

Wenige Tage nach der Implantation beginnen plazentare Zellen mit der Produktion des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), mit dessen Hilfe die Aminosäure Tryptophan katabolisiert wird (Munn, 1998). Weil aber aktivierte T-Zellen besonders viel Tryptophan benötigen, führt ein gesteigerter Abbau dieser Aminosäure zu einer Hemmung der T-Zell-Aktivität und zu einem Schutz des Feten vor maternaler cytotoxischer Immunreaktion. Eine Hemmung der IDO während der Schwangerschaft führt zu einer Abstoßung des Feten, jedoch nicht in Müttern mit T-Zell-Defizit.

1.2.1.3 HÄMOXYGENASE (HO) UND ALPHA-HÄMOGLOBIN STABILISIERENDES PROTEIN (AHSP)

Aufgabe des Enzyms Hämoxigenase (HO) ist die Katalysation der ersten Reaktion beim Abbau von Häm, welches in freier Form direkt und indirekt gewebeschädlich ist. Häm ist zentraler Bestandteil der am Sauerstofftransport beteiligten Proteine Hämoglobin und Myoglobin sowie weiterer Proteine wie Cytochrom P450, Cytochrom-Oxidase und anderer Cytochrome. Von der Hämoxigenase sind bisher drei Formen beschrieben: die induzierbare Variante HO-1 mit mehreren regulatorischen Domänen in der Promotorregion und die konstitutiv exprimierten Formen HO-2 und HO-3. Eine Induktion der HO-1 erfolgt hauptsächlich durch Stress-Faktoren wie inflammatorische Cytokine, Hitze, Schwermetalle und oxidativen Stress (Applegate, 1991; Keyse, 1989; Maines, 1993; Terry, 1999). Jedoch zeigen einige Untersuchungen, dass auch die vermeintlich konstitutive HO-2 in bestimmten Geweben wie der Plazenta und der Dezidua induzierbar ist (Lindquist, 1988; Zenclussen, 2002). Über die HO-3 ist bisher noch wenig bekannt.

HO-1 wird eine wichtige Rolle bei der Akzeptanz eines Transplantates zugeschrieben, weshalb die Vermutung naheliegt, dass es auch bei der Akzeptanz des Feten während einer Schwangerschaft von Bedeutung ist. Die Expression von HO (HO-1 und HO-2) im Myometrium schwangerer Frauen verglichen mit dem nicht-schwangerer Frauen wurde von Acevedo und Mitarbeitern (Acevedo, 1998) als um das 16-fache erhöht beschrieben. Die Menge der HO scheint dabei im Verlauf der Gravidität zu schwanken: HO-1 wird fortlaufend in recht geringer Konzentration produziert, während die Menge an HO-2 vor allem zu Anfang der Schwangerschaft hoch ist und sich später verringert. Eine mögliche Begründung hierfür liegt darin, dass beim Abbau von Häm durch die HO unter anderem Kohlenmonoxid (CO) entsteht, welches einen positiven Effekt auf den Blutfluss in den Spiralarterien des Uterus und somit auf die Ausbildung der Plazenta hat.

Es wurde beobachtet, dass bei Frauen mit Präeklampsie die HO-Aktivität signifikant reduziert war im Vergleich zu Frauen mit normal verlaufender Schwangerschaft; gleiches gilt für Frauen, deren Feten eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) aufwiesen (Ahmed, 2000; Barber, 2001; Wang, 2002). Eine ebenfalls erniedrigte Expression von HO-2 in invasiven Trophoblastzellen, Endothelzellen und Synzytiotrophoblastzellen konnte bei Frauen mit spontanen Aborten beobachtet werden (Zenclussen, 2003).

Auch das Alpha-Hämoglobin stabilisierende Protein (AHSP) dient dem Schutz v.a. des Erythrozyten vor reaktiven Sauerstoffradikalen. Hierzu interagiert es mit freiem α -Globin und hält es in Lösung, wodurch die hohe Zelltoxizität dieses instabilen Monomers verringert wird (Feng, 2004). In einer kleinen Studien stellten nun Emanuelli et al. ein signifikant vermindertes Level an AHSP (mRNA und Protein) in Trophoblastgewebe von Frauen mit habituellen Aborten in der Vergangenheit fest, verglichen mit fertilen Kontrollen (Emanuelli, 2008).

1.2.1.4 FAS/FAS-L-INTERAKTION

Auf maternalen T- und NK-Zellen ist Fas oder CD95 (Typ-I-Membranprotein von 45 kDa) stark exprimiert, während Fas-Ligand (Typ-II-Membranprotein von 37 kDa) an der Oberfläche von Trophoblastzellen exprimiert wird (Hammer, 1999; Hunt, 1997; Nagata, 1994). Die Fas/Fas-L-Interaktion führt über mehrere Schritte zu einer Aktivierung von Caspasen und zur Apoptose von aktivierten Immunzellen, was vermutlich ein weiterer Faktor ist, der zur Akzeptanz des Feten durch den mütterlichen Organismus führt (Perricone, 2003; Sakata, 1998; Smith, 1997). Zwei Proteine sind an der Regulation des Fas/Fas-L-Mechanismus beteiligt: bcl-2 unterstützt oben beschriebenen Vorgang, bax hemmt ihn (Lea, 1997; Sakata, 1998). Entsprechende Veränderungen der Expression von bcl-2 und bax sowie eine Reduktion von Fas oder Fas-L können sich demnach negativ auf den Verlauf der Schwangerschaft ausprägen, was einige Studien unterstreichen (Kokawa, 1998; Lea, 1997; Lea, 1999).

1.2.1.5 HORMONAKTIVITÄT

Einige Hormone, z.B. Relaxin, sind als Aktivatoren einer Th₁-Zell-Antwort beschrieben worden, die zum Abort führen kann (Piccinni MP, 1996). Das von der Plazenta produzierte Human placental growth hormone (HPGH) könnte ebenfalls eine aktive Rolle bei der maternalen Immuntoleranz gegenüber dem Feten spielen (Frankenne, 1987; Hennen, 1985). Der immunmodulatorische Effekt von Progesteron ist möglicherweise auf die Induktion des Progesteron-induzierten Blocking-Faktors (PIBF) zurückzuführen, der seinerseits Einfluss auf die NK-Zell-Aktivität und die Th₂-Zell-Antwort nimmt (Szekeres-Bartho, 1990 und 1996).

1.2.2 ZELLULÄRE FAKTOREN

1.2.2.1 NATÜRLICHE KILLERZELLEN (NK-ZELLEN)

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zu den Lymphozyten und exprimieren an ihrer Oberfläche verschiedene Rezeptoren (z.B. KIR = killer cell ig-like receptors, KAR = killing activating receptors, CD56 und CD16), über die sie u.a. mit HLA-Klasse I-Molekülen auf anderen Zellen interagieren können. So erkennen sie z.B. Virus-befallene oder entartete Zellen, die nicht mehr das normale Muster an HLA-I an ihrer Zellmembran aufweisen, und zerstören diese durch Entleerung cytotoxischer Granula oder interagieren mit HLA-G-positiven Zellen wie dem Trophoblast (Moffett-King, 2002). Auch die Sekretion von immunmodulatorischen Cytokinen wie TNF- α und IFN- γ gehört zu den Aufgaben der NK-Zellen. Letztere wird v.a. durch die sog. CD56^{bright}-NK-Zellen wahrgenommen, welche sich durch eine große Menge des

Oberflächenantigens CD56 auszeichnen (Rai, 2005). Cytotoxische Aktivität besitzen hingegen in erster Linie die CD56^{dim}-NK-Zellen, die an ihrer Zelloberfläche weniger CD56 exprimieren. Diese Differenzierung ist auch in der Schwangerschaftsimmunologie von Bedeutung, denn Untersuchungen von Koopman et al. zeigten, dass es sich bei den peripheren NK-Zellen schwangerer Frauen in 90% um CD56^{dim} CD16⁺-NK-Zellen handelt, während die uterinen NK-Zellen schwangerer Frauen vorwiegend CD56^{bright} CD16⁻ sind (Koopman, 2003).

Periphere NK-Zellen sind im Normalfall während der Schwangerschaft supprimiert (Kwak JY, 1995), und einige Autoren stellten eine Koinzidenz von erhöhten peripheren NK-Zell-Levels und Aborten fest (Emmer, 2000; Ntrivalas, 2001; Yamada, 2003). Diese Beobachtung erscheint auch angesichts der Tatsache logisch, dass Patientinnen mit einem Antiphospholipid-Syndrom erhöhte NK-Zell-Level und vermehrt Aborte aufweisen (Carbone, 2009). Auf der anderen Seite kritisieren Rai et al. die Vorgehensweisen oben genannter Kollegen; so hänge beispielsweise das Level peripherer NK-Zellen von der Tageszeit, von vorheriger körperlicher Aktivität der Probandin, von der Parität der Probandin und sogar von der Aufbewahrungsmethode der Blutprobe ab (Plackett, 2004; Rai, 2005; Reichert, 1991). Zudem werden von verschiedenen Autoren unterschiedliche Grenzwerte für periphere NK-Zellen festgesetzt. Diese kontroverse Diskussion lässt momentan noch keine eindeutige Antwort auf die Frage zu, ob das Level peripherer NK-Zellen im Zusammenhang mit Aborten steht, und ob eine Testung dieses NK-Zell-Levels schwangerer Frauen und eine eventuelle Behandlung vermeintlich erhöhter Werte sinnvoll ist.

Uterine NK-Zellen hingegen scheinen eine zentrale Rolle in der Pathogenese schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen (Präeklampsie, habitueller Abort, Intrauterine growth restriction (IUGR)) zu spielen. NK-Zellen sind im Endometrium schwangerer Frauen die vorherrschende Leukozytenfraktion; ihre Zahl steigt während der Sekretionsphase des weiblichen Zyklus an und bleibt im Falle einer eintretenden Gravidität auf einem hohen Level, bevor sie etwa ab der 20. SSW wieder sinkt (Trundley, 2004). Diese uterinen NK-Zellen mit immunmodulatorischen Funktionen durch die Produktion verschiedener Cytokine (s.o.) nehmen wahrscheinlich einen wichtigen Platz bei der Kontrolle der Trophoblasten-Invasion ins Endometrium ein (Moffett-King, 2002).

1.2.2.2 T-HELPER-ZELL-BALANCE

T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung zwischen Selbst und Nichtselbst. Dabei interagieren die CD8⁺-T-Zellen (cytotoxische T-Zellen) mit HLA-I-Molekülen und darauf präsentierten Antigenen, während die CD4⁺-T-Helfer-Zellen HLA-II erkennen und im aktivierten Zustand Cytokine sezernieren können. Anhand der Cytokin-Muster kann man die T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) in drei Gruppe einteilen: Th₀-Zellen sind frisch aktiviert und befinden sich im Übergangsstadium zu entweder Th₁- oder Th₂-Zellen. Th₁-Zellen zeichnen sich durch die

Produktion pro-inflammatorischer Cytokine aus, zu denen Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Tumor-Nekrose-Faktor- β (TNF- β) gehören. Hingegen gelten die Cytokine der Th₂-Zellen (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13) als anti-inflammatorisch und außerdem bedeutsam für die humorale Abwehr, die Entstehung von Allergien und die Abwehr von Parasiten (Mosmann, 1989). Der Mediator IL-4 ist ein wichtiger Faktor für die Differenzierung von Th₀-Zellen zu Th₂-Zellen. Ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen den beiden Gruppen der T-Helfer-Zellen bzw. ein Übergewicht der Th₂-Cytokine („Th₂-Phänomen“) wird als notwendig für die erfolgreich verlaufende Schwangerschaft postuliert.

Bei Frauen mit habituellen Aborten konnte ein Ungleichgewicht zugunsten der Th₁-Cytokine beobachtet werden (Chaouat, 2004; Raghupathy, 1997; Raghupathy, 2000; Saito, 2000). Dies stimmt mit der Feststellung überein, dass Frauen mit habituellen Aborten ein höheres Level an IL-12 aufwiesen, welches begünstigend auf die Sekretion von Th₁-Cytokinen und hemmend auf die Sekretion von Th₂-Cytokinen wirkt (Hayakawa, 1999; Zenclussen, 2002). Die Th₁-Cytokine stehen im Verdacht, auf direktem und indirektem Weg über die Aktivierung weiterer Immunzellen die Plazenta zu schädigen, wohingegen den Th₂-Cytokinen eine die Plazenta schützende Funktion zugeschrieben wird. IFN- γ wird verdächtigt, die Sekretion von GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) zu inhibieren, wodurch es zur Wachstums- und Differenzierungsstörung beim Trophoblasten kommen kann (Perricone, 2003; Robertson, 1994). TNF- α hat möglicherweise einen stimulierenden Effekt auf die Uterusmuskulatur, wodurch es zur Kontraktion und Abstoßung des Feten kommt, oder es verursacht eine Nekrose des Embryos oder führt zu einer Behinderung des Blutflusses zum Fetus. Zusammen mit IFN- γ kann TNF- α bei Trophoblastzellen die Apoptose provozieren (Yui, 1994). Jedoch ist eine geringe Menge an TNF- α an der feto-maternalen Grenzzone notwendig für die erfolgreiche Implantation (Meisser A, 1999). Eine aktuelle Studie von Yang et al. zeigte signifikant erhöhte Konzentrationen von aktivierten T-Zellen (CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ und CD3⁺ CD4⁺ CD154⁺) im Blut von Frauen mit habituellen Aborten, verglichen mit Frauen ohne Aborte (Yang, 2010).

Die Th₂-Cytokine unterstützen die Akzeptanz des Feten u.a. durch die Induktion von Alloantikörpern und die Hemmung von NK-Zell-Aktivität (Hanna, 2000; Wegmann, 1993). Es gibt allerdings auch einige Studien, die dem Status des übergeordneten Systems der Th₁/Th₂-Balance widersprechen. Mäuse, die kein IL-10 und IL-4 produzierten, waren dennoch zu normalen Schwangerschaften in der Lage (Svensson, 2001), gleiches gilt für Mäuse, in denen die Gene für IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 deaktiviert wurden (Fallon, 2002). Frauen mit Spontanabort wiesen verringerte Mengen an IL-12 verglichen mit fertilen Frauen auf, was folgerichtig zu einer verminderten Aktivierung der Th₁-Zellen führen musste (Zenclussen, 2002). Weiterhin zeigten Frauen mit habituellen Aborten eine verminderte IFN- γ -Produktion (Bates, 2002). Nicht das starre Th₁/Th₂- und Cytokin-Gleichgewicht scheint in der Schwangerschaft von Bedeutung zu sein, sondern die dynamische Balance abhängig vom Zeitpunkt in der Gravidität.

1.3 HLA IN DER SCHWANGERSCHAFT

1.3.1 MORPHOLOGISCHE GRUNDLAGEN

Die direkte Kontaktzone zwischen mütterlichem und fetalem Gewebe bildet die Plazenta mit ihrem charakteristischen Aufbau. An verschiedenen Stellen treffen nun die zellulären und nicht-zellulären Strukturen der beiden nicht identischen Organismen unmittelbar aufeinander: der Synzytiotrophoblast, der embryonalen Ursprungs ist, kleidet den intervillösen Raum der Plazenta aus, welcher mit maternalem Blut aus den Spiralarterien gefüllt ist. Nach außen hin schließt sich der extravillöse Zytotrophoblast an, der in das deziduale Gewebe des Uterus ausgewandert ist und nun Kontakt mit mütterlichen Zellen, v.a. NK-Zellen, T-Lymphozyten und Makrophagen hat. Als drittes ist der endovaskuläre Trophoblast zu erwähnen, der das Endothel der uterinen Spiralarterien ersetzt.

1.3.2 HLA-STATUS DER PLAZENTA

Alle vom Fetus ausgehenden Zelltypen der Plazenta haben eine interessante Eigenschaft: sie exprimieren keine klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A und -B), so dass eine reguläre Immunantwort über T-Zellen wegfällt. Dahingegen konnte mHLA-G auf diversen plazentaren Zellen nachgewiesen werden, so z.B. auf dem invasiven Cytotrophoblasten, der plazentaren Riesenzelle, dem endovaskulären Trophoblasten und der Chorionmembranzelle (Le Bouteiller, 1999; Morales, 2003), auf der Hofbauer-Zelle im mesenchymalen Kern der Chorionvilli (Chu, 1998; Yang, 1996) sowie auf der Endothelzelle in den Plazentazotten (Blaschitz, 1997; Dye, 2001; Urosevic, 2002). Es herrscht in Fachkreisen Einigkeit darüber, dass der Hauptträger des membrangebundenen HLA-G der invasive extravillöse Cytotrophoblast ist. Dies stimmt mit Studienergebnissen überein, die demonstrieren, dass die Menge der produzierten HLA-G-mRNA umso größer ist, je näher sich die entsprechende Zelle an der feto-maternalen Grenzlinie befindet (Hunt, 1991).

Neben den membrangebundenen gibt es noch die löslichen Formen des HLA-G, welche in der Amnionflüssigkeit und im maternalen Blut nachgewiesen werden können (Fournel, 2000b; Hunt, 2000; Puppo, 1999; Rebmann, 1999). Der Synzytiotrophoblast produziert ausschließlich sHLA-G, und alle anderen Subtypen des Trophoblasten produzieren wahrscheinlich ebenfalls die löslichen HLA-G-Isoformen (Chu, 1998; Ishitani, 2003; Kovats, 1990). Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Feststellung einiger Forscher, dass sich die sHLA-G-Level schwangerer und nicht-schwangerer Frauen kaum voneinander unterscheiden würden, was auf eine Produktion von sHLA-G durch mütterliche Zellen schließen ließe und weiterhin nahelegen würde, dass das vom Trophoblast gebildete sHLA-G wohl nicht in großen Mengen ins mütterliche Blut gelangt (Hviid, 2004b; Pfeiffer, 2000; Puppo, 1999; Rebmann, 1999; Steinborn, 2003). Jedoch wiesen Hunt et al. nach, dass sHLA-G während der gesamten Schwangerschaft in

einer etwa doppelt so hohen Konzentration wie bei nicht-schwangeren Frauen im mütterlichen Blut zirkuliere (Hunt, 2000). Grund für die sich widersprechenden Erkenntnisse könnten die unterschiedlichen angewandten Messmethoden und Grenzbereiche sein.

Neben HLA-G wurden auf Trophoblastzellen der Plazenta auch geringe Mengen HLA-C sowie HLA-E nachgewiesen (King, 2000a und 2000b), und vermutlich gilt dies auch für HLA-F. Es scheint, als könnten sich die drei HLA-Klasse-Ib-Formen gegenseitig beeinflussen und evtl. auch ersetzen (Hviid, 2006).

1.3.3 FUNKTION VON HLA-G IN DER SCHWANGERSCHAFT

Die Hauptfunktion der membrangebundenen und löslichen HLA-G-Proteine während der Schwangerschaft liegt nach heutigem Wissensstand darin, das Semiallotransplantat Fetus direkt an der feto-maternalen Grenze vor einer abwehrenden Immunreaktion des mütterlichen Organismus zu schützen und den Erhalt der Schwangerschaft zu gewährleisten. Vermutlich spielt HLA-G schon während der Implantation eine wichtige Rolle; so stellten mehrere Autoren durch Messung der sHLA-G-Konzentration im Kulturmedium von zur in-vitro-Fertilisation vorbereiteten Embryonen einen Zusammenhang zwischen sHLA-G-Positivität und erfolgreicher Implantation (d.h. später klinisch nachweisbarer Schwangerschaft) fest (Jurisicova, 1996; Yie, 2005). Umgekehrt versagte die Implantation nach IVF mit Embryonen, die sHLA-G-negativ waren, in den meisten Fällen (Fuzzi, 2002; Noci, 2005; Sher, 2004). Sher et al. wiesen anhand von durch Intracytoplasmatische Spermien-Injektion (ICSI) gewonnenen Embryonen nach, dass die Implantations- und Schwangerschaftsraten bei Transfer von mindestens zwei sHLA-G-positiven Embryonen im Vergleich zu den Fällen, in denen ausschließlich sHLA-G-negative Embryonen eingesetzt wurden, signifikant anstiegen (Sher, 2005). Jedoch ist die Nachweisbarkeit von sHLA-G kein Garant für eine erfolgreiche Implantation, zumal bisher in den verschiedenen Untersuchungen keine einheitliche Methodik für die Konzentrationsmessung des löslichen HLA-G verwendet wurde (Hviid, 2006).

Wie die obigen Ausführungen zeigen, ist das lösliche HLA-G nicht in allen Fällen in der Umgebung des Embryos zu finden, und dasselbe gilt für HLA-G-mRNA. Zudem hängt das Vorhandensein von HLA-G-Produkten offenbar vom Entwicklungsstadium der befruchteten Eizelle ab: so wiesen diverse Autoren die erste HLA-G-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten im 2-Zell- bis 16-Zell-Stadium nach (Fuzzi, 2002; Hiby, 1999; Jurisicova, 1996; Noci, 2005; Sher, 2004; Yie, 2005; Zeng, 2005).

Zwei weitere Studien zeigen, dass das Vorhandensein von HLA-G1 und sHLA-G nicht unbedingt notwendig für eine erfolgreich verlaufende Schwangerschaft ist: sog. Null-Allel-Patientinnen, also homozygote Trägerinnen des Allels G*0105N, existieren, obwohl sie als Feten offenbar kein oder kaum HLA-G1 und sHLA-G produziert haben. Zusätzlich wurde beobachtet, dass ebendiese

Frauen zwar häufiger durch Aborte belastet waren als Frauen ohne dieses Allel, jedoch konnten sie Schwangerschaften erfolgreich austragen (Castro, 2000; Ober, 1998).

1.3.3.1 MÖGLICHE WIRKMECHANISMEN

Hinsichtlich der Nicht-Abstoßung des Feten dominiert die Interaktion des HLA-G mit den Leukozyten. Außerdem wird die Beeinflussung des plazentaren Cytokin-Milieus in Richtung einer nicht-inflammatorischen Umgebung i. S. einer Th₂-Dominanz inzwischen als wichtige Aufgabe von HLA-G angesehen. Die Konzentrationslevel an mHLA-G und sHLA-G scheinen hierbei von Bedeutung zu sein.

Im Endometrium einer nicht schwangeren Frau befinden sich für gewöhnlich zahlreiche B- und T-Zellen, doch bei Eintritt einer Gravidität verringert sich diese Zahl beträchtlich (Pröll, 2000). Stattdessen sind in der Dezidua des graviden Uterus vermehrt NK-Zellen (30% der Leukozyten) und Makrophagen (10-15% der Leukozyten) zu finden (Bulmer, 1995).

Leukozyten haben Rezeptoren für HLA-Klasse I-Moleküle, die über Signalweiterleitung entweder zur Aktivierung oder zur Inhibition der Immunzelle führen (Long, 1999). Das bedeutet in der Theorie, dass ein die Dezidua in Richtung Spiralarterie durchwandernder HLA-G-positiver Cytotrophoblast in der Lage ist, unterwegs die abwehrende Funktion von NK-Zellen oder Makrophagen zu beeinflussen. Auch HLA-E und HLA-F haben wahrscheinlich eine ähnliche Fähigkeit, und bis jetzt ist der invasive extravillöse Cytotrophoblast die einzige Zellart, die alle drei HLA-Klasse-Ib-Formen exprimiert (Ishitani, 2003).

Zu den Rezeptoren, über die HLA-G seine hemmende Wirkung auf Immunzellen ausübt, gehören die leukozyte Ig-like receptors LILR-B1 und LILR-B2, der killer cell Ig-like receptor KIR 2DL4, die Ig-like transcript receptors ILT2 und ILT4, CD160 und CD8 (Colonna, 1999; Hunt, 2005; O'Callaghan, 1998). Besonders wichtig scheint hierbei die hemmende Interaktion zwischen HLA-G und LILR-B1 bzw. LILR-B2 auf Antigen-präsentierenden Immunzellen, NK-Zellen sowie T-Lymphozyten, wobei die Rezeptoren offenbar eine starke Affinität zu HLA-G (v.a. zu den β_2m -assoziierten Formen) haben (Shiroishi, 2003). Verschiedene Studienergebnisse lassen vermuten, dass die β_2m -freie Form des HLA-G selektiv mit LILR-B2 interagiert und auf diesem Wege einen hemmenden Effekt auf Antigen-präsentierende Zellen ausübt (Gonen-Gross, 2005; Shiroishi, 2006). Des weiteren vermag HLA-G die NK-Zell-vermittelte Zellyse von solchen Zellen zu verhindern, die nicht das klassische HLA-Muster auf ihrer Oberfläche tragen.

Makrophagen, auch in Dezidua und Plazenta, besitzen Ig-like transcript receptors ILT2 und ILT4, und HLA-G wirkt hier v.a. über ILT4 aktivitäts- und proliferationshemmend ein (Allan, 1999; Petroff, 2000). Unklar bleibt hingegen, ob HLA-G-Dimere tatsächlich mit den Rezeptoren KIR2DL4 und CD160 interagieren können (Yan, 2005).

1.3.3.2 WIRKWEISEN DES LÖSLICHEN HLA-G

Die lösliche Form von HLA-G hat im Prinzip dieselben Funktionen wie die membrangebundene Form, nämlich die Verhinderung einer Abstoßung des Fetus durch maternale Immunzellreaktionen, jedoch übt sie diese in einem größeren und nicht lokal begrenzten Bereich aus.

Über Bindung an den CD8-Rezeptor der cytotoxischen T-Zellen kann sHLA-G diese zur Apoptose zwingen, wobei das nur für aktivierte T-Zellen gilt (Fournel, 2000; Le Gal, 1999). Neben CD8 ist auch der Fas/Fas-L-Weg hierbei von Bedeutung. Diese gezielte Tötung von Abwehrzellen geschieht z.B. im intervillösen Raum und in der Dezidua. Lila et al. zeigten, dass in einer „mixed lymphocyte reaction“ bei Anwesenheit von sHLA-G auch eine Downregulation der CD4-T-Helferzellen stattfindet (Lila, 2001); in Analogie hierzu stellten Marchal-Bras-Goncalves et al. fest, dass auch die NK-Zell-gesteuerte Cytotoxizität durch sHLA-G gehemmt wird (Marchal-Bras-Goncalves, 2001).

Des Weiteren herrscht inzwischen ein gewisser Konsens darüber, dass sHLA-G Einfluss auf die Subpopulationen der Leukozyten im Uterus hat: so steigt das Level der Th₂-Lymphozyten und der von ihnen produzierten Cytokine einerseits durch Progesteron und IL-10, aber auch durch lösliches HLA-G (Moreau, 1999; Szekeres-Bartho, 1996; s.u.).

1.3.3.3 BEEINFLUSSUNG DES CYTOKIN-MILIEUS

Wie oben bereits angeführt, nehmen mHLA-G und sHLA-G auch Einfluss auf das Muster der Cytokin-Expression in der Plazenta, unter anderem durch Aktivierung und Hemmung von Leukozyten-Populationen, wobei die genauen Mechanismen bisher nicht aufgeklärt wurden. Die Ergebnisse einiger Studiengruppen, die *in vitro* mHLA-G und/oder sHLA-G mit peripheren und/oder uterinen Immunzellen zusammenbrachten, sind z.T. widersprüchlich. Wurden mit mHLA-G ausgestattete Zellen mit PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) kombiniert, so sanken die Level der proinflammatorischen Th₁-Cytokine TNF- α und IFN- γ eindeutig, während die Th₂-Cytokine IL-10 und IL-4 anstiegen (Kanai, 2001a und 2001b; Maejima, 1997). Weniger eindeutig waren die Ergebnisse bei Co-Kultivierung von mHLA-G und uterinen mononukleären Zellen (UMC) nicht schwangerer Frauen und deciduellen mononukleären Zellen (DMC) fröhschwangerer Frauen: zwar sanken auch hier TNF- α und IFN- γ in fast allen Fällen, jedoch konnte keine Veränderung oder sogar eine Verminderung von IL-10 beobachtet werden (Kanai, 2001b und 2003; Rieger, 2002). Insgesamt legen die Erkenntnisse dieser Studien außerdem nahe, dass bei der Interaktion zwischen mHLA-G und PBMC bzw. UMC und DMC möglicherweise

Unterschiede bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen bestehen. Weitere Untersuchungen sind hier zur Klärung der Annahmen vonnöten.

Hinsichtlich des Einflusses von sHLA-G auf die Cytokin-Expression peripherer und uteriner Immunzellen brachten verschiedene Studien sehr widersprüchliche Ergebnisse hervor, die jedoch alle darauf hinweisen, dass die Konzentration an sHLA-G ausschlaggebend für das Sinken oder den Anstieg der Level von TNF- α , IFN- γ und IL-10 ist (Kanai, 2001a und 2003; Kapasi, 2000; McIntire, 2004; Rizzo, 2005a). Steigende sHLA-G-Level (evtl. mit einem notwendigen Minimum) scheinen die Sekretion der Th₁-Cytokine TNF- α und IFN- γ tendenziell zu hemmen, und zwischen IL-10 und sHLA-G besteht möglicherweise eine wechselseitige Beziehung i.S. einer negativen Rückkopplung, durch die bei fallenden sHLA-G-Werten die Produktion von IL-10 ansteigt und umgekehrt. Dazu passt, dass IL-10 offenbar in der Lage ist, die Expression von HLA-G zu aktivieren (Moreau, 1999). Es ist durchaus wahrscheinlich, dass auch die Konzentration des membrangebundenen HLA-G eine Rolle für die exakte Cytokin-Produktion spielt, jedoch gibt es dazu bisher kaum Forschungsergebnisse (Hviid, 2006).

1.3.3.4 BEEINFLUSSUNG DER ENDOTHELZELL-AKTIVITÄT

Membrangebundenes HLA-G1 hemmt die transendotheliale Migration von NK-Zellen (Dorling, 2000), und die Expression von HLA-G in der Plazenta ist bei Frauen mit Präeklampsie deutlich vermindert (Goldman-Wohl, 2000; Lim, 1997). Drittens konnte gezeigt werden, dass spezifische Antikörper gegen HLA-G an Endothelzellen binden (Blaschitz, 1997; Dye, 2001; Urosevic, 2002). Le Bouteiller et al. konnten zudem demonstrieren, dass rekombinantes sHLA-G1 die Proliferation und Migration von Endothelzellen *in vitro* herunterreguliert (Le Bouteiller, 2003). Daraus ergibt sich, dass sHLA-G1 neben seinen immunologischen Funktionen auch eine Rolle bei der vaskulären Umwandlung in der Plazenta und beim Ersatz von Endothelzellen durch endovaskulären Trophoblast in den Spiralarterien spielen könnte (Kam, 1999; Zhou, 1997).

1.3.4 HLA-G UND HABITUELLER ABORT

Zwei deutsche Studiengruppen erkannten beim Monitoring von IVF-Patientinnen einen positiven Zusammenhang zwischen sHLA-G1 und intakter Schwangerschaft: die im maternalen Blut nachweisbare Menge des sHLA-G1 war bei Frauen mit Frühabort in den ersten 10 Schwangerschaftswochen deutlich geringer als bei Frauen ohne Abort (Pfeiffer, 2000; Rebmann, 1999). Interessant ist, dass auch die bereits vor Beginn der Schwangerschaft gemessene sHLA-G1-Konzentration in gleicher Weise zwischen Frauen mit und ohne späteren Frühabort differierte.

Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft erfahren deutlich mehr Frauen mit niedrigem sHLA-G-Level eine vorzeitige Plazentalösung als Frauen mit höherem sHLA-G-Level; so haben laut Steinborn et al. (2003) Schwangere mit einem Wert unter 9,5 ng/ml ein relatives Risiko von 7,1, eine vorzeitige Plazentalösung mit der Gefahr eines Kindsverlustes zu erleiden.

Assoziationen zwischen HLA-G-Polymorphismen und detektierbaren HLA-G-Proteinen wurden bereits in Kap. 1.1.5.4 erwähnt. Habituelle Aborte, also mindestens drei aufeinander folgende Aborte, konnten in einer Studie von Hviid et al. (Hviid, 2004a) in Zusammenhang gebracht werden mit dem homozygoten Vorliegen der 14-bp-Insertion im Exon 8 der 3'UTR des HLA-G-Gens, welche ja auch mit der Nicht-Nachweisbarkeit von s-HLA-G1 im maternalen Serum assoziiert ist (Hviid, 2004b; Rizzo, 2005a); Ober et al. (2003) erkannten wie in Kap. 1.1.5.4 erwähnt ein signifikant erhöhtes Risiko für habituelle Aborte, wenn beide Partner einen Polymorphismus an Position -725 des Promotors aufweisen. In mehreren Studien wurde das Null-Allel G*0105N mit habituellen Aborten in Zusammenhang gebracht, und einzelne Forschungsgruppen beschrieben einen solchen möglichen Zusammenhang auch für die Allele G*010103, G*0104 und G*0106 (Aldrich, 2001; Hviid, 2002; Pfeiffer, 2001; Yamashita, 1999). Eindeutige Aussagen hinsichtlich Assoziationen zwischen bestimmten HLA-G-Polymorphismen und habituellen Aborten, die hinreichend durch übereinstimmende Studien gesichert sind, können bis jetzt jedoch noch nicht gemacht werden (Hviid, 2006).

Auf ähnliche Weise wie beim habituellen Abort spielt HLA-G mit großer Wahrscheinlichkeit eine Rolle bei der Entstehung der Präeklampsie, einer Störung der Spätschwangerschaft, die als übermäßige inflammatorische Antwort des mütterlichen Organismus auf die Schwangerschaft i.S. einer Th₁-Reaktion beschrieben wurde (Darmochwal-Kolarz, 1999; Redman, 1999). Bisherige Studien zu möglichen Assoziationen zwischen HLA-G-Polymorphismen und Präeklampsie erbrachten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. So scheint lediglich der 14-bp-Insertions-Polymorphismus in Exon 8 in gewisser Weise mit dem Entstehen einer Präeklampsie verbunden zu sein, wohingegen die SNPs in Exon 2, 3 und 4 bei betroffenen Frauen nicht überrepräsentiert waren im Vergleich mit Frauen, deren Schwangerschaft normal verlief (Hylenius, 2004; O'Brien, 2001). Selbst das Null-Allel G*0105N scheint nicht mit der Präeklampsie in Verbindung zu stehen (Hylenius, 2004). Die Konzentration an sHLA-G im Blut präeklampsischer Schwangerer wurde von Yie et al. (2004) als vermindert beschrieben, was bisher aber nicht weiter bestätigt wurde. Zentrale Frage in diesem Zusammenhang ist, ob das verminderte HLA-G-Protein Ursache oder Folge der gestörten Schwangerschaft ist.

1.4 DER HABITUELLE ABORT

1.4.1 DEFINITION

Als Abort wird ein Verlust der Schwangerschaft vor der Lebensfähigkeit des Feten bezeichnet, dies entspricht in etwa einem maximalen Geburtsgewicht von 500 Gramm und einer Schwangerschaftsdauer von weniger als 20-24 Wochen.

Unterschieden werden Früh- und Spätaborte: bei einem Abort vor der 14. SSW spricht man von einem Frühabort, ein Verlust der Schwangerschaft bis zur 20.-24. SSW bezeichnet man entsprechend als Spätabort (Hinney, 2007a). Die Grenzen sind hier allerdings nicht ganz eindeutig definiert; ab der 24. SSW gilt ein Fetus theoretisch als lebensfähig, so dass dies eine sinnvolle Obergrenze für die Definition des Abortes darstellt.

Seit einiger Zeit wird der Verlust der Schwangerschaft vor einer sonographischen Nachweisbarkeit derselben, d.h. bei nur durch biochemische Verfahren bestätigter Gravidität, als Frühestabort bezeichnet. Die Grenze zum Frühabort liegt etwa in der 5.-6. SSW.

Von habituellen Aborten spricht man nach WHO-Richtlinien im Vergleich zum Spontanabort dann, wenn mindestens drei Fehlgeburten aufeinander folgen und nicht von einer erfolgreich verlaufenden Schwangerschaft oder einer Frühgeburt unterbrochen werden. Man unterscheidet weiterhin zwischen primären und sekundären habituellen Aborten: haben vor den drei oder mehr Aborten bereits eine oder mehr Schwangerschaften mit Geburt stattgefunden, spricht man von sekundärem, andernfalls von primärem habituellem Abort (Hinney, 2007a).

1.5.2 EPIDEMIOLOGIE

Die natürliche Abortrate hängt vom Alter der Patientin und der erreichten Schwangerschaftsdauer ab: mit steigendem Alter der Frau steigt auch die Abortrate, sie sinkt aber mit fortschreitender Schwangerschaftsdauer.

Von allen klinisch diagnostizierten Schwangerschaften enden 11-15% mit einem Abort (bezogen auf Aborte bei Frauen unter 35 Jahren); das Risiko liegt für 20-24jährige Frauen bei 10%, bei 30-34jährigen Frauen bei 15%, bei 35-39jährigen Frauen bei 25% und bei 40-44jährigen Frauen bei ca. 50% (Heffner, 2004). Bezieht man sich auf alle biochemisch nachgewiesenen Schwangerschaften, so enden bis zu 50% mit einem Frühabort (Edmonds, 1982; Nybo Andersen, 2000). Angesichts des zunehmenden Alters erstgebärender Frauen in den Industrienationen hat die Abortrate in den letzten Jahren zugenommen, ein weiterer Anstieg ist zu erwarten.

Von habituellen Aborten sind nur etwa 1% aller Frauen mit Kinderwunsch betroffen (Stirrat). Dennoch liegt diese empirisch bestimmte Zahl deutlich über der errechneten Wahrscheinlichkeit

für drei Aborte in Folge von 0,34% (Hinney, 2007a; Wilcox, 1988). Dies ist ein wichtiger Indikator dafür, dass es sich beim habituellen Abort um ein eigenständiges Krankheitsbild handelt.

Die Abortwahrscheinlichkeit steigt mit der Anzahl vorangegangener Aborte: nach einem Abort liegt das Risiko bei 12-24%, nach zwei Aborten bei 19-35% und bei drei Aborten bereits bei 25-45% (Steck, 1997). Das Risiko für einen weiteren Abort liegt bei einer Patientin mit zehn oder mehr Aborten in der Vergangenheit bei über 80%. Dabei ist stets auch an die Abhängigkeit der Abortrate vom mütterlichen Alter zu denken.

1.5.3 ÄTIOLOGIE

1.5.3.1 GESICHERTE URSACHEN

Als Ursachen für den habituellen Abort werden ganz verschiedene Faktoren diskutiert. Hierbei ist es sinnvoll, zwischen durch Studien hinreichend gesicherten und weniger gesicherten, vermuteten Ursachen zu unterscheiden.

Das Ursachenspektrum unterscheidet sich stark bei den verschiedenen Formen des Abortes. So spielen beim habituellen Abort andere Faktoren eine Rolle als beim sporadischen Abort, und auch die Ursachen von Früh- und Spätaborten sind verschieden.

GENETISCHE URSACHEN

Bei 50-70% der sporadischen Aborte können Chromosomenanomalien als Ursache festgestellt werden. An erster Stelle stehen hierbei mit ca. 65% die autosomalen Trisomien (am häufigsten Trisomie 16 und 22), gefolgt von der Monosomie X, den Polyploidien und strukturellen Chromosomenabweichungen wie der reziproken und der Robertsonschen Translokation. Mosaik und Mehrfachtrisomien sind selten (Hinney, 2007a; Warren, 2008).

In 90% der Fälle entstehen die chromosomalen Fehlverteilungen bei der ersten Reifeteilung der Oozyte, nur in 10% liegt die Ursache in der paternalen Meiose (Voigt, 2005). Spontane Aborte aufgrund von genetischen Störungen finden v.a. in der Frühschwangerschaft statt: so sind entsprechende Ursachen bei einem Abort zwischen der 8. und 11. Schwangerschaftswoche in 50% der Fälle zu finden, bei einem Abort zwischen der 16. und 19. Schwangerschaftswoche sind es nurmehr 30% (Warren, 2008).

Die Rate von Chromosomenaberrationen im Abortgewebe sinkt mit zunehmender Zahl der vorangegangenen Spontanaborte, d.h. nur in wenigen Fällen besteht durch eine im mütterlichen

oder väterlichen Genom verankerte balancierte Chromosomenanomalie ein systematisches Risiko für chromosomale Störungen beim Feten. Von einer balancierten Translokation (z.B. einer Robertsonischen Translokation oder einer Inversion) sind etwa 4% aller Paare mit habituellen Aborten betroffen, während es in der Allgemeinbevölkerung nur ca. 0,2% sind (Warren, 2008; Wieacker, 2005). 50-70% der Gameten der phänotypisch unauffälligen Träger einer balancierten Translokation sind unbalanciert, die Abortrate liegt bei 50% (Hinney, 2007a). Numerische Aberrationen mit Abweichung von der Gesamtzahl der Chromosomen sind spontane Ereignisse und daher nur in seltenen Fällen zufällige Ursache für drei oder mehr Aborte in Folge.

Mikrodeletionen und Veränderungen einzelner Gene beeinflussen ebenfalls den Verlauf einer Schwangerschaft, wobei das Risiko für derartige Ereignisse insbesondere bei Blutsverwandtschaft der Eltern erhöht ist (Warren, 2008).

ORGANVERÄNDERUNGEN DES UTERUS

Unterschieden werden kann zwischen angeborenen und erworbenen Anomalien des Uterus. Hierzu zählen die Hemmungsmisbildungen der Müller-Gänge, intrauterine Synechien und Asherman-Syndrom, Myome, Polypen und die Cervixinsuffizienz. Die Datenlage bezüglich des Risikos der verschiedenen Anomalien für habituelle Aborte ist allerdings uneinheitlich und unzureichend und erlaubt keine suffiziente Risikobewertung.

Die Häufigkeit angeborener uteriner Anomalien in der weiblichen Bevölkerung wird mit zwischen 2 und 37-38% angegeben (Hinney, 2007a; Rai, 2006). Das Risiko für eine Fehlgeburt ist allgemein bei uteriner Anomalie erhöht, jedoch hängt es entscheidend von Art und Schwere der Anomalie ab (Grimbizis, 2001). Das höchste Risiko für habituelle Aborte birgt demnach der Uterus septus bzw. subseptus mit 26-94%, gefolgt vom Uterus unicornis (33-66%), vom Uterus bicornis (28-44%), vom Uterus duplex (13-42%) und vom Uterus arcuatus (29%) (Steck, 1997).

Erklärungsansätze für den Zusammenhang zwischen Uterusanomalie und Abortrisiko sind die Minderdurchblutung anomaler Strukturen, z.B. eines Septums, mit entsprechender Implantationsstörung bei eintretender Schwangerschaft und der eingeschränkte Raum für Fetus und Plazenta.

Aufgrund mangelhafter Datenlage kann das Abortrisiko bei erworbenen Uterusanomalien schlecht beurteilt werden. Zweifellos können ein hochgradiges Asherman-Syndrom und große intracavitäre Myome und Polypen zur Implantationsstörung oder zum Frühabort führen. Dementsprechend steigt die Rate erfolgreich verlaufender Schwangerschaften nach einer die Struktur des Uterus normalisierenden Operation; eine Auswertung von neun Studien ergab eine Abortrate von 14-16% nach Resektion eines Uterusseptums (Grimbizis, 2001; Salim, 2003). Die

Cervixinsuffizienz ist als potentielle Ursache von Spätaborten anzusehen. Die Bedeutung von Uterusanomalien für habituelle Aborte bleibt umstritten.

HÄMOSTASEOLOGISCHE STÖRUNGEN

Für die Entstehung und den Erhalt einer Schwangerschaft ist ein funktionierendes Gerinnungssystem unerlässlich. Zwischen Gerinnung und Gerinnungsauflösung besteht ein dynamisches Gleichgewicht, mögliche Störungen betreffen demnach sowohl die Förderung als auch die Hemmung der Gerinnung. Gemeinsame Gefahr der meisten Gerinnungsstörungen sind neben Thrombosen und Embolien im Allgemeinen letztendlich die Plazentainsuffizienz und der Plazentainfarkt.

Auch hier lassen sich angeborene von erworbenen Störungen grob unterscheiden, weiterhin sind die eventuellen Folgen für eine Schwangerschaft verschieden. Zu den angeborenen Gerinnungsstörungen zählen die Faktor-V-Leiden-Mutation und die Prothrombin-Mutation G20210A. Zur Kategorie der erworbenen Erkrankungen gehören die APC-Resistenz, die Hyperhomocysteinämie, das Antiphospholipidsyndrom sowie ein Mangel an Antithrombin, Protein C oder S und Faktor XII (Middeldorp, 2007). Bei erhöhtem Homocystein-Spiegel ist die Abortrate signifikant erhöht, die Ursache hierfür ist meist eine Mutation im MTHFR-Gen. Zwei Polymorphismen im MTHFR-Gen spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle: C677T und A1298C (Goodman, 2006). Dabei scheint die compound-Heterozygotie C667T/A1298C mit habituellen Aborten assoziiert zu sein, nicht jedoch die C677T- oder die A1298C-Homozygotie (Goodman, 2006; Subrt, 2008). Für die Therapie der nachgewiesenen plasmatischen Homocystein-Erhöhung wird eine Substitution von Folsäure und eventuell Vitamin B6 und B12 empfohlen.

Das Antiphospholipidsyndrom (APS) zeichnet sich durch das Vorhandensein verschiedener Antikörper gegen Membran-Bestandteile (Phospholipide) aus; hierzu zählen das Lupus-Antikoagulanz und die Antiphospholipid-Antikörper mit der Untergruppe der Anticardiolipin-Antikörper. Letztendlich führen diese Antikörper auf verschiedene Weisen u.a. zu einer Thrombophilie. Zu den Definitionskriterien für die Autoimmunerkrankung zählt neben arteriellen und venösen Thrombosen das Auftreten von wiederholten spontanen Aborten; Frauen mit habituellen Aborten wiesen in einigen Studien erhöhte Werte für Anticardiolipin-Antikörper und Antiphospholipid-Antikörper auf, ohne abseits einer Schwangerschaft klinische Anzeichen für ein APS zu zeigen (Aoki, 1993; Kwak, 1992). Mittlerweile wird das APS für bis zu 15-20% der habituellen Aborte verantwortlich gemacht (Empson, 2002). Eine Therapie ist mit Heparin und ASS möglich.

Bei nachgewiesener Gerinnungsproblematik ist im Allgemeinen eine Therapie mit Heparin (oder ASS) möglich, die Abortrate wird als verringert beschrieben. Die Patientin sollte jedoch streng kontrolliert werden mit besonderem Augenmerk auf der Gefahr eines HIT-Syndroms.

ENDOKRINOPATHIEN

Genereller Risikofaktor bei einer Schwangerschaft ist ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus mit passageren Hyperglykämien; in diesen Fällen werden vermehrt Polyhydramnion, Makrosomie und Anomalien des Fetus beobachtet. Dahingegen besteht keine erhöhte Abortwahrscheinlichkeit bei guter medikamentöser Einstellung der diabetischen Patientin (Rosenn, 1994).

Viele Untersuchungen deuten auf einen Zusammenhang v.a. zwischen einer Hypothyreose und (habituellen) Aborten hin. Dies ist besonders dann interessant, wenn Autoantikörper gegen Schilddrüsengewebe vorliegen (Prummel, 2004). Es wird empfohlen, selbst latente Hypothyreosen, die sich nur in grenzwertigen TSH-Erhöhungen zeigen, als Risikofaktor für einen Abort zu betrachten und entsprechend zu behandeln. Auch die Hyperthyreose wird als mögliche Ursache von Aborten gehandelt.

Die Bedeutung einer Hyperprolaktinämie wurde besonders durch eine randomisierte Studie von Hirahara et al. aus dem Jahr 1998 gestützt (Hirahara, 1998). Eine Therapie mit Bromocriptin bis zur 9. SSW führte hierbei zu einer Reduktion der Aborthäufigkeit auf 52% (unbehandeltes Kontrollkollektiv: 85%). Unklar bleibt jedoch die genaue Pathogenese; möglicherweise wird durch die Behandlung der Hyperprolaktinämie lediglich eine prolaktininduzierte Hypothyreose ausgeglichen.

Als durch medikamentöse Therapieversuche weitgehend gesichert gilt die Bedeutung eines PCO-Syndroms für das Auftreten habitueller Aborte, wobei einige Autoren dies vor allem auf die Adipositas der Patientin zurückführen. Die Pathogenese rezidivierender Aborte bei PCO-Syndrom ist nicht abschließend geklärt, doch eine Behandlung des PCOS mit Metformin und Gewichtsreduktion führt zu einer Verringerung der Abortraten (Cocksedge, 2008; Jakubowicz, 2002).

Die Lutealphaseninsuffizienz als Ursache habitueller Aborte wird kontrovers diskutiert. Vorrangiges Problem ist hierbei die starke Variabilität der endokrinen Profile, wodurch es an eindeutigen Richtwerten mangelt. Zwar wird bei Patientinnen mit Frühabort in 20-30% der Fälle eine inadäquate Lutealphase diagnostiziert, doch stellt sich die Frage, ob es sich dabei um Ursache oder Folge der gestörten Graviddität handelt (Ogasawara, 1997). Eventuell besteht ein Einfluss der Progesteron-Konzentration auf das Immunsystem. Bisher gibt es keinen Beweis für den Nutzen einer Substitutionstherapie, bei geringem Nebenwirkungsprofil wird eine generelle

Behandlung aller Patientinnen mit Progesteron aber oft empfohlen (Oates-Whitehead, 2003; Haas, 2008).

MATERNALE ERKRANKUNGEN

Seltene erbliche Erkrankungen sind mit einem erhöhten Risiko für Fehlgeburten vergesellschaftet. Hierzu gehören Gendefekte, die sich zumeist in veränderten Strukturproteinen oder auf hämatologischer Ebene manifestieren. Zu nennen sind hier das Marfan-Syndrom, das Ehlers-Danlos-Syndrom, das Pseudoxanthoma elasticum sowie die Sichelzellanämie, verschiedene Formen der Dysfibrinogenämie und der Morbus Wilson (Schagen van Leeuwen, 1991).

In die Kategorie der Autoimmunerkrankungen gehören die bereits angeführten Erscheinungen des Antiphospholipid-Syndroms und der Autoimmun-Thyreoiditis; für die Mutter schädliche (Auto-) Antikörper sind potentiell auch in der Lage, die Schwangerschaft zu stören. Untersuchungen haben ergeben, dass Frauen mit habituellen Aborten eine erhöhte Inzidenz von Antinukleären Antikörpern (ANA) aufweisen, die Zeichen für einen unterschwellig verlaufenden Autoimmunprozess sein können. Der Mechanismus, durch den ANA zu einem Verlust der Schwangerschaft führen können, ist jedoch noch ungeklärt (Eroglu, 1996). Das Vorhandensein von Schilddrüsen-Antikörpern verdoppelt das Risiko für einen gestörten Schwangerschaftsverlauf (Bussen, 1997).

1.5.3.2 NICHT GESICHERTE URSACHEN

INFEKTIÖSE URSACHEN

Jede schwere systemische bakterielle oder virale Infektion kann einen Abort auslösen, doch ist dies als Ursache habitueller Aborte eher unwahrscheinlich. Als solche sind lediglich virale reaktivierbare Infektionen denkbar (Cytomegalieviren, Herpes-simplex-Viren). Relevanter ist hingegen die lokale bakterielle Infektion des Genitaltraktes mit möglicher Persistenz der Keime. Unterschieden werden die bakterielle Vaginose und subklinische Infektionen mit *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* und *Mycoplasma hominis*. Die bakterielle Vaginose ist zweifellos mögliche Ursache eines vorzeitigen Blasensprunges und einer Cervixinsuffizienz bei Spätaborten, während verschiedene Autoren *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* und *Mycoplasma hominis* als Ursache habitueller Frühaborte beschreiben. Andere Arbeiten konnten dies jedoch nicht bestätigen. Ein Infektionsausschluss ist derweil trotzdem aufgrund der Bedeutung von Infektionen für Spätaborte anzuraten (Steck, 1997; Odland, 2001).

GENUSSGIFTE UND UMWELTSCHADSTOFFE

Der Einfluss von Genussgiften und Schadstoffen in der Umwelt auf das Auftreten von Aborten ist nicht eindeutig erwiesen und wird als eher gering eingeschätzt. Es leuchtet aber ein, dass ein exzessiver Genuss von Alkohol, Nikotin, Koffein, Kokain und Opiaten durchaus schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit der Patientin und damit auf den Verlauf einer Schwangerschaft haben kann. Bezüglich des moderaten Genusses dieser Mittel gibt es kontroverse Meinungen (Steck, 1997).

PSYCHOLOGISCHE FAKTOREN

Zahlreiche Arten der emotionalen Belastung stehen im Verdacht, unter anderem durch eine Beeinflussung der immunologischen Situation der Patientin das Risiko für einen Spontanabort zu erhöhen. Eine besondere Untergruppe stellen hierbei die Paare dar, die bereits zwei oder mehr Aborte erlitten haben und einer weiteren Schwangerschaft häufig mit großer Angst begegnen. Eine Verminderung der Abortrate durch „tender loving care“, d.h. engmaschige und psychologisch fundierte Betreuung während der Schwangerschaft, konnte nachgewiesen werden (Liddell, 1991).

IMMUNOLOGISCHE FAKTOREN

Für die Mutter stellt der Embryo ein Semiallotransplantat dar, da seine genetische Ausstattung zur Hälfte vom Vater stammt. Eine erfolgreich verlaufende Schwangerschaft ist also nur dann zu erwarten, wenn der mütterliche Organismus in der Lage ist, den Embryo als zwar fremdes, aber nicht abzustoßendes Objekt zu erkennen. Die konsequente Schlussfolgerung daraus ist, dass Mechanismen existieren müssen, die das mütterliche Immunsystem zum Schutz der Frucht modifizieren.

Die Immunologie der Schwangerschaft stellt einen umfangreichen und für die Fragestellung der Arbeit wichtigen Bereich dar, weshalb sowohl Grundlagen als auch Erkenntnisse hinsichtlich dem Zusammenhang zwischen Immunologie und Aborten in einem gesonderten Kapitel besprochen wurden.

2 FRAGESTELLUNG

Habituelle Aborte sind nicht nur für die medizinische Wissenschaft von Bedeutung, die sich an ihrer bis heute währenden teilweisen Unerklärbarkeit reibt, sondern natürlich in erster Linie für die betroffenen Frauen und ihre Partner. Inmitten unserer übertechnisierten Welt erscheint es womöglich mehr denn je unfassbar und schrecklich, wenn einer Frau die Fähigkeit zu Schwanger- und Mutterschaft versagt bleibt. Sogar die zahlreichen beeindruckenden Wege der Reproduktionsmedizin stellen bei den habituellen Aborten oftmals Sackgassen dar. Eine Therapie oder ein Handling des Syndroms der habituellen Aborte ist erst dann gezielt möglich, wenn die Ursachen bekannt sind. Einige wurden bereits entdeckt, und ihnen kann inzwischen erfolgreich begegnet werden. Jedoch haben wir es mit einer vielseitigen Genese zu tun, und den Großteil der Betroffenen vermögen die Mediziner nicht mit einer klaren Diagnose zu versehen.

Zu den Kandidaten auf der langen Liste möglicher Ursachen habitueller Aborte zählt auch das Zelloberflächenprotein HLA-G, welches an der feto-maternalen Grenzzone eine herausragende Position einnimmt und mit großer Wahrscheinlichkeit Teil der Entscheidung zwischen Akzeptanz oder Abstoßung ist. Die dieser wissenschaftlichen Arbeit zugrunde liegende Annahme lautet also, dass minimale Veränderungen im hoch konservierten genetischen Code für HLA-G und seine Isoformen sich über veränderte Proteine oder veränderte Proteinkonzentrationen auf den Verlauf der Schwangerschaft auswirken können. Drei codierende Abschnitte des HLA-G-Gens werden in der vorliegenden Arbeit auf Polymorphismen untersucht: die Exone 2 und 3 (codieren für die beiden extrazellulären Domänen α_1 und α_2), welche als eine funktionelle Einheit betrachtet werden können, sowie das Exon 8 (codiert für einen Teil der cytoplasmatischen Domäne).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 PATIENTENGUT

Als Pool für zu untersuchende DNA standen Blutproben von derzeitigen und ehemaligen Patientinnen der Endokrinologie der Universitäts-Frauenklinik Bonn sowie von deren Partnern zur Verfügung, die zwischen 1995 und 2007 abgenommen und mit dem Antikoagulant EDTA versetzt worden waren.

Einschlusskriterien für das Testkollektiv waren

- Drei oder mehr aufeinander folgende Aborte in der Vergangenheit
- Keine gesicherte Chromosomenanomalie, Uterusfehlbildung, Endokrinopathie, Gerinnungsstörung oder vaginale Infektion der Patientin bzw. Abortgeschehen trotz Therapie einer derartigen Vorerkrankung
- Kein Abort durch nachgewiesene Chromosomenanomalie des Fetus.

Zum Ausschluss oben genannter möglicher Ursachen für Aborte wurden folgende Untersuchungen standardmäßig durchgeführt:

- Karyotypisierung beider Elternteile
- Gerinnungsdiagnostik (Analyse auf das eventuelle Vorliegen einer Faktor-V-Leiden-Mutation, Prothrombin-Mutation, APC-Resistenz, Hyperhomocysteinämie, Plasminogen-Veränderung oder eines Antiphospholipidsyndroms)
- Feststellung der normalen Uterusanatomie per 3D-Sonographie und / oder Hysteroskopie
- HLA-Typisierung der Patientin und ihres Partners
- Hormonanalysen:
 - Ausschluss einer (latenten) peripheren Insulinresistenz mit Hilfe des HOMA-Indexes (= Homeostasis Model Assessment)
 - Ausschluss einer Hyperandrogenämie
 - Ausschluss einer Hyperprolaktinämie
 - Ausschluss einer Lutealphaseninsuffizienz
 - Ausschluss einer Hyper- oder Hypothyreose
- Mikrobiologische Untersuchungen der Vagina / Cervix und des Serums im Hinblick auf subklinische Infektionen (Chlamydien, Ureaplasmen, Gardnerella vaginalis, Pilze und Trichomonaden)

Hinsichtlich weiterer möglicher Risikofaktoren für den Verlauf einer Schwangerschaft, wie z.B. der Exposition gegenüber allgemeinen Umweltschadstoffen oder Genussgiften wie Nikotin, wurde keine Differenzierung zwischen Test- und Kontrollkollektiv vorgenommen, so dass in allen Gruppen von einer der Gesamtbevölkerung entsprechenden Verteilung auszugehen ist. Nach eigenanamnestischen Angaben war keine der Frauen aus dem Test- und dem Kontrollkollektiv während der Schwangerschaften einer auffälligen körperlichen Belastung ausgesetzt.

Es konnte ein zu untersuchendes Kollektiv aus 60 Patientinnen sowie deren Ehemännern bzw. Partnern zusammengestellt werden.

Das Kontrollkollektiv bestand aus 35 Proben fertiler Frauen ohne habituelle Aborte, deren Blut ebenfalls aus dem Archiv der UFK Bonn stammte (Durchschnittsalter bei Blutabnahme 32,21 Jahre).

Durchschnittsalter bei Abortgeschehen	30,66 Jahre
Primäre habituelle Aborte	59,61 %
Sekundäre habituelle Aborte	40,39 %
Durchschnittliche Anzahl der Aborte	3,56
	n = 60

TABELLE 1: DURCHSCHNITTLICHES ALTER, DURCHSCHNITTLICHE ANZAHL DER ABORTE PRO PATIENTIN UND VERTEILUNG PRIMÄRE/SEKUNDÄRE ABORTE BEI DEN 60 IN DIE UNTERSUCHUNG EINBEZOGENEN PATIENTINNEN MIT HABITUELLEN ABORTEN

Die Blutproben waren bei 4° C aufbewahrt worden; das zum Zeitpunkt der Untersuchung vorhandene Volumen schwankte zwischen 2 und 10 ml.

3.2 DNA-EXTRAKTION

Es wurde zunächst eine DNA-Extraktion aus dem peripheren Blut der Kollektiv-Teilnehmer durchgeführt. Die verwendeten Materialien stammten aus dem *QiAmp® DNA Mini Kit* von *Qiagen*.

Nachdem alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht worden waren, wurden 20 µl *Qiagen Protease* in ein 1,5 ml fassendes Eppendorfgefäß pipettiert. Dieser wurden 200 µl EDTA-Blut der entsprechenden Probe hinzugefügt, bevor die Lösung nach Zugabe von 200 µl *AL-Puffer* für 15 Sekunden auf dem Vortexer gemischt wurde. Anschließend erfolgte eine „quick run“-Zentrifugation der Lösung: konstante Beschleunigung auf 10.200 Umdrehungen pro Minute und unmittelbar folgende Verlangsamung bis zum Stillstand der Zentrifuge. Die Probe wurde dann im vorgeheizten Inkubator (*Techne DRI-Block DB 2A*) bei 56°C 10 Minuten lang inkubiert. Nach

erneuter „quick run“-Zentrifugation wurden 200 µl Ethanol zugegeben. Die Lösung wurde zweimal 15 Sekunden lang auf dem Vortexer gut gemischt. Danach erfolgte wiederum eine schnelle Zentrifugation.

Die gesamte Lösung wurde anschließend auf ein mit der Patientenummer vorbeschriftetes *QIAmp Spin Column* pipettiert und 1 Minute lang bei 8.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnte die Säule auf ein Waschröhrchen gesetzt und mit 500 µl *AW1-Puffer* versetzt werden. Es folgte die Zentrifugation für 1 Minute bei 8.000 Umdrehungen pro Minute. Die Säule wurde nun auf ein zweites, frisches Waschröhrchen gesetzt. 500 µl *AW2-Puffer* wurden vorsichtig hinzugegeben, bevor das Gemisch für 4 Minuten bei maximaler Drehzahl (13.000 Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert wurde. Nach diesem Schritt wurde die Säule auf ein mit Patientenummer und Extraktionsdatum beschriftetes Eppendorfgefäß (1,5 ml) gestellt. Es wurden 200 µl *AE-Puffer* hineinpipettiert, dann wurde die Lösung für 1 Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zuletzt erfolgte eine Zentrifugation für 1 Minute bei 8.000 Umdrehungen pro Minute, wonach die Säule verworfen und das Eppendorfgefäß mit dem Extraktat verschlossen und kühl gelagert werden konnte.

Die einzelnen Untersuchungen von Promotor, Exon 2 und 3 sowie Exon 8 werden im Folgenden nicht entsprechend ihrer Reihenfolge im HLA-G-Gen erläutert, sondern aufgrund der steigenden Komplexität der Vorgänge in der Reihenfolge Exon 8 – Exon 2 und 3.

3.3 14-BP-INSERTIONS/DELETIONSPOLYMORPHISMUS (EXON 8)

Die zuvor extrahierte DNA aller Patientinnen des zu untersuchenden Kollektivs sowie deren Partnern und der Kontrollen sollte nun auf das eventuelle Vorliegen einer Deletion von 14 Basenpaaren in der 3'-UTR (Exon 8) des HLA-G-Gens untersucht werden (5'-ATTGTTCATGCCT-3'). Hierzu wurde der das Exon 8 tragende DNA-Abschnitt (155 bp ohne Deletion) mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 2,5%-Agarose-Gel (s. unten). Die um 14 bp verkürzte DNA lief unter Spannung schneller und zeichnete sich nach Beendigung der Spannungszufuhr durch eine entsprechend weiter vom Startpunkt entfernte Bande aus (141 bp). Heterozygotie führte zu zwei nebeneinander liegenden Banden (141 bp und 155 bp).

3.3.1 POLYMERASE-KETTENREAKTION

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis, 1987) lässt sich ein DNA-Abschnitt enzymatisch *in vitro* vervielfältigen. Zwei definierte Oligonukleotide lagern sich an

komplementäre DNA-Regionen an und begrenzen dadurch den zu amplifizierenden Bereich. Durch zyklische Wiederholung von drei Einzelreaktionen kommt es zur exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes:

1. Denaturierung: Zerlegung der als Matrize („Template“) dienenden DNA in Einzelstränge durch Erhitzen
2. Hybridisierung/Annealing: Anlagerung der Oligonukleotide („Primer“) an die entstandenen DNA-Einzelstränge, dadurch Flankierung der zu amplifizierenden Region
3. Polymerisierung: enzymatische Synthese komplementärer Kopien der Einzelstränge, ausgehend vom 3'-Ende des jeweiligen „Primers“ durch eine DNA-Polymerase

Dieser Zyklus kann mehrmals ohne Unterbrechung ablaufen, da eine hitzestabile Taq- (*Thermus aquaticus*-) Polymerase verwendet wird. Das bei jedem Zyklus neu entstehende Fragment dient als zusätzliche Vorlage für die nächste Reaktion, so dass es bei jedem Zyklus zu einer Verdopplung des Produktes kommt. Demnach werden bei n Zyklen theoretisch 2^n (= Amplikons) gebildet. Unter optimalen Bedingungen erreicht man jedoch bei 30 Zyklen nur eine Anzahl von etwa 10^6 Kopien (Saiki, 1988).

3.3.2 PCR-ANSATZ

Für die Amplifikation wurden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Primer und Taq-DNA-Polymerase der Firma *GE Healthcare* (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) verwendet. Zur Herstellung der 5 mM dNTP-Stammlösung werden jeweils 12,5 μ l der vier 100 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit 950 μ l sterilen Wassers verdünnt.

Der Taq-Polymerase liegt ein 10x-Reaktionspuffer [500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl; pH 9,0 RT] bei.

Zur Vereinfachung und Ökonomisierung der Arbeitsabläufe wurde zunächst ein Mastermix hergestellt:

Menge	Einheit	Substanz
0,15	μ l	5'-Primer
0,15	μ l	3'-Primer
4,0	μ l	dNTPs
2,5	μ l	10x-Reaktionspuffer
0,5	μ l	Taq-Polymerase

TABELLE 2: MASTERMIX FÜR EXON 8

Grundlage der Amplifikation des Exon 8 beinhaltenden DNA-Abschnittes bildete folgender Reaktionsansatz:

Menge	Einheit	Substanz
1,5	µl	DNA
7,3	µl	Mastermix [5'-Primer, 3'-Primer, dNTPs, 10x-Reaktionspuffer, Taq- Polymerase]
16,2	µl	H ₂ O
25,0	µl	

TABELLE 3: PCR-REAKTIONSANSATZ FÜR EXON 8

Die in Tab. 2 aufgelisteten Einzelvolumina wurden mit der Anzahl der zu analysierenden Proben multipliziert, um anschließend zu einem „Mix“ zusammengemischt zu werden. Die Taq-Polymerase wurde dem Mastermix stets zuletzt beigefügt, um unspezifische Voramplifikationen zu vermeiden. DNA und steriles Wasser wurden in Einzelschritten in die 200 µl umfassenden Tubes der Firma Eppendorf pipettiert. Jedes Tube enthielt nun 25 µl des PCR-Ansatzes (1,5 µl DNA, 16,2 µl H₂O, 7,3 µl Mastermix). Zur Reinheitskontrolle der verwendeten Reagenzien wurde jedem PCR-Lauf ein Ansatz mit sterilem Wasser anstelle von DNA hinzugefügt.

3.3.3 PRIMER

Für die PCR wurden sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer der Firma *Sigma Genosys* verwendet, deren Konzentration bei 100 pmol/µl lag:

Primer	Nukleotidsequenz
HLA-G x8/5'	5'GTAGTGTGAAACAGCTGCCC3'
HLA-G x8/3'	3'AAGGAATGCAGTTCAGCATGA5'

TABELLE 4: PRIMER FÜR DIE AMPLIFIKATION VON EXON 8

3.3.4 PCR-PROGRAMM

Alle Amplifikationen wurden mit dem Thermozykler *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) durchgeführt. Für HLA-G, Exon 8 sah das Programm folgendermaßen aus: Denaturierung bei 94°C für 3 Minuten, anschließend 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 1 Minute, Hybridisierung bei 62°C für 50 Sekunden und Synthese bei 72°C für ebenfalls 50 Sekunden. Zuletzt folgten einmalig 7 Minuten bei 72°C, bevor bis zur Entfernung der Proben aus dem Thermozykler eine Temperatur von 4°C gehalten wurde.

3.3.5 VISUALISIERUNG DER AMPLIFIKATION MITTELS GELELEKTROPHORESE UND TYPISIERUNG

Die DNA-Moleküle wurden über horizontale submarine Agarose-Plattengelelektrophorese aufgetrennt. Hierbei zeigte sich das Vorliegen der 14 bp-Deletion durch eine entsprechende Bande im Bereich von 141 bp, während die nicht veränderte DNA im Bereich von 155 bp angesiedelt war.

Die Größe des Gels von 15 cm Breite und 16 cm Länge ermöglichte die Analyse von 32 Proben pro Elektrophorese. Die Konzentration der Agarose betrug 2,5%: Es wurden 5 g Agarose (*Biozym LE Agarose*) abgewogen, mit 200 ml 1xTAE-Puffer (*Gibco BRL*) gemischt und in der Mikrowelle bis auf ca. 95° C erhitzt. Anschließend wurden der Mischung 20 µl 1%-ige Ethidiumbromidlösung (*Sigma Genosys*) hinzugefügt, um die DNA auf dem Agarose-Gel zu visualisieren (Ethidiumbromid lagert sich an DNA und leuchtet unter UV-Licht). Nach Abkühlen der Agaroselösung auf Handwärme wurde sie in eine vorbereitete Elektrophorese-Kammer gegossen. Zwei Plastikämme mit je 16 Zähnen hielten die Pipettierstellen frei und wurden nach halbstündiger Gelierung entfernt. Das PCR-Produkt wurde im Verhältnis 5:1 mit je 2,5 µl 10x-Blue Juice [12,5 g Ficoll, 0,125 g Bromphenol Blau, 0,125 g Xylen Cyanol, 5 ml 0,5 mM EDTA-Lösung] versetzt, bevor die jeweils 15 µl der Lösung in die Geltaschen pipettiert wurden. Das Gel wurde in die Flachbett-Gelkammer (*Biozym*) gesetzt, mit einfachem TAE-Puffer bedeckt und unter eine Gleichspannung von etwa 70 V gesetzt. Die anionischen DNA-Moleküle wanderten entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit. Nach etwa zweistündigem Lauf konnte das Gel unter Ultraviolettlcht betrachtet und die Amplifikate beurteilt werden. Die Identifizierung der größeren und kleineren Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit einer sog. „Ladder“, die nach den Vorgaben des *Sigma PCR Low Ladder Set* angefertigt worden und im Gel mitgelaufen war. Die „Ladder“ enthielt 10,5 µl H₂O, 3,5 µl 6x *Sample Loading Buffer* [15% Ficoll, 0,06% Bromphenol Blau, 0,06% Xylen Cyanol FF, 30 mM EDTA] und 2,5 µl Nukleotidfragmente von 100 bis 1000 Basenpaaren in 100er-Schritten. Anhand dieser Standardmarker mit gestaffelter Fragmentgröße konnten die einzelnen DNA-Amplifikate durch die parallele Lage zu Leitfragmenten mit bekannter Größe der Gruppe mit oder derjenigen ohne Deletion zugeordnet werden.

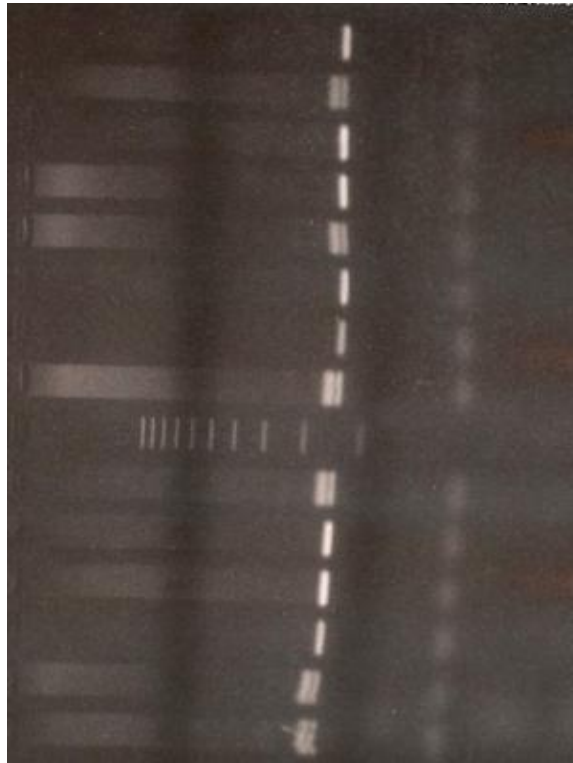


ABBILDUNG 4: BEISPIEL FÜR DIE VISUALISIERUNG DER AMPLIFIKATION VON EXON 8 MIT ANSCHLIEßENDER FOTO-DOKUMENTATION; LAUFRICHTUNG IST VON LINKS NACH RECHTS; MITTIG IST DIE „LADDER“ MIT EXEMPLARISCHER VERTEILUNG DER UNTERSCHIEDLICH GROßEN FRAGMENTE ZU ERKENNEN, WÄHREND SICH DIE AMPLIFIKATE DER 14 PROBEN JE NACH VORLIEGEN DER 14-BP-DELETION ODER –INSERTION IM BEREICH 141 / 155 BP ANSIEDELN: FRAGMENTE MIT DELETION SIND KLEINER (141 BP) UND LAUFEN IM ELEKTRISCHEN FELD SCHNELLER, D.H. IN FESTGELEGTER ZEIT WEITER ALS SOLCHE MIT INSERTION (155 BP); DOPPELTE BANDE BEDEUTET VORLIEGEN BEIDER FRAGMENTE, D.H. HETEROZYGOTIE

3.4 SEQUENZIERUNG VON EXON 2 UND 3

Beim zweiten Merkmal, auf das Testkollektiv und Kontrollkollektiv untersucht wurden, handelt es sich um einen weiter 3'-wärts liegenden Bereich im HLA-G-Gen, Exon 2 und 3. Beide Exons werden in der Allelklassifikation und –nomenklatur von HLA-G als ein zusammenhängender Abschnitt betrachtet. In dem insgesamt 546 Basenpaare umfassenden Bereich befinden sich 10 definierte Positionen, an denen Polymorphismen festgestellt wurden. Diese einzelnen Basenaustausche sind entweder synonym, d.h. beide entstehenden Triplets codieren dieselbe Aminosäure, oder nicht synonym, wobei es bei der folgenden Translation zum Einbau einer von der Ausgangsform differierenden Aminosäure kommt. Entsprechend der nach Abschluss der Analyse vorliegenden Gesamtsequenz des Abschnittes Exon 2 und 3 können mindestens 13 verschiedene Allele bezeichnet werden:

Allel	P. 31	P. 35	P. 54	P. 57	P. 69	P. 93	P. 107	P. 110	P. 130	P. 188
1011	ACG	CGG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG	CAC
1012	ACG	CGG	CAG	CCA	GCC	CAT	GGA	CTC	CTG	CAC
1013	ACG	CGG	CAG	CCA	GCC	CAC	GGT	CTC	CTG	CAC
1014	ACG	CGG	CAG	CCG	GCT	CAC	GGA	CTC	CTG	?
1015	ACG	CGG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGT	CTC	CTG	CAC
1016	ACG	CGG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG	CAT
1017	ACG	CGG	CAG	CCA	GCC	CAT	GGT	CTC	CTG	CAC
1018	ACG	CGG	CAG	CCA	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG	CAC
1031	TCG	CGG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG	CAC
1041	ACG	CGG	CAG	CCA	GCC	CAC	GGA	ATC	CTG	CAC
1043	ACG	CGG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGA	ATC	CTG	CAC
104b	ACG	CGG	CAG	CCA	GCC	CAT	GGA	ATC	CTG	?
105N	ACG	CGG	CAG	CCA	GCC	CAT	GGA	CTC	-TG	?

TABELLE 5: POLYMORPHISMEN IM BEREICH EXON 2/3 (P = POSITION; ERSTER POLYMORPHISMUS VON EXON 3 BEI P. 93) UND ALLELBEZEICHNUNGEN DER EINZELNEN KOMBINATIONEN VON POLYMORPHISMEN

ACG	Threonin	TCG	Serin
CTC	Leucin	ATC	Isoleucin
CTG	Leucin	-TG	-stop-

TABELLE 6: NICHT SYNONYME BASENAUSTAUSCHE IM BEREICH VON EXON 2/3

CGG	Arginin	CGA	Arginin
CCG	Prolin	CCA	Prolin
GCC	Alanin	GCT	Alanin
CAC	Histamin	CAT	Histamin
GGA	Glycin	GGT	Glycin

TABELLE 7: SYNONYME BASENAUSTAUSCHE IM BEREICH VON EXON 2/3

Aus den oben stehenden Tabellen ist abzuleiten, dass die Allele 1031, 1041, 1043, 104b und 105N mit nicht synonymen Basenaustauschen einhergehen.

Um die einzelnen Abort-Patientinnen, deren Partner und die Kontroll-Patientinnen hinsichtlich der Polymorphismen in Exon 2 und 3 von HLA-G untersuchen und sie in die verschiedenen

Allelgruppen einordnen zu können, wurden Exon 2 und Exon 3 jeweils in separaten Arbeitsepisoden sequenziert und die eventuell vorhandenen Basenaustausche identifiziert. Hierbei wurde der synonyme Polymorphismus an Position 188 bei teilweise schlechter Auswertbarkeit der Sequenziergele nicht in die Auswertung einbezogen.

3.4.1 SCHRITT 1: AMPLIFIKATION

Die DNA-Sequenzierung ist ein mehrschrittiger Prozess und wird im Folgenden ausführlich erläutert.

Exon 2 und 3 wurden zunächst mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden locusspezifische Primer verwendet.

3.4.1.1 PCR-ANSATZ

Für die Amplifikation wurde wiederum Material der Firma *GE Healthcare* verwendet: Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Primer und Taq-Polymerase. Der der Taq-Polymerase beiliegende 10x-Reaktionspuffer wurde ebenfalls eingesetzt. Die dNTP-Stammlösung wurde wie unter 3.3.2 geschildert hergestellt.

Es bot sich auch in dieser Versuchsreihe an, zuerst einen Mastermix entsprechend der gewünschten Probenzahl herzustellen, der dann auf die einzelnen Tubes mit DNA und sterilem Wasser verteilt wurde. Die Taq-Polymerase wurde im letzten Schritt zugefügt, um unspezifische Voramplifikationen zu vermeiden. Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Menge	Einheit	Substanz
0,3	µl	5'-Primer
0,3	µl	3'-Primer
8,0	µl	dNTPs
5,0	µl	10x-Reaktionspuffer
1,0	µl	Taq-Polymerase

TABELLE 8: MASTERMIX FÜR DIE AMPLIFIKATION VON EXON 2/3

Für den PCR-Ansatz wurde folgendes Schema umgesetzt:

Menge	Einheit	Substanz
3,0	µl	DNA
14,6	µl	Mastermix [5'-Primer, 3'-Primer, dNTPs, 10x-Reaktionspuffer, Taq- Polymerase]
32,4	µl	H ₂ O
50,0	µl	

TABELLE 9: PCR-REAKTIONSANSATZ FÜR EXON 2/3

Die Ansatzprotokolle waren für Exon 2 und 3 identisch bis auf die unterschiedlichen Primerpaare (s. Abschnitt 3.4.1.3). DNA und steriles Wasser wurden in Einzelschritten in die 200 µl fassenden Reaktionsgefäße pipettiert. Jedes Tube enthielt zuletzt 50 µl des PCR-Ansatzes. Ein DNA-freier Leerwert zur Reinheitskontrolle der verwendeten Reagenzien wurde mitgeführt.

3.4.1.2 PRIMER

Folgende Oligonukleotid-Primer der Firma *Sigma Genosys* wurden für die Amplifikation von HLA-G, Exon 2 und Exon 3 verwendet:

Exon	Primer	Nukleotidsequenz
Exon 2	HLA-G 2I5 / 5'	5'GAGGGTCGGGCGGGTCTCTAAC3'
	HLA-G Cs5I3 / 3'	3'GCATGGAGGTGGGGGTCGTGA5'
Exon 3	HLA-G Cs6I5 / 5'	5'GACCCTCTACCTGGGAGAACCCCA3'
	HLA-G Cs4I3 / 3'	3'CCTCCACTCCCTCAGAGACTTCATC5'

TABELLE 10: PRIMER FÜR DIE AMPLIFIKATION VON EXON 2 / 3

Die Primer lagen in einer Konzentration von 100 pmol/µl vor.

3.4.1.3 PCR-PROGRAMM

Das PCR-Programm (Thermozykler: *iCycler, Bio-Rad*) für die Amplifikation von HLA-G, Exon 2 und Exon 3 sah wie folgt aus: Denaturierung bei 94°C für 2 Minuten, anschließend 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 1 Minute und kombinierter Hybridisierung und Synthese bei 68°C für 2 Minuten, zuletzt einmalig 7 Minuten bei 72°C und konstante Temperatur von 10°C bis zur Entfernung der Proben.

3.4.1.4 VISUALISIERUNG AUF AGAROSE-GEL

Im Gegensatz zur Elektrophorese der PCR-Produkte von HLA-G, Exon 8, die gleichzeitig zur Kontrolle der Amplifikation und zur Auswertung diente, sollte in diesem Arbeitsabschnitt lediglich die erfolgreiche Amplifikation von Exon 2 und 3 nachgewiesen werden. Anschließend wurden die PCR-Produkte weiter verarbeitet.

Es wurde nun ein 1%-Agarose-Gel produziert. Hierzu wurden 2 g Agarose (*Biozym LE Agarose*) mit 200 ml 1xTAE-Puffer (*Gibro BRL*) gemischt und in der Mikrowelle auf ca. 95°C erhitzt. Darauf folgten die Zugabe von 20 µl Ethidiumbromidlösung und die Abkühlung des flüssigen Gels auf Handwärme, bevor es in die vorbereitete Kammer gegossen werden und dort aushärten konnte. Auch hier hielten zwei Plastikkämme mit jeweils 16 Zähnen die Taschen für die Proben offen und wurden nach Aushärtung des Gels vorsichtig entfernt. Auf diese Weise konnten pro Lauf 32 Proben untersucht werden.

Da die Elektrophorese nur zur Amplifikationskontrolle diente, wurden jeweils nur 8 µl des PCR-Produktes mit 2 µl 10x-Blue Juice gemischt (Verhältnis 4:1) und in die Geltaschen pipettiert. Nach ca. einstündigem Lauf bei 80 V wurde unter Ultraviolettlicht festgestellt, ob die Amplifikation korrekt stattgefunden hatte: eine Bande im Bereich von 270 bp (Exon 2) bzw. 276 bp (Exon 3) wurde sichtbar. Eine „Ladder“ lieferte eine Orientierung an DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe (s. oben).

3.4.2 SCHRITT 2: AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE

Nachdem durch die Visualisierung auf Agarose-Gel bestätigt worden war, dass die Amplifikation gelungen war, konnten die PCR-Produkte mit Hilfe des *MicroSpin Columns-Kits* der Firma *GE Healthcare* aufgereinigt und so von Resten der zuvor verwendeten Substanzen (Desoxyribonukleinsäuren, Proteine) befreit werden. Hierzu wurden die im Kit enthaltenen Reinigungssäulen (Sephacryl S-200 HR resin, TE-puffer, pH 7,6) zunächst in ebenfalls enthaltene Reagenzgefäße von 1,5 ml Volumen gesetzt, ihre Deckel durch eine halbe Drehung gelockert und für 1 Minute bei 3.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Gefäße mit der abzentrifugierten Pufferlösung wurden verworfen und die Säulen auf frische, sterile und

beschriftete Eppendorfgefäße gesetzt. Das PCR-Produkt – nach Abzug der 8 µl für die Amplifikationskontrolle blieben noch 42 µl – wurde nun vorsichtig auf die Säule pipettiert, bevor eine zweite Zentrifugation für 2 Minuten bei 3.000 Umdrehungen pro Minute erfolgte. Zuletzt wurde die Säule entfernt und die weiter zu verwendende Lösung im Eppendorfgefäß verschlossen und kühl gelagert.

3.4.3 SCHRITT 3: SEQUENZIERUNG

Das momentane Standardverfahren zur Sequenzierung der DNA, die die genauesten Informationen über die Basenfolge liefert, ist die sog. Didesoxymethode nach Sanger. Das Prinzip dieser enzymatischen Methode besteht darin, in einer modifizierten PCR (Sequenzier-PCR) durch den Einsatz von markierten Didesoxytriphosphaten (ddNTPs) Kettenabbrüche während der Amplifikation herbeizuführen, so dass viele verschieden lange Amplifikate entstehen. Dem Ansatz wird nur ein sequenzspezifischer Primer hinzugefügt, der an einzelsträngige Matrizen-DNA bindet. Hiervon ausgehend synthetisiert eine DNA-Polymerase den komplementären Strang mit dNTPs, der abbricht, sobald eines der beigefügten ddNTPs eingebaut wird: die ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxylgruppe, welche für die weitere Strangverlängerung nötig wäre. Der Einbau der ddNTPs erfolgt nach den Gesetzen der Statistik, so dass DNA-Fragmente entstehen, deren Länge sich jeweils durch ein Nukleotid unterscheidet. Je nach Base sind die vier ddNTPs mit spezifischen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert, und so liegt am Ende der PCR ein Gemisch dieser DNA-Moleküle vor, an deren Ende sich stets eine bestimmte, markierte Base befindet.

Nach Ethanol-Aufreinigung der DNA-Fragmente werden diese mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Ein Detektor erkennt die unterschiedlichen Farben, und ein Chromatogramm gibt schließlich die Sequenz der Basen im verwendeten DNA-Abschnitt wieder. Diese letzten Schritte nach Ethanol-Aufreinigung übernimmt heute ein Computer, der mit den gereinigten Proben, gelöst in einem speziellen Puffer, bestückt wird und nach Trennung und Detektion die Sequenz darstellt (s. unten).

Die einzelnen Vorgänge werden im Folgenden detailliert erläutert.

3.4.3.1 SEQUENZIERUNGS-PCR

Für diese PCR wurden Reagenzien der Firma *Beckman Coulter* eingesetzt, da die hierdurch gewonnenen Substratlösungen kompatibel mit dem Sequenzierer derselben Firma sind. Der PCR-Ansatz war für Exon 2 und Exon 3 hinsichtlich der benötigten Volumina identisch, die PCR-Programme unterschieden sich jedoch geringfügig.

SEQUENZIER-PCR-ANSATZ

Der Ansatz für eine Probe setzte sich zusammen aus 7,0 µl H₂O, 8,0 µl *DTCS Quick Start Master Mix* (Beckman Coulter, Fullerton, USA), 2,0 µl Primer und 3,0 µl des PCR-Produktes. Die Primer lagen in der Konzentration 5 pmol/µl vor und sind unten aufgeführt. Es entstand ein Ansatz von insgesamt 20 µl. Eine Vormischung analog zum oben beschriebenen Mastermix wurde nicht angelegt, jeder Ansatz wurde stattdessen in Einzelschritten zusammenpipettiert. Dies verringerte die mögliche Kontaminationsgefahr der Substrate und eventuelle Vorabreaktionen. Ein Leerwert oder eine Kontrolle wurde nicht mitgeführt.

PRIMER

Exon	Primer	Nukleotidsequenz
Exon 2	HLA-G 2I5	5'GAGGGTTCGGGCGGGTCTCTAAC3'
Exon 3	HLA-G 3I3	3'TCTGTGGAGCCACTCCACGCACGT5'

TABELLE 11: PRIMER FÜR DIE SEQUENZIER-PCR VON EXON 2 UND 3

Die Primer der Firma *Sigma Genosys* lagen zunächst in einer Konzentration von 100 pmol/µl vor und wurden mit sterilem Wasser auf 5 pmol/µl verdünnt.

SEQUENZIER-PCR-PROGRAMME

Auch diese Amplifikationen wurden mit dem Thermozykler *iCycler* der Firma *Bio-Rad* durchgeführt.

Für Exon 2 sah das PCR-Programm wie folgt aus: Initialisierung bei 96°C für 20 Sekunden, anschließend 30 Zyklen aus Denaturierung bei 69°C für 1 Minute und kombinierter Hybridisierung und Synthese bei 60°C für 4 Minuten, zuletzt Reaktionsbeendigung und Aufbewahrung bei 4 °C.

Das Programm für Exon 3 unterschied sich etwas von dem für Exon 2: Initialisierung bei 96°C für 20 Sekunden, dann 30 Zyklen aus Denaturierung bei 69°C für 20 Sekunden und kombinierter Hybridisierung und Synthese bei 69°C für 4 Minuten, zuletzt ebenfalls Reaktionsabschluss und Aufbewahrung bei 4 °C.

3.4.3.2 ETHANOL-AUFREINIGUNG

Nach der Sequenzier-PCR wurde jede Probe mit Ethanol in mehreren Schritten aufgereinigt, um anschließend die PC-gesteuerte Sequenzierung zu durchlaufen. Zuerst wurde eine Fällungslösung angesetzt, die pro Probe 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 2 µl 100 mM EDTA (pH 8,0), 1 µl Glykogen und 10 µl steriles Wasser enthielt. Das Glykogen wurde von der Firma Beckman Coulter mitgeliefert und war auf 20 mg/ml konzentriert. Von der Fällungslösung wurden je 15 µl in ein Eppendorfgefäß von 1,5 ml Volumen pipettiert und um 10 µl des Sequenzier-PCR-Produktes ergänzt. Es folgte die Zugabe von 60 µl 95% Ethanol (aufbewahrt im Gefrierschrank bei -20°C). Die Lösung wurde gründlich gemischt und anschließend für 15 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C und 14.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation hatte sich ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes gebildet, und der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und verworfen. 200 µl 70% Ethanol (aufbewahrt im Gefrierschrank bei -20°C) wurden hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation für 2 Minuten bei 4°C und 14.000 Umdrehungen pro Minute konnte der Überstand wieder abpipettiert werden. Diese drei letzten Schritte (Ethanol – Zentrifugation – Abpipettieren) wurden einmal wiederholt. Anschließend trocknete das Pellet 10 Minuten lang in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf, *Concentrator 5301*; ohne Temperaturregelung, max. Rotation 1.400 rpm). Danach wurde es in 40 µl *Sample Loading Solution* (SLS, Firma *Beckman Coulter*; aufbewahrt im Gefrierschrank bei -20°C) resuspendiert und in die entsprechende Vertiefung der 96er-Platte (*Beckman Coulter*) gegeben. Mit je einem Tropfen Mineral-Öl (*Beckman Coulter*) wurden die Proben abgedeckt. Nun wurde die Pufferplatte vorbereitet, indem jede Vertiefung zu $\frac{3}{4}$ mit *CEQ Separation Buffer* (*Beckman Coulter*) gefüllt wurde. Probenplatte und Pufferplatte – beide an den befüllten Reihen markiert – wurden in den Sequenzierer gestellt.

3.4.3.3 AUFTRENNUNG UND SEQUENZIERUNG

Die auf die Ethanol-Aufreinigung folgende Auftrennung der Amplikons durch Kapillarelektrophorese und Laserbestrahlung zur Identifizierung der verschiedenen markierten Molekül-Enden wurde in einem zusammenhängenden Prozess vom automatischen Sequenzierer *CEQ 2000 XL DNA Analysis System* durchgeführt. Hierzu wurde nach Start des Computers der im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrte Kapillarenträger vorsichtig eingesetzt. An einem Ende befinden sich acht Kapillaren, die später in die acht Vertiefungen der Probenplatte eintauchen und die Lösung ansaugen. Des Weiteren wurde im unteren Bereich des Sequenzier-Gerätes eine Gelspritze eingesetzt, die zu Anfang 10 ml *Genome Lab™ Separation Gel LPA I* (Beckman Coulter; beinhaltet Harnstoff in gepufferter Siebmatrix und Polyacrylamid) enthielt. Das Gel wird ebenfalls bei 4°C gelagert.

Nachdem die Proben- und die Pufferplatte platziert wurden, wurde ein virtuell abgebildetes Schema der Probenplatte am PC mit Probennummer und Datum beschriftet. Der Sequenziervorgang wurde gestartet und dauerte für acht Proben ca. 60 Minuten. Nach Abschluss desselben konnten die entstandenen Konzentrationskurven für die vier verschiedenen Basen am Computer abgelesen und interpretiert werden.

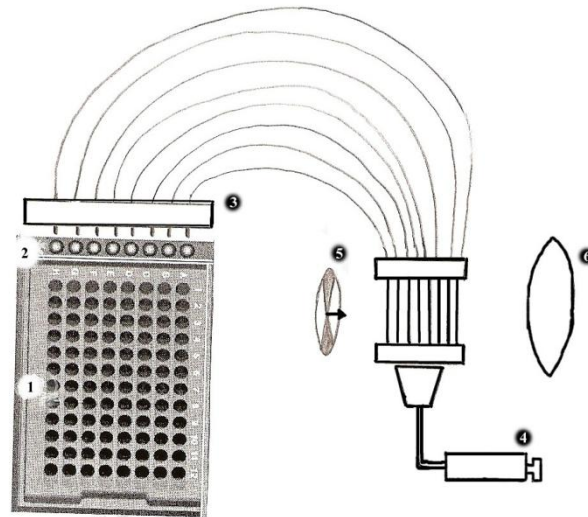


ABBILDUNG 5: SCHEMA WICHTIGER BESTANDTEILE FÜR DIE SEQUENZIERUNG MIT DEM SEQ 200 XL DNA ANALYSIS SYSTEM VON BECKMAN COULTER: PROBENPLATTE (1) MIT 12 X 8 VERTIEFUNGEN FÜR DAS AUFGEREINIGTE SEQUENZIER-PCR-PRODUKT; SOG. WETTING TRAY (2) MIT DEST. WASSER ZUR REINIGUNG DER KAPILLAREN WÄHREND DES SEQUENZIERVORGANGES; KAPILLARENTRÄGER (3) MIT ACHT KAPILLARSPITZEN; GELSPRITZE (4); LASER-LICHTQUELLE (5) UND EMPFÄNGER FÜR DIE FLUORESZENZSIGNALE (6)

4 ERGEBNISSE

4.1 ERGEBNISSE DER INSERTIONS-DELETIONSANALYSE (EXON 8)

4.1.1 ÜBERBLICK

In die Deletionsanalyse wurden von den 60 Paaren alle Proben einbezogen, was je einer Allelsumme von 120 (Frauen) und 120 (Männer) entspricht. Zudem wurden die insgesamt 70 Allele von den 35 weiblichen fertilen Kontrollen untersucht.

			Gesamt	p-Wert
	del	ins		
Frauen	79	41	120	
	65,8 %	34,2 %	100,0 %	1,000
Männer	76	44	120	
	63,3 %	36,7 %	100,0 %	0,740
Fertile Kontrollen	46	24	70	
	65,7 %	34,3 %	100,0 %	-
Gesamt	201	109	310	
	64,8 %	35,2 %	100,0 %	-

TABELLE 12: ERGEBNISSE DER DELETIONANALYSE VON EXON 8: BERECHNUNG DER ALLEL-HÄUFIGKEITEN DER DELETION BZW. INSERTION IN DEN EINZELNEN UNTERSUCHUNGSGRUPPEN SOWIE DER P-WERTE (POSITIV ASSOZIIERT), ERRECHNET MIT DEM EXAKTEN TEST NACH FISHER

				Gesamt	p-Wert
	del/del	ins/ins	del/ins		
Frauen	27	8	25	60	0,918
	45,0 %	13,3 %	41,7 %	100,0 %	
Männer	28	12	20	60	0,381
	46,7 %	20,0 %	33,3 %	100,0 %	
Fertile Kontrollen	15	4	16	35	-
	42,9 %	11,4 %	45,7 %	100,0 %	
Gesamt	70	24	61	155	-
	45,2 %	15,5 %	39,3 %	100,0 %	

TABELLE 13: GENOTYPENFREQUENZEN FÜR DEN DELETIONS- BZW. INSERTIONSPOLYMORPHISMUS IN DEN DREI UNTERSUCHUNGSGRUPPEN FRAUEN MIT ABORTEN, MÄNNER UND FERTILE KONTROLLEN SOWIE DIE P-WERTE (POSITIV ASSOZIIERT), ERRECHNET MIT DEM EXAKTEN TEST NACH FISHER

Kombination	Anzahl	p-Wert (HWG)
del ² /del ²	12	1,000
del ² /insdel	20	1,000
del ² /ins ²	11	0,807
insdel ²	8	1,000
ins ² /insdel	9	0,790
ins ² /ins ²	0	0,500

TABELLE 14: ANZAHL DER TATSÄCHLICH AUFTRETENDEN KOMBINATIONEN VON GENOTYPEN BEI DEN 60 PAAREN (FRAUEN MIT HABITUELLEN ABORTEN UND IHRE PARTNER) UND P-WERTE AUS DER ÜBERPRÜFUNG DES HARDY-WEINBERG-GLEICHGEWICHTES

4.1.2 BESCHREIBUNG

Bei der Allelauszählung von Exon 8 zeigt sich, dass bei den Frauen mit habituellen Aborten das Allel „del“ mit 65,8% deutlich häufiger ist als das Allel „ins“ mit 34,2%. Jedoch besteht dieselbe

Allelverteilung bei den fertilen Kontrollen ($p=1,000$), sodass hier von der natürlichen Verteilung in der Bevölkerung ausgegangen werden muss. Auch die Allele der Männer zeigen keine wesentlichen Unterschiede hierzu (63,3% „del“; 36,7% „ins“; $p=0,74$).

Betrachtet man die Frequenzen der Genotypen in den drei Gruppen, so zeigt sich die „del“/“del“-Homozygotie-Variante bei Frauen und Männern am häufigsten (45,0 % bzw. 46,7 %), während die fertilen Kontrollen mit 45,7 % am häufigsten heterozygot für das Merkmal sind. Dennoch ist sowohl zwischen Frauen und fertilen Kontrollen ($p=0,918$) als auch zwischen Männern und fertilen Kontrollen ($p=0,381$) kein signifikanter Unterschied bei der Verteilung festzustellen. Es fällt lediglich ins Auge, dass 20,0 % der Männer homozygot für die „ins“-Variante sind, wohingegen es nur 13,3 % der Frauen und 11,4 % der fertilen Kontrollen sind (s.u.).

Auch wenn ein Vergleich der beiden Testgruppen mit den fertilen Kontrollen bereits eine Aussage darüber macht, ob die Verteilung der Genotypen regelhaft ist oder nicht, wurde bei der Auswertung zusätzlich noch das Hardy-Weinberg-Equilibrium überprüft. Dieses zeigt mögliche Differenzen zwischen der anhand der Allelfrequenzen erwarteten und der tatsächlichen Genotyp-Häufigkeiten. Im Bereich des Exon 8 ergab die Überprüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts keine Auffälligkeiten bei den Frauen mit Aborten ($p=0,572$) und bei den fertilen Kontrollen ($p=1,000$). Jedoch liegt bei den Männern mit $p=0,029$ ein signifikanter Unterschied zwischen erwarteten und tatsächlichen Genotypfrequenzen vor. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Genotypen fällt eine Verschiebung der Häufigkeiten zugunsten der homozygoten Varianten auf, wobei vor allem die „ins“/“ins“-Version mit beobachteten 20,0 % gegenüber erwarteten 13,4 % aus dem Rahmen fällt.

Die Betrachtung der Paarkonstellationen zeigte keine Auffälligkeiten i. S. von vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichenden Häufigkeiten von Kombinationen; ein Zusammentreffen von zwei Partnern mit Homozygotie für das Merkmal „ins“ kam nicht vor (s. Tab. 19).

4.2 ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNG VON EXON 2 UND 3

4.2.1 ÜBERBLICK

4.2.1.1 FREQUENZEN DER EINZELNEN POLYMORPHISMEN

Die folgenden Tabellen 19 bis 27 stellen die Ergebnisse der Auszählung von Polymorphismen an den einzelnen Positionen P. 31 bis P. 130 im Bereich von Exon 2 und 3 dar.

				Gesamt	p-Wert
		ACG	TCG		
P. 31	Frauen	118	2	120	0,532
		98,3 %	1,7 %	100,0 %	
	Männer	118	2	120	0,532
	98,3 %	1,7 %	100,0 %		
	Fertile Kontrollen	70	0	70	-
		100,0 %	0 %	100,0 %	
	Gesamt	306	4	310	-
		98,7 %	1,3 %	100,0 %	

				Gesamt	p-Wert
		CGG	CGA		
P. 35	Frauen	120	0	120	1,000
		100,0 %	0 %	100,0 %	
	Männer	120	0	120	1,000
	100,0 %	0 %	100,0 %		
	Fertile Kontrollen	70	0	70	-
		100,0 %	0 %	100,0 %	
	Gesamt	310	0	310	-
		100,0 %	0 %	100,0 %	

				Gesamt	p-Wert
		CAG	CGG		
P. 54	Frauen	120	0	120	1,000
		100,0 %	0 %	100,0 %	
	Männer	120	0	120	1,000
	100,0 %	0 %	100,0 %		
	Fertile Kontrollen	70	0	70	-
		100,0 %	0 %	100,0 %	
	Gesamt	310	0	310	-
		100,0 %	0 %	100,0 %	

				Gesamt	p-Wert
		CCG	CCA		
P.57	Frauen	63	57	120	0,452
		52,5 %	47,5 %	100,0 %	
	Männer	62	58	120	0,369
	51,7 %	48,3 %	100,0 %		
	Fertile Kontrollen	41	29	70	-
		58,6 %	41,4 %	100,0 %	
	Gesamt	166	144	310	-
		53,5 %	46,5 %	100,0 %	

				Gesamt	p-Wert
		GCC	GCT		
P. 69	Frauen	120	0	120	1,000
		100,0 %	0 %	100,0 %	
	Männer	120	0	120	1,000
	100,0 %	0 %	100,0 %		
	Fertile Kontrollen	70	0	70	-
		100,0 %	0 %	100,0 %	
	Gesamt	310	0	310	-
		100,0 %	0 %	100,0 %	

				Gesamt	p-Wert
		CAC	CAT		
P.93	Frauen	88	32	120	0,620
		73,3 %	26,7 %	100,0 %	
	Männer	84	36	120	1,000
	70,0 %	30,0 %	100,0 %		
	Fertile Kontrollen	49	21	70	-
		70,0 %	30,0 %	100,0 %	
	Gesamt	221	89	310	-
		71,3 %	28,7 %	100,0 %	

				Gesamt	p-Wert
		GGA	GGT		
P.107	Frauen	111	9	120	0,540
		92,5 %	7,5 %	100,0 %	
	Männer	114	6	120	1,000
	95,0 %	5,0 %	100,0 %		
	Fertile Kontrollen	67	3	70	-
		95,7 %	4,3 %	100,0 %	
	Gesamt	292	18	310	-
		94,2 %	5,8 %	100,0 %	

				Gesamt	p-Wert
		CTC	ATC		
P.110	Frauen	94	26	120	0,081
		78,3 %	21,7 %	100,0 %	
	Männer	99	21	120	0,301
	82,5 %	17,5 %	100,0 %		
	Fertile Kontrollen	62	8	70	-
		88,6 %	11,4 %	100,0 %	
	Gesamt	255	55	310	-
		82,3 %	17,7 %	100,0 %	

				Gesamt	p-Wert
		CTG	-TG		
P. 130	Frauen	120	0	120	1,000
		100,0 %	0,0 %	100,0 %	
	Männer	118	2	120	0,532
	98,3 %	1,7 %	100,0 %		
	Fertile Kontrollen	70	0	70	-
		100,0 %	0,0 %	100,0 %	
	Gesamt	308	2	310	-
		99,4 %	0,6 %	100,0 %	

TABELLE 15-23: ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNG VON EXON 2 UND 3: AUFLISTUNG DER HÄUFIGKEITEN VON POLYMORPHISMEN AN DEN NEUN EINZELNEN POSITIONEN (PM 31-130) BEI FRAUEN, MÄNNERN UND FERTILEN KONTROLLEN SOWIE DER P-WERTE (POSITIV ASSOZIIERT), ERRECHNET MIT DEM EXAKTEN TEST NACH FISHER

4.2.1.2 GENOTYPEN-FREQUENZEN

Im Anschluss an die Auszählung der einzelnen Polymorphismen in den drei Untersuchungsgruppen (Allelfrequenzen) wurden die Häufigkeiten der jeweils drei möglichen Paarungen von Allelen in einem Individuum bestimmt (Genotypfrequenzen). Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 28-32 dargestellt; Positionen, die in allen drei Gruppen zu 100 % dasselbe Allel aufweisen, sind hierbei nicht mehr beachtet.

					Gesamt	p-Wert
		ACG/ACG	ACG/TCG	TCG/TCG		
P. 31	Frauen	58	2	0	60	0,275
		96,7 %	3,3 %	0,0 %	100,0 %	
	Männer	58	2	0	60	0,275
		96,7 %	3,3 %	0,0 %	100,0 %	
Fertile Kontrollen	35	0	0	35	-	
	100,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0 %		
	Gesamt	151	4	0	155	-
		97,4 %	2,6 %	0,0 %	100,0 %	

					Gesamt	p-Wert
		CCG/CCG	CCG/CCA	CCA/CCA		
P. 57	Frauen	18	27	15	60	0,668
		30,0 %	45,0 %	25,0 %	100,0 %	
	Männer	21	20	19	60	0,213
		35,0 %	33,3 %	31,7 %	100,0 %	
Fertile Kontrollen	12	17	6	35	-	
	34,3 %	48,6 %	17,1 %	100,0 %		
	Gesamt	51	64	40	155	-
		32,9 %	41,3 %	25,8 %	100,0 %	

					Gesamt	p-Wert
		CAC/CAC	CAC/CAT	CAT/CAT		
P. 93	Frauen	33	22	5	60	0,822
		55,0 %	36,7 %	8,3 %	100,0 %	
	Männer	33	18	9	60	0,377
		55,0 %	30,0 %	15,0 %	100,0 %	
	Fertile Kontrollen	17	15	3	35	-
		48,6 %	42,8 %	8,6 %	100,0 %	
	Gesamt	83	55	17	155	-
		53,5 %	35,5 %	11,0 %	100,0 %	

					Gesamt	p-Wert
		GGA/GGA	GGA/GGT	GGT/GGT		
P. 107	Frauen	51	9	0	60	0,363
		85,0 %	15,0 %	0,0 %	100,0 %	
	Männer	54	6	0	60	0,819
		90,0 %	10,0 %	0,0 %	100,0 %	
	Fertile Kontrollen	32	3	0	35	-
		91,4 %	8,6 %	0,0 %	100,0 %	
	Gesamt	137	18	0	155	-
		88,4 %	11,6 %	0,0 %	100,0 %	

					Gesamt	p-Wert
		CTC/CTC	CTC/ATC	ATC/ATC		
P. 110	Frauen	42	10	8	60	0,197
		70,0 %	16,7 %	13,3 %	100,0 %	
	Männer	44	11	5	60	0,222
		73,3 %	18,3 %	8,3 %	100,0 %	
Fertile Kontrollen	30	2	3	35	-	
	85,7 %	5,7 %	8,6 %	100,0 %		
	Gesamt	116	23	16	155	-
		74,8 %	14,8 %	10,3 %	100,0 %	

					Gesamt	p-Wert
		CTG/CTG	CTG/-TG	-TG/-TG		
P. 130	Frauen	60	0	0	60	1,000
		100,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0 %	
	Männer	58	2	0	60	0,275
		96,7 %	3,3 %	0,0 %	100,0 %	
Fertile Kontrollen	35	0	0	35	-	
	100,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0 %		
	Gesamt	153	2	0	155	-
		98,7 %	1,3 %	0,0 %	100,0 %	

TABELLEN 24-28: ERGEBNISSE DER SEQUENZIERUNG VON EXON 2 UND 3: AUFLISTUNG DER GENOTYPFREQUENZEN AN DEN POSITIONEN P. 31, P. 57, P. 93, P. 110 UND P. 130 BEI FRAUEN, MÄNNERN UND FERTILEN KONTROLLEN SOWIE DER P-WERTE (POSITIV ASSOZIIERT), ERRECHNET MIT DEM EXAKTEN TEST NACH FISHER

Kombination	Anzahl	p-Wert (HWG)
CTC ² /CTC ²	32	0,855
CTC ² /CTCATC	14	0,833
CTC ² /ATC ²	8	0,799
CTCATC ²	3	0,619
ATC ² /CTCATC	1	0,619
ATC ² /ATC ²	2	1,000

TABELLE 29: ANZAHL DER TATSÄCHLICH AUFTRETENDEN KOMBINATIONEN VON GENOTYPEN AN DER POSITION 110 BEI DEN 60 PAAREN (FRAUEN MIT HABITUELLEN ABORTEN UND IHRE PARTNER) UND P-WERTE AUS DER ÜBERPRÜFUNG DES HARDY-WEINBERG-GLEICHGEWICHTES

4.2.2 BESCHREIBUNG

4.2.2.1 FREQUENZEN DER EINZELNEN POLYMORPHISMEN

An den Positionen 35, 54 und 69 im Bereich von Exon 2 wies keine Frau mit habituellen Aborten einen Polymorphismus auf, gleiches gilt für die Männer. Auch die fertilen Kontrollen zeigten zu 100% die CGG-Variante (P. 35), die CAG-Variante (P. 54) und die GCC-Variante (P. 69). Damit verbleiben die sechs Lokalisationen P. 31, P. 57, P. 93, P. 107 und P. 110.

An der Position 31 im Bereich von Exon 2 wiesen nur 2 Patientinnen des weiblichen Testkollektivs den Polymorphismus TCG auf (1,7%), ebenso viele waren es bei den Männern. In der Kontrollgruppe zeigte keine Probandin den TCG-Polymorphismus. Der Unterschied zwischen den Frauen mit habituellen Aborten bzw. den Männern einerseits und den fertilen Kontrollen andererseits ist nicht signifikant, was auch auf die geringe absolute Zahl zurückzuführen ist ($p=0,532$ bei Frauen und Männern). Eine noch geringere Häufigkeit des zweiten Merkmals zeigt sich an Position 130, wo es sich nur bei 2 von 120 Allelen der Männer um die -TG-Variante handelt (1,7 %). Dementsprechend besteht auch hier keine signifikante Differenz zu den fertilen Kontrollen ($p=0,532$), zumal die niedrige absolute Zahl eine weitergehende Interpretation kaum möglich machen würde.

Eine beinahe gleichmäßige Verteilung der zwei Triplet-Varianten zeigte sich im weiblichen Testkollektiv an Position 57. Hier wiesen 52,5% das Triplet CCG auf, während der CCA-Polymorphismus in 47,5% der Fälle vorhanden war. Die Zahlen der Männer unterscheiden sich

hiervon kaum (51,3% CCG; 48,7% CCA). Bei den fertilen Kontrollen war das CCG-Allel mit 58,6% zwar nicht signifikant ($p=0,452$), dennoch deutlicher als bei den Frauen mit habituellen Aborten dem CCA-Polymorphismus überlegen.

An der Position 93 ist bei den Frauen mit habituellen Aborten der CAT-Polymorphismus in 26,7% der Allele nachweisbar (CAC in 73,3%), während genau 30% der fertilen Kontrollen den CAT-Polymorphismus aufwiesen. Damit liegt auch hier kein signifikanter Unterschied vor ($p=0,620$). Die Männer zeigen ebenfalls zu 30% das CAT-Allel und zu 70% das CAC-Allel ($p=1,000$).

An der Position 107 wiesen 7,5% der Allele des weiblichen Testkollektivs den Polymorphismus GGT auf, bei den fertilen Kontrollen waren es 4,3% und bei den Männern 5%. Auch hier liegen demnach keine signifikanten Unterschiede zwischen Frauen und Kontrollen ($p=0,540$) sowie zwischen Männern und Kontrollen ($p=0,823$) vor.

Der ATC-Polymorphismus an Position 110 im Bereich von Exon 3 stellte sich in dieser Untersuchungsreihe als der interessanteste heraus, da er bei den Frauen mit habituellen Aborten in 21,7% nachweisbar war, bei den fertilen Kontrollen hingegen nur in 11,4%. Zwar liegt auch hier keine Signifikanz vor, jedoch kann man von einer starken Tendenz sprechen ($p=0,081$). Die Häufigkeit des ATC-Polymorphismus bei den Männern liegt mit 17,5% zwischen denen der beiden weiblichen Gruppen und ist verglichen mit den fertilen Kontrollen nicht signifikant anders ($p=0,262$). Betrachtet man die Paarkonstellationen an der Position 110, so ergeben sich keine Auffälligkeiten i. S. einer überzufälligen Häufung von z.B. ATC-Homozygotie bei beiden Partnern, welche dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nicht entspräche (s. Tab. 34).

4.2.2.2 GENOTYPEN-FREQUENZEN

Die Positionen 35, 54 und 69 von Exon 2/3 weisen jeweils nur ein Allel auf, weshalb sich die Bestimmung von Genotypen erübrigt. An den Positionen 31 und 130 sind in allen drei Untersuchungsgruppen entweder 100,0 % oder 96,7 % homozygot für die ACG- bzw. die CTG-Variante; an Position 31 sind lediglich je 2 Frauen und Männer heterozygot, an Position 130 sind es nur 2 Männer. Eine Homozygotie für das zweite Merkmal (TCG an P. 31 bzw. -TG an P. 130) kommt dagegen nicht vor. Signifikante Unterschiede zwischen Frauen bzw. Männern und fertilen Kontrollen bestehen demnach nicht ($p=0,275$ für beide Gruppen an P. 31; $p=1,000$ für die Frauen und $p=0,275$ für die Männer an P. 130).

An Position 57 zeigen Frauen, Männer und fertile Kontrollen jeweils eine ähnliche Häufigkeit des Genotyps CCG/CCG mit durchschnittlich 32,9 % (Frauen 30,0 %, Männer 35,0 %, Kontrollen 34,3 %). Sowohl bei den Frauen als auch bei den fertilen Kontrollen ist die heterozygote Variante mit 45,0 % bzw. 48,6 % am häufigsten, während von den Männern nur 33,3 % diesen Genotyp

aufweisen. Entsprechend öfter vertreten ist dafür bei den Männern die zweite homozygote Variante, CCA/CCA, mit 31,7 %. Die Frauen mit habituellen Aborten zeigen sie in 25,0 %, die fertilen Kontrollen nur in 17,1 %. Obwohl insgesamt zwischen Männern und fertilen Kontrollen kein signifikanter Unterschied in der Genotypen-Verteilung vorliegt ($p=0,213$; $Z=0,403$), fällt dennoch die Differenz gerade bei der homozygoten CCA/CCA-Variante ins Auge. Die Frauen unterscheiden sich nicht signifikant von den fertilen Kontrollen ($p=0,668$; $Z=0,432$).

An Position 93 sind jeweils 55,0 % der Frauen und Männer homozygot für das Triplet CAC, bei den fertilen Kontrollen sind es 48,6 %. Letztere weisen wie auch die Frauen mit habituellen Aborten die CAT/-CAT-Variante nur in knapp 8-9 % auf, während es bei den Männern 15,0 % sind. Dies ergibt für die Frauen $p=0,822$ im Vergleich mit den Kontrollen, für die Männer $p=0,377$. Auch die Anwendung des Cochran-Armitage Trend Tests, welcher präziser bei der Auswertung dreier möglicher Genotypen ist, ergibt keine signifikanten Unterschiede.

An Position 107 kommt die homozygote GGT-Variante in allen drei Gruppen nicht vor. Die homozygote GGA-Variante ist hier mit Abstand die häufigste und macht bei den fertilen Kontrollen 88,4 %, bei den Frauen 85,0 % und bei den Männern 90,0 % aus. Es bestehen bei der Verteilung der Genotyp-Häufigkeiten keine signifikanten Unterschiede zwischen Frauen und fertilen Kontrollen ($p=0,363$) sowie zwischen Männern und fertilen Kontrollen ($p=0,819$).

An Position 110 zeigen 85,7 % der fertilen Kontrollen die homozygote CTC-Variante, während es bei den Frauen mit habituellen Aborten 70,0 % und bei den Männern 73,3 % sind. Der Unterschied scheint sowohl zwischen Frauen und Kontrollen als auch zwischen Männern und Kontrollen auffällig und setzt sich für die heterozygote Variante CTC/ATC fort: 16,7 % der Frauen, 18,3 % der Männer und nur 5,7 % der fertilen Kontrollen weisen diese auf. ATC-homozygot sind 13,3 % der Frauen und jeweils 8-9 % der Männer und fertilen Kontrollen. Bei $p=0,197$ (im Trend-Test $Z=0,156$) für die Frauen und $p=0,222$ ($Z=0,355$) für die Männer liegt wiederum keine Signifikanz für die beschriebenen Differenzen vor, ein gewisser Trend ist dennoch zu erkennen.

ÜBERPRÜFUNG DES HARDY-WEINBERG-GLEICHGEWICHTS

In der folgenden Tabelle sind die p-Werte für den Vergleich zwischen erwarteten und tatsächlichen Genotyp-Häufigkeiten in den drei Untersuchungsgruppen für die einzelnen Positionen angegeben.

	Frauen	Männer	Kontrollen
P. 31	1,000	1,000	1,000
P. 57	0,446	0,010	1,000
P. 93	0,740	0,031	1,000
P. 107	1,000	1,000	1,000
P. 110	0,0003	0,010	0,001
P. 130	1,000	1,000	1,000

TABELLE 30: P-WERTE FÜR DEN VERGLEICH ZWISCHEN ERWARTETEN UND TATSÄCHLICHEN GENOTYPEN-FREQUENZEN AN DEN 6 INTERESSIERENDEN POSITIONEN VON EXON 2/3 BEI FRAUEN, MÄNNERN UND FERTILEN KONTROLLEN

Wie aus der oben stehenden Tabelle deutlich wird, befinden sich die Genotypen-Frequenzen in allen drei Untersuchungsgruppen an den Positionen P. 31, P. 107 und P. 130 im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, d.h. die tatsächliche Verteilung der Genotypen entspricht der anhand der bestimmten Allelhäufigkeiten erwarteten.

An den Positionen 57 und 93 sind die die fertilen Kontrollen ebenfalls im Gleichgewicht, während die Frauen mit Aborten davon abweichen, jedoch in dieser Abweichung keine Signifikanz erreichen (p jeweils $> 0,05$). Anders stellen sich die Männer dar: an beiden Positionen entspricht ihre Genotypen-Verteilung nicht der erwarteten, sie liegen außerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes.

Sehr auffällig sind die p-Werte für alle drei Gruppen an Position 110: hier liegt nach den vorliegenden Untersuchungen kein Ergebnis im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Auch die Genotypen-Frequenzen der fertilen Kontrollen, von denen eine Widerspiegelung der allgemeinen Verteilung angenommen wird, weichen stark von den erwarteten Werten ab.

5 DISKUSSION

In den letzten Jahrzehnten beschäftigten sich diverse Studiengruppen mit der möglichen Verbindung zwischen Polymorphismen und Variationen im HLA-G-Gen und Störungen des Schwangerschaftsverlaufes. Bisher konnten jedoch keine eindeutigen Aussagen darüber gemacht werden, ob und wenn ja, in welcher Weise Veränderungen im HLA-G-Gen von Mutter und / oder Vater Einfluss auf die Akzeptanz oder Abstoßung des Feten haben.

Da nicht das Genom des Feten selbst zur Verfügung steht, sich in diesem jedoch die Informationen für die brisanten HLA-G-Moleküle im fetomaternalen Grenzbereich befinden, können nur indirekte Aussagen über eventuelle Zusammenhänge zwischen genetischen Variationen und erhöhtem Risiko für den gestörten Verlauf einer Schwangerschaft durch die Daten von Mutter und Vater gewonnen werden.

5.1 EXON 8

Bei Exon 8 handelt es sich um einen nicht-translatierten Abschnitt des HLA-G-Gens. 1993 entdeckte Harrison hier einen 14-bp-Insertions-/Deletionspolymorphismus ab Position 3741, der auf DNA- und Transkript-Ebene vorhanden ist (Harrison, 1993). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen in allen drei Gruppen eine sehr ähnliche Verteilung der Allele, wobei diese von den bisher angenommenen Werten („del“ in 55 %, „ins“ in 45 %) abweicht: im Durchschnitt handelt es sich in 64,8 % der Allele um die „del“-Variante (Frauen 65,8 %, Männer 63,3 %, fertile Kontrollen 65,7 %), während das Allel „ins“ nur 35,2 % (Frauen 34,2 %, Männer 36,7 %, fertile Kontrollen 34,3 %) ausmacht. Eine mögliche Ursache hierfür ist die vergleichsweise geringe Größe der drei Untersuchungsgruppen.

Im direkten Vergleich der mRNA-Konzentrationen von 14-bp-positiver und 14-bp-negativer mRNA in Trophoblastzellen heterozygoter Schwangerer beschrieb zuletzt Hviid eine Differenz zugunsten der 14-bp-negativen mRNA sowie das Erscheinen zusätzlich verkürzter mRNA-Formen bei homozygoten 14-bp-positiven Probandinnen (Hviid, 2006). Dies lässt – unter Vorbehalt eines möglichen Kopplungsungleichgewichtes mit der Promotorregion – darauf schließen, dass das Vorhandensein des 14-bp-Abschnittes eine verminderte Transkription zur Folge hat, z.B. durch Signalcodes für Splicing-Vorgänge. Homozygote Träger(innen) der 14-bp-Insertion weisen also verminderte Level an entsprechender mRNA auf. In einer solchen Gruppe konnte von mehreren Forschern kein sHLA-G1 nachgewiesen werden (Hviid, 2004b; Rizzo, 2005a). Überträgt man diese Überlegungen auf die Schwangerschaft, so könnte es bedeuten, dass sich ein homozygoter 14-bp-positiver Fetus durch die geringe Menge sHLA-G1 nicht in ausreichendem Maße gegen die Immunreaktion der Mutter schützen kann (s. Einleitung),

wodurch wiederum mit größerer Wahrscheinlichkeit eine Abstoßung erfolgt. Zwei deutsche Studiengruppen haben nach einigen Untersuchungen eine Verbindung zwischen sHLA-G1-Level und intakter Schwangerschaft postuliert (Pfeiffer, 2000; Rebmann, 1999); Hviid brachte 2004 die Homozygotie für die 14-bp-Insertion mit habituellen Aborten in Zusammenhang (Hviid, 2004a). Damit aber der Fetus homozygot sein kann, müssen entweder beide Eltern heterozygot sein (25 % Wahrscheinlichkeit) oder einer von ihnen homozygot (50 % Wahrscheinlichkeit) oder aber beide homozygot für das gefragte Merkmal (100 % Wahrscheinlichkeit). Spiegelt sich dies womöglich in den vorliegenden Daten wider, gibt es also bei Frauen mit habituellen Aborten und deren Partnern mehr Homozygotie für das Allel „ins“ verglichen mit den fertilen Kontrollen?

Signifikante Unterschiede zwischen Frauen und Kontrollen bzw. Männern und Kontrollen bestehen nicht, wobei dennoch bei den Männern der recht hohe Wert von 20,0 % für das Vorliegen von „ins“/“ins“ auffällt (Frauen 13,3 %, fertile Kontrollen 11,4 %). Er liegt zudem im Hardy-Weinberg-Ungleichgewicht ($p=0,029$). Nähme man jedoch hier einen Zusammenhang mit dem Auftreten habitueller Aborte an, bliebe die Frage offen, warum die Frauen keine vermehrte Homozygotie für die Insertion zeigen. Auch die direkte Untersuchung der Paare ergibt keine Auffälligkeiten in der Verteilung der Kombinationen; ein vollkommen „ins“-homozygotes Paar kommt nicht vor. Das heißt abschließend, dass durch die gewonnenen Daten eine eventuelle positive Assoziation zwischen der 14-bp-Insertion und habituellen Aborten nicht hergestellt werden kann. Um das vermehrte Vorkommen „ins“-homozygoter Männer zu klären, bedarf es weiterer Untersuchungen mit einer größeren Zahl an Probanden.

5.2 EXON 2 UND 3

Wie bereits in Kap. 3.4 geschildert, handelt es sich bei Exon 2 und 3 um einen verglichen mit Exon 8 weiter 3'-wärts liegenden Abschnitt im HLA-G-Gen, der in der gültigen Allelklassifikation und -nomenklatur als ein zusammenhängender Bereich betrachtet wird. Der Bereich umfasst 546 Basenpaare mit 10 definierten Positionen, an denen Polymorphismen beschrieben wurden. Von diesen gehen jedoch lediglich vier mit nicht-synonymen Basenaustauschen und entsprechend veränderter Proteinstruktur einher, während die restlichen Sequenzvarianten sich nicht auf Proteinebene wiederfinden und so nach aktuellem Verständnis keinen Einfluss auf ein mögliches pathologisches Geschehen um HLA-G-Formen haben.

Die interessierenden Polymorphismen sind die an den Positionen P. 31, P. 54, P. 110 und P. 130. An drei Positionen führt der Polymorphismus zum Einbau einer anderen Aminosäure (s. Tab. 5); an P. 130 entsteht durch die Deletion einer Base mit Verschiebung des Leserahmens ein Stopp-Codon, das zum Abbruch der Translation an dieser Stelle und damit zur Bildung eines nicht funktionstüchtigen Moleküls führt. Für homozygote Trägerinnen dieses sog. Null-Allels (G*0105N) wurde in mehreren Studien ein signifikant erhöhtes Risiko für habituelle Aborte

beschrieben (Hviid, 2006; Ober, 1998), jedoch war eine erfolgreiche Schwangerschaft trotz z.T. stark verminderter Expression von HLA-G1 und sHLA-G nicht unmöglich. Noch unklarere Ergebnisse lieferten die wenigen bisher durchgeführten Studien zur Bedeutung der Polymorphismen an den drei anderen Positionen (Hviid, 2006).

In den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen fand sich der Polymorphismus an Position 54 in keinem Fall, während die drei anderen in unterschiedlichen Häufigkeiten vertreten waren. Das Null-Allel konnte nur in 2 Fällen im männlichen Testkollektiv nachgewiesen werden, während die Frauen mit habituellen Aborten und die fertilen Kontrollen es gar nicht aufwiesen. Auch an Position 31 fanden sich vernachlässigbar kleine Zahlen von Polymorphismen bei den Frauen und Männern, so dass hier ein Zusammenhang mit habituellen Aborten nicht wahrscheinlich erscheint; eventuell sind Studien mit größeren Testgruppen erforderlich. Einzig an Position 110 im Bereich von Exon 3 zeigten sich auffällige Werte für das Vorkommen des ATC-Polymorphismus: die Allelfrequenz bei den Frauen mit habituellen Aborten lag bei 21,7%, während sie bei den fertilen Kontrollen nur 11,4% betrug (Männer: 17,5%). Die Analyse der Genotypen-Frequenzen zeigte ebenso zwar nicht signifikante, dennoch auffällige Werte: 13,3% der Frauen mit habituellen Aborten, 8,3% der Männer und 8,6% der fertilen Kontrollen wiesen die homozygote ATC-Variante auf, während die ATC/CTC-Heterozygotie bei Frauen mit Aborten und Männern deutlich häufiger und die homozygote CTC-Form in den beiden Gruppen deutlich seltener war als bei den fertilen Kontrollen. Diese Ergebnisse gewinnen noch an Bedeutung, wenn man das Hardy-Weinberg-Gesetz überprüft: hiernach sollten in der Gruppe der Frauen mit Aborten lediglich 4,7% und in der Gruppe der Männer lediglich 3,1% homozygot für ATC sein, die Unterschiede sind signifikant. Unklar bleibt aber, warum auch die fertilen Kontrollen mit den tatsächlichen Genotypen-Frequenzen nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegen (s. Tab. 33); womöglich spielt hier wiederum die zu kleine Kollektivgröße eine Rolle. Die Betrachtung der Paarkonstellationen ergab keine statistischen Signifikanzen i. S. einer überzufällig häufigen Paarung von ATC-Homozygoten. Träfe das oben beschriebene Hardy-Weinberg-Ungleichgewicht nur auf Frauen und Männer zu, so könnte man eher einen kausalen Zusammenhang zwischen ATC-Homozygotie und Abortrisiko herstellen; angesichts der hier vorliegenden Daten ist ein behutsamer Umgang mit Interpretationen angezeigt.

Das Triplet ATC führt zum Einbau von Isoleucin statt Leucin; beide Aminosäuren zählen zu den verzweigtkettigen und essentiellen Aminosäuren und sind Konstitutionsisomere. Letztere zeigen aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Strukturen Unterschiede in chemischen und physikalischen Eigenschaften wie z.B. der Reaktivität. Das heißt, dass ein Protein, welches Isoleucin enthält, sich in seinem organischen Milieu anders verhält als ein Protein, welches Leucin enthält. Konkret könnte dies bedeuten, dass ein derartig verändertes HLA-G-Molekül mit Isoleucin im Bereich der α_2 -Domäne (die von Exon 3 codiert wird) sich evtl. seinen Bindungspartnern gegenüber anders verhält als die Leucin-Form, was wiederum mit einer Verminderung der protektiven Wirkung des HLA-G-Moleküls am fetomaternalen Übergang einhergehen könnte – vielleicht auch dann, wenn die veränderte Aminosäure selbst nicht im Bindungsbereich des Proteins liegt. Bei diesen Überlegungen handelt es sich bisher jedoch nur

um theoretische Erklärungsansätze, die durch weitere entsprechende Untersuchungen bestätigt oder widerlegt werden müssen. In der bis heute zum Thema HLA-G und habitueller Abort veröffentlichten Literatur finden sich noch keine entsprechenden Ergebnisse.

Ob auch ein Polymorphismus mit der Folge eines synonymen Basenaustausches Einfluss auf das spätere Protein haben könnte, ist unklar, erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen für die entsprechenden Positionen (P. 35, P. 57, P. 93 und P. 107) keine wesentlichen Auffälligkeiten; lediglich bei den Männern ist an den Positionen P. 57 und P. 93 jeweils der seltenere homozygote Genotyp (CCA/CCA bzw. CAT/CAT) häufiger als bei den Frauen und den fertilen Kontrollen und liegt zudem nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Eine Bedeutung kann diesen Ergebnissen nach aktuellem Wissensstand nicht beigemessen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Dieser Arbeit zugrunde gelegt wurde die Annahme, dass angesichts der wahrscheinlichen und zum Teil bereits wissenschaftlich nachgewiesenen Funktionen des Zelloberflächenmoleküls HLA-G im Rahmen der Akzeptanz des semiallogenen Feten durch seine Mutter Veränderungen auf der genetischen Ebene, sprich Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) von HLA-G Einfluss auf den Verlauf einer Schwangerschaft nehmen können, sei es durch eine veränderte Konzentration oder eine dysfunktionale Struktur des Moleküls auf den fetalen Zellen der Plazenta. Einige Studiengruppen haben sich in den letzten Jahren mit ähnlichen Fragestellungen beschäftigt, doch bisher besteht kein Konsens darüber, inwieweit ein Zusammenhang zwischen HLA-G-Polymorphismen und der Schwangerschaftserkrankung der habituellen Aborte besteht. Es zeigen sich einige Tendenzen hin zu vereinzelt Polymorphismen und entsprechenden Haplotypen im mütterlichen und väterlichen HLA-G-Gen, die offenbar ein erhöhtes Risiko für Aborte mit sich bringen.

Das Augenmerk lag in dieser Arbeit auf drei codierenden Regionen des HLA-G-Gens, den Exons 2, 3 und 8. Die ersten beiden werden in Fachkreisen als funktionelle Einheit betrachtet und weisen an bisher neun definierten Positionen Polymorphismen auf, von denen jedoch nur drei zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen. Die beiden Varianten von Exon 8 unterscheiden sich durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines 14 Basenpaare langen Abschnittes, wobei einige Studien darauf hinweisen, dass die Insertion des Abschnittes mit einem erhöhten Risiko für Aborte verbunden ist. Exon 2 und 3 wurden für die Untersuchungen amplifiziert und sequenziert, für die Differenzierung der zwei Formen von Exon 8 reichten Amplifikation und Auftrennung per Gel-Elektrophorese aus.

Eindeutige Erkenntnisse hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs zwischen bestimmten HLA-G-Polymorphismen in Exon 2, 3 oder 8 können zu diesem Zeitpunkt nicht formuliert werden. Dennoch fanden sich in den durchgeführten Untersuchungen einige Auffälligkeiten, die durch weitere Experimente mit größeren Testgruppen verifiziert werden müssen. Dazu zählen das in Kombination mit habituellen Aborten signifikant vermehrte Auftreten des Insertions-homozygoten Genotypes für Exon 8 bei den Männern und die in allen Untersuchungsgruppen sehr auffällige Häufigkeit des ATC-Polymorphismus an Position 110 von Exon 3, welcher mit dem nicht-synonymen Basenaustausch Leucin zu Isoleucin und damit einer veränderten Proteinstruktur einhergeht (s.o.).

7 ANHANG

7.1 MATERIALIEN, GERÄTE UND STAMMLÖSUNGEN

Verwendete Materialien	Firma
<i>6x Sample Loading Buffer</i>	Beckman Coulter
<i>AE-Puffer</i>	Quiagen Inc.
Agarose	Biozym
<i>AL-Puffer</i>	Quiagen Inc.
<i>AW1-Puffer</i>	Quiagen Inc.
<i>AW2-Puffer</i>	Quiagen Inc.
Bromphenol Blau	Sigma Genosys
<i>CEQ Separation Buffer</i>	Beckman Coulter
ddH ₂ O / <i>Ampuwa</i>	Fresenius Kabi
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	GE Healthcare
<i>DTCS Quick Start Master Mix</i>	Beckman Coulter
EDTA-Lösung	Sigma Genosys
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma Genosys
Ficoll	Sigma Genosys
<i>Genome Lab™ Separation Gel LPA I</i>	Beckman Coulter
KCl	Sigma Genosys
MgCl ₂	Sigma Genosys
Mineral Oil	Beckman Coulter
NaCl	Sigma Genosys
Oligonukleotidprimer	GE Healthcare
Oligonukleotidprimer	Sigma Genosys
<i>Qiagen Protease</i>	Quiagen Inc.
<i>QiAmp® DNA Mini Kit</i>	Quiagen Inc.
rTaq-DNA-Polymerase	GE Healthcare
<i>Sample Loading Solution</i>	Beckman Coulter
<i>Sigma PCR Low Ladder Set</i>	Sigma Genosys
TAE-Puffer	Gibco BRL
Taq-Polymerase	GE Healthcare
Tris-HCl	Sigma Genosys
Xylene Cyanol FF	Sigma Genosys

Verwendete Geräte	Firma
Flachbett-Elektrophoresegelkammer	Biozym
Inkubator <i>Techne DRI-Block DB 2A</i>	Barloworld Scientific
<i>MicroSpin Columns-Kits</i>	GE Healthcare
Pipetten und Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)	Eppendorf
<i>QIAmp Spin Columns</i>	Quiagen Inc.
Sequenzierer <i>CEQ 2000 XL DNA Analysis System</i>	Beckman Coulter
Spannungsquelle	Pharmacia Biotech
Thermozykler <i>GeneAmp PCR System 2400</i>	Perkin Elmer
Thermozykler <i>iCycler</i>	Bio-Rad
Tubes 200 µl, 500 µl und 1 ml	Eppendorf
Vakuumzentrifuge <i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf
<i>Vortex Genie 2™</i>	Scientific Industries

Stammlösungen

10x-Reaktionspuffer

500 mM KCl
 15 mM MgCl₂
 100 mM Tris-HCl (pH 9,0 RT)

10x-Blue Juice

12,5 g Ficoll
 0,125 g Bromphenol Blau
 0,125 g Xylen Cyanol
 5 ml 0,5 mM EDTA-Lösung

dNTP-Stammlösung

je 12,5 µl der vier 100 mM dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
 950 µl ddH₂O

Ethanol 70%

700 ml Ethanol

ad 1000 ml ddH₂O

Ethanol 95%

950 ml Ethanol
ad 1000 ml ddH₂O

Einfacher TAE-Puffer

1 Volumen 50-fach-TAE (GibcoBRL) auf 49 Volumen ddH₂O

Ethidiumbromidstammlösung

1 g Ethidiumbromid auf 100 ml ddH₂O

0,5 M EDTA

186,1 g EDTA auf 1000 ml ddH₂O

Agarose-Gel 1%

1 g Agarose auf 100 ml Einfach-TAE-Puffer

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Acevedo CH, Ahmed A** Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is up regulated by progesterone during pregnancy // *Journal of Clinical Investigation*. - 1998. - 101. - pp. 949-955
- Agrawal S, Pandey MK, Mandal S, Mishra L, Agrawal S** Humoral immune response to an allogenic foetus in normal fertile women and recurrent aborters // *BMC Pregnancy and Childbirth*. - 2002. - 2. - p. 6
- Ahmed A, Rahman M, Zhang X, Acevedo CH, Nijjar S, Rushton I, Bussolati B, St John J** Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNF-alpha // *Molecular medicine*. - 2000. - 6. - pp. 391-409
- Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, Schreiber JR, Ober C** HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage // *Mol Hum Reprod*. - 2001. - 7. - pp. 1167-1172
- Allan DSJ, Colonna M, Lanier LL, Churakova TD, Abrams JS, Illis JA, McMichael AJ, Braud VM** Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells // *Journal of Experimental Medicine*. - 1999. - 189. - p. 1149
- Amiot L, Onno M, Drenou B, Monvoisin C, Fauchet R** HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells // *Human Immunology*. - 1998. - 59. - p. 524
- Aoki K** Specific antiphospholipid antibodies as a predictive variable in patients with recurrent pregnancy loss // *Am J Reprod Immunol*. - 1993. - 29. - pp. 82-87
- Applegate LA, Luscher AP, Tyrrel RM** Induction of hemeoxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells // *Cancer Research*. - 1991. - 51. - pp. 974-978
- Audus KL, Soares MJ, Hunt JS** Characteristics of the fetal/maternal interface with potential usefulness in the development of future immunological and pharmacological strategies // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. - 2002. - 301. - pp. 402-409
- Bainbridge D, Ellis S, Le Bouteiller P, Sargent I** HLA-G remains a mystery // *Trends in Immunology*. - 2001. - 22. - pp. 548-552
- Bainbridge D, Ellis S, Sargent I** The short forms of HLA-G are unlikely to play a role in pregnancy because they are not expressed at the cell surface // *Journal of Reproductive Immunology*. - 2000. - 47. - pp. 1-16
- Barber A, Robson SC, Myatt L, Bulmer J, Lyall F** Heme oxygenase expression in human placenta and placental bed: reduced expression of placenta endothelial HO-2 in preeclampsia and fetal growth restriction // *Federation of American Societies for Experimental Biology*. - 2001. - 15. - pp. 1158-1168
- Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM, Vince GS** Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? // *Human Reproduction*. - 2002. - 17. - pp. 2439-2444
- Benjamin R, Parham P** Guilt by association: HLA-B 27 and ankylosing spondylitis // *Immunology today*. - 1990. - 11. - pp. 137-142

- Bianchi D, Shuber AP, DeMaria MA, Fougner AC, Klinger KW** Fetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction // *American Journal of Obstetrics and gynecology*. - 1994. - 171 (4). - pp. 922-926
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC** The foreign antigen binding site and T-cell-recognition regions of class I histocompatibility antigens // *Nature*. - 1987. - 329. - pp. 512-518
- Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE, Le Bouteiller P, Dohr G** Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G // *European Journal of Immunology*. - 1997. - 27. - pp. 3380-3388
- Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE, Le Bouteiller P, Dohr G** Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G // *European Journal of Immunology*. - 1997. - 27. - pp. 3380-3388
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC** Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 // *Nature*. - 1993. - 364. - pp. 33-39
- Bulmer JN, Kurpisz M, Fernandez N (eds)** Immune cells in the decidua / *Immunology of human reproduction* // Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd.. - 1995
- Bussen SS, Steck T** Thyroid antibodies and their relation to antithrombin antibodies, anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant in women with recurrent spontaneous abortions // *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. - 1997. - 74. - pp. 139-143
- Campbell RD, Trowsdale J** Map of the human MHC // *Immunology today*. - 1993. - 14. - pp. 349-352
- Carbone J, Gallego A, Lanio N, Navarro J, Orera M, Aguaron A, Fernandez-Cruz E, Sarmiento E** Quantitative abnormalities of peripheral blood distinct T, B and natural killer cell subsets and clinical findings in obstetric antiphospholipid syndrome // *J Rheumatol*. - 2009. - 36. - pp. 1217-1225
- Castro MJ, Morales P, Rojo-Amigo R, Martinez-Laso J, Allende L, Varela P, Garcia-Berciano M, Guillen-Perales J, Arnaiz-Villena A** Homozygous HLA-G *0105N healthy individuals indicate that membrane-anchored HLA-G1 molecule is not necessary for survival // *Tissue Antigens*. - 2000. - 56. - pp. 232-329
- Chaoat G, Kolg JP, Wegmann TG** The murine placenta as an immunological barrier between the mother and the fetus // *Immunology Review*. - 1983. - 75. - pp. 31-60
- Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J** Th1/Th2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the Th1/Th2 paradigm // *Int Arch Allergy Immunol*. - 2004. - 134. - pp. 93-119
- Chu W, Fant ME, Geraghty DE, Hunt JS** Soluble HLA-G in human placentas: synthesis in trophoblasts and interferon-gamma-activated macrophages but not placental fibroblasts // *Human Immunology*. - 1998. - 59. - pp. 435-442
- Clark DA, Arck PC, Chaouat G** Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1999. - 41 (1). - pp. 5-22

- Clifford K, Flanagan AM, Regan L** Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study // *Human Reproduction*. - 1999. - 14. - pp. 2727-2730
- Cocksedge KA, Li TC, Saravelos SH, Metwally M** A reappraisal of the role of polycystic ovary syndrome in recurrent miscarriage // *Reprod Biomed Online*. - 2008. - 17. - pp. 151-160
- Colonna M, Nakajima H, Cella M** Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells // *Journal of Leukocyte Biology*. - 1999. - 66. - pp. 718-722
- Daher S, Fonseca F, Mattar R, Musatti CC, de Lima MG** Inhibitory serum factor of lymphoproliferative response to allogeneic cells in pregnancy // *Revista paulista de medicina*. - 1997. - 115. - pp. 1485-1489
- Dausset J** Iso-leuco-anticorps // *Acta Haematologica*. - 1958. - 20. - pp. 156-166
- Dausset J** Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion // *Vox Sanguinis*. - 1954. - 4. - pp. 190-198
- Davis DM, Reyburn HT, Pazmany L, Chiu I, Mandelboim O, Strominger JL** Impaired spontaneous endocytosis of HLA-G // *European Journal of Immunology*. - 1997. - 27. - pp. 2714-2719
- Dorling A, Monk N, Lechler R** HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells // *European Journal of Immunology*. - 2000. - 30. - pp. 586-593
- Dye JF, Jablenska R, Donnelly JL, Lawrence L, Leach L, Clark P, Firth JA** Phenotype of the endothelium in the human term placenta // *Placenta*. - 2001. - 22. - pp. 32-43
- Dye JF, Jablenska R, Donnelly JL, Lawrence L, Leach L, Clark P, Firth JA** Phenotype of the endothelium in the human term placenta // *Placenta*. - 2001. - 22. - pp. 32-43
- Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF et al.** Early embryonic mortality in women // *Fertility and Sterility*. - 1982. - 38. - pp. 447-453
- Emanuelli M, Cecati M, Sartini D, Stortoni P, Corradetti A, Giannubilo S, Turi A, Tranquilli A** Placental Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein (AHSP) and recurrent miscarriage // *Cell Stress Chaperones*. - 2008. - 14. - pp. 193-197
- Emmer PM, Nelen WL, Steegers, EA, Hendricks JC, Veerhoek M, Joosten I** Peripheral natural killer cytotoxicity and CD56(pos) CD16(pos) cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion // *Hum Reprod*. - 2000. - 15. - pp. 1163-1169
- Empson M, Lassere M, Craig JC, Scott JR** Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: a systemic review of therapeutic trials // *Obstet Gynecol*. - 2002. - 99. - pp. 135-144
- Eroglu GE, Scopelitis E** Antiphospholipid antibodies in healthy women with recurrent spontaneous abortions // *American Journal of Reproduction and Immunology*. - 1996. - 4. - pp. 4008-4014
- Fallon PG, Jolin HE, Smith P, Emson CL, Townsend MJ, Fallon R, Smith P, McKenzie AN** IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9 and IL-13 // *Immunity*. - 2002. - 17. - pp. 7-17
- Feng I, Gell L, Zhou DA** Molecular mechanism of AHSP mediated stabilization of alpha-hemoglobin // *Cell*. - 2004. - 119. - pp. 629-640

- Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, Bensussan A, Le Bouteiller P** Soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8 cells by interacting with CD8 // *Journal of Immunology*. - 2000. - 164. - p. 6100
- Fournel S, Huc X, Aguerre-Girr M, Solier C, Legros M, Praud-Brethenou C, Moussa M, Chaouat G, Berrebi A, Bensussan A, Lenfant F, Le Bouteiller P** Comparative reactivity of different GLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules // *Tissue Antigens*. - 2000b. - 55. - pp. 510-518
- Frankenne F, Rentier-Delrue F, Scippo ML, Martial J, Hennen G** Expression of the growth hormone variant gene in human placenta // *Journal of Clinical Endocrinology*. - 1987. - 64. - pp. 635-637
- Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE** A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4 // *Journal of Immunology*. - 1994. - 153. - pp. 5516-5524
- Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A, Baricordi OR** HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy // *European Journal of Immunology*. - 2002. - 32. - pp. 311-315
- Geraghty DE, Koller BH, Orr HT** A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. - 1987. - 84. - pp. 9145-9149
- Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C, Hanoch J, Yagel S** HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: a lesson learned from ectopic pregnancies // *Molecular Human Reproduction*. - 2000. - 6. - pp. 534-540
- Gonen-Gross T, Achdout H, Arnon TI, Gazit R, Stern N, Horejsi V, Goldman-Wohl D et al.** The CD85J/leukocyte inhibitory receptor-1 distinguishes between conformed and beta2-microglobulin-free HLA-G molecules // *Journal of Immunology*. - 2005. - 175. - pp. 4866-4874
- Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R** Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? // *Am J Reprod Immun*. - 2006. - 56. - pp. 230-236
- Gorer PA** The detection of antigenetic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera // *British Journal of Experimental Pathology*. - 1936. - 17. - pp. 42-50
- Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC et al.** Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results // *Human Reproduction Update*. - 2001. - 7. - pp. 161-174
- Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC, Bontis JN, Devroey P** Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results // *Hum Reprod Update*. - 2001. - 7. - pp. 161-174
- Hammer A, Blaschitz A, Daxbock C, Walcher W, Dohr G** Fas and Fas-ligand are expressed in the uteroplacental unit of first-trimester pregnancy // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1999. - 41. - pp. 41-51
- Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wanger E, Dougherty Balkundi D, Padbury J, Sharma S** Gestational age dependent expression of IL 10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts // *J Immunol*. - 2000. - 164. - pp. 7721-7728
- Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB, Cooper DW** A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene // *Hum Mol Genet*. - 1993. - 2. - p. 2200

- Hayakawa S, Nagai N, Kanaeda T, Karasaki-Suzuki M, Ishii M, Chishima F, Satoh K** Interleukin-12 augments cytolytic activity of peripheral and decidual lymphocytes against choriocarcinoma cell lines and primary culture human placental trophoblasts // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1999. - 41. - pp. 320-329
- Heffner LJ** Advanced maternal age - how old is too old? // *New England Journal of Medicine*. - 2004. - 351. - pp. 1927-1929
- Hennen G, Frankenne F, Closset J, Gomez F, Pirens G, Khayat N** A human placental GH: increasing levels during second half of pregnancy with pituitary GH suppression as revealed by monoclonal antibody radioimmunoassays // *International Journal of Immunology*. - 1985. - 30. - pp. 27-33
- Hiby S, King A, Sharkey A, Loke Y** Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo // *Tissue Antigens*. - 1999. - 53. - pp. 1-13
- Hill AVS, Elvin J, Willis AC, Aidoo M et al.** Molecular analysis of the association of HLA-B 53 and resistance to severe malaria // *Nature*. - 1992. - 360. - pp. 434-439
- Hill AVS** The immunogenetics of human infectious diseases // *Annual Review of Immunology*. - 1998. - 16. - pp. 593-617
- Hinney B** Habituelle Abortneigung (Review) // *Der Gynäkologe*. - 2007a. - Vol. 2. - pp. 114-115
- Hirahara F, Andoh N, Sawai K et al.** Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials // *Fertility and Sterility*. - 1998. - 70. - pp. 246-252
- Hunt JS, Hsi BL, King CR, Fishback JL** Detection of class I MHC mRNA in subpopulations of first trimester cytotrophoblast cells by in situ hybridization // *Journal of Reproductive Immunology*. - 1991. - 19. - pp. 315-331
- Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C** HLA-G and immune tolerance in pregnancy // *FASEB Journal*. - 2005. - 19. - pp. 681-693
- Hunt JS, Petroff MG, Morales P, Sedlmayr P, Geraghty DE, Ober C** HLA-G in Reproduction: Studies on the Maternal-Fetal Interface // *Human Immunology*. - 2000. - 61. - pp. 1113-1117
- Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L** Flas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus // *Journal of Immunology*. - 1997. - 158. - pp. 4122-4128
- Hutter H, Blaschitz A, Gauster M, Hofmeister V, Weiss E, Dohr G** Expression analysis of human leukocyte antigen-G isoforms HLA-G1 and HLA-G2 on human transfected cells // *Placenta*. - 2002. - 23. - p. A.26
- Hviid TV** HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications // *Hum Reprod Update*. - 2006. - 12. - pp. 209-232
- Hviid TV, Hylenius S, Hogh AM, Kruse C, Christiansen OB** HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions // *Tissue Antigens*. - 2002. - 60. - pp. 122-132
- Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, Christiansen OB** Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome // *Tissue Antigens*. - 2004a. - 64. - pp. 66-69
- Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG** HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels // *Immunogenetics*. - 2003. - 55. - pp. 63-79

- Hviid TV, Meldgaard M, Sorensen S, Morling N** Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene // *J Reprod Immunol.* - 1997. - 35. - pp. 31-42
- Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR** HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms // *Immunogenetics.* - 2004b. - 56. - pp. 135-141
- Hviid TV, Sorensen S, Morling N** Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promotor region, and exon 1 of the HLA-G gene // *Hum Immunol.* - 1999. - 60. - pp. 1237-1244
- Ishitani A, Geraghty DE** Alternative Splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* - 1992. - 89. - pp. 3947-3951
- Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, Geraghty DE** Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F and G in maternal-placental immune recognition // *J Immunol.* - 2003. - 171. - pp. 1376-1384
- Ito K, Tanaka T, Tsutsumi N, Obata F, Kashiwagi N** Possible mechanisms of immunotherapy for maintaining pregnancy in recurrent spontaneous aborters: analysis of antiidiotypic antibodies directed against autologous T-cell receptors // *Human Reproduction.* - 1999. - 14. - pp. 650-6555
- Jablonska B, Palfi M, Enerudh J, Kjellberg S, Selbing A** Blocking antibodies in blood from patients with recurrent spontaneous abortion in relation to pregnancy outcome and intravenous immunoglobulin treatment // *American Journal of Reproductive Immunology.* - 2001. - 45. - pp. 226-231
- Jakubowicz DJ, Luorno MJ, Jakubowicz S et al.** Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome // *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism.* - 2002. - 87. - pp. 524-529
- Jones CA, Holloway JA, Warner JO** Phenotype of fetal monocytes and B lymphocytes during the third trimester of pregnancy // *Journal of Reproductive Immunology.* - 2002. - 56 (1-2). - pp. 45-60
- Juriscova A, Casper RF, MacLusky NJ, Librach CL** Embryonic human leukocyte antigen-G expression: possible implications for human preimplantation development // *Fertility and Sterility.* - 1996. - 65. - pp. 997-2002
- Kam EP, Gardner L, Loke YW, King A** The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries // *Human Reproduction.* - 1999. - 14. - pp. 2131-2138
- Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Miki A, Yamashita T, Hyodo H, Unno N, Yoshida S, Taketani Y** A subclass of soluble HLA-G1 modulates the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua additively to membrane-bound HLA-G1 // *J Reprod Immunol.* - 2003. - 60. - pp. 85-96
- Kanai T, Fujii T, Unno N, Yamashita T, Hyodo H, Miki A, Hamai Y, Kozuma S, Taketani Y** Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood // *Am J Reprod Immunol.* - 2001b. - 45. - pp. 94-99
- Kanai T, Fujii T, Unno N, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, Taketani Y** Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogenic peripheral blood mononuclear cells in culture // *Mol Hum Reprod.* - 2001a. - 7. - pp. 195-200

- Kapasi K, Albert SE, Yie S, Zavazava N, Librach CL** HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response // *Immunology*. - 2000. - 101. - pp. 191-200
- King A, Allan D, Bowen M, Powis S, Joseph S, Verma S, Hiby S, McMichael A, Loke Y, Braud V** HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells // *European Journal of Immunology*. - 2000a. - 30. - pp. 1623-1631
- King A, Burrows T, Hiby S, Bowen J, Joseph S, Lim P, Gardner L, Le Bouteiller P, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B, Loke Y** Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast // *Placenta*. - 2000b. - 21. - pp. 376-387
- Kirszenbaum M, Djoulah S, Hors J, Prost S, Dausset J, Carosella ED** Polymorphism of HLA-G gene and protein // *J Reprod Immunol*. - 1999. - 43. - pp. 105-109
- Klein J, Sato A** The HLA system: first of two parts // *New England Journal for Medicine*. - 2000. - 343. - pp. 702-709
- Kokawa K, Shikone T, Nakano R** Apoptosis in human chorionic villi and deciduas during normal embryonic development and spontaneous abortion in first trimester // *Placenta*. - 1998. - 19. - pp. 21-26
- Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ** Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential // *J Exp Med*. - 2003. - 198. - pp. 1201-1212
- Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R** A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts // *Science*. - 1990. - 248. - pp. 220-223
- Kwak JY** Autoantibodies in women with primary recurrent spontaneous abortion of unknown etiology // *J Reprod Immunol*. - 1992. - 22. - pp. 15-31
- Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE** Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+ and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent spontaneous abortions // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1995. - 34. - pp. 93-99
- Le Bouteiller P, Blaschitz A** The functionality of HLA-G is emerging // *Immunology Review*. - 1999. - 167. - pp. 233-244
- Le Bouteiller P** Commentary: Major breakthrough in the HLA-G debate: occurrence of pregnancy in human depends on the HLA-G status of preimplantation embryos // *European Journal of Immunology*. - 2002. - 32. - pp. 309-310
- Le Bouteiller P, Legrand-Abrevanel F, Solier C** Soluble HLA-G1 at the Materno-foetal Interface - A Review // *Placenta*. - 2003. - 24. - pp. S10-S15
- Le Bouteiller P, Solier C, Pröll J, Aguerre-Girr M, Fournel S, Lenfant F** Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? // *Human Reproduction Update*. - 1999. - 5. - pp. 223-233
- Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED, Rouas-Freiss N** HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes // *International Immunology*. - 1999. - 11. - p. 1351
- Lea RG, al-Sharekh N, Tulppala M, Critchley HO** The immunolocalization of bcl-2 at the maternal-fetal interface in healthy and failing pregnancies // *Human Reproduction*. - 1997. - 12. - pp. 153-158

- Lea RG, Riley SC, Antipatis C, Hannah L, Ashworth CJ, Clark DA, Critchley HO** Cytokines and the regulation of apoptosis in reproductive tissues: a review // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1999. - 42. - pp. 100-109
- Liddell HS, Pattison NS, Zanderigo A** Recurrent miscarriage - outcome after supportive care in early pregnancy // *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology*. - 1991. - 31. - pp. 320-322
- Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED** Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4 T cells suppresses the alloproliferative response: A CD4 T cell regulatory mechanism // *Proceedings in the National Academy of Sciences*. - 2001. - 98. - pp. 12150-12155
- Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass, K, Chun SH, Fisher SJ** Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia // *American Journal of Pathology*. - 1997. - 151. - pp. 1809-1818
- Lindquist S, Craig SA** The heat-shock proteins // *Annual Review of Genetics*. - 1988. - 22. - pp. 631-677
- Little AM, Stern PL** Does HLA type predispose some individuals to cancer? // *Molecular Medicine Today*. - 1999. - 5. - pp. 337-342
- Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS** Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications // *Blood* 1. - 1996. - 88 (11). - pp. 4390-4395
- Long EO** Regulation of immune responses through inhibitory receptors // *Annual Review of Immunology*. - 1999. - 17. - p. 875
- Maejima M, Fujii T, Kozuma S, Okai T, Shibata Y, Taketani Y** Presence of HLA-G-expressing cells modulate s the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines // *Am J Reprod Immunol*. - 1997. - 38. - pp. 79-82
- Maines MD, Mayer RD, Ewig JF, Mc Coubrey WKJ** Induction of a kidney heme-oxygenase 1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP 32 // *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. - 1993. - 264. - pp. 457-462
- Mallet V, Blaschitz A, Crisa L, Schmitt C, Fournel S, King A et al.** HLA-G in the human thymus: a subpopulation of meduallary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein // *International Immunology*. - 1999. - 11. - pp. 889-898
- Mallet V, Pröll J, Solier C, Aguerre-Girr M, DeRossi M, Loke Y, Lenfant F, Le Bouteiller P** The full length HLA-G1 and no other alternative form of HLA-G is expressed at the cell surface of transfected cells // *Human Immunology*. - 2000. - 61. - pp. 212-224
- Mandelboim O, Pazmany L, Davis DM, Vales-Gomez M, Reyburn HT, Rybalov B, Strominger JL** Multiple receptors for HLA-G on human natural killer cells // *Proceedings in Natural Academics of Sciences*. - 1997. - 94. - pp. 14666-14670
- Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F, Choppin J, Dausset J, Carosella ED, Kirszenbaum M, Guillet J** A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity // *Transplant Proceedings*. - 2001. - 33. - pp. 2355-2359
- McIntire RH, Morales PJ, Petroff MG, Colonna M, Hunt JS** Recombinant HLA-G5 and -G6 drive U937 myelomonocytic cell production of TGF-beta1 // *J Leukoc Biol*. - 2004. - 76. - pp. 1220-1228

- McIntyre JA, Coulam CB, Faulk WP** Recurrent spontaneous abortion // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 1989. - 21. - pp. 100-104
- McMaster MT, Librach C, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R et al.** Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts // *Journal of Immunology*. - 1995. - 134. - pp. 3771-3778
- Medawar PB** Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates // *Symposia of the Society for Experimental Biology*. - 1953. - 7. - pp. 320-338
- Meisser A, Chardonens D, Campana A, Bischof P** Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases // *Mol Hum Reprod*. - 1999. - 5. - pp. 252-260
- Middeldorp S.** Thrombophilia and pregnancy complications: cause or association? // *J Thromb Haemost.* - 2007. - 5. - pp. 276-282
- Mignot E, Hayduk R, Black J, Grumet FC et al.** HLA DQB1 *0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients // *Sleep*. - 1997. - 11. - pp. 1012-1020
- Mignot E, Thorsby E** Narcolepsy and the HLA system // *New England Journal for Medicine*. - 2001. - 344. - p. 692
- Moffett-King A.** Natural killer cells and pregnancy // *Nat Rev Immunol*. - 2002. - 2. - pp. 656-663
- Morales PJ, Race JL, Platt JS, Phillips TA, Morgan K, Fazleabas AT, Hunt JS** Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype // *J Immunol*. - 2003. - 171. - pp. 6215-6224
- Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P** IL-10 selectivity induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes // *International Immunology*. - 1999. - 11. - p. 803
- Mosmann TR, Coffmann RL** Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells // *Advances in Immunology*. - 1989. - 46. - pp. 111-147
- Moss DJ, Khanna R** Major histocompatibility complex: from genes to function // *Trends in Immunology*. - 1999. - 20. - pp. 165-167
- Mullis KB, Faloona FA** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction // *Methods of Enzymology*. - 1987. - 155. - pp. 335-350
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL** Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism // *Science*. - 1998. - 281. - pp. 1191-1193
- Nagata S** Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor // *Advances in Immunology*. - 1994. - 57. - pp. 129-144
- Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A, Baricordi OR** Embryonic soluble HLA-G as a marker of development potential in embryos // *Hum Reprod*. - 2005. - 20. - pp. 138-146
- Ntrivalas EI, Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, Ng SC, Beaman KD, Mantouvalos HP, Beer AE** Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology // *Hum Reprod*. - 2001. - 16. - pp. 855-861

- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M** Maternal age and fetal loss: population based register linkage study // *Br Med J*. - 2000. - 320. - pp. 1708-1712
- O'Callaghan CA, Bell JI** Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G // *Immunology Review*. - 1998. - 163. - pp. 129-138
- Oates-Whitehead RM, Haas DM, Carrier JA** Progesterone for preventing miscarriage // *Cochrane Database for systematic Reviews*. - 2003. - CD003511
- Ober C, Aldrich C, Rosinsky B, Robertson A, Walker MA, Willadsen S, Verp MS, Geraghty DE, Hunt JS** HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival // *Placenta*. - 1998. - 19. - p. 127
- Ober C, Aldrich CL** HLA-G polymorphisms: neutral evolution or novel function? // *Journal of Reproductive Immunology*. - 1997. - 36. - pp. 1-21
- Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, Hyslop T** Variation in the HLA-G promotor region influences miscarriage rates // *Am J Hum Genet*. - 2003. - 72. - pp. 1425-1435
- Ober C, Rosinsky B, Grimsley C, van der Ven K, Robertson A, Runge A** Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A1 // *J Reprod Immunol*. - 1996. - 32. - pp. 111-123
- Odland JO, Sergejeva IV, Ivaneev MD et al.** Seropositivity of cytomegalovirus, parvovirus and rubella in pregnant women an recurrent aborters in Leningrad County, Russia // *Acta obstetricia et gynecologica scandinavica*. - 2001. - 80. - pp. 1025-1029
- Ogasawara M, Shoji K, Kinue K, Tomomi A, Koji A** Are serum progesterone levels predictive of recurrent miscarriage in future pregnancies? // *Fertility and Sterility*. - 1997. - 68. - pp. 806-809
- Pandey MK, Saxena V, Agrawal S** Characterization of mixed lymphocyte reaction blocking antibodies (MLR-Bf) in human pregnancy // *BMC Pregnancy and Childbirth*. - 2003. - 3. - p. 2
- Pangault C, Amiot L, Caulet-Maugendre S, Brasseur F, Burtin F, Guillous V, Drenou B, Fauchet R, Onno M** HLA-G protein expression is not induced during malignant transformation // *Tissue Antigens*. - 1999. - 53. - p. 335
- Park B, Lee S, Kim E, Chang S, Jin M, Ahn K** The truncated cytoplasmic tail of HLA-G serves a quality-control function in post-ER compartments // *Immunity*. - 2001. - 15. - pp. 213-224
- Pazmany L, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Becker TC, Reyburn HT, Seebach JD, Hill JA, Strominger JL** Human leukocyte antigen-G and its recognition by natural killer cells // *Journal of Reproductive Immunology*. - 1999. - 43. - pp. 127-137
- Perricone R, De Carolis C, Giacomelli R, Guarino MD, De Sanctis G, Fontana L** GM-CSF and pregnancy: evidence of significantly reduced blood concentrations in unexplained recurrent abortion efficiently reverted by intravenous immunoglobulin treatment // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2003. - 50. - pp. 232-237
- Petroff MG, Morales P, Sedlmayr P, Hunt JS** Decidual macrophages but not trophoblasts express messenger RNA for ILT2 and ILT4 inhibitory HLA class I receptors // *Annual Meeting of American Association of Immunology*. - 2000. - (Abstract)
- Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, van der Ven H, van der Ven K** The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion // *Mol Hum Reprod*. - 2001. - 7. - pp. 373-378

- Pfeiffer KA, Rebmann V, van der Ven K** Soluble histocompatibility antigen levels in early pregnancy after IVF // *Hum Immunol.* - 2000. - 61. - pp. 559-564
- Piccinni MP, Romagnani S** Regulation of fetal allograft survival by hormone controlled Th1- and Th2-type cytokines // *Immunology Reviews.* - 1996. - 15. - pp. 141-150
- Piccinni MP, Scaletti C, Mavilia C, Lazzeri E, Romagnani P, Natali I, Pellegrini S, Livi C, Romagnani S, Maggi E** Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development // *European Journal of Immunology.* - 2001. - 31. - pp. 2431-2437
- Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ** Aging and innate immune cells // *J Leukoc Biol.* - 2004. - 76. - pp. 291-299
- Pröll J, Bensussan A, Goffin F, Foidart FM, Berrebi A, Le Bouteiller P** Tubal versus uterine placentation: similar HLA-G expressing extravillous cytotrophoblast invasion but different maternal leukocyte recruitment // *Tissue Antigens.* - 2000. - 56. - pp. 479-491
- Prummel MF, Wiersinga WM** Thyroid autoimmunity and miscarriage // *Eur J Endocrinol.* - 2004. - 150. - pp. 751-755
- Puppo F, Costa M, Contini P, Brenci S, Cevasco E, Ghio M, Norelli R, Bensussan A, Capitano G, Indiveri F** Determination of soluble HLA-G and HLA-A, -B and -C molecules in pregnancy // *Transplantation Proceedings.* - 1999. - 31. - pp. 1841-1843
- Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis-Jones DI, Johnson PM, Vince G** Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage // *Human Reproduction.* - 1999. - 14. - pp. 2386-2391
- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R** Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion // *Human Reproduction.* - 2000. - 15. - pp. 713-718
- Raghupathy R.** Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy // *Immunology today.* - 1997. - 18. - pp. 478-482
- Rai R, Regan L** Recurrent miscarriage // *Lancet.* - 2006. - 368. - pp. 601-611
- Rai R, Sacks G, Trew G** Natural killer cells and reproductive failure - theory, practice and prejudice // *Hum Reprod.* - 2005. - 20. - pp. 1123-1126
- Rebmann V, Pfeiffer K, Passler M, Ferrone S, Maier S, Weiss E, Grosse-Wilde H** Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid // *Tissue Antigens.* - 1999. - 53. - pp. 14-22
- Regan L, Braude PR, Hill DP** A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of antipaternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy // *Human Reproduction.* - 1991. - 6. - pp. 294-298
- Reichert T, DeBruyere M, Deneys V, Totterman T, Lydyard P, Yuksel F, Chapel H, Jewell D, Van Hove L, Linden J** Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians // *Clin Immunol Immunopathol.* - 1991. - 60. - pp. 190-208
- Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I** Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis // *Lancet.* - 2003. - 361. - pp. 901-908

- Rieger L, Hofmeister V, Probe C, Dietl J, Weiss EH, Steck T, Kammerer U** Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E // *Mol Hum Reprod.* - 2002. - 8. - pp. 255-261
- Rizzo R, Hviid TV, Stignani M, Balboni A, Grappa MT, Melchiorri L, Baricordi OR** The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs // *Immunogenetics.* - 2005a. - 57. - pp. 172-181
- Keyse SM and Tyrell RM** Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite // *Proceedings of the national Academy of Sciences.* - 1989. - 86. - pp. 99-103
- Robertson SA, Seamark RF, Guilbert LJ, Wegmann TG** The role of cytokines in gestation // *Critical Review in Immunology.* - 1994. - 14. - pp. 239-292
- Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J, Siddiqi TA** Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformations in insulin-dependent diabetes mellitus // *Obstet Gynecol.* - 1994. - 84. - pp. 515-520
- Sageshima N, Ishitani A, Umekage H, Oomura M, Nakanishi M, Geraghty D, Hatake K** The expression of HLA-E, -F and HLA-G, HLA class Ib genes on placenta // *Placenta.* - 2001. - 22. - p. A4
- Saiki LH, Gelfand LH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase // *Science.* - 1988. - 239. - pp. 487-491
- Saito S** Cytokine network at the feto-maternal interface // *Journal of Reproductive Immunology.* - 2000. - 47. - pp. 87-103
- Sakata K, Sakata A, Kong L, Dang H, Talal N** Role of Fas/Fas L interaction in physiology and pathology: the good and the bad // *Clinical Immunology and Immunopathology.* - 1998. - 87. - pp. 1-7
- Salim R, Regan L, Woelfer B et al.** A comparative study of the morphology of congenital uterine anomalies in women with and without a history of recurrent first trimester miscarriage // *Human Reproduction.* - 2003. - 18. - pp. 162-166
- Schagen van Leeuwen JH, Christiaens GC, Hoogenraad TU** Recurrent abortion and the diagnosis of Wilson disease // *Obstetrics and Gynecology.* - 1991. - 78. - pp. 547-549
- Sher G, Kerkintepe L, Batzofin J, Fisch J, Acacio B, Ahlering P, Ginsburg M** Influence of early ISCI-derived embryo sHLA-G expression on pregnancy and implantation rates: a prospective study // *Hum Reprod.* - 2005. - 20. - pp. 1359-1363
- Sher G, Keskintepe L, Nouriani M, Roussev R, Batzofin J** Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of "emryo competency" and IVF outcome // *Reprod Biomed Online.* - 2004. - 9. - pp. 74-78
- Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai L, Kurimoto E, Kato K et al.** Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d) // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* - 2006. - 103. - pp. 16412-16417
- Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, Allan DS et al.** Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* - 2003. - 100. - pp. 8856-8861

- Shukla H, Swaroop A, Srivastava R, Weissman SM** The mRNA of human class I genes HLA-G/HLA 6.0 exhibits a restricted pattern of expression // *Nucleic Acids Research*. - 1990. - 18. - p. 2189
- Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A et al.** Ankylosing spondylitis: an overview // *Annals of the Rheumatic Diseases*. - 2002. - 61 (Supl III). - pp. iii8-iii18
- Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO** Autoimmune diseases: the failure of self tolerance // *Science*. - 1990. - 248. - pp. 1380-1388
- Smith SC, Baker PN, Symonds EM** Placental apoptosis in normal human pregnancy // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. - 1997. - 177. - pp. 57-65
- Solier C, Mallet V, Lenfant F, Bertrand A, Huchenaq A, Le Bouteiller P** HLA-G unique promoter region: functional implications // *Immunogenetics*. - 2001. - 53. - pp. 617-625
- Steck T, Bussen S, Marzusch K** Strategien zur Abortprophylaxe bei einer Vorgeschichte mit wiederholten Aborten. I: Epidemiologie, genetische und anatomische Abortursachen // *Fertilität*. - 1997. - 13. - pp. 7-16
- Steck T, Bussen S, Marzusch K** Strategien zur Abortprophylaxe bei einer Vorgeschichte mit wiederholten Aborten. II: Infektionen, metabolische und endokrine Störungen, Schadstoffe und Gerinnungsdefekte // *Fertilität*. - 1997. - 13. - pp. 17-26
- Steinborn A, Rebmann V, Scharf A, Sohn C, Grosse-Wilde H** Placental abruption is associated with decreased maternal plasma levels of soluble HLA-G // *J Clin Immunol*. - 2003. - 23. - pp. 307-314
- Stirrat GM** Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes and management // *Lancet*. - 336. - pp. 728-733
- Subrt I, Ulvova-Gallova Z, Bibkova K, Micanova Z, Hejnalova M, Cerna M, Hradecky L, Novotny Z** Recurrent pregnancy loss and frequency of eight antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in Czech women // *Am J Reprod Immun*. - 2008. - 59. - pp. 193-200
- Svensson L, Arvola M, Sallstrom MA, Holmdahl R, Mattsson R** The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice // *Journal of Reproductive Immunology*. - 2001. - 51. - pp. 3-7
- Szekeres-Bartho J, Szekeres G, Debre P, Autran B, Chaouat G** Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody // *Cellular Immunology*. - 1990. - 125. - pp. 273-283
- Szekeres-Bartho J, Wegmann TG** A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance // *Journal of Reproductive Immunology*. - 1996. - 31. - p. 81
- Tamura M, Takakuwa K, Arakawa M, Yasuda M, Kazama Y, Tanaka K** Relationship between MLR blocking antibodies and the outcome of the third pregnancy in patients with two consecutive spontaneous abortions // *Journal of Perinatal Medicine*. - 1998. - 26. - pp. 49-53
- Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS** TNF-alpha and IL-1 alpha induce heme-oxygenase-1 via protein kinase C, Ca²⁺ and phospholipase A2 in endothelial cells // *American Journal of Physiology*. - 1999. - 276. - pp. 1493-1501
- Trundley A, Moffett A** Human uterine leukocytes and pregnancy // *Tissue Antigens*. - 2004. - 63. - pp. 1-12

- Urosevic M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R** HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas // *Blood*. - 2002. - 99. - pp. 609-617
- Urosevic M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R** HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas // *Blood*. - 2002. - 99. - pp. 609-617
- Van der Ven K, Pfeiffer K, Skrablin S** HLA-G polymorphisms and molecule function - questions and more questions - a review // *Placenta*. - 2000. - 21 (Suppl. A). - pp. 86-92
- Voigt R, Axt-Fliedner R, Diedrich KSE** Chromosomale Ursachen habitueller Aborte // *Gynäkologische Endokrinologie*. - 2005. - 2. - pp. 40-44
- Wang YP, Yu YH** Expression of endogenous heme oxygenase on surface of placental trophoblasts of pregnant women with intrauterine growth retardation of the fetus // *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. - 2002. - 22. - pp. 637-639
- Warren JE, Silver RM** Genetics of pregnancy loss // *Clin Obstet Gynecol*. - 2008. - 51. - pp. 84-95
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? // *Immunol Today*. - 1993. - 14. - pp. 353-356
- Wegmann TG** Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion // *Immunology letters*. - 1988. - 17. - p. 297
- Wieacker P, Hehr U, Gromoll J, Ludwig M** Empfehlungen zur genetischen Diagnostik bei Aborten // *J Reproduktionsmed Endokrinol*. - 2005. - 2. - pp. 148-150
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC** Incidence of early loss of pregnancy // *N Engl J Med*. - 1988. - 319. - pp. 189-194
- Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H** Pre-conceptual natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype // *Am J Reprod Immunol*. - 2003. - 50. - pp. 351-354
- Yamashita T, Fujii T, Tokunaga K, Tadokoro K, Hamai Y, Miki A, Kozuma S, Juji T, Taketani Y** Analysis of human leukocyte antigen-G polymorphism including intron 4 in Japanese couples with habitual abortion // *Am J Reprod Immunol*. - 1999. - 41. - pp. 159-163
- Yan WH, Fan LA** Residues Met76 and Gln79 in HLA-G alpha1 domain involve in KIR2DL4 recognition // *Cell Research*. - 2005. - 15. - pp. 176-182
- Yang KM, Ntrivalas E, Choi HJ, Kim NY, Beaman K, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J** Women with multiple implantation failures and recurrent pregnancy losses have increased peripheral blood T cell activation // *Am J Reprod Immunol*. - 2010. - 63. - pp. 173-180
- Yang Y, Chu W, Geraghty DE, Hunt JS** Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma // *Journal of Immunology*. - 1996. - 156. - pp. 4224-4231
- Yie SM, Balakier H, Motamedi G, Librach CL** Secretion of human leukocyte antigen-G by human embryos is associated with a higher in vitro fertilization pregnancy rate // *Fertil Steril*. - 2005. - 83. - pp. 30-36

Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts // *Placenta*. - 1994. - 15. - pp. 819-835

Zenclussen AC, Fest S, Busse P, Joachim R, Klapp BF, Arck PC Questioning the Th1/Th2 paradigm in reproduction: peripheral levels of IL-12 are down-regulated in miscarriage patients // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2002. - 48. - pp. 245-251

Zenclussen AC, Joachim R, Hagen E, Peiser C, Klapp BF, Arck PC Heme oxygenase is downregulated in stress-triggered and IL-12 mediated murine abortion // *Scandinavian Journal of Immunology*. - 2002. - 55. - pp. 560-569

Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, Klapp BF, Arck PC Heme Oxygenases In Pregnancy II: HO-2 is Downregulated in Human Pathological Pregnancies // *American Journal of Reproductive Immunology*. - 2003. - 50. - pp. 66-76

Zeng F, Schultz RM RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo // *Dev Biol*. - 2005. - 283. - pp. 40-57

Zhou Y, Damsky C, Fisher S Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype // *Journal of Clinical Investigation*. - 1997. - 99. - pp. 2152-2164

9 DANKSAGUNG

Ich danke meiner Mutter dafür, dass sie einfach immer da gewesen ist; meinem Vater dafür, dass er mir sachverständig den Rücken stärkte; meinen Geschwistern Lisa, Robert und Martin dafür, dass sie mich emotional durch alle Hochs und Tiefs begleiteten.

Ich danke der MTA Christina Drengner für ihr unglaubliches Engagement, ihre Ausdauer und ihre liebenswürdige Fröhlichkeit.

Ich danke Herrn Dr. Fimmers für seine kompetente Hilfe in allen statistischen Dingen.

Schließlich danke ich Frau Professor van der Ven dafür, dass sie mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.