

Aus dem
Center for Cardiovascular Research / Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Charité Mitte

DISSERTATION

Einfluss des mütterlichen Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)
Insertion / Deletion Polymorphismus
auf Blutdruck und Proteinurie während der Schwangerschaft

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Andreas Sohn
aus Chemnitz

Gutachter/in:

1. Priv.-Doz. Dr. med. T. Pfab

2. Prof. Dr. M. Tepel

3. Priv.-Doz. Dr. J. Raila

Datum der Promotion:

05.06.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	6
1.1	Bluthochdruck in der Schwangerschaft	6
1.1.1	Chronische Hypertonie	6
1.1.2	Gestationshypertonus	7
1.1.3	Präeklampsie / Eklampsie	7
1.1.4	Präeklampsie, die auf einen vorbestehenden chronischen Hypertonus aufgepfropft ist	8
1.1.5	Pathogenese der Präeklampsie	8
1.1.6	Genetische Ursachen der Präeklampsie	11
1.2	Das Renin-Angiotensin-System	12
1.2.1	Überblick über das Renin-Angiotensin-System	12
1.2.2	Das Renin-Angiotensin-System in der Schwangerschaft	14
1.2.3	Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)	15
1.2.4	Der ACE Insertion / Deletion Polymorphismus	17
1.3	Aufgabenstellung	18
2	Materialien und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Geräte	19
2.1.2	Chemikalien	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Die Probandenrekrutierung	21
2.2.2	Die Blutdruckmessung	22
2.2.3	Die Messung der Proteinausscheidung	22
2.2.4	Die DNA-Extrahierung aus Vollblut	23
2.2.5	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.2.5.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.2.5.2	Spezifische PCR für den Angiotensin-Converting-Enzym Insertion/Deletion Polymorphismus	24
2.2.5.3	Gelelektrophorese	26

2.2.5.4	Ethidiumbromidfärbung und Auswertung der PCR	26
2.2.6	Statistik	27
3	Ergebnisse	28
3.1.	Mütterliche und kindliche phänotypische Merkmale	28
3.2.	Häufigkeitsverteilung der Genotypen bei den Müttern	29
3.3.	Der Einfluss des ACE I/D Polymorphismus auf mütterliche und kindliche Merkmale	29
3.3.1	Der mittlere systolische Blutdruck	29
3.3.2	Der mittlere diastolische Blutdruck	30
3.3.3	Gestationshochdruck	31
3.3.4	Eiweißausscheidung	31
3.3.5	Neu aufgetretene Ödeme nach der 20. Schwangerschaftswoche	34
3.3.6	Präeklampsie	35
3.3.7	Mütter mit Gestationshypertonus oder Präeklampsie	35
3.3.8	Geburtsgewicht der Neugeborenen	36
4	Diskussion	37
4.1	Die Bedeutung des ACE I / D Polymorphismus für die Ausprägung von klinischen Symptomen und diagnostischen Markern der Präeklampsie	37
4.2	Vergleich mit bereits publizierten Daten	38
4.3	Mögliche Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Ergebnisse der bisher erfolgten Studien	40
4.4	Die Bedeutung des ACE I / D Polymorphismus für die Entwicklung des kindlichen Geburtsgewichts	42
5	Zusammenfassung	44
6	Literaturverzeichnis	46

7	Anhang	65
	Abkürzungsverzeichnis	65
	Lebenslauf	66
	Veröffentlichung	67
	Danksagung	68
	Eidesstattliche Erklärung	69

1. Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

1.1 Bluthochdruck in der Schwangerschaft

Bluthochdruck ist definiert als eine systolische Druckerhöhung im großen Blutkreislauf über 140 mmHg und / oder eine diastolische Druckerhöhung über 90 mmHg.

Während einer unkomplizierten Schwangerschaft fällt der Blutdruck kontinuierlich in gewissen Grenzen ab und steigt im Verlauf dann wieder etwas an.

6 – 8 % der Schwangeren erleiden Hypertonieerkrankungen, welche somit häufige Erkrankungen während der Schwangerschaft sind [Galao 2004]. Schwangerschaftsbluthochdruck ist eine Hauptursache für mütterliche Morbidität und Mortalität. In den USA ist er mit fast 15 % die zweithäufigste Ursache für Muttersterblichkeit. Hypertonieerkrankte, schwangere Frauen haben ein hohes Risiko für potentiell tödliche Komplikationen, wie zum Beispiel akutes Nierenversagen, Leberversagen, zerebrale Blutungen, disseminierte intravasale Gerinnung, Plazentaabritt, Präeklampsie und Eklampsie. Des Weiteren ist die Schwangerschaftshypertonie ein signifikanter Risikofaktor für kindliche Morbidität und Mortalität [American College of Obstetricians and Gynecologists 1996].

Bluthochdruck in der Schwangerschaft wird in folgende Gruppen unterteilt:

- a, chronische Hypertonie,
- b, Gestationshypertonus,
- c, Präeklampsie / Eklampsie und
- d, Präeklampsie, welche auf eine vorbestehende chronische Hypertonie aufgepfropft ist [National High Blood Pressure Education Program Working Group 2000].

1.1.1 Chronische Hypertonie

Als chronische Form der Hypertonie wird angesehen, wenn der Bluthochdruck bereits vor der Schwangerschaft oder in den ersten 20 Schwangerschaftswochen diagnostiziert wurde. Eine Hypertonie welche während der Schwangerschaft erstmals aufgefallen ist und welche post partum auch nach der 12 Woche weiterhin vorhanden ist, wird ebenfalls als chronische Hypertonie klassifiziert.

1.1.2 Gestationshypertonus

Gestationshypertonus steht als Bezeichnung für eine Blutdruckerhöhung welche erstmalig nach der zwanzigsten Schwangerschaftswoche diagnostiziert wurde und nicht mit einer Proteinurie einhergeht. Diese Diagnose beinhaltet sowohl Patientinnen mit Präeklampsie, bei denen sich noch keine Proteinurie manifestiert hat, als auch Patientinnen welche im Verlauf keine Präeklampsie entwickeln, sondern eine reine Hypertonie. Sofern keine Präeklampsiesymptome oder eine Proteinurie aufgetreten sind und der Blutdruck wieder in den Normalbereich abgesunken ist, kann man von einer vorübergehenden Gestationshypertonie sprechen. Bleibt jedoch eine Blutdruckerhöhung bestehen, so hat sich eine chronische Hypertonie entwickelt.

1.1.3 Präeklampsie / Eklampsie

Die Präeklampsie ist eine schwangerschaftsspezifische Erkrankung [Morgan T 1999]. Sie tritt häufig erst nach der zwanzigsten Schwangerschaftswoche auf, selten früher. Sie wird durch einen Blutdruckanstieg auf über 140 mmHg systolisch und / oder über 90 mmHg diastolisch, bei zuvor normotensiven Müttern und dem Auftreten von pathognomonischen Läsionen der renalen Glomerula [Fisher KA 1981], welche sich in Form einer Proteinurie klinisch manifestieren, charakterisiert. Sollte sich eine Proteinurie noch nicht manifestiert haben, so ist die Präeklampsie sehr wahrscheinlich, wenn folgende Symptome auftreten: Kopfschmerzen, Sehstörungen, Bauchschmerzen, niedrige Thrombozytenzahlen oder abnormale Leberenzyme (HELLP-Syndrom).

Noch vor einiger Zeit wurden neu aufgetretene Ödeme als Kriterium angewendet, es gibt jedoch sehr viele unterschiedliche Ursachen für Ödeme in der Schwangerschaft, so dass man diese nicht mehr als Kriterium heranzieht [Helewa 1997, Brown 2000].

Zeitweise wurde die Erhöhung des systolischen Blutdruckes um 30 mmHg und / oder die Erhöhung des diastolischen Blutdruckes um 15 mmHg als Diagnosekriterium angesehen, auch wenn die absoluten Werte unter 140 / 90 mmHg waren. Verschiedene Studien zeigen hierfür keine Unterstützung [North 1999, Levine 2000].

Das klinische Spektrum der Präeklampsie reicht von leichten bis zu sehr schweren, bedrohlichen Formen, bei denen es innerhalb weniger Tage, manchmal Stunden, von

einer leichten zur schweren Form der Präeklampsie, bis hin zur Eklampsie, kommt. Zumeist ist das Fortschreiten der Erkrankung jedoch langsam.

Als Eklampsie wird ein neu auftretendes Anfallsleiden bei Frauen mit Präeklampsie bezeichnet. Zur Pathogenese der Eklampsie gibt es unterschiedliche Hypothesen. Zum einen werden erhöhte Koagulabilität und Fibrinablagerungen diskutiert, zum anderen eine hypertensive Enzephalopathie, obwohl bei Frauen mit Eklampsie eher moderate Hypertonieformen beobachtet werden. Die Vasokonstriktion könnte jedoch selektiv sein. Ultraschalluntersuchungen haben suggeriert, dass bedrohliche zerebrale Vasospasmen auftreten können, obwohl die periphere Vasokonstriktion eher gering ist [Ohno 1997, Belfort 1999]. In Autopsien, welche innerhalb weniger Stunden nach Todeseintritt durchgeführt wurden, fand man verschiedene Schweregrade von Hämorrhagien und Petechien, Gefäßzerstörung und Nekrosen, ischämische Schäden und Mikroinfarkte [Sheehan 1973, Richards 1988] – eventuell Schäden durch eine andauernde Hypertension.

1.1.4 Präeklampsie, die auf einen vorbestehenden, chronischen Hypertonus aufgepfropft ist

Eine Präeklampsie kann sich auch auf einen bereits bestehenden chronischen Hypertonus aufpfropfen. In diesem Fall wird die Prognose für Mutter und Kind, im Vergleich zur Präeklampsie ohne vorbestehenden chronischen Hypertonus, deutlich schlechter. Als Diagnosekriterien gelten ein bereits bestehender Bluthochdruck $> 140 / 90$ mmHg und eine neu aufgetretene Proteinurie $> 0,3$ g / 24 Stunden. Bei Frauen, bei denen sich schon vor der zwanzigsten Woche ein Bluthochdruck und eine Proteinurie zeigt, sind hilfreiche Hinweise auf eine Präeklampsie: plötzlicher Anstieg der Urineiweißausscheidung und / oder des Blutdruckes, Thrombozytenabfall auf unter $100000 / \mu\text{l}$ und / oder ein Anstieg der Leberenzyme (HELLP-Syndrom).

1.1.5 Pathogenese der Präeklampsie

Die Präeklampsie ist mehr als nur erhöhter Blutdruck. Sie ein systemisches Syndrom, deren vielfältige Komplikationen lebensbedrohlich sein können, auch wenn der

Blutdruck nur mäßig erhöht ist. Präeklampsie ist eine heterogene Erkrankung, beeinflusst durch Umweltfaktoren, Parität, ethnische Herkunft [Morgan 1999] und genetische Variationen. Die pathophysiologischen Ursachen sind bis dato noch zu großen Teilen unerforscht. Man geht davon aus, dass die Plazenta der ursächliche Fokus ist, da die Entbindung die einzige definitive Heilung der Erkrankung ist. Es wurde beobachtet, dass Patientinnen mit einem erhöhten Plazentagewicht (zum Beispiel bei Zwillingen oder bei einem Hydrops) und somit einer relativen Verminderung der Plazentadurchblutung, ein erhöhtes Risiko für eine Präeklampsie haben. Es zeigt sich, dass die resultierende relative Plazentaischämie ein initialisierender Faktor bei der Entstehung einer Präeklampsie ist [Redman 1991].

Am Anfang der Schwangerschaft entwickeln sich die Spiralarterien, also die terminalen Enden der Gebärmutterarterien, von muskelstarken, dickwandigen Gefäßen zu schlaffen, ausgestülpten Arterien und passen sich so dem zehnfach vergrößertem uterinen Blutfluss an. Diese physiologischen Veränderungen beginnen frühzeitig während der Schwangerschaft [Pijnenborg 1980]. Endovaskuläre Trophoblasten wandern in die Spiralarterien ein [Robertson 1976, Zhou 1997]. Es gibt Hinweise, dass diese Trophoblasteneinwanderung bei Frauen in denen sich eine Präeklampsie entwickelt, unvollständig abläuft [Pijnenborg 1990, Zhou 1993, Fox 1988]. Die Ursache hierfür könnte eine Fehlfunktion der Cytotrophoblasten bei der Bereitstellung von Adhensionsmolekülen sein, welche für die normale Umwandlung der mütterlichen Spiralarterien während der Schwangerschaft notwendig sind [Zhou 1997]. Das fehlende Remodelling der Spiralarterien oder ein abnormes Remodelling, mit Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen [Brosens 1972], wird als morphologische Basis für die verringerte Plazentadurchblutung bei der Präeklampsie angesehen, welche zu einem Sauerstoffmangel der Plazenta führen könnte.

Die Immunantwort könnte einen weiteren Beitrag zur Präeklampsie besteuern. Hier stieß man auf das humane Leukozytenantigen G, welches im normalen Plazentagewebe vorhanden ist. Es wird vermutet, dass dieses Antigen eine Rolle in der mütterlichen Antwort auf die immunologisch fremde Plazenta spielt [Kovats 1990, Harrison 1997]. Im Plazentagewebe von Müttern mit Präeklampsie fanden sich verminderte und auch veränderte humane Leukozytenantigen-G-Eiweiße, welches einen Zusammenbruch der mütterlichen Immuntoleranz zur Folge hatte [Main 1994]. Weiterhin fielen erhöhte Spiegel von Zytokinen in der Plazenta und dem mütterlichen

Kreislauf, sowie erhöhte Spiegel von natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten als mögliche beeinflussende Faktoren auf [Taylor 1997].

Bei präeklampsischen Müttern zeigt sich in der Regel keine signifikante Blutdruckerhöhung vor der zweiten Schwangerschaftshälfte. Es können jedoch bereits vorher vasokonstriktive Einflüsse nachgewiesen werden. Veränderungen der vaskulären Reaktivität können schon vor der zwanzigsten Schwangerschaftswoche auftreten. In der Literatur findet man Hinweise darauf, dass der Blutdruck bei Müttern die eine Präeklampsie entwickeln, bereits im zweiten Trimester im Vergleich zum Durchschnitt der normalen Schwangeren etwas erhöht ist (diastolischer Blutdruckwert > 70 mmHg) [Sibai 1997], er liegt dabei aber noch im normalen Bereich. Während einer regelhaften Schwangerschaft kommt es zu einer Vasodilatation, bei der Präeklampsie ist dies genau umgekehrt. Es entwickelt sich ein erhöhter peripherer Widerstand. Normalerweise zeigt eine normotensive, schwangere Frau eine verminderte Antwort auf verschiedene vasoaktive Peptide und Amine, speziell auf Angiotensin II. Die Gefäße einer präeklampsischen Mutter hingegen zeigen eine überschießende Reaktion auf solche Hormone. Im Falle des Angiotensin II kann dies schon Monate vor einer offensichtlichen Erkrankung auftreten [Gant 1973]. Dies konnte jedoch nicht in allen Untersuchungen beobachtet werden [Kyle 1993].

Der Blutdruck präeklampsischer Mütter normalisiert sich post partum normalerweise in den ersten Tagen. Bei sehr schweren Fällen kann dies auch 2-4 Wochen dauern [Ferrazzani 1994].

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Vasokonstriktion und der veränderten vaskulären Reaktivität sind noch unklar. Arbeitsgruppen haben sich mit dem Verhältnis von vasokonstriktiven und vasodilatativen Prostanoiden beschäftigt, wie zum Beispiel Prostacyclin und Thromboxan [Walsh 1985, Fitzgerald 1990, Mills 1999]. Andere Studien beschäftigten sich mit den Auswirkungen einer verminderten Aktivität der Stickstoffoxidsynthetase und der verminderten Produktion von Stickstoff-abhängigem oder - unabhängigem Endothelium-derived relaxing factor (endothelständige vasodilatatorisch wirksame Mediatoren, zum Beispiel Stickoxid (NO)). (Baylis 1992 und 1998, Molnar 1994, Seligman 1994, Begum 1996).

Die Rolle der Endothelzellen ist ein weiterer Forschungsschwerpunkt. In den Endothelzellen werden zum Beispiel Prostanoid, Endothelin und Endothelin-derived relaxing factor gebildet, welche bei der Präeklampsie durch inflammatorische Zytokine (Tumor Nekrose Faktor alpha) oder oxidativen Stress, Fehlfunktionen aufweisen

könnten [Roberts JM 1989 und 1992, Davidge 1996, Taylor 1991, Hubel 1989 und 1997, Barden 1996, Poranen 1996].

Andere Faktoren, die bei der Präeklampsieentstehung eine Rolle spielen, könnten das sympathische Nervensystem [Schobel 1996], die calciotrophischen Hormone [August 1992, Seely 1992], das Insulin [Long 1977, Solomon 1994, Lorentzen 1998, Roberts 1998] und der Magnesiumstoffwechsel [Bardicéf 1995] sein.

1.1.6 Genetische Ursachen der Präeklampsie

Präeklampsie zeigt eine deutliche familiäre Häufung. Welches Vererbungsmuster bei Präeklampsie am ehesten vorliegt, wird vielfach debattiert. Die Frage ob hauptsächlich mütterliche Gene, fetale Gene oder deren Interaktionen eine Prädisposition schaffen, ist bis dato unbeantwortet.

Viele Studien legen besonderes Augenmerk auf das „Maternale Gen Model“. Dieses postuliert, dass hauptsächlich maternale Gene für die Entstehung der Präeklampsie mitverantwortlich sind [Chesley und Cooper 1986; Arngrimsson 1990]. Bereits 1873 hatte Elliot einen fatalen Fall von Eklampsie bei einer Frau geschildert, deren Mutter während ihrer fünften Schwangerschaft an Eklampsie gestorben war. Jede ihrer vier Töchter entwickelte Eklampsie, drei von ihnen starben daran. [Elliot 1873].

Manche Arbeitsgruppen, so zum Beispiel Boyd et al. fanden eher fetale Gene als ursächlich für die Entstehung einer Präeklampsie [Boyd 1987].

Andere Studien wiederum beschäftigen sich mit den Interaktionen zwischen mütterlichen und fetalen Genen [Cooper 1979].

Manche Stammbaumanalysen suggerieren eine Single-Gen Vererbung [Chesley 1986, Arngrimsson 1990].

Zur Untersuchung der pathogenetischen Ursachen wurden sogenannte Kandidatengene postuliert und untersucht, zum Beispiel der Angiotensinogen Thr 235 Polymorphismus [Morgan T, 1999].

In dieser Arbeit soll ein mögliches Kandidatengen des Renin-Angiotensin-Systems untersucht werden - der Angiotensin Converting Enzym (ACE) Insertion / Deletion Polymorphismus im ACE-Gen.

1.2 Renin-Angiotensin System (RAS)

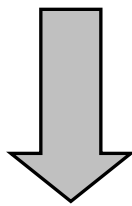
1.2.1 Überblick über das Renin-Angiotensin-System

Das Enzym Renin, eine spezifische saure Protease, kommt in den Epitheloidzellen der afferenten und in geringem Ausmaß auch efferenten Arteriolen der Niere vor. Dort katalysiert es die Bildung von Angiotensin, indem es das Decapeptid Angiotensin I von seinem Substrat Angiotensinogen abspaltet. Angiotensin I, welches biologisch inaktiv ist, wird durch eine Konvertase, dem Angiotensin Converting Enzym (in der Gefäßwand vorkommend) zum biologisch aktiven Octapeptid Angiotensin II umgewandelt. Im Herzen kann die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II auch durch die sogenannte Humane Herz Chymase erfolgen [Urata 1990]. Angiotensin II kann weiterhin in verschiedene aktive und inaktive Formen umgewandelt werden. Das biologisch aktive Angiotensin III entsteht durch die Abspaltung der N – terminalen Aminosäure Aspartat durch die nicht selektive Aminopeptidase A. Dieses kann zu Angiotensin IV durch die nicht selektive Aminopeptidase N verändert werden. Mit Hilfe von Endopeptidasen kann Angiotensin II auch in inaktive Fragmente gespalten werden, wie zum Beispiel Angiotensin [Ferrario 1991].

Angiotensine vermitteln ihre Funktionen über spezifische Angiotensinrezeptoren, welche in den Plasmazellmembranen der Zielzellen liegen. Es sind verschiedene Rezeptoren bekannt, wie zum Beispiel der AT1-Rezeptor, der AT2-Rezeptor und der AT3-Rezeptor. Die meisten Angiotensineffekte sind AT1-Rezeptor vermittelt (ein G-Protein Rezeptor) [Peters 1995].

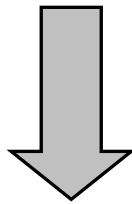
Schematische Darstellung des Renin – Angiotensin – System

Angiotensinogen (alpha2-Globulin aus der Leber)



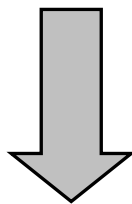
Renin (Protease)

Angiotensin I (Dekapeptid)



Angiotensin Converting Enzyme (Konvertase)

Angiotensin II (Oktapeptid) – biologisch aktiv



Aminopeptidase A

Angiotensin III (Heptapeptid)

Angiotensine haben vielfältige Funktionen. Sie regulieren die Volumenhomöostase, den Elektrolytstoffwechsel, den Gefäßtonus, modulieren periphere [Watt 1992, Bonnardeaux 1994] und zentrale Blutdruckregulation [Lind 1985, Ganten 1984], den uteroplazentalen Blutfluss [Nielsen 2000], zentrale und periphere sympathische Aktivität [Ganong 1984], Nierenfunktionen und die Biosynthese von Steroiden (Aldosteron) [Bird 1992]. Angiotensin II hat einen Einfluss auf kardiale Hypertrophie, Proliferation von glatten Muskelzellen und Nebennierenrindenzellen [Naftilan 1990, Sadoshima 1993]. Das RAS ist in die Angiogenese, den Diabetes mellitus, sowie dem Tumorwachstum involviert [Fuchs 2004].

1.2.2 Renin-Angiotensin-System in der Schwangerschaft

Die normale Schwangerschaft ist durch folgende Adaptionsmechanismen charakterisiert: Blutdruckabfall, Verminderung des vaskulären Widerstandes, Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und eine verminderte Blutdruckantwort auf infundiertes Angiotensin II [Goran 1984, Peters 1995]. Das Renin-Angiotensin-System spielt hierbei eine bedeutende Rolle [Kaur 2005]. Es erfolgt eine Erhöhung der Plasmarenin- und Aldosteronspiegel. Angiotensin II ist trotz seiner mehrfach erhöhten Konzentration nicht in der Lage einen Blutdruckabfall zu verhindern. Dies ist der Tatsache einer erhöhten Resistenz gegenüber der blutdrucksteigernden Wirkung von Angiotensin II geschuldet [Abdul-Karim 1961].

Bei Müttern, die während der Schwangerschaft eine Bluthochdruckerkrankung und / oder eine Präeklampsie entwickeln, wurde in Studien gezeigt, dass es nicht zur Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems kommt [August 1990]. Die gesamte Renin-Angiotensin Achse ist bei Präeklampsie beeinträchtigt. Plasmareninkonzentration, Plasmareninaktivität, Angiotensinogen-, Angiotensin II-, Aldosteronplasma- und -urin-spiegel sind erniedrigt [August 1990]. Da das Renin-Angiotensin-System eine so zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Bluthochdruckerkrankungen in der Schwangerschaft spielt, wurde spekuliert, ob genetische Variationen des Renin-Angiotensin-Systems eine Auswirkung auf die Entwicklung solcher Erkrankungen haben [Bouba 2003].

1.2.3 Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)

1956 wurde die erste Isolation des „hypertensin-converting enzyme“ durch Skeggs und Shumway beschrieben [Skeggs 1956]. Die Arbeitsgruppe um Soubrier konnte 1988 über ein erfolgreiches Klonieren der DNA, welche komplementär zur Gefäßzell-endothel-ACE-mRNA ist, berichten [Soubrier 1988].

Das Angiotensin-Converting-Enzym, auch Konvertase genannt, ist eine Zinkmetalloxidase mit einer Molekularmasse von 150-180 kDa.

ACE existiert als eine membrangebundene Form und kommt in endothelialen Zellen, sowie in verschiedenen epithelialen und neuroepithelialen Zellen vor [Rigat 1990], im Besonderen in den Nieren, dem Dünndarm, reifen Keimzellen (Spermatozoiden), dem Choroidplexus, den Basalganglien und dem Striatum [Soubrier 1993]. Die aktiven Anteile sind in Richtung Zellaußenseite gerichtet.

Desweiteren gibt es eine zirkulierende Enzymform, welche wahrscheinlich von der membranständigen Form abgespalten wird. Sie kommt zum Beispiel im Plasma, der Amnionflüssigkeit oder der Samenflüssigkeit vor [Rigat 1990].

Das Angiotensin Converting Enzym besteht aus 1306 Aminosäuren und hat 17 N-Glycosylierungspunkte. Ein 29 Aminosäuren großes, hydrophobes, N-terminales Signalpeptid fehlt beim ausgereiften Angiotensin Converting Enzym. Durch 17 hydrophobe Aminosäuren wird ACE an der Zellmembran verankert [Peters 1995].

Das testiculare ACE, welches 1971 erstmals beschrieben wurde [Cushman 1971], ist mit 92 kDa kleiner und hat nur einen aktiven Anteil. Seine Transkription startet vom Intron 12.

Das menschliche ACE-Gen ist auf Chromosom 17q23 lokalisiert und 21 Kilobasen groß. Es besteht aus 26 Exons, welche Größen zwischen 88 und 481 Basenpaaren haben. Die strukturelle Organisation des ACE-Genes zeigt zwei überlappende Transkriptionseinheiten [Hubert 1991]. Die große Endotheliale-ACE-mRNA ist 4,3 Kilobasen lang und wird von Exon 1 bis 26 transkribiert (ohne Exon 13). Durch molekulares Klonen der Endothelvariante des ACE-Genes konnten zwei homologe Bereiche offenbart werden. Jede hat einen katalytisch aktiven Anteil mit hoher Homologie, aber unterschiedlichen katalytischen Teilen und verschiedenen Wegen der Chloridaktivierung [Soubrier 1988]. Es wurde suggeriert, dass jede dieser Seiten unterschiedliche Funktionen haben könnte. Exon 13 wird nach der Transkription der endothelialen ACE-mRNA herausgeschnitten. Die 3 Kilobasen große Testiculare-ACE-

mRNA wird von Exon 13 bis Exon 26 transkribiert. Exon 13 kodiert 67 Aminosäuren der NH₂-terminalen Region des testiculären ACE, wohingegen die weiteren Exons eine Sequenz kodieren, die beiden Isoenzymen gemein ist [Hubert 1991]. Die verschiedenen 5'-Enden der zwei ACE Transkriptionen zeigen einen Promoter für die Endotheliale-ACE-mRNA in der 5'-Region des ersten Exons und einen Promoter für die Testiculäre-ACE-mRNA im Intron 12 [Hubert 1991].

Genexperimente zeigen die Anwesenheit einer positiven Regulationseinheit in einer 132 bp großen Region in der Nähe des Bereiches des Transkriptionsstarts. Weiterhin lassen sich zwei negative Regulationsbereiche zwischen -132 und -343 und zwischen -472 und -754 finden. Oberhalb der Transkriptionsstartstelle des testiculären ACE enthält das Intron 12 eine CRE-Konsensus Sequenz, welche nukleare Proteine binden kann [Howard 1990, Wei 1991, Soubrier 1993].

Die Expression der zwei Formen des ACE erfolgt durch unterschiedliche hormonelle Regulation. Das endotheliale Enzyme wird durch Glukokortikoide induziert, die testiculäre Form durch Androgene [Krulowitz 1984, Velletri 1985].

ACE ist kein sehr spezifisches Enzym, es ist identisch mit der Kininase II. Die Hauptfunktionen sind neben der Katalysierung der Reaktion Angiotensin I zu Angiotensin II, die Degradierung des Vasodilatators Bradykinin, sowie Funktionen im Stoffwechsel verschiedener Neuropeptide, wie zum Beispiel Neurotensin, Enkephaline, Substanz P, Luteinisierendes Hormon, Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon [Erdös 1987, Soubrier 1993]. In verschiedenen Studien finden sich diverse Hinweise auf weitere, noch zum großen Teil unerforschte Funktionen des Angiotensin-Converting Enzyms [Fuchs 2004].

Aufgrund folgender Beobachtungen wurde eine genetische Kontrolle der Angiotensin-Converting-Enzym Plasmaspiegel (pACE) postuliert: Auf der einen Seite ist pACE innerhalb einer Person recht stabil, auf der anderen gibt es aber große interindividuelle Unterschiede, teilweise bis zu fünffach höhere Werte, innerhalb einer Familie wieder eher ähnliche Spiegel [Dux 1984, Alhenc-Gelas 1991]. Studien innerhalb von Familien sehen die Weitergabe eines "Hauptgenes" als ursächlich für die interindividuellen Unterschiede [Cambien 1988].

1.2.4 Der ACE Insertion / Deletion Polymorphismus

Im menschlichen Angiotensin-Converting-Enzym-Gen wurde ein Insertion / Deletion Polymorphismus gefunden. Dieser ist im Intron 16 lokalisiert [Tiret 1992]. Der Polymorphismus wird durch eine Alu Element Insertion in das Intron 16 verursacht und ist 287 Basenpaare lang. Der Alu Einschub generiert drei Genotypen Alu +/+, Alu +/-, Alu -/-, diese sind weitgehend bekannt als II (Insertion), ID (gemischt) und DD (Deletion) [Hamid 2004].

Dieser Polymorphismus wurde mit einem Unterschied der zirkulierenden ACE-Spiegel assoziiert [Rigat 1990]. Kombinierte Segregations- und Linkage-Analysen haben gezeigt, dass nicht der I / D Polymorphismus selbst die Variation der Plasma-ACE-spiegel verursacht, sondern ein neutraler, allerdings sehr informativer Marker hierfür ist. Die Allele des I / D Polymorphismus stehen in einer statistisch signifikanten räumlichen Beziehung zu einem „major gene allele 's' “ genanntem Allel, welches eigentlich für die Plasmaspiegelvariationen genetisch verantwortlich ist [Tiret 1992]. Das I Allel ist mit niedrigeren Plasma-ACE-Spiegeln (pACE) und somit niedrigerer Aktivität assoziiert.

In einer Studie von Rigat et al. konnten verschiedene ACE-Spiegel den unterschiedlichen Genotypen zugeordnet werden. Die Unterschiede sind in Abbildung 1 dargestellt. Der genetische Effekt ist für 47 Prozent der Unterschiede der Serum-ACE-Unterschiede verantwortlich [Rigat 1990].

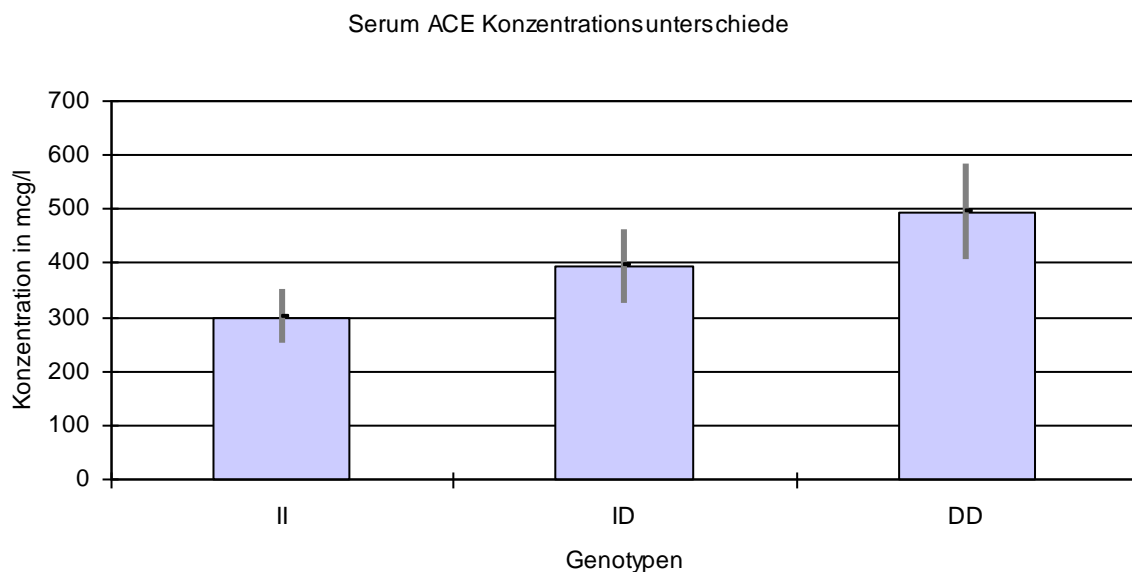


Abbildung 1: Serum ACE Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit vom ACE I/D Polymorphismus Genotyp. Nach Rigat et al., J Clin Invest 1990; 86:1343-46.

1.3 Aufgabenstellung

In einer normalen Schwangerschaft laufen folgende (oben beschriebene) Adaptionsmechanismen ab: Verminderung des vaskulären Widerstandes sowie daraus folgender Blutdruckabfall, Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems und eine verminderte Blutdruckantwort auf infundiertes Angiotensin II [Goran 1984, Peters 1995]. Das Renin-Angiotensin-System spielt hierbei eine bedeutende Rolle [Kaur 2005]. Es erfolgt eine Erhöhung der Plasmaprenin- und Aldosteronspiegel. Angiotensin II ist trotz seiner mehrfach erhöhten Konzentration nicht in der Lage einen Blutdruckabfall zu verhindern. Dies ist der Tatsache einer erhöhten Resistenz gegenüber der blutdrucksteigernden Wirkung von Angiotensin II geschuldet [Abdul-Karim 1961]. Angiotensine haben allerdings weitere vielfältige Funktionen. Sie regulieren die Volumenhomöostase, den Elektrolytstoffwechsel, den Gefäßtonus, modulieren periphere [Watt 1992, Bonnardeaux 1994] und zentrale Blutdruckregulation [Lind 1985, Ganten 1984], den uteroplazentalen Blutfluss [Nielsen 2000], und die zentrale und periphere sympathische Aktivität [Ganong 1984].

Da das Renin-Angiotensin-System, im speziellen die Umwandlung zu Angiotensin II durch das Angiotensin Converting Enzym, eine so zentrale Rolle in der Pathophysiologie von Bluthochdruckerkrankungen in der Schwangerschaft spielt, wurde spekuliert, ob genetische Variationen des Renin-Angiotensin-Systems eine Auswirkung auf die Entwicklung solcher Erkrankungen haben [Bouba 2003].

In dieser Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob der bekannte Angiotensin Converting Enzym Insertion / Deletion Polymorphismus einen Einfluss auf den Blutdruck und die Eiweißausscheidung von schwangeren Frauen hat und somit einen Risikofaktor für die Entstehung einer Präeklampsie darstellt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Agagel Midi – Wide, BIOMETRA, BIOMEDIZINISCHE ANALYTIK GmbH, Göttingen

Combitips plus, 0,1 ml, EPPENDORF GmbH, Hamburg

Feinwaage Typ H16 Mettler, SPOERHASE AG, Giessen

Mikrowelle, PANASONIC

Neolab Kryo – Aufbewahrungsbox,

PCR Caps ultradünn, 0,2 ml, BIOZYM SCIENTIFIC GmbH, Hess. Oldendorf

PCR Tubes ultradünn, 0,2 ml, BIOZYM SCIENTIFIC GmbH, Hess. Oldendorf

Pipettenspitzen, 0,5 – 20 µl, EPPENDORF GmbH, Hamburg

Pipettenspitzen, 2,0 – 200 µl, EPPENDORF GmbH, Hamburg

Pipettenspitzen, 100 – 1000 µl, EPPENDORF GmbH, Hamburg

Power Pack P25, BIOMETRA, BIOMEDIZINISCHE ANALYTIK GmbH, Göttingen

Polypipetten, 0,5 – 10 µl, EPPENDORF GmbH, Hamburg

Polypipetten, 10 – 100 µl, EPPENDORF GmbH, Hamburg

Polypipetten, 200 – 1000 µl, EPPENDORF GmbH, Hamburg

Safe – Lock Tubes, 1,5/ 2 ml, EPPENDORF GmbH, Hamburg

Safeseal T.I.P.S. Premium, BIOZYM SCIENTIFIC GmbH, Hess. Oldendorf

Safeskin satin plus, KIMBERLY CLARK

SPSS für Windows, Version 10.07, SPSS Software GmbH, München

T3 Thermocycler, BIOMETRA, BIOMEDIZINISCHE ANALYTIK GmbH, Göttingen

Thermostat TCR 100, CARL ROTH GmbH +Co., Karlsruhe

Tischzentrifuge Biofuge 13, HERAEUS, Berlin

Tischwaage Sartorius BL 600, SARTORIUS AG, Göttingen

Transilluminator TI1, BIOMETRA, BIOMEDIZINISCHE ANALYTIK GmbH, Göttingen

Varipetten, EPPENDORF GmbH, Hamburg

Vortex Genie 2, BENDER & HOBEIN AG, Zürich, Schweiz

Wasserbad GFL Typ 1013, GESELLSCHAFT FÜR LABORTECHNIK mbH, Burgwedel

2.1.2 Chemikalien

Agarose, ICN BIOMEDICALS INC., Costa Mesa, CA 92626, USA.

Amplitaq-DNA-Polymerase, ROCHE MOLECULAR SYSTEMS INC., Branchburg, New Jersey, USA

Bromphenolblau, SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, Missouri, USA

dNTPs (Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP), ADVANCED BIOTECHNOLOGIES LTD., Hamburg,

Elektrophorese-Marker, LIFE TECHNOLOGIES, Rockville, MD 20850, USA

Ethidiumbromid 10 mg/ml, SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, Missouri, USA

MgCl₂-Puffer, ROCHE MOLECULAR SYSTEMS INC., Branchburg, New Jersey, USA

PCR Puffer, ROCHE MOLECULAR SYSTEMS INC., Branchburg, New Jersey, USA

Primer hace-3-se, hace-3-ase, hace-5-se, hace-5-ase, TIB MOLBIOL SYNTHESELABOR, Berlin

TE – Puffer wurde aus 10 mM Tris – Cl und 1 mM EDTA hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

K – Puffer setzte sich aus 50 mM KCl, 10 mM Tris – Cl, 2,5 mM MgCl, Tween 20 - 0,5%, und 100 µg/ml Proteinase K zusammen und wurde auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt.

TBE – Puffer bestand aus 108 g/l Tris, 55 g/l Borsäure und 40ml/l 0,5 M EDTA. Der pH-Wert betrug 8,0.

Blaumarker wurde aus 15g/100ml Ficoll (Type 400) 15,00% und 250mg/100ml Bromphenolblau 0,25% zusammengesetzt und in 1x TBE-Puffer gelöst.

2.2 Methoden

2.2.1 Die Probandenrekrutierung

Wir führten eine prospektive, epidemiologische Studie an der Universitätsklinik Charité - Campus Mitte der Humboldt Universität zu Berlin durch. Diese Studie wurde vorab von der Ethikkommission der Charite geprüft und bewilligt, sie folgt den Empfehlungen des Weltärztebundes. Des Weiteren fand sie in Übereinstimmung mit den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki aus dem Jahr 1964 (neuerliche Fassung von 1996) statt. Wir luden alle 1132 Frauen und ihre neugeborenen Kinder ein, die zwischen Januar 2000 und April 2001 in der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin der Charite Campus Mitte entbunden hatten, an dieser Studie teilzunehmen. Die Frauen wurden in einem ausführlichen Gespräch über die Studie informiert und aufgeklärt. Die ausdrückliche Zustimmung der Frauen war eine Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie. 5,6 % der Frauen wünschten keine Teilnahme an der Studie.

Nach dem Aufklärungsgespräch wurde mit den Studienteilnehmerinnen gemeinsam ein Fragebogen ausgefüllt. Dieser standardisierte Fragebogen eruierte Name und Geburtsdatum der Frauen, aktuelles Gewicht, Gewicht vor der Schwangerschaft (durch die Frauen selbst angegeben), Gewichtszunahme, Raucheranamnese, Nationalität, sowie bekannte Erkrankungen, z.B. Bluthochdruck oder Diabetes mellitus.

Die Mütter wurden weiterhin um Ihre Zustimmung gebeten, die Daten aus ihren Mutterpässen in die Studie aufnehmen und verwenden zu dürfen. Folgende Daten wurden aus dem Mutterpass übernommen: Familienanamnese, Vorerkrankungen, Allergien, Medikamente, Schwangerschaftsanzahl, Urinstreifentestresultate, Ödeme, Varikosis, Gewicht, Blutdruck und Hämoglobinwert.

Laut American College of Obstetricians and Gynecologists [1996] und Helewa et al. [1997], sowie Brown und Hague et al. [2000] werden Ödeme nicht mehr zur Klassifizierung von Bluthochdruckerkrankungen während der Schwangerschaft herangezogen. Trotzdem untersuchten wir neu aufgetretene Ödeme in der zweiten Schwangerschaftshälfte, weil diese häufig mit Präeklampsie assoziiert sind und möglicherweise die gleiche Pathophysiologie haben.

Im Anschluss an die Entbindung erfolgte eine pädiatrische Untersuchung. Hier wurden Geschlecht, Gewicht, Größe und Kopfumfang des Kindes, der pH-Wert des

Nabelschnurblutes, sowie der APGAR-Index ermittelt. APGAR ist ein Akronym und setzt sich aus den Anfangsbuchstaben von: Aussehen, Puls, Grimassieren, (Muskel)Aktivität und Respiration zusammen. Diese 5 Parameter werden bei einem Neugeborenen unmittelbar nach der Geburt und im Verlauf mehrfach beurteilt. Der APGAR-Index wurde nach der US-amerikanischen Anästhesistin Virginia Apgar benannt und wird seit 1953 angewandt.

2.2.2 Die Blutdruckmessung

Der Blutdruck wurde bei allen Vorsorgeuntersuchungen durch erfahrene Gynäkologen oder Hebammen gemessen. Es wurde die Auskultationsmethode nach Korotkoff verwendet. Korotkoff Phase V wurde zur Bestimmung des diastolischen Blutdruckes angewandt. [Johanning AR 1992, Gallery 1994, Lopez 1994, Perry 1996, Brown und Buddle, 1998] Die Probandinnen wurden gemäß der Definition der National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy klassifiziert [National High Blood Pressure Education Program Working Group, 2000]. Für jede Studienteilnehmerin wurde der mittlere Blutdruck für jedes Trimenon berechnet (durchschnittliche Anzahl der Blutdruckmessungen: 1,8; 4,0 und 5,5).

2.2.3 Die Messung der Proteinausscheidung

Zur Analyse der Proteinurie wurde eine standardisierte Urinteststreifenmethode verwendet. Die Proteinurie als Kriterium für eine Präeklampsie ist als Nachweis von Eiweiß $> 0,3$ g im 24 h Urin oder > 30 mg / dl definiert [National High Blood Pressure Education Program Working Group, 2000]. Das entspricht einem Urinteststreifenergebnis von 1+. Es wurden nur nitrit-negative Urinteststreifenergebnisse ausgewertet, um eine durch Harnwegsinfekte verursachte Proteinurie auszuschließen.

2.2.4 DNA – Extrahierung aus Vollblut

Allen Frauen wurde venöses EDTA-Blut während einer Routineblutkontrolle post partum entnommen. Den Neugeborenen wurde kurz nach der Geburt venöses Blut aus der Nabelschnur entnommen. Das Blut wurde 5 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert. Das Plasma konnte dann verworfen werden und die verbliebenen Zellen wurden 1:1 mit NaCl 0,9 % resuspendiert und bei -20° Celsius eingefroren und gelagert.

Die DNA-Isolierung erfolgte nach einem Standardprotokoll [Miller 1988]. 50 μ l NaCl-Blutzellengemisch wurden mit 500 μ l TE-Puffer gemischt. Dieser Ansatz wurde dann 3 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 μ l TE-Puffer resuspendiert. Erneutes Zentrifugieren mit 13000 U/min eine Minute lang schloss sich an. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis das Pellet nicht mehr rot gefärbt war. Sämtlicher noch verbliebener Überstand wurde nun mit einer Pipette entfernt. Das makroskopisch hämoglobinfreie Pellet wurde in 100 μ l K-Puffer resuspendiert und in einem Wasserbad bei 56 Grad Celsius 45 Minuten inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen und eventuell vorhandene Proteasen, insbesondere DNAasen, zu inaktivieren, wurde die Suspension abschließend 10 Minuten lang auf 95 Grad Celsius erhitzt. Dann wurden die Proben auf Eis gelegt und anschließend bei -20° Celsius gelagert.

2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.5.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

1985 beschrieben Mullis und Faloona die Polymerasekettenreaktion [Saiki 1985]. Mit dieser molekularbiologischen in vitro Technik gelang es bestimmte Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Abschnitte gezielt zu vervielfältigen [Mullis 1987].

Die Voraussetzung für die gezielte Vervielfältigung ist, dass die endständigen Randbereiche des DNA-Abschnittes beziehungsweise deren Basenabfolge genau bekannt sind. An diesen Endbereichen müssen Starthilfen, sogenannte Primer, ansetzen, die speziell dafür hergestellt sind. Diese Primer sind spezifizierte einzelsträngige DNA-Moleküle, Oligonukleotide die sich komplementär zur DNA-

Sequenz der Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes verhalten. Die doppelsträngige (ds) DNA-Helix denaturiert bei 92-98° Celsius, dabei kommt es zur Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen. Es bilden sich zwei Einzelstränge. Beim Absinken der Temperatur kommt es zum Annealing: die Primer können sich an ihre komplementären DNA-Abschnitte binden. Bei geeigneten Reaktionsbedingungen hinsichtlich des pH-Wertes und der Temperatur und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) und Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) werden die Primer durch die DNA-Polymerase entlang der denaturierten DNA-Matrize (template) verlängert. Hierdurch entstehen neuen DNA-Stränge, diese sind komplementär zur Matrize. Am Reaktionsende formieren sie sich zu Doppelsträngen. Zur Wiederholung der DNA-Synthese werden die dsDNA-Abschnitte durch Hitze erneut denaturiert, so dass sich die Primer wieder anlagern können. Damit ergibt sich folgender wiederkehrender Ablauf: 1. Denaturierung der zu vermehrenden DNA in Einzelstränge 2. Anlagerung der Starthilfen (Primer) an ihre komplementären DNA-Abschnitte (annealing) 3. Erstellung einer DNA-Kopie durch die DNA-Polymerase. Jeder Zyklus verdoppelt so die Anzahl der DNA-Kopien, so dass nach 20 Zyklen ein einzelner DNA-Abschnitt über eine Million Mal vermehrt wurde. Aufgrund der hohen Sensitivität muss auf strenge Hygiene und steriles Arbeiten besonders geachtet werden, da im Falle einer Kontamination mit Fremd-DNA und einer ungewollten Vervielfältigung dieser, eine Verfälschung des Ergebnisses die Folge wäre. Die so entstandenen DNA-Fragmente können auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Es folgt die Anfärbung mit Ethidiumbromid. Unter ultraviolettem Licht kann man die Fragmente sichtbar machen.

In der Anfangszeit der PCR unter Mullis und Faloona war die Durchführung einer PCR wesentlich aufwendiger als heute. Man kannte noch keine programmierbaren, vollautomatischen Heizgeräte, da diese erst 1989 auf den Markt kamen. Man war somit auf eine Stoppuhr und mehrere, unterschiedlich temperierte Wasserbäder angewiesen. Aufgrund der hitzeempfindlichen Polymerase-Enzyme musste ein Abkühlung auf unter 50° Celcius nach jedem Denaturierungsvorgang erfolgen. Erst durch die Entdeckung der Taq-Polymerase konnte auf diesen Arbeitsschritt verzichtet werden. Die Taq-polymerase ist ein hitzestabiles Enzym aus *Thermus aquaticus*, einem thermophilen Bacterium, das man ursprünglich aus den heißen Quellen des Yellowstone-Nationalparks (USA) isolierte. Inzwischen wird Taq-Polymerase gentechnisch hergestellt.

2.2.5.2 Spezifische PCR für den Angiotensin-Converting-Enzym Insertion / Deletion Polymorphismus

Zur Genotypisierung des ACE I/D Polymorphismus wurde die Methode nach Lindpainter et al. [Lindpaintner 1995] verwendet. 1 Mikroliter DNA wurde mittels der Primer: 5'-GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT-3' und 5'-GGA TGG CTC TCC CCG CCT TGT CTC-3' in einem 20 Mikroliter Ansatz amplifiziert. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

DNA	1 µl
H ₂ O	13,44 µl
Puffer 10 x	2 µl
MgCl 25 mM	1,2 µl
dATP 100 mM	0,04 µl
dCTP 100 mM	0,04 µl
dGTP 100 mM	0,04 µl
dTTP 100 mM	0,04 µl
Primer sense 10 –15 µM	1 µl
Primer antisense 10 –15 µM	1 µl
Taq-Polymerase 5 U / µl	0,2 µl

Das Cyclerprogramm war wie folgt:

12 min 95° Celsius

30 sec 94° Celsius

45 sec 67° Celsius

02 min 72° Celsius

07 min 72° Celsius

Pause 04° Celsius

35 Zyklen

Deckeltemperatur 105° Celsius

Es entstanden PCR-Produkte von 319 Basenpaaren für das D-Allel und 597 Basenpaaren für das I-Allel.

Alle Proben die nur das D-Allel nach der Amplifikation zeigten und daher potentiell als DD typisiert waren, wurden in einer speziellen zweiten Amplifikationsreihe untersucht. Hier wurden spezifische Primer für die eingeschobene Sequenz in Intron 16 des I-Allels verwendet. Diese waren 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3' und 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3'.

Hierfür wurde folgendes Cyclorprogramm verwendet:

12 min 95° Celsius

30 sec 94° Celsius

01 min 72° Celsius

07 min 72° Celsius

Pause 04° Celsius

35 Zyklen

Deckeltemperatur 104° Celsius

Nur wenn ein I-Allel vorhanden war, zeigte die PCR ein Amplifikationsprodukt von 355 Basenpaaren.

2.2.5.3 Gelelektrophorese

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf ein 1,5%iges-Agarosegel aufgetragen und es erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in der Gelkammer bei 100 V.

2.2.5.4 Ethidiumbromidfärbung und Auswertung

Anschließend wurde das Gel für 15 min in ein Ethidiumbromidbad gelegt. Unter einer UV-Lampe wurden die entstandenen Banden sichtbar gemacht. Zeigten sich Banden bei 319 Basenpaaren (Bp) und bei 597 Bp lag ein ID-Genotyp vor. Fand sich nur eine Bande bei 597 Bp handelte es sich um einen II-Genotyp. War nur eine Bande bei 319 Bp wies dies auf einen potentiellen DD-Genotyp hin, es folgte die Bestätigungs-PCR mit den für das Intron 16 des I-Allels spezifischen Primern. Waren keine Banden sichtbar, galt der DD-Genotyp als bestätigt.

Es wurden nur übereinstimmende Resultate von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen akzeptiert.

2.2.6 Statistik

Zur Datenanalyse verwendeten wir SPSS für Windows, Version 11.5 (Chicago, IL, USA). Resultate von kontinuierlichen Variablen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben (außer es ist im Besonderen anders ausgewiesen). Zum Vergleich von kontinuierlichen Variablen zwischen Gruppen erfolgte eine Varianzanalyse (ANOVA). Kategoriale Daten wurden mit Hilfe des Pearson- χ^2 Test verglichen. Da das Alter der Mutter, der Body Mass Index (BMI) vor der Schwangerschaft, Mehrlingsgeburten und Primigravidität den Blutdruck während der Schwangerschaft beeinflussen, wurden alle Blutdruckvergleiche einer Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit o.g. Parametern als Kovariablen unterzogen. Ein $P < 0,05$ wurde als signifikant beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1 Mütterliche und kindliche phänotypische Merkmale

In die Auswertung der Studie wurden Daten von 1068 Frauen und Ihren Neugeborenen eingeschlossen. Die deskriptiven Daten der Studienpopulation sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Deskriptive Daten der Studienpopulation

Merkmale der Mütter N =1068	Mittelwerte \pm Standardabweichung
Alter bei der Geburt (Jahre)	30 \pm 5,4
BMI vor der Schwangerschaft (kg/m ²)	22,6 \pm 3,9
Gestationsalter zur Entbindung (Wochen)	39,0 \pm 2,1
Zwillingschwangerschaft (%)	5,0
Primigravida (%)	42,7
Chronische Hypertonie vor der Schwangerschaft (%)	5,5
Antihypertensive Medikation vor der Schwangerschaft (%)	1,0
Antihypertensive Medikation während der Schwangerschaft (%)	2,1
Positive Familienanamnese für Bluthochdruckerkrankungen (%)	37,8
Diabetes mellitus vor der Schwangerschaft (%)	1,9
Diabetes mellitus während der Schwangerschaft (%)	3,4
Positive Familienanamnese für Diabetes mellitus (%)	33,9
Rauchen vor der Schwangerschaft (%)	43,5
Rauchen während der Schwangerschaft (%)	17,9
Geburtsgewicht der Kinder (g)	3367 \pm 614

3.2 Häufigkeitsverteilung der Genotypen bei den Müttern

Die Häufigkeitsverteilung der ACE I/D Polymorphismus Genotypen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tab.2: Häufigkeitsverteilung der ACE I/D Polymorphismus Genotypen

ACE Genotyp	Mütter (n=1068)
II	179 (16,8 %)
ID	549 (51,4 %)
DD	340 (31,8 %)
I-Allelfrequenz (fI)	0,425 ± 0,01
D-Allelfrequenz (fD)	0,575 ± 0,01

3.3 Der Einfluss des ACE I/D Polymorphismus auf mütterliche und kindliche Merkmale

Es wurde untersucht, ob sich die untersuchten mütterlichen und kindlichen Merkmale zwischen den verschiedenen ACE Genotypen signifikant ($p < 0,05$) unterscheiden.

3.3.1 Der mittlere systolische Blutdruck

Die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen ACE-Genotypen auf den mittleren systolischen Blutdruck der Mütter ergab folgende, in Tabelle 3 aufgeführte Ergebnisse. Eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) für Unterschiede zwischen den Gruppen mit Berücksichtigung von Alter, Body-Mass-Index (BMI), Zwillingsschwangerschaften und Erstschwangerschaft wurde durchgeführt.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Tab. 3: Einfluss der unterschiedlichen ACE-Genotypen auf den mittleren systolischen Blutdruck der Mütter.

	II	ID	DD	P
Anteil an Gesamtmenge N (%)	179 (17%)	549 (51%)	340 (32%)	
Blutdruck im 1.Trimenon	115.0 ± 12	115.4 ± 12	116.7 ± 13	0.28
Blutdruck im 2.Trimenon	114.7 ± 11	115.5 ± 10	115.2 ± 11	0.74
Blutdruck im 3.Trimenon	117.0 ± 11	117.0 ± 10	117.2 ± 11	0.69

Mittelwerte +/- Standardabweichung. P-Wert aus ANCOVA für Unterschiede zwischen den Gruppen mit Berücksichtigung von Alter, Body-Mass-Index (BMI), Zwillingsschwangerschaften und Erstschwangerschaft.

3.3.2 Der mittlere diastolische Blutdruck

In der folgenden Tabelle 4 ist die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen ACE-Genotypen auf den mittleren diastolischen Blutdruck der Mütter angegeben. Eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) hinsichtlich der Beeinflussung durch Alter, Body-Mass-Index (BMI), Zwillingsschwangerschaften und Erstschwangerschaft wurde durchgeführt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Tab. 4: Einfluss der unterschiedlichen ACE-Genotypen auf den mittleren diastolischen Blutdruck der Mütter.

	II	ID	DD	P
Anteil an Gesamtmenge N (%)	179 (17%)	549 (51%)	340 (32%)	
Blutdruck im 1.Trimenon	68.7 ± 9	69.3 ± 9	69.6 ± 9	0.71
Blutdruck im 2.Trimenon	67.7 ± 8	68.1 ± 8	67.9 ± 8	0.98
Blutdruck im 3.Trimenon	70.3 ± 8	70.9 ± 8	70.0 ± 7	0.53

Mittelwerte +/- Standardabweichung. P-Wert aus ANCOVA für Unterschiede zwischen den Gruppen mit Berücksichtigung von Alter, Body-Mass-Index (BMI), Zwillingsschwangerschaften und Erstschwangerschaft.

3.3.3 Gestationshochdruck

Die folgende Abbildung 2 zeigt den prozentualen Anteil der an Gestationshypertonus erkrankten Mütter jeweils innerhalb der drei verschiedenen Genotypen und vergleicht diese miteinander. Graphisch zeigt sich der Trend, dass Frauen, die homozygot das D-Allel tragen, weniger an Gestationshochdruck erkranken. Ein statistisch signifikanter Unterschied ist jedoch nicht vorhanden.

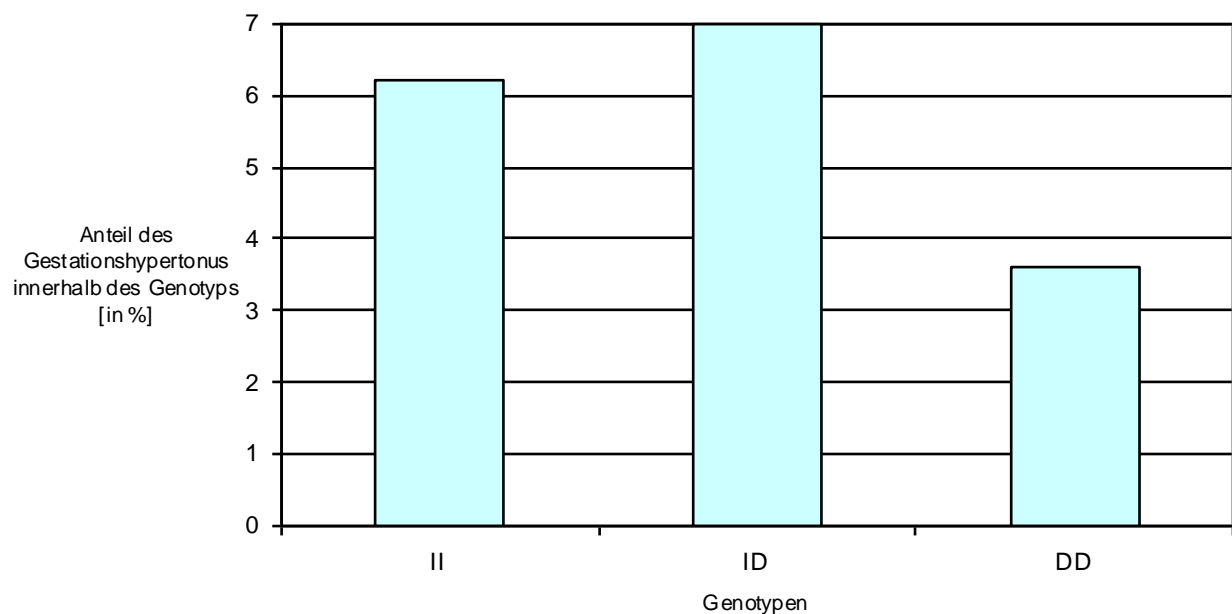


Abbildung 2: Gestationshypertonus in Abhängigkeit vom ACE I/D Polymorphismus Genotyp. Im Pearson- χ^2 Test ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.3.4 Eiweißausscheidung

Die Proteinausscheidung wurde in drei Qualitäten eingeteilt. Kein Eiweiß im Urin = 0, geringe Eiweißausscheidung = + und große Eiweißausscheidung = >+.

In den folgenden Abbildungen 3, 4 und 5 ist die Eiweißausscheidung in Abhängigkeit vom ACE I/D Polymorphismus Genotyp jeweils für die drei verschiedenen Trimester dargestellt. Die Eiweißausscheidung unterschied sich nicht statistisch signifikant zwischen den Gruppen (Pearson- χ^2 Test).

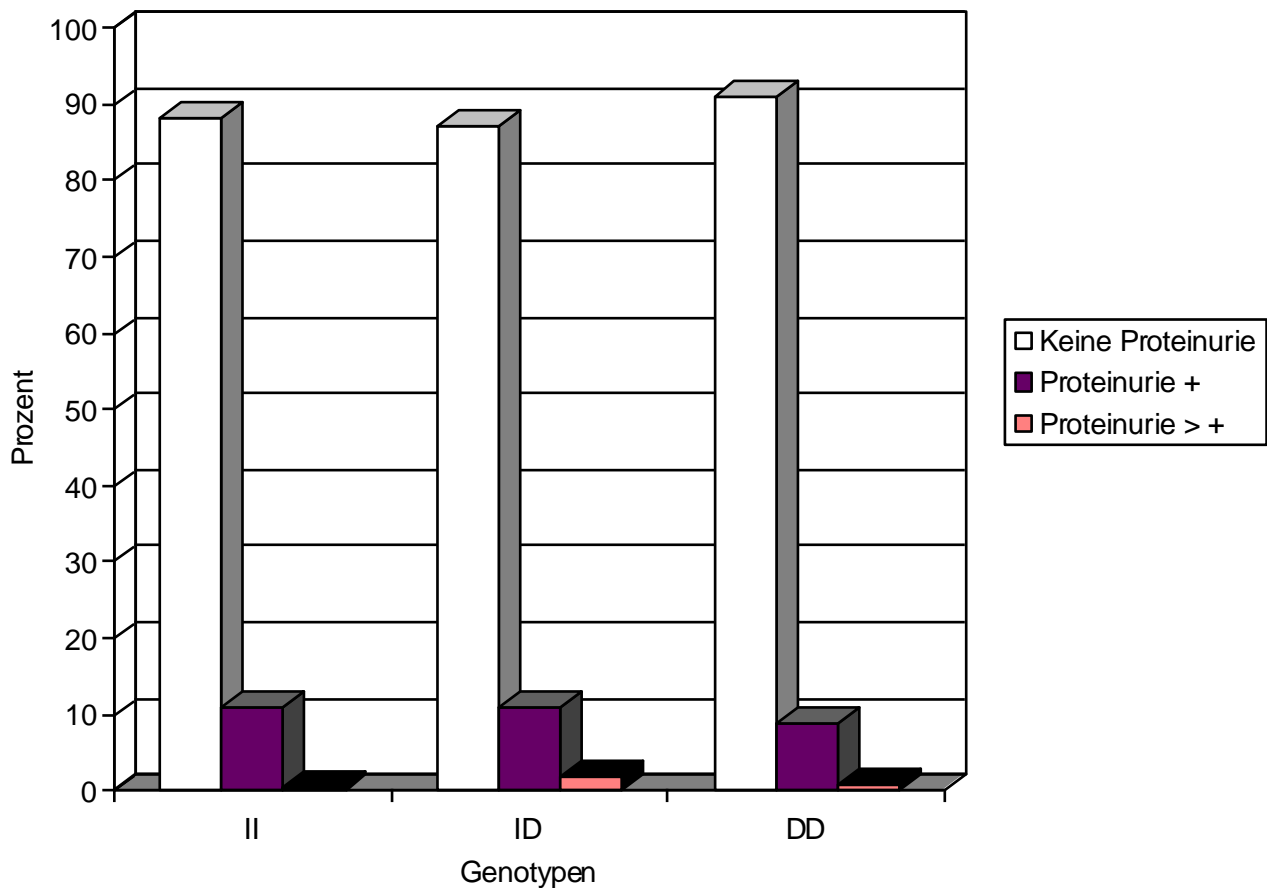


Abbildung 3: Eiweißausscheidung im 1. Trimenon in Abhängigkeit vom ACE I/D Polymorphismus Genotyp

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Mütter mit ausgeprägter, geringer und keiner Proteinurie innerhalb eines Genotyps. Es zeigte sich im Pearson-chi² Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen.

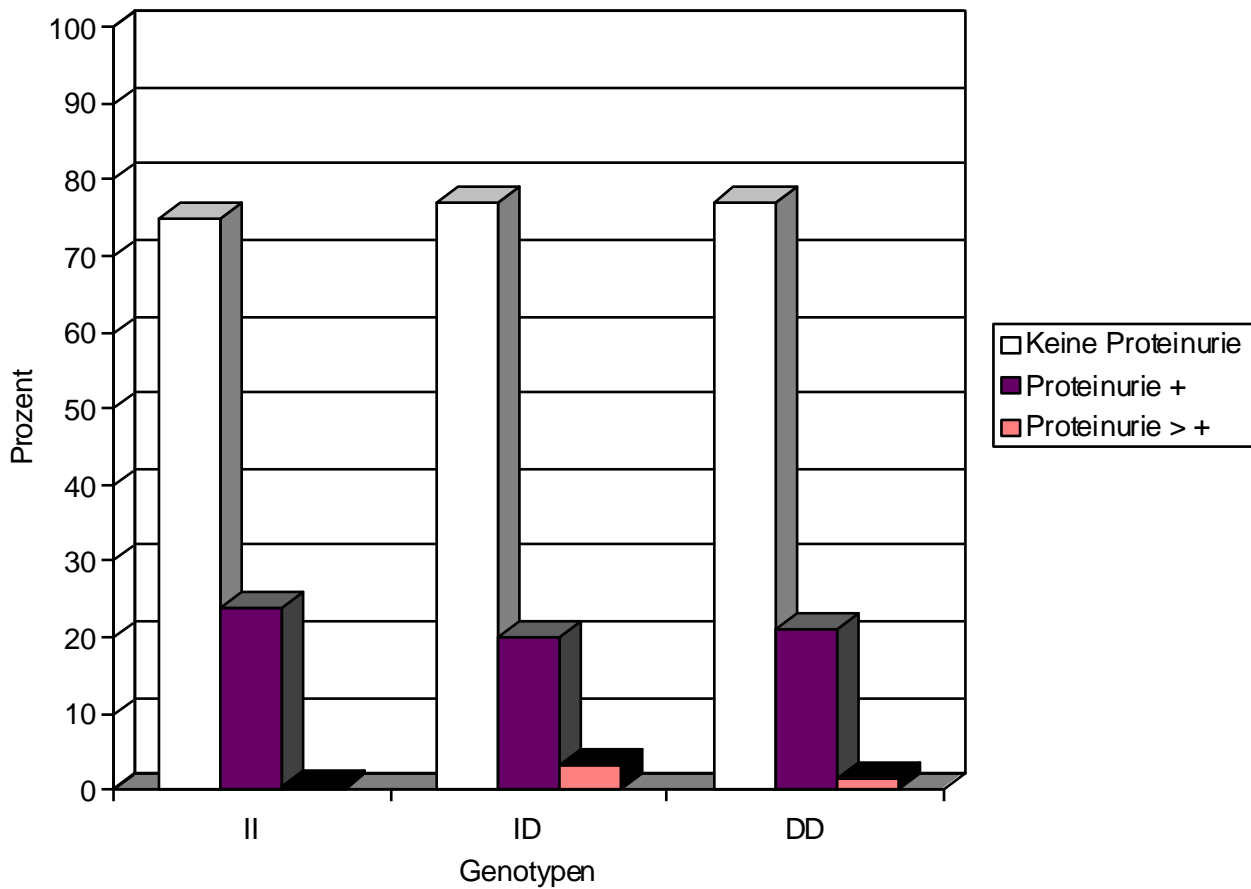


Abbildung 4: Eiweißausscheidung im 2. Trimenon in Abhängigkeit vom ACE I/D Polymorphismus Genotyp

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Mütter mit ausgeprägter, geringer und keiner Proteinurie innerhalb eines Genotyps. Es zeigte sich im Pearson- χ^2 Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen.

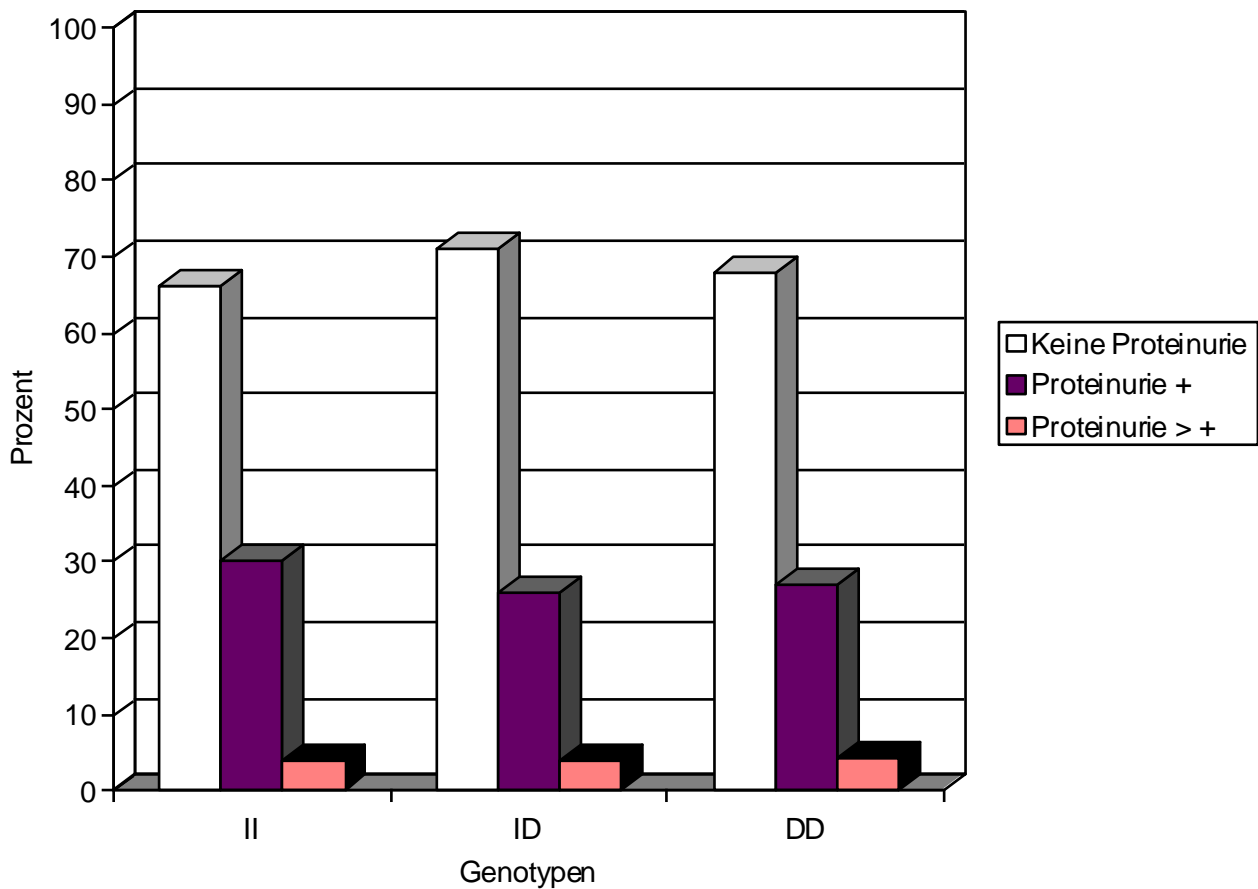


Abbildung 5: Eiweißausscheidung im 3. Trimenon in Abhängigkeit vom ACE I/D Polymorphismus Genotyp

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Mütter mit ausgeprägter, geringer und keiner Proteinurie innerhalb eines Genotyps. Es zeigte sich im Pearson- χ^2 Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen.

3.3.5 Neu aufgetretene Ödeme nach der 20. Schwangerschaftswoche

Bei 31,6 % der Frauen mit II Genotyp wurden neu aufgetretene Ödeme nach der 20. Woche der Schwangerschaft diagnostiziert. Die Frauen mit dem ID Genotyp zeigten diese neuen Ödeme in 35,5 %. In der DD Genotypgruppe hatten 35,3 % der Frauen neue Ödeme. Es wurde ein Pearson- χ^2 Test durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Pearson- χ^2 Test) bestand nicht.

3.3.6 Präeklampsie

Eine Präeklampsie trat bei 5,1 % der II Genotypgruppe auf. Bei 5,5 % der Frauen mit ID Genotyp und bei 5,4 % der Frauen mit DD Genotyp war eine Präeklampsie aufgetreten. Die statistischen Unterschiede waren bei einem p-Wert von 0,98 nicht signifikant.

3.3.7 Mütter mit Gestationshypertonus und / oder Präeklampsie

Wir verglichen die Mütter gemeinsam, welche entweder an einem Gestationshypertonus und / oder an einer Präeklampsie, inklusive der sich auf einen vorbestehenden Hypertonus aufgepfropften Form, erkrankten, hinsichtlich der Genotypverteilung. Nachfolgende Abbildung 6 zeigt die Unterschiede.

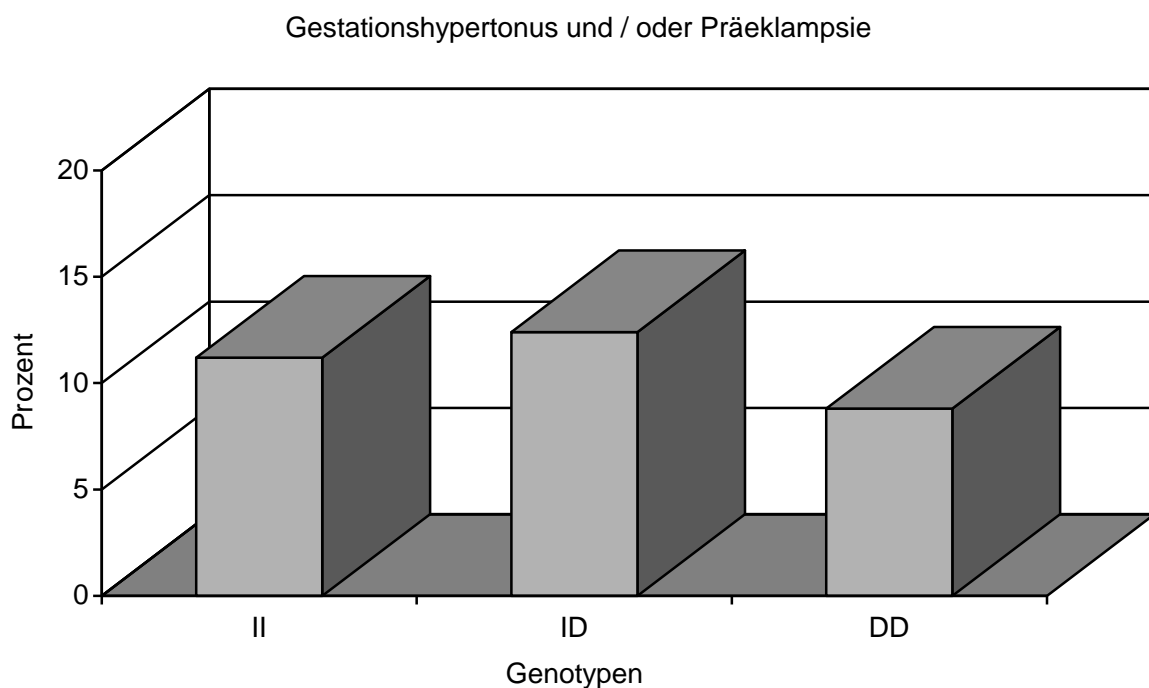


Abbildung 6: Auftreten von Gestationshypertonus und / oder Präeklampsie in Abhängigkeit vom ACE I/D Polymorphismus Genotyp

Es wurde eine Pearson- χ^2 Test durchgeführt. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3.3.8 Geburtsgewicht der Neugeborenen

In der Abbildung Nr. 7 wird das mittlere Geburtsgewicht der Neugeborenen in Abhängigkeit vom ACE-Genotyp der Mutter dargestellt. Es wurde eine ANOVA durchgeführt. Der p-Wert hier liegt bei 0,08 und ist somit statistisch nicht signifikant. Es zeigt sich jedoch auch hier ein Trend. Kinder die von Müttern mit einer homozygoten Anlage des D-Alleles geboren werden, haben tendenziell ein höheres Geburtsgewicht, als Kinder, deren Mütter das I-Allel im Genotyp haben. In dieser Studie beträgt der Gewichtsunterschied durchschnittlich 63 Gramm zwischen Kindern, deren Mütter das D-Allel tragen und Kindern, deren Mütter das I-Allel tragen. Der p-Wert wurde für das Gestationsalters zur Entbindung, Geschlecht des Neugeborenen, Zwillingsschwangerschaft, mütterlichen Hypertonus, mütterlichen Diabetes mellitus, mütterlichen Body Mass Index und das Rauchverhalten während der Schwangerschaft in einer Kovarianzanalyse (ANCOVA) korrigiert.

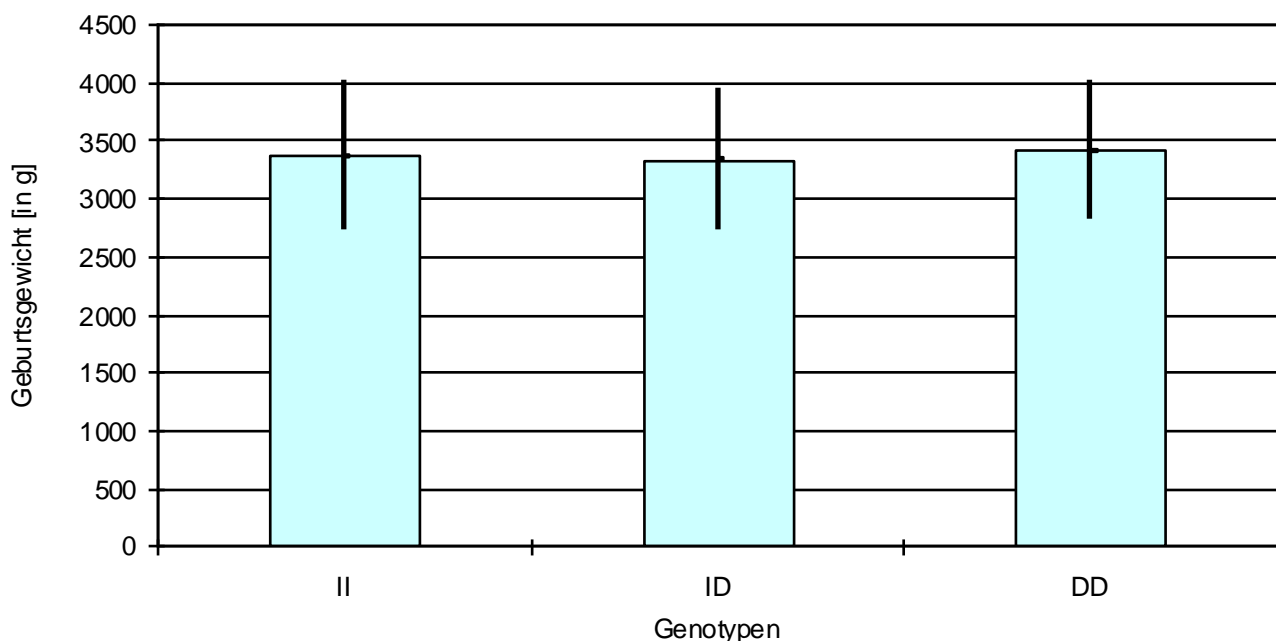


Abbildung 7: Geburtsgewicht der Neugeborenen in Abhängigkeit vom ACE I/D Polymorphismus Genotyp der Mutter.

Das Geburtsgewicht der Kinder in Abhängigkeit von den unterschiedlichen ACE I/D Polymorphismus Genotypen der Mütter wird in dieser Abbildung dargestellt. Die Spannweitenlinien geben jeweils die Standardabweichung an. Es wurde eine ANCOVA für o.g. Merkmale durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied besteht nicht, $p = 0,08$.

4. Diskussion

Diese Studie diente der Überprüfung der Hypothese, ob die Pathogenese von hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft und somit die Entstehung einer Präeklampsie durch genetische Variationen des Renin-Angiotensin-Systems beeinflusst wird. Es wurden Effekte eines mütterlichen RAS Polymorphismus, des Angiotensin-Converting Enzyme Insertion / Deletion Polymorphismus, auf klassische Marker der Präeklampsie, wie zum Beispiel Blutdruckerhöhung und Proteinausscheidung, aber auch Ödeme untersucht.

Die Verteilung der Allelfrequenzen in dieser Arbeit ist ähnlich derer, welche in früheren Arbeiten über kaukasische Populationen veröffentlicht wurden, so zum Beispiel von Bloem et al., 1996 und Heiskanen et al., 2001.

4.1 Die Bedeutung des ACE I / D Polymorphismus für die Ausprägung von klinischen Symptomen und diagnostischen Markern der Präeklampsie

Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass es keine Assoziationen zwischen dem mütterlichen Angiotensin Converting Enzyme Insertion / Deletion Polymorphismus und den klassischen Markern einer Präeklampsie in dieser in Berlin/Deutschland rekrutierten Population gibt. Wenn man die mittleren Blutdruckwerte für die unterschiedlichen Genotypen II, ID und DD in den drei verschiedenen Trimestern vergleicht, ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Bei Betrachtung der Urineiweißausscheidung ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen ACE I/D Genotypen zu erkennen.

Neu aufgetretene Ödeme nach der zwanzigsten Schwangerschaftswoche werden seit einigen Jahren nicht mehr zur Diagnosefindung einer Präeklampsie herangezogen [American College of Obstetricians and Gynecologists 1996, Helewa 1997, Brown MA 2000]. In dieser Untersuchung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen ACE I / D Polymorphismus Genotypen hinsichtlich neu aufgetretener Ödeme.

Nach Betrachtung der klassischen, diagnosestützenden Marker der Präeklampsie schauten wir uns die Genetik der Mütter an, welche tatsächlich eine Präeklampsie entwickelt hatten. Es waren 57 Frauen der insgesamt 1068 untersuchten, werdenden Mütter, was einem prozentuellen Anteil von 5,3 Prozent entspricht. Diese Häufigkeit der Präeklampsie zeigt sich auch bei anderen Arbeitsgruppen, so zum Beispiel bei Bouba et al., 2003. Die Genotypverteilung, sowie die Allelverteilung des ACE I/D Polymorphismus zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung einer Präeklampsie.

4.2 Vergleich mit bereits publizierten Daten

Es gibt verschiedene Arbeitsgruppen, welche Auswirkungen des Genpolymorphismus auf die Entwicklung einer Präeklampsie zeigen konnten. Die Gruppe um Hyunah Choi, 2004 fand in ihrer koreanischen Gruppe einen signifikanten Einfluss des ACE Gen Polymorphismus auf die Entwicklung einer Präeklampsie. Sie konnte zeigen, dass der DD Genotyp signifikant häufiger bei an Präeklampsie erkrankten Müttern vorkam als in den Kontrollen. Die Frequenz des D-Allels war 0,55 bei an Präeklampsie erkrankten Müttern und 0,40 in der Kontrollgruppe. Auch Gürdöl et al., 2004 konnte in ihrer Studie bei türkischen Müttern zeigen, dass das D-Allel mit 65,8 Prozent in der Präeklampsiegruppe signifikant häufiger vorkam als in der Kontrollgruppe, wo es nur eine Häufigkeit von 55,8 Prozent hatte, $p < 0,05$.

2005 untersuchten Kaur et al. in Indien mögliche Zusammenhänge zwischen dem DD-Genotyp des ACE Gen Polymorphismus und dem Gestationshypertonus. Sie konnten eine signifikante Erhöhung des DD-Genotyps bei schwangerschaftsinduzierter Hypertonie aufzeigen [Kaur 2005]. Zhu et al., konnten 1998 ebenfalls eine Erhöhung der D-Allel Frequenz und des DD-Genotypes bei schwangerschaftsinduzierten Hypertonieformen in einer Gruppe chinesischer Frauen finden. Auch Dizon-Townson et al. fanden 1995 in ihrer Studiengruppe aus Utah, USA ein höheres Auftreten des DD-Genotypes bei Präeklampsiepatientinnen, wie auch bei schwangeren Patientinnen mit chronischem Bluthochdruck.

Rigat et al. zeigten 1990, dass der Serum-ACE Spiegel deutlich vom ACE I/D Polymorphismus abhängt, homozygote DD Genotypen haben einen höheren ACE-Spiegel als II-Genotypen. Es existiert die Hypothese, dass eine Überexpression des D-Allel und somit eine höhere Aktivität des Angiotensin Converting Enzymes auch zu einem höheren Blutdruck und zur Ausbildung von Präeklampsie führt [Dizon 1995]. Wie oben genannt, finden sich diverse Studien welche eine erhöhte Inzidenz der Präeklampsie im Zusammenhang mit dem D-Allel finden konnten.

Candice Roberts et al. verwies in einer Studie von 2004 darauf, dass obwohl keine Assoziation des DD-Genotypes mit Präeklampsie gefunden werden konnte, eine signifikante Verminderung der II-Frequenz in der Gruppe mit Gestationshypertonus im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden wurde. Im Gegensatz hierzu stellte die Arbeitsgruppe um Mrozikiewicz 2001 eine Studie vor, bei der eine Erhöhung des I-Allels in der Gruppe polnischer Frauen mit schwangerschaftsinduzierter Hypertonie auftrat. In der hier vorgelegten Studie zeigte sich eine Erhöhung des I-Allels in der Gruppe mit Gestationshypertonus, II-Genotyp mit 6,2 Prozent und ID-Genotyp mit 7,0 Prozent der Gesamtstudiengruppe im Vergleich zu 3,6 Prozent mit DD-Genotyp. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht aufgezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie sind vergleichbar mit den Ergebnissen von zum Beispiel Galao et al., 2004. Sie untersuchten den ACE Gen Polymorphismus in einer Gruppe brasilianischer, schwangerer Frauen mit und ohne Präeklampsie. Sie konnten keine statistisch signifikante Assoziation zwischen ACE Genotypen und der Entwicklung einer Präeklampsie finden. Heiskanen et al., 2001 untersuchten in einer finnischen Gruppe den ACE Gen Polymorphismus hinsichtlich auftretender Schwangerschaftskomplikationen. Sie fanden eine ausgeglichene Verteilung des Polymorphismus zwischen Frauen mit Präeklampsie, der Kontrollgruppe und der Normalbevölkerung. Eine weitere Studie zur genetischen Beeinflussung der Pathogenese der Präeklampsie wurde von Kobashi et al. 2005 in Japan durchgeführt. In dieser Studie zeigte sich ebenfalls keine statistisch signifikante Variation der Genotypen, beziehungsweise der Allelfrequenzen zwischen Müttern mit und ohne Präeklampsie. Weitere Studien ohne signifikante Assoziation zwischen ACE I/D Polymorphismus und hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft wurden von Kim et al., 2004 in Korea, Morgan and Foster et al., 1999 in England und Tamura et al., 1996 in den USA vorgestellt.

Ein großer Teil, jedoch auf keinen Fall alle, der bisher veröffentlichten Arbeiten zur Assoziation des ACE I/D Polymorphismus mit schwangerschaftsinduzierten Hypertonieformen bis hin zur Präeklampsie, erbrachte ähnliche Ergebnisse wie unsere Studie – keine Assoziation von statistischer Relevanz.

In weiteren, größeren Studien sollte versucht werden, Licht in die pathophysiologischen Wege der Assoziationsergebnisse zu bringen.

4.3 Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Ergebnisse der bisher erfolgten Studien

International gesehen zeigen sich inkongruente Ergebnisse in der Suche des Einflusses des ACE I/D Gen Polymorphismus auf die Entstehung einer Präeklampsie. Was können die Ursachen hierfür sein?

Wenn man sich die unterschiedlichen Studien genauer anschaut, dann fällt eines sehr früh auf. Es handelt sich jeweils um Studiengruppen mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft. In verschiedenen Studien wurde herausgearbeitet, dass es zwischen den verschiedenen Rassen vielfältige Unterschiede in der Verteilung und der Varianz der Gene gibt [Lachmeijer 2002, Kobashi 2005]. In unserer Studiengruppe handelt es sich zum großen Teil um Mütter mit kaukasischem genetischem Hintergrund. Es zeigte sich eine Genotypverteilung wie oben genannt von II 16.8 Prozent, ID 51.4 Prozent und DD 31.8 Prozent. Die Allelfrequenzen lagen bei 0.575 für das D-Allel und 0.425 für das I-Allel. Dies entspricht der häufig beschriebenen Verteilung in der kaukasischen Bevölkerung [Morgan 1999, Heiskanen 2001]. Die Arbeitsgruppe um Kim et al., 2004 zeigte in einer koreanischen Population eine Allelfrequenz, welche genau umgekehrt zur bei uns beschriebenen ist, das D-Allel fand sich bei koreanischen Müttern zu 0.42 – 0.52, das I-Allel zu 0.48 – 0.58, ähnlich einer anderen koreanischen Studie von Hong et al., 1997. Dies zeigt deutlich die genetische Variationsbreite zwischen den verschiedenen ethnischen Ursprüngen und gibt einen Ansatzpunkt zur Erklärung der physiologischen und pathogenetischen Unterschiede. Johanning et al. veröffentlichte 1995 eine Arbeit, in der eine Assoziation des ACE I/D Polymorphismus mit der ethnischen Abstammung aufgezeigt wurde. Es wurde veranschaulicht, dass Japaner,

Yanomami Indianer und Samoaner eine höhere Frequenz des I-Allels haben, im Vergleich zu beispielsweise Australiern oder Europäern. Es wurde auch gezeigt, dass unterschiedliche Untersuchungen der gleichen Populationsgruppe, zum Beispiel von Europäern, ähnliche Verteilungsmuster offenbaren.

Da die Entwicklung einer Präeklampsie das Resultat einer komplexen Pathogenese aus genetischen Faktoren, ethnischer Herkunft, Verhaltensmustern und auch Umweltfaktoren zu sein scheint, spielen die Umweltfaktoren natürlich eine entscheidende Rolle. Der Lebensstil der verschiedenen, untersuchten Kollektive, zum Beispiel Japaner versus Mitteleuropäer versus Brasilianer ist in gewissen Grenzen recht unterschiedlich und beeinflusst somit auch die Ergebnisse der Studien [Kobashi 2005]. Die Untersuchungen, welche auf verschiedenen Kontinenten durchgeführt wurden, sind hinsichtlich ihrer Umgebungsfaktoren wie zum Beispiel Klima, geographische Gegebenheiten oder beispielsweise Kriegszustände unterschiedlich. Chesley LC konnte zeigen, dass diese Faktoren einen Einfluss auf die Entstehung einer Präeklampsie haben können, und somit Ergebnisse der verschiedenen Populationen unterschiedlich beeinflussen [Chesley LC 1984].

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sind die jeweiligen Einschlusskriterien in die Untersuchungsreihe. In diese Studie schlossen wir kontinuierlich alle Mütter ein, die in der Klinik für Geburtsmedizin der Universitätsklinik Charité, Campus Berlin Mitte zwischen Januar 2000 und April 2001 entbunden hatten. Somit ergab sich eine große Gruppe von Schwangeren (über 1000 Fälle), um auch kleine, klinisch messbare Effekte in einer Population von Frauen mit meistens normalen Schwangerschaften zu eruieren. Verschiedene Begleitfaktoren wie zum Beispiel Erstgebärende, Fettleibigkeit oder positive Familienanamnese für Bluthochdruckerkrankungen, von denen man weiß, dass diese Risikofaktoren für die Entstehung einer Präeklampsie sein können, beeinflussen das Studiendesign und somit auch die Studienergebnisse, je nachdem ob diese Faktoren bei den Studienteilnehmern vorhanden sind oder nicht [Kobashi 2001]. In verschiedenen Studien [Sibai 1995, Ros 1998] wurde das erhöhte Präeklampsieentstehungsrisiko bei vorbestehendem Hypertonus, Diabetes mellitus, Insulinresistenz und Zwillingsschwangerschaft bestätigt, wohingegen überraschend Zigarettenrauchen mit einem niedrigeren Risiko einherging. Wir untersuchten unsere Ergebnisse im Zusammenhang zum Alter, dem Body Mass

Index vor der Schwangerschaft, Zwillingschwangerschaften und erstgebärend in einer Kovarianzanalyse (ANCOVA). Es fanden sich keine unterschiedlichen Häufigkeiten bezüglich des ACE I/D Polymorphismus.

Ein nicht zu vernachlässigender Einflussfaktor auf die statistischen Möglichkeiten einer Studie ist die Gesamtzahl der ausgewählten Teilnehmerinnen. So ist die statistische Signifikanz nicht zuletzt häufig von der tatsächlichen Größe der Probandengruppe abhängig [Lachmeijer 2002, Roberts 2004]. In diese Studie nahmen wir 1068 Mütter auf, von diesen waren jedoch „nur“ 118 an Präeklampsie und / oder Gestationshypertonus erkrankt, was das zu betrachtende Kollektiv und die statistische Aussagekraft bezüglich des Endpunkts Präeklampsie / Gestationshypertonus schmälert.

4.4 Die Bedeutung des ACE I / D Polymorphismus für die Entwicklung des kindlichen Geburtsgewichts

Barker suggerierte in seiner 1997 veröffentlichten „Barker Hypothese“, dass sich bestimmte menschliche Föten in Utero auf ein limitiertes Nährstoffangebot einstellen müssten, und dass dies zu einer permanenten Veränderung ihrer Physiologie und ihres Stoffwechsels führen würde. Diese programmierten Veränderungen könnten die Grundlage vieler Erkrankungen im späteren Leben sein, so zum Beispiel von Bluthochdruckerkrankungen. Er veranschaulichte den Zusammenhang des Phänotyps „niedriges Geburtsgewicht“ mit verschiedenen Erkrankungen im weiteren Leben, so zum Beispiel Koronarer Herzkrankheit. Die Barker Hypothese wurde 1999 von Klebanoff et al. getestet und unterstützt. 2001 veröffentlichte Hochar et al. die „advanced fetal programming hypothesis“ – weiterentwickelte fetale Programmierung-Hypothese. In dieser wurde der Zusammenhang des 825T Allel des G-Protein $\beta 3$ mit vermindertem Geburtsgewicht aufgezeigt und die Hypothese erarbeitet, dass dieses 825T Allel somit ein Risikofaktor für spätere metabolische Systemerkrankungen ist. In dieser Arbeit schauten wir uns ebenfalls die Genotyp spezifische Verteilung des Geburtsgewichts an, um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des ACE I / D Polymorphismus auf die Entwicklung des kindlichen Geburtsgewichtes zu bekommen. Es zeigte sich eine leichte Tendenz zu niedrigerem Geburtsgewicht bei I-Allelträgern,

eine statistisch signifikante Variation der Geburtsgewichte fand sich jedoch nicht. Somit lässt sich keine Verbindung des ACE I / D Polymorphismus zur „advanced fetal programming hypothesis“ aufbauen.

5. Zusammenfassung

Schwangerschaftsinduzierte Hypertonieformen treten heutzutage bei 6-8 Prozent aller Schwangeren auf und zeichnen für einen bedeutenden Teil der mütterlichen Morbidität und Mortalität verantwortlich [Galao 2004]. Hypertonieerkrankte Schwangere haben ein hohes Risiko für potentiell tödliche Komplikationen. 15 Prozent aller Todesfälle bei Schwangeren (in den USA) werden mit Hypertonieerkrankungen in Verbindung gebracht. Eine der gravierendsten Bluthochdruckerkrankungen ist die Präeklampsie, definiert als Bluthochdruck über 140 mmHg systolisch und / oder 90 mmHg diastolisch und gleichzeitig auftretender Eiweißausscheidung über 300 mg im 24 Stundenurin. Präeklampsie ist ein systemisches Syndrom, deren vielfältigen Komplikationen lebensbedrohlich sein können. Sie kann sich bis hin zu zerebralen Krampfanfällen ausweiten – der Eklampsie. Die Pathogenese der Präeklampsie ist bis dato zu weiten Teilen unbekannt [Morgan L 1999, Redman 1991] und nach wie vor Thema vielfältiger Forschung. Es werden und wurden verschiedene genetische Modelle untersucht und verschiedene Pathogenesen favorisiert [Chesley L 1986, Boyd 1987, Arngrimsson 1990, Liston W 1991]. Viel Beachtung erhielt das sogenannte single-gene model, bei dem von einem einzelnen Gen ausgegangen wurde, welches für die Präeklampsie kodiert. Aufgrund der großen Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) für die Blutdruckregulierung [Ganten 1984, Lind 1985, Watt 1992, Bonnardeaux 1994] erscheint es annehmbar, dass eines der Kandidatengene für eine Substanz aus dem RAS kodiert. Der Angiotensin Converting Enzym I / D Polymorphismus könnte so ein Kandidatengen sein. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss des mütterlichen Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) Insertion / Deletion Polymorphismus auf Blutdruck und Proteinurie während der Schwangerschaft untersucht und die Frage gestellt, ob der ACE I / D Polymorphismus ein Risikofaktor für Präeklampsie ist ?

Es wurden die Genotypverteilung des ACE I/D Polymorphismus und die Allelfrequenz hinsichtlich der Präeklampsiemarker Blutdruck, Proteinurie und Ödeme untersucht. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich dieser Marker. Auch die Inzidenz von Gestationshochdruck und Präeklampsie war zwischen den Genotypen nicht statistisch signifikant different. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass der ACE Deletions Polymorphismus im Vergleich zum ACE Insertions Polymorphismus keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Entwicklung von

schwangerschaftsinduzierten Hypertonien in dieser kaukasischen Studiengruppe in Deutschland verursacht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Studien diverser Arbeitsgruppen [Tamura 1996, Morgan and Foster 1999, Heiskanen 2001, Kim 2004, Galao 2004, Kobashi 2005], jedoch auch im Widerspruch zu den Ergebnissen mancher anderer Arbeitsgruppen [Dizon-Townson 1995, Zhu 1998, Mrozikiewicz 2001, Choi 2004, Roberts 2004, Kaur 2005]. Ursachen hierfür sind in der komplexen Pathogenese der schwangerschaftsinduzierten Hypertonien zu finden, in den unterschiedlichen ethnischen Hintergründen, den unterschiedlichen Umwelt- und Lebensbedingungen und den unterschiedlichen Studiendesigns.

In der weiteren Erforschung der genetischen Grundlagen solcher komplexer Krankheitsbilder wird es in Zukunft noch mehr darauf ankommen, diese Faktoren zu berücksichtigen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdul-Karim R, Assali NS.
Pressor response to angiotensin in pregnant and non pregnant women.
Am J Obstet Gynecol 1961; 82:246-51.

2. Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D et al.
Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters.
Journal of Laboratory and Clinical Medicine 1991; 117:33-39.

3. American College of Obstetricians and Gynecologists.
Hypertension in pregnancy.
ACOG Technical Bulletin No.: 219. Washington, DC: The College; 1996. p. 1-8.

4. Arngrimsson R, Björnsson S, Geirsson RT, Björnsson H, Walker JJ, Snaedal G.
Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population.
Br J Obstet Gynaecol 1990; 97:762-9.

5. Arngrimsson R, Björnsson H, Geirsson R.
Analysis of different inheritance patterns in preeclampsia / eclampsia syndrome.
Hypertens Pregnancy 1995; 14:27-38.

6. August P, Lenz T, Ales KL, Druzin ML, Edersheim TG, Hutson JM et al.
Longitudinal study of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive pregnant women: deviations related to the development of superimposed preeclampsia.
Am J Obstet Gynecol 1990; 163:1612-21.

7. August P, Marcaccio B, Gertner JM, Druzin ML, Resnick LM, Laragh JH.
Abnormal 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in preeclampsia.
Am J Obstet Gynecol 1992; 166:1295-9.
8. Barden A, Beilin LJ, Ritchie J, Croft KD, Walters BN, Michael CA.
Plasma and urinary 8-iso-prostane as an indicator of lipid peroxidation in pre-eclampsia and normal pregnancy.
Clin Sci (Colch) 1996; 91:711-8.
9. Bardicef M, Bardicef O, Sorokin Y, Altura BM, Altura BT, Cotton DB et al.
Extracellular and intracellular magnesium depletion in pregnancy and gestational diabetes.
Am J Obstet Gynecol 1995; 172:1009-13.
10. Barker DJP.
Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life.
British Medical Bulletin 1997; 53(No.1):96-108.
11. Baylis C, Beinder E, Suto T, August P.
Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy.
Semin Nephrol 1998; 18:208-30.
12. Baylis C, Engels K.
Adverse interactions between pregnancy and a new model of systemic hypertension produced by chronic blockade of endothelial derived relaxing factor (EDRF) in the rat.
Clin Exp Hypertens (B Pregnancy) 1992; 11:117-29.
13. Begum S, Yamasaki M, Michizuki M.
Urinary levels of nitric oxide metabolites in normal pregnancy and preeclampsia.
J Obstet Gynaecol Res 1996; 22:551-9.

14. Belfort MA, Saade GR, Grunewald C, Dildy GA, Abedejos P, Herd JA et al.
Association of cerebral perfusion pressure with headache in women with pre-eclampsia.
Br J Obstet Gynaecol 1999; 106:814-21.
15. Bird IM, Magness RR, Mason JI & Rainey WE.
Angiotensin-II acts via the type 1 receptor to inhibit 17-alpha-hydroxylase cytochrome p450 expression in ovine adrenocortical cells.
Endocrinology 1992; 130:3113-21.
16. Bloem LJ, Manatunga AK, Pratt JH.
Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin I-converting enzyme activity.
Hypertension 1996; 27:62-66.
17. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tired L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F.
Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension.
Hypertension 1994 ; 24:63-69.
18. Bouba I, Makrydimas G, Kalaitzidis R, Lolis DE, Siamopoulos KC, Georgiou I.
Interaction between the polymorphisms of the renin-angiotensin system in preeclampsia.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003; 110:8-11.
19. Boyd PA, Lindenbaum RH, Redman CW.
Pre-eclampsia and trisomy 13: a possible association.
Lancet 1987; 2:425-7.
20. Brosens I, Robertson W, Dixon H.
The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. Obstet Gynecol Annu 1972; 1:177-91.

21. Brown MA, Buddle ML, Farrel T, Davis G, Jones M.
Randomised trial of management of hypertensive pregnancies by Korotkoff phase IV or phase V.
Lancet 1998; 352:777-81.
22. Brown MA, Hague WM, Higgins J, Lowe S, Mcowan L, Oates et al.
The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy, full consensus statement of recommendations from the Council of the Australasian Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ASSHP).
Aust N Z J Obstet Gynaecol 2000; 40:139-56.
23. Chesley L, Cooper DW.
Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women.
Br J Obstet Gynaecol 1986; 93:898-908.
24. Chesley LC.
History and epidemiology of preeclampsia-eclampsia.
Clin Obstet Gynecol 1984; 27:801-20.
25. Choi H, Kang JY, Yoon HS, Han SS, Whang CS, Moon IG et al.
Association of Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms with preeclampsia.
J Korean Med Sci 2004; 19:253-257.
26. Cooper WD, Liston WA.
Genetic control of severe pre-eclampsia.
J Med Genet 1979; 16:409-16.
27. Cushman DW, Cheung HS.
Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat.
Biochim Biophys Acta 1971, 250:261-65.

28. Davidge St, Signorella AP, Hubel CA, Lykins DL, Roberts JM.
Distinct factors in plasma of preeclamptic women increase endothelial nitric oxide or prostacyclin.
Hypertension 1996; 28:758-64.
29. Dizon-Townson D, Lempe I, Hastings S, Nelson LM, Varner M, Ward K.
A common genetic variant of the angiotensin converting enzyme is associated with both preeclampsia and chronic hypertension.
Am J Obstet Gynecol 1995; 172:374 [abstract].
30. Dux S, Aron N, Boner G, Carmel A, Yaron A, Rosenfeld JB.
Serum angiotensin convertin enzyme activity in normal adults and patients with different types of hypertension.
Ir J Med Sci 1984; 20:1138-42.
31. Elliot GTJ.
Case 120. Puerperal eclampsia in the eight month extraordinary family history.
New York: Appleton, 1873; p.291-93.
32. Erdös EG, Skidgel RA.
The Angiotensin I-Converting Enzyme.
Lab Invest 1987; 56:365-68.
33. Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI et al.
Angiotensin (1-7): a new hormone of the angiotensin system.
Hypertension 1991; 18(supplement III):III126-III133.
34. Ferrazzani S, De Carolis S, Pomini F, Testa AC, Mastromarino C, Caruso A.
The duration of hypertension in the puerperium of preeclamptic women: relationship with renal impairment and week of delivery.
Am J Obstet Gynecol 1994; 171:506-12.

35. Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD.
Hypertension in pregnancy: clinico-pathological correlations and remote prognosis.
Medicine 1981; 60:267-76.
36. Fitzgerald DJ, Rocki W, Murray R, Mayo G, FitzGerald GA.
Thromboxane A2 synthesis in pregnancy-induced hypertension.
Lancet 1990; 335:751-4.
37. Fox H.
The placenta in pregnancy hypertension.
In: Rubin PC, editor.
Handbook of hypertension, volume 10: hypertension in pregnancy.
New York: Elsevier, 1988; p.16-37.
38. Fuchs S, Frenzel K, Xiao HD, Adams JW, Zhao H, Keshelava G, Teng L, Bernstein KE.
Newly Recognized Physiologic and Pathophysiologic Actions of the Angiotensin-converting Enzyme.
Curr Hypertens Rep. 2004; 6(2):124-8.
39. Galao AO, de Souza LH, da Costa BE, Scheibe RM, Poli de Figueiredo CE.
Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in preeclampsia and normal pregnancy.
Am J Obstet Gynecol 2004; 191:821-24.
40. Gallery ED, Brown MA, Ross MR, Reiter L.
Diastolic blood pressure in pregnancy: phase IV or phase V Kortkoff sounds?
Hypertens Pregnancy 1994; 13:285-92.
41. Ganong WF.
The brain renin-angiotensin system.
Annual Review of Physiology 1984; 46:17-31.

42. Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC.
A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy.
J Clin Invest 1973; 52:2682-89.
43. Ganten D, Lang RE, Lehmann E & Unger T.
Brain angiotensin: on the way to becoming a wellstudied neuropeptid system.
Biochemical Pharmacology 1984; 33:3523-28.
44. Goran E.
Pre-eclampsia: a hypothesis for its pathogenesis.
Acta Obstet Gynecol Scand Suppl 1984; 118:7-11.
45. Gürdöl F, Isbilen E, Yilmaz H, Isbir T, Dirican A.
The association between preeclampsia and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism.
Clin Chim Acta 2004; 341:127-31.
46. Hamid KH, Castellon R.
A genetic variant of ACE increases cell survival: a new paradigm for biology and disease.
Biochemical and Biophysical Research Communications 2004; 318:187-91.
47. Harrison GA, Humphrey KE, Jones N, Badenshop R, Guo G, Elakis G et al.
A genomewide linkage study of preeclampsia / eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q.
Am J Hum Genet 1997; 60:1158-67.
48. Heiskanen JT, Pirskanen MM, Hiltunen MJ, Punnonen KR, Heinonen ST.
Insertion-deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is associated with obstetric cholestasis but not with preeclampsia.
Am J Obstet Gynecol 2001; 185:600-3.

49. Helewa ME, Burrows RF, Smith J, Williams K, Brain P, Rabkin SW.
Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference:
1. Definitions, evaluation and classification of Hypertensive disorders in
pregnancy.
CMAJ 1997; 157:715-25.
50. Hocher B, Slowinski T, Bauer C, Halle H.
The advanced fetal programming hypothesis.
Nephrol Dial Transplant 2001; 16:1298-99.
51. Hong SH, Kang BY, Park WH, Kim JQ, Lee CC.
Genomic variation of the angiotensin-converting enzyme gene: increased
frequency of the insertion allele in Koreans.
Clin Genet 1997; 51:35-8.
52. Howard TE, Shai S-Y, Langford KG et al.
Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated
within the 12th intron of the somatic ACE gene.
Molecular and Cell Biology 1990; 10:4294-302.
53. Hubel CA, Kagan VE, Kisin ER, McLaughlin MK, Roberts JM.
Increased ascorbate radical formation and ascorbate depletion in plasma
from women with preeclampsia: complications for oxidative stress.
Free Radic Biol Med 1997; 23:597-609.
54. Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rogers GM, McLaughlin MK.
Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia.
Am J Obstet Gynecol 1989; 161:1025-34.
55. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F.
Structure of the Angiotensin I-converting Enzyme Gene. Two alternate
promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene.
The Journal of Biological Chemistry 1991; 266:15377-83.

56. Johenning AR, Barron WM.
Indirekt blood pressure measurement in pregnancy; Karotkoff phase 4 versus phase 5.
Am J Obstet Gynecol 1992; 167:577-80.
57. Johanning GL, Johnston KE, Tamura T, Goldenberg RL.
Ethnic differences in angiotensin-converting enzyme gene polymorphism.
J Hyperten 1995; 13:710-1.
58. Kaur R, Jain V, Khuller M, Gupta I, Sherawat BS.
Association of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with pregnancy-induced hypertension.
Acta Obstet Gynecol Scand 2005; 84:929-33.
59. Kim YJ, Park MH, Park HS, Lee KS, Ha EH, Pang MG.
Associations of polymorphisms of the angiotensinogen M235 polymorphism and angiotensin-converting-enzyme intron 16 insertion / deletion polymorphism with preeclampsia in Korean women.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; 116:48-53.
60. Klebanoff MA, Secher NJ, Mednick BR, Schulsinger C.
Maternal size at birth and the development of hypertension during pregnancy: a test of the Barker hypothesis.
Arch Intern Med 1999; 159:1607-12.
61. Kobashi G, Hata A, Shido K, Ohta K, Yamada H, Kato EH et al.
Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and preeclampsia in Japanese patients.
Semin Thromb Hemost 2005; 31:346-50.

62. Kobashi G, Shido K, Hata A, Yamada H, Kato E-H, Kanamori M, Fujimoto S, Kondo K.
Multivariate analysis of genetic and acquired factors; T235 variant of the angiotensinogen gene is a potent independent risk factor for preeclampsia.
Semin Thromb Hemost 2001; 27:143-47.
63. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R.
A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts.
Science 1990; 248:220-3.
64. Krulewicz AH, Baur WE, Fanburg BL.
Am J Physiol 1984; 247:C163-C168.
65. Kyle PM, Clark SJ, Buckley D, Kissane J, Coats AJ, De Swiet M et al.
Second trimester ambulatory blood pressure in nulliparous pregnancy: a useful screening test for pre-eclampsia?
Br J Obstet Gynaecol 1993; 100:914-9.
66. Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse J, ten Kate L, Arngrimsson R.
Searching for preeclampsia genes: the current position.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002; 105:94-113.
67. Levine RJ.
Should the definition of preeclampsia include a rise in diastolic blood pressure > 15 mm Hg?
Am J Obstet Gynecol 2000; 182:225.
68. Lind RW, Swanson LW & Ganten D.
Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system.
Neuroendocrinology 1985; 40:2-24.

69. Lindpaintner Klaus, Pfeffer Marc A., Kreutz Reinhold, Stampfer Meir J., Grodstein Francine, LaMotte Fran, Buring Julie, Hennekens Charles H.
A Prospective Evaluation of an Angiotensin-Converting-Enzyme Gene Polymorphism and the Risk of Ischemic Heart Disease.
N Engl J Med 1995; 332(11):706-711.
70. Liston WA, Kilpatrick DC.
Is genetic susceptibility to pre-eclampsia conferred by homozygosity for the same single recessive gene in mother and fetus?
Br J Obstet Gynaecol 1991; 98:1079-86.
71. Long PA, Abell DA, Beischer NA.
Importance of abnormal glucose tolerance (hypoglycemia and hyperglycemia) in the etiology of pre-eclampsia.
Lancet 1977; 1:923-5.
72. Lorentzen B, Birkeland KI, Endresen MJ, Henriksen T.
Glucose intolerance in women with preeclampsia.
Acta Obstet Gynecol Scand 1998; 77:22-7.
73. Lopez MC, Belizan JM, Villar J, Bergel E.
The measurement off diastolic blood pressure during pregnancy: which Korotkoff phase should be used?
Am J Obstet Gynecol 1994; 170:574-8.
74. Main E, Chiang M, Colbern G.
Nulliparous preeclampsia (PE) is associated with placental expression of a variant allele of the new histocompatibility gene: HLA-G [abstract].
Am J Obstet Gynecol 1994; 170:289.
75. Miller S, Dykes D, Polesky G.
Simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucl Acids Res 1988; 16:1215.

76. Mills JL, DerSimonian R, Raymond E, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Clemens JD et al.
Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study.
JAMA 1999; 282:356-62.
77. Molnar M, Suto T, Toth T, Hertelendy F.
Prolonged blockage of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterin growth retardation.
Am J Obstet Gynecol 1994; 170:1458-66.
78. Morgan L, Foster F, Hayman R, Crawshaw S, Baker PN, Broughton PF et al.
Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and pre-eclamptic pregnancies.
J Hypertens 1999; 17:765-68.
79. Morgan T, Craven C, Lalouel JM, Ward K.
Angiotensinogen Thr235 variant is associated with abnormal physiologic change of the uterine spiral arteries in first-trimester decidua.
Am J Obstet Gynecol 1999; 180:95-102.
80. Mrozikiewicz A, Drews K, Chmara E, Mrozikiewicz A.
Polymorphism of gene angiotensin converting enzyme in pregnancy induced hypertension.
Ginekol Pol 2001; 72:605-10 [abstract].
81. Mullis KB, Faloona FA.
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol 1987; 155:335-50.

82. Naftilan AJ, Gilliland GK, Eldridgs CS & Kraft AS.
Induction of the proto-oncogene c-jun by angiotensin II.
Molecular and Cell Biology 1990; 10:5536-40.
83. National High Blood Pressure Education Program Working Group.
Report of the National High Blood Pressure Education
Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy.
Am J Obstet Gynecol 2000; 183:S1-S22.
84. North RA, Taylor RS, Schellenberg JC.
Evaluation of a definition of pre-eclampsia.
Br J Obstet Gynaecol 1999; 106:767-73.
85. Nielsen AH, Schauser KH, Poulsen K.
Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system.
Placenta 2000; 21:468-77.
86. Ohno Y, Kawai M, Wakahara Y, Kitagawa T, Kakihara M, Arii Y.
Transcranial assessment of maternal cerebral blood flow velocity in
patients with pre-eclampsia.
Acta Obstet Gynecol Scand 1997; 76:928-32.
87. Perry IJ.
Diastolic blood pressure during pregnancy; phase IV or phase V Korotkoff
sounds? [letter]
Hypertens Pregnancy 1996; 15:139-41.
88. Peters, J.
Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensin.
Baillieres Clin Endocrinol Metab 1995; 9:657-78.

89. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson W, Brosens I.
Trophoblastic invasion of human decidua from 8 – 18 weeks of pregnancy.
Placenta 1980; 1:3-19.
90. Pijnenborg R.
Trophoblast invasion and placentation in the human: morphological aspects.
Trophoblast Res 1990; 4:33-47.
91. Poranen AK, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M.
Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies.
Placenta 1996; 17:401-5.
92. Redman CW.
Current topics. Preeclampsia and the placenta.
Placenta 1991; 12:301-8.
93. Richards A, Graham D, Bullock R.
Clinicopathological study of neurological complications due to hypertensive disorders of pregnancy.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 1988; 51:416-21.
94. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F.
An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.
J Clin Invest 1990; 86:1343-46.
95. Roberts CB, Rom L, Moodley J, Pegoraro RJ.
Hypertension-related gene polymorphisms in pre-eclampsia, eclampsia and gestational hypertension in Black South African women.
J Hypertens 2004; 22:945-48.

96. Roberts JM.
Endothelial dysfunction in preeclampsia.
Semin Reprod Endocrinol 1998; 16:5-15.
97. Roberts JM, Edep ME, Goldfien A, Taylor RN.
Sera from preeclamptic women specifically activate human umbilical vein endothelial cells in vitro. Morphological and biochemical evidence.
Am J Reprod Immunol 1992; 27:101-8.
98. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK.
Preeclampsia: an endothelial cell disorder.
Am J Obstet Gynecol 1989; 161:1200-4.
99. Robertson WB, Brosens I, Dixon G.
Maternal uterine vascular lesions in the hypertensive complications of pregnancy. In: Lindheimer MD, Katz AI, Zuspan FP, editors.
Hypertension in pregnancy. New York: John Wiley; 1976; p.115-29.
100. Ros HS, Cnattingius S, Lipworth L.
Comparison of risk factors for preeclampsia and gestational hypertension in a population-based cohort study.
Am J Epidemiol 1998; 147:1062-70.
101. Sadoshima J, Xy Y, Slayter HS & Izumo S.
Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hyperthrophy of cardiac myocytes in vitro.
Cell 1993; 75:977-84.
102. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB et al.
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science 1985; 230(4732):1350-54.

103. Schobel HP, Fischer T, Heuszer K, Geiger H, Schmieder RE.
Preeclampsia – a state of sympathetic overactivity.
N Engl J Med 1996; 335:1480-5.
104. Seely EW, Wood RJ, Brown EM, Graves SW.
Lower serum ionized calcium and abnormal calciotropic hormone levels in pre-eclampsia.
J Clin Endocrinol Metab 1992; 74:1436-40.
105. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB.
The role of nitric oxide (NO) in the pathogenesis of preeclampsia.
Am J Obstet Gynecol 1994; 171:944-8.
106. Sheehan HL, Lynch JB.
Pathology of toxæmia of pregnancy.
London: Churchill Livingstone 1973.
107. Sibai BM, Ewell M, Levine RJ, Klebanoff MA, Esterlitz J, Catalano PM et al.
Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women.
The Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group.
Am J Obstet Gynecol 1997; 177:1003-10.
108. Sibai BM, Gordon T, Thom E, Caritis SN, Klebanoff M, McNellis D et al.
Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units.
Am J Obstet Gynecol 1995; 172:642-8.
109. Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP.
The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme.
J Exp Med 1956; 103:295-99.

110. Solomon CG, Graves SW, Greene MF, Seely EW.
Glucose intolerance as a predictor of hypertension in pregnancy.
Hypertension 1994; 23:717-21.
111. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C et al.
Two putative active centers in human angiotensin I converting enzyme revealed by molecular cloning.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1988; 85:9386-90.
112. Soubrier F, Hubert C, Testut P et al.
Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme. I. Biochemistry and structure of the gene.
Journal of Hypertension 1993; 11:471-76.
113. Tamura T, Johanning GL.
Effect of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on pregnancy outcome, enzyme activity and zinc concentration.
Obstet Gynecol 1996; 88:497-502.
114. Taylor RN.
Review: immunobiology of preeclampsia.
Am J Reprod Immunol 1997; 37:79-86.
115. Taylor RN, Casal DC, Jones LA, Varma M, Martin JN Jr, Roberts JM.
Selective effects of preeclamptic sera on human endothelial cell procoagulant protein expression.
Am J Obstet Gynecol 1991; 165:1705-10.
116. Tired L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F et al.
Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels.
Am J Hum Genet 1992; 51:197-205.

117. Urata H, Kinoshita A, Misono KS et al.
Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II –
forming enzyme in the humane heart.
Journal of Biological Chemistry 1990; 265:22348-57.
118. Velletri PA, Aquilano DR, Bruckwick E, Tsai-Morris CH, Dufau ML, Lovenberg
W.
Endocrinology 1985; 116:2516-22.
119. Walsh SW.
Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane
production.
Am J Obstet Gynecol 1985; 152:335-40.
120. Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR,
Connor JM, Lever AF, Fraser R.
Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin
system: a four-corners approach to the identification of genetic
determinants of blood pressure.
J Hypertens 1992; 10:473-82.
121. Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P & Clauser E.
The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme
are both catalytically active.
Journal of Biological Chemistry 1991; 266:9002-8.
122. Zhou Y, Damsky Ch, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ.
Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion
molecules by invasive cytotrophoblasts.
J Clin Invest 1993; 91:950-60.

123. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M et al.
Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate:
a strategy for successful endovascular invasion?
J Clin Invest 1997; 99:2139-51.
124. Zhu M, Xia Y, Cheng W.
Study on a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme
gene in pregnancy induced hypertension.
Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 1998; 33:83-5 [abstract].

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ACE	-	Angiotensin Converting Enzym
ANOVA	-	Varianzanalyse
ANCOVA	-	Kovarianzanalyse
ATP	-	Adenosintriphosphat
Bp	-	Basenpaare
CTP	-	Cytidintriphosphat
dsDNA	-	Doppelstrangdesoxyribonukleinsäure
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	-	Desoxyribonukleosintriphosphat
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
GTP	-	Guanosintriphosphat
I / D	-	Insertion / Deletion
ICD-10	-	Internationale Klassifikation der Krankheiten 10
PCR	-	Polymerasekettenreaktion
TTP	-	Thymidintriphosphat
U	-	Umdrehung
uv	-	Ultraviolett

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Veröffentlichung:

Einige Ergebnisse wurden schon vorab veröffentlicht:

Pfab T, Stirnberg B, Sohn A, Krause K, Slowinski T, Godes M, Guthmann F, Wauer R, Halle H, Hoher B.

Impact of maternal angiotensinogen M235T polymorphism and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy.

J Hypertens 2007 Jun; 25(6):1255-61.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Berthold Hocher und Herrn PD Dr. med. Thiemo Pfab möchte ich für die Anregung des Dissertations-Themas und die Unterstützung in der Ausführung der Arbeit herzlich danken.

Dem Forschungsteam im „Mutter-Kind-Projekt“, im Besonderen Rolf Kraus, Sophia Hügler, Bulza Stirnberg und Dr. med. Torsten Slowinski möchte ich für die konstruktive und kommunikative Zusammenarbeit meinen ausdrücklichen Dank sagen.

Den freundlichen Mitarbeiterinnen der medizinischen Bibliothek des Klinikum Chemnitz möchte ich für die ausführliche Hilfe bei der Literaturrecherche danken.

Meiner Frau Dr. med. Andrea Sohn danke ich für die Hilfe bei der Layoutgestaltung und ganz besonders für Ihre Geduld.

Ausgesprochen großen Dank möchte ich meinen Eltern Ester und Dr. med. Ulrich Sohn sagen. Sie haben mich mit großer Zuneigung unterstützt und mir ein sorgenfreies Studium, sowie diese Dissertation ermöglicht. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Andreas Sohn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss des mütterlichen Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) Insertion / Deletion Polymorphismus auf Blutdruck und Proteinurie während der Schwangerschaft“, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Chemnitz, den 30.08.2010

Andreas Sohn