

Aus dem Institut für Pharmakologie/Center for Cardiovascular Research

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Zusammenhang zwischen dem eNOS Polymorphismus im Intron 4 a/b und dem
Blutdruck und der Eiweißausscheidung der Schwangeren, sowie dem
Geburtsgewicht des Kindes**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Jenny Repey, geb. Reichelt

aus Spremberg

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Einleitung	6
1.1. Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft	7
1.1.1. Chronische Hypertonie	7
1.1.2. Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie	7
1.1.3. Präeklampsie-Eklampsie	8
1.1.4. Pfropfgestose	8
1.2. Anpassung der Herz- und Kreislauffunktion an die Schwangerschaft	9
1.3. Pathogenese der schwangerschaftsinduzierten Hypertonie und Präeklampsie	10
1.3.1. Remodeling der Spiralarterien	10
1.3.2. Erklärungsmodell zur Pathogenese der SIH und Präeklampsie	11
1.4. Endotheliale Nitritoxid-Synthase (eNOS)	13
1.4.1. Aufbau und Wirkung der eNOS	13
1.4.2. Wirkung der endothelialen NO-Synthase auf die Blutdruckregulation	13
1.4.3. Wirkung der endothelialen NO-Synthase auf die Blutdruckregulation in der Schwangerschaft	14
1.4.4. Genpolymorphismus der eNOS Synthase im Intron 4	14
1.4.5. eNOS Intron 4 assoziierte Krankheiten des Herzkreislaufsystems	16
1.5. Fetale Programmierung kardiovaskulärer Erkrankungen	16
1.5.1. Konzept der fetalen Programmierung	16
1.5.2. Die “Advanced fetal programming” Hypothese	18
1.6. Aufgabenstellung der Dissertation	19
2. Material und Methoden	19
2.1. Methoden	19
2.1.1. Studiendesign	19
2.1.2. Isolation der menschlichen DNA aus dem Vollblut	20
2.1.3. PCR-Amplifikation	21
2.1.4. Elektrophorese	22
2.2. Verwendete Materialien	23
2.2.1. Puffer und Lösungen	23
2.2.2. Reagenzien	24
2.2.3. Instrumente	25
2.3. Statistik	26
3. Ergebnisse	26
3.1. Daten des Studienprotokolls	26

3.2.	Frequenz der Allele des Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b	27
3.3.	Systolischer und diastolischer Blutdruck, Proteinausscheidung und Ödeme während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b	29
3.3.1.	Systolischer Blutdruck während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b	29
3.3.2.	Diastolischer Blutdruck während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps	30
3.3.3.	Proteinausscheidung während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps	31
3.3.4.	Ödeme während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps	33
3.3.5.	Schwangerschaftshypertonus und Präeklampsie in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps	33
3.4.	Geburtsgewicht in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps.....	33
4.	Diskussion	34
4.1.	Häufigkeit der Allelfrequenz im Vergleich zu anderen Studien	34
4.2.	Genetische Prädisposition der schwangerschaftsinduzierten hypertensiven Erkrankungen am Beispiel der Präeklampsie	34
4.3.	Einfluss des Genpolymorphismus eNOS Intron 4 a/b auf schwangerschaftsinduzierte hypertensive Erkrankungen.....	36
4.4.	Multifaktorielle Ursachen in der Pathogenese der schwangerschaftsbedingten hypertensiven Erkrankungen insbesondere der Präeklampsie	38
4.5.	Einfluss des maternalen Genpolymorphismus eNOS Intron 4 a/b auf das Geburtsgewicht	39
4.6.	Theorien zur Wirkungsweise eines Introns.....	40
5.	Zusammenfassung.....	42
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	44
7.	Literaturverzeichnis.....	45
8.	Eidesstattliche Versicherung.....	56
9.	Lebenslauf.....	57
10.	Veröffentlichungen.....	58
11.	Danksagung	59

Abstrakt

Man vermutet, dass hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft unter anderem durch Störungen der mütterlichen Immuntoleranz gegenüber dem Feten sowie durch Störungen der Plazentaentwicklung und -perfusion ausgelöst werden. In zahlreichen Studien wurde der Verdacht geäußert, dass Polymorphismen im Gen der endothelialen NO-Synthase eine Rolle bei der Entstehung von Gestationshypertonus und Präeklampsie spielen könnten. Ziel dieser Dissertation war es, den Einfluss des eNOS 4 a/b Genpolymorphismus auf Marker der Präeklampsie wie Blutdruck, Proteinausscheidung und Ödembildung in der Schwangerschaft zu untersuchen. Es erfolgte die Typisierung des eNOS Polymorphismus im Intron 4 a/b mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Es konnte anhand einer großen Teilnehmerzahl an schwangeren Kaukasierinnen (n=2186) gezeigt werden, dass der untersuchte Genpolymorphismus eNOS Intron 4 a/b allein keinen signifikanten Einfluss auf die Blutdruckregulation, die Proteinausscheidung und die Entwicklung von Ödemen während der Schwangerschaft ausübt. Des Weiteren konnten wir in unserer Studie keinen Zusammenhang zwischen dem untersuchten maternalen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b und dem kindlichen Geburtsgewicht im Sinne der „advanced fetal programming hypothesis“ feststellen. Im Gegensatz zu pathophysiologischen Gesichtspunkten und den Ergebnissen von zahlreichen kleineren Studien, scheinen die Auswirkungen des eNOS Genpolymorphismus im Intron 4 a/b allein nicht stark genug zu sein, um messbare Veränderungen bei Schwangeren und ihren Neugeborenen zu verursachen.

Abstract

Impact of eNOS polymorphism in intron 4 a/b on blood pressure, protein excretion, new-onset peripheral edema and fetal birth weight during pregnancy

Impaired maternal immune tolerance towards the fetus and impaired placental development and perfusion are postulated to play a role in the pathophysiology of hypertensive diseases in pregnancy. Our study was performed in order to analyze the impact of the eNOS intron 4 a/b gen polymorphism, assumed to be involved in placentation and hemodynamics, on markers of preeclampsia like blood pressure, protein excretion and edema. A large number of Caucasian women (n=2186) were included into our study after delivery and genotyped for the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in intron 4 a/b. We found no differences of mean blood pressure, protein excretion or new-onset peripheral edema during pregnancy among the different genotypes. The investigated maternal polymorphism has no impact on the fetal birth weight. Our study showed for a large number of Caucasian women that the maternal polymorphism of the eNOS intron 4 a/b is not related to clinical markers of preeclampsia. This single polymorphism does not seem to be strong enough to affect blood pressure regulation during pregnancy.

1. Einleitung

Bluthochdruck ist mit einer Inzidenz von 5 bis 10 % weltweit eine der häufigsten Erkrankungen in der Schwangerschaft und steht im Zusammenhang mit mütterlicher und kindlicher Morbidität und erhöhter Mortalität.¹ Vor allem eine Präeklampsie, welche circa 3-5 % aller Schwangerschaften betrifft, kann schwerwiegende mütterliche und kindliche Erkrankungen wie Frühgeburt, vorzeitige Plazentalösung, geringes Geburtsgewicht bis hin zum intrauterinen Kindstod verursachen.^{2,3} Hypertonus während der Schwangerschaft, unabhängig vom Typ des Bluthochdrucks, geht mit einem stark erhöhten mütterlichen Risiko für spätere kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall, chronische Erkrankungen der Niere und Diabetes mellitus einher.^{4,5} Weltweit sind Präeklampsie und Eklampsie mit einem Anteil von 12 % die dritthäufigste Ursache maternaler Mortalität.⁶ Auf kindlicher Seite verursacht eine Präeklampsie vermehrt intrauterine Wachstumsretardierungen (IUGR), eine vorzeitige Entbindung und ein niedriges Geburtsgewicht.⁷ 15 % aller Frühgeburten sind indizierte frühzeitige Entbindungen aufgrund einer Präeklampsie.⁸ Präeklampsie verursacht 12 % der IUGR und wiederum 20 % dieser Kinder werden zu früh geboren.⁹ Neonatologische Intensivüberwachung ist damit erforderlich, was wiederum erklärt, dass circa 20 % der Ausgaben der Neonatologie durch die Präeklampsie verursacht werden.¹⁰ Neugeborene mit niedrigem Geburtsgewicht weisen überdies ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im späteren Leben auf.¹¹ Man vermutet, dass hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft unter anderem durch Störungen der Plazentaentwicklung und -perfusion ausgelöst werden. In zahlreichen Studien wurde der Verdacht geäußert, dass Polymorphismen im Gen der endothelialen NO-Synthase eine Rolle bei der Entstehung von Gestationshypertonus und Präeklampsie spielen könnten.^{12,13,14} Bei der Regulation des Vasotonus spielt Stickstoffmonoxid als stärkster endogener Dilator eine entscheidende Rolle. Man konnte nachweisen, dass die NO-Synthase während der Schwangerschaft in verschiedenen maternalen Geweben erhöht ist.^{15,16} Des Weiteren kann durch Hemmung der NO-Synthase ein präeklampsieähnliches Syndrom verursacht werden.^{17,18} Diese und andere Studien legen nahe, dass Polymorphismen der endothelialen NO-Synthase (NOS3), welche die NO-Verfügbarkeit vermindern, eine Prädisposition für hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft darstellen.¹⁹ Ziel dieser Dissertation war es, den Einfluss des eNOS Polymorphismus im Intron 4 a/b auf die Blutdruckregulation, die Proteinausscheidung und die Ödembildung in der Schwangerschaft zu untersuchen. Des

Weiteren wurde beobachtet, ob der untersuchte Genpolymorphismus Einfluss auf das Geburtsgewicht beim Neugeborenen hat.

1.1. Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft

Die aktuell geltende Einteilung von hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft wurde von der „National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy“ ausgearbeitet.^{20,21} Nach der aktuellen Klassifikation spricht man ab einem systolischen Wert von ≥ 140 mmHg und einem diastolischen Wert von ≥ 90 mmHg von Bluthochdruck. Eine Proteinurie liegt bei $> 0,3$ g/l im 24h-Sammelurin vor.

1.1.1. Chronische Hypertonie

Eine chronische Hypertonie ist eine Hypertonie, die bereits vor der Konzeption, vor der 20. SSW oder länger als 12 Wochen postpartal besteht. Meist verschlechtert sich der Blutdruck im Zuge der Schwangerschaft. Die meisten Patientinnen haben einen primären Hypertonus, einige weisen aber auch Erkrankungen der Niere oder andere Ursachen auf. Das wiederum erhöht die Risiken für eine Präeklampsie, Frühgeburt, intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR), vorzeitige Plazentalösung, Herzinsuffizienz und akutes Nierenversagen während der Schwangerschaft.^{2,3}

1.1.2. Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie

Eine schwangerschaftsinduzierte Hypertonie ist eine Hypertonie ohne Proteinurie, die sich erst nach der 20. SSW entwickelt. Man unterscheidet die vorübergehende Hypertonie, bei welcher sich der Blutdruck nach spätestens 12 Wochen postpartal normalisiert hat. Bei der chronischen Hypertonie bleibt der Bluthochdruck auch nach der 12. postpartalen Woche bestehen. Man spricht von einem schwangerschaftsinduzierten Hypertonus ab einem systolischen Blutdruck von 140 mmHg und/oder einem diastolischen Druck von wenigstens 90 mmHg bei mindestens zwei Messungen nach der 20. SSW, welche 4 bis 6 Stunden auseinander liegen müssen. Außerdem sollten diese Frauen bis zur 20. SSW normotensiv gewesen sein und der Blutdruck muss sich bis spätestens zur 12. postpartalen Woche normalisiert haben. Der diastolische Blutdruck wird dabei nach Korotkoff (Phase V) bestimmt.

1.1.3. Präeklampsie-Eklampsie

Eine Präeklampsie ist eine Hypertonie, die sich erst nach der 20. SSW entwickelt, mit einer zusätzlich neu aufgetretenen Proteinurie von mindestens 300 mg Protein im 24 h-Sammelurin. Falls ein 24 h-Sammelurin nicht möglich ist, spricht man ab einem Wert von 30 mg/dl in zwei Urinproben von mindestens 6 Stunden Abstand von Proteinurie. Der klinische Verlauf der Multisystemerkrankung Präeklampsie ist komplex, wobei der Zeitpunkt des Auftretens sowie das Vorliegen einer Plazentainsuffizienz entscheidende Einflussfaktoren darstellen.²² Als Risikofaktoren für die Präeklampsie gelten ein Alter der Mutter über 34, Nulliparität, vorherige Präeklampsie, positive Familienanamnese für Präeklampsie, Mehrlingsgravidität, präexistente Erkrankungen wie insulinabhängiger Diabetes mellitus, Hypertonus, Nierenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Antiphospholipidsyndrom. Außerdem steigt das Risiko, je mehr Zeit zwischen mehreren Schwangerschaften liegt und je höher der prägravide Body Mass Index (BMI) der Mutter ist.²³ Von einem HELLP-Syndrom spricht man bei nachgewiesener Hämolyse (H), erhöhten Leberenzymen (EL) und Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl unter 100×10^9 Zellen/l). Eine gefürchtete Komplikation der Präeklampsie stellt die Eklampsie dar. Es kommt zu tonisch-klonischen Anfällen, welchen oft starke Kopfschmerzen, Unruhezustände, Sehstörungen oder sogenannte Auren vorhergehen. Meist tritt eine Eklampsie während der Schwangerschaft oder Geburt auf, doch zu circa 33 % kommt sie während der ersten 48 Stunden nach der Geburt zum Tragen.²⁴

Laut eines Berichtes vom 15.11.2013 des *American College of Obstetricians and Gynecologists* gilt die Proteinurie nicht mehr als zwingendes diagnostisches Kriterium für die Präeklampsie. Demzufolge spricht man von einer Präeklampsie bei vorliegendem Hypertonus in der Schwangerschaft in Kombination mit Thrombozytopenie, pathologischen Leberenzymen, neu aufgetretene Niereninsuffizienz, Lungenödem oder neu aufgetretenen Sehstörungen oder ZNS-Auffälligkeiten. Diese neue Definition ist aber zu diesem Zeitpunkt noch nicht in den deutschen Leitlinien zu finden.²⁵

1.1.4. Pfropfgestose

Dabei handelt es sich um eine neu aufgetretene oder plötzlich verschlechterte Proteinurie, einem plötzlichen Anstieg des Blutdruckes, dem Auftreten einer Thrombozytopenie oder erhöhten Leberenzymen nach der 20. SWW bei einer Frau mit bereits vorbestehender Hypertonie.

1.2. Anpassung der Herz- und Kreislauffunktion an die Schwangerschaft

Beginnend mit der Nidation der befruchteten Eizelle kommt es zu physiologischen Veränderungen des weiblichen Körpers. Durch Aktivierung verschiedener Blutdruckregulationsmechanismen zeigt sich initial ein Abfall des peripheren Gefäßwiderstandes. Dies führt wiederum zu einer peripheren Vasodilatation, welche man bereits ab der 6. SSW feststellen kann. Des Weiteren findet man eine Pulsfrequenzerhöhung von etwa 65 auf 80 Schläge/Minute. Es kommt zu einer Verminderung der Nierendurchblutung, wodurch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert wird. So erfolgt die Zunahme der Natriumrückresorption aus der Niere. Die erhöhte Flüssigkeitsretention führt zu einem deutlich vermehrten Blutvolumen. Bis zur 20. SSW steigt das Herzminutenvolumen von circa 4 auf 6 l/min. Der Anstieg des Herzzeitvolumens führt zu einer vermehrten Nierendurchblutung. Die glomeruläre Filtrationsrate steigt um circa 40 %. Zur Vermeidung eines Flüssigkeitsverlustes wird nun die tubuläre Rückresorption von vor allem von Natriumchlorid gesteigert. Auch andere Transportsysteme, wie zum Beispiel für Glukose oder Protein, steigern ihre Rückresorption erheblich, können aber zum Teil nicht alles rückresorbieren. Die Urin-Stix-Untersuchungen auf Protein können wegen häufig falsch positiven Ergebnissen nur auf eine Präeklampsie hinweisen, müssen aber z.B. durch einen 24 h-Sammelurin verifiziert werden. Für die Verlaufskontrolle genügen wiederholte Urin Stick-Messungen.^{26,27}

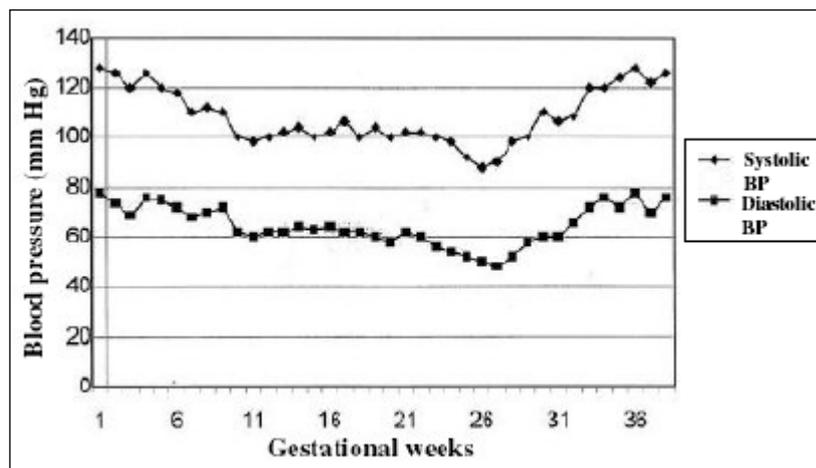


Abb. 1. Blutdruckverlauf während einer normalen Schwangerschaft, gemessenen in sitzender Position. Diastolischer Wert nach Korotkoff V. Diese Abbildung stammt aus Pridjian und Puschett, *Obstet Gynecol Surv* 2002.²⁸

Wie bereits erwähnt führen diese physiologischen Veränderungen im Normalfall zu einem Blutdruckabfall während der Schwangerschaft. Schon in der 7. SSW sinkt der Blutdruck messbar, erreicht seinen Tiefpunkt zwischen der 16. und 20. SSW, steigt ab der 28. SSW wieder an und erreicht am Ende des dritten Trimesters die Ausgangswerte vor der Schwangerschaft (*Abbildung 1*). Die Durchschnittswerte des Blutdruckes im ersten Trimester im Sitzen betragen systolisch 103 ± 10 mmHg und diastolisch 56 ± 10 mmHg. Im dritten Trimester findet man einen systolischen Wert von 109 ± 12 mmHg und diastolisch von 69 ± 9 mmHg.²⁸

1.3. Pathogenese der schwangerschaftsinduzierten Hypertonie und Präeklampsie

1.3.1. Remodeling der Spiralarterien

Die uteroplazentaren Gefäße im engeren Sinne liegen innerhalb der Uteruswand. Den Arkaden- oder Kranzarterien, die durch multiple Anastomosen gekennzeichnet sind, entspringen die Radialarterien, die das Myometrium radiär durchdringen. Sie geben einerseits Basilarterien zum basalen Endometrium ab, andererseits zwei oder mehr helixartig gewundene Spiralarterien, die im Bereich der Plazenta offen in den intervillösen Raum münden. Bei einer gesunden Schwangerschaft dringen Zytotrophoblastenzellen in die mütterliche Dezidua bis zum ersten Drittel des Myometriums und den dazugehörigen Spiralarterien ein, wo sie das Endothel, das elastische Gewebe, die glatte Muskelzellschicht und neuronales Gewebe zerstören und die Gefäßwand ersetzen.³⁰ Dabei kommt es auch zur Veränderung der Expression der Adhäsionsmoleküle des Trophoblasten. Das Lumen der Spiralarterien wird durch diese Umbauvorgänge erheblich erweitert und kann durch keinerlei vasomotorische Reize enger gestellt werden. Der gesteigerte Blutfluss zur Plazenta gewährleistet eine adäquate Versorgung des wachsenden Feten mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die invasive Aktivität der Zytotrophoblastenzellen zeigt während des ersten Schwangerschaftsdrittels um die 10. bis 12. SSW ihr Maximum und nimmt danach ab.²⁹ Die uteroplazentare Blutzufuhr wird durch Lumenregulation der uteroplazentaren Arterien gesteuert. Die Gefäße passen sich der Schwangerschaft durch eine erhebliche Zunahme ihrer Weite an. So nehmen die Aa. uterinae um das 1,5 bis 3fache zu, die retroplazentaren Aa. arcuatae um das 10fache und die Spiralarterien um das 30fache.³⁰

1.3.2. Erklärungsmodell zur Pathogenese der SIH und Präeklampsie

Die optimale Durchblutung der Plazenta erfordert eine kontrollierte Invasion der Trophoblastzellen. Die unzureichende Invasion der Trophoblastzellen führt zu einem gestörten Gefäßremodeling und somit zu einer verminderten Perfusion der Plazenta.³¹ Während der Pathogenese der schwangerschaftsinduzierten hypertensiven Erkrankungen erfolgt die Invasion des Trophoblasten in die mütterliche Dezidua nur oberflächlich, so dass bis zu 50 % der Spiralarterien vom Remodeling ausgeschlossen werden.³² Außerdem bleibt die oben beschriebene Veränderung des Expressionsmusters der Adhäsionsmoleküle aus.³³ All dies führt zu einer unzureichenden Dilatation der Spiralarterien, deren mittlerer Durchmesser im Vergleich zu physiologisch veränderten Spiralarterien weniger als halb so groß ist. *Kublickiene et al.* postulierten, dass sich die uterinen Arterien bei präeklampsischen Frauen gegensätzlich zu denen gesunder Schwangerer verhielten.³⁴ Kleinere uterine Arterien werden bei präeklampsischen Frauen nicht durch Scherstress am Endothel dilatiert wie während einer normalen Schwangerschaft, sondern konstringiert. Durch diese Mechanismen kann der erhöhte Blutbedarf des wachsenden Fetus nicht gedeckt werden. Des Weiteren wird durch das unzureichende Remodeling die uteroplazentare Zirkulation vermindert und führt im Verlauf der Schwangerschaft zu einer zunehmenden Ischämie der Plazenta, gefolgt von intrauteriner Wachstumsrestriktion bis hin zum intrauterinen Fruchttod. Möglicherweise bedingt die Ischämie der Plazenta eine Freisetzung verschiedener biologisch aktiver Faktoren, z.B. Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α und reaktive Sauerstoffmetabolite.^{35,36}

Die Plazentation und das vaskuläre Remodeling sind vielschichtige Prozesse. Verschiedene Faktoren wie Hypoxie, oxidativer Stress des plazentaren Gewebes, zu starke oder atypische mütterliche Immunreaktion auf das Trophoblastgewebe, übertriebene Entzündungsreaktionen, erhöhte Produktion von anti-Angiogenesefaktoren wie z.B. die lösliche Form des vascular endothelial growth factor (VEGF) Rezeptors (sFlt-1) und lösliches Endoglin (sENG) stehen im Verdacht, eine gestörte Plazentation zu bewirken.^{37,38,39} Ein Schema zur möglichen Pathogenese der Schwangerschaftshypertonie ist in *Abbildung 2.* dargestellt.⁴⁰

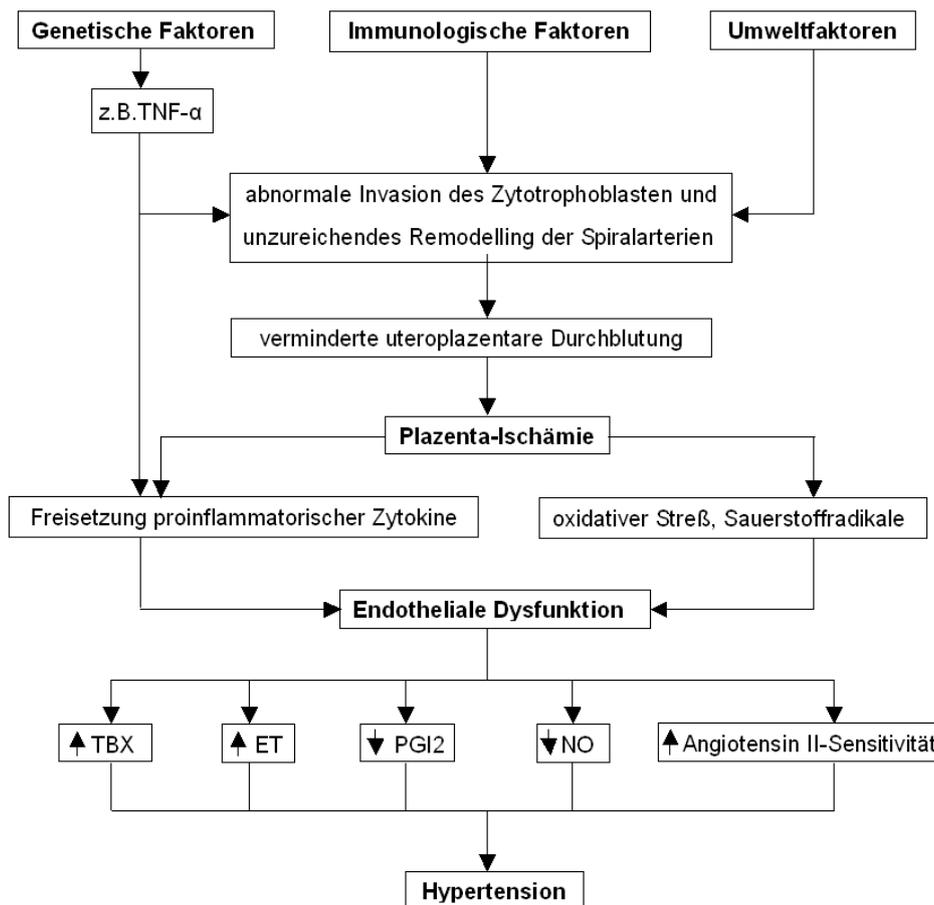


Abb. 2: **Mögliche Pathogenese der Schwangerschaftshypertonie.** Modifiziert nach Granger et al., 01. *TNF- α* , Tumor Nekrose Faktor- α ; *TBX*, Thromboxan; *ET*, Endothelin; *PGI2*, Prostaglandin I2; *NO*, Stickoxid. Schema entnommen aus: *Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction*, *Hypertension* (Band 38), 2001, Nr. 3 Pt 2: 718-722.⁴¹

Diese Faktoren können zur Schädigung des maternalen Endothels führen und möglicherweise zur Pathogenese schwangerschaftsassoziierter hypertensiver Erkrankungen beitragen.⁴² Durch die Endothelzellschädigung kommt es zu einer verminderten Sekretion vasodilatativer Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin (PGI2) sowie zu einer Zunahme vasokonstriktiver Faktoren wie Endothelin, Thromboxan und Angiotensin II, was wiederum zu Entstehung von Thromben und Ischämie innerhalb der Plazenta führen kann.^{43,44,45} Ein anderes Erklärungsmodell zur Pathogenese der SIH und Präeklampsie geht von einer gestörten Differenzierung der Trophoblasten aus, was zu einer eingeschränkten Funktion der Plazentaschranke führt. Durch das Einschwemmen von nekrotischen Trophoblastenmaterial in den mütterlichen Blutkreislauf kommt es zu systemischen inflammatorischen Reaktionen und zur Entstehung einer Präeklampsie. Begründet wird diese Erklärungsmodell damit, dass

man bereits in der 7. SSW präeklampsiespezifische Serummarker im mütterlichen Blut detektieren kann, obwohl zu diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft noch keine maternalen Blutzellen durch den intervillösen Raum fließen.^{46,47}

1.4. Endotheliale Nitritoxid-Synthase (eNOS)

1.4.1. Aufbau und Wirkung der eNOS

Die genaue Pathophysiologie der Präeklampsie ist noch nicht geklärt. Auffällig ist eine familiäre Prädisposition.⁴⁸ Man vermutet, dass unter anderem verschiedene genetische Variationen, in Verbindung mit bestimmten Umweltfaktoren sowie väterlichen Komponenten für die Entstehung einer Präeklampsie verantwortlich sind.⁴⁹ In verschiedene Untersuchungen wurde der Verdacht geäußert, dass die endotheliale NO-Synthase eine Rolle bei der Entstehung von Präeklampsie spielen könnte.^{12,13,14} Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Gas mit kurzer Halbwertszeit und wird von Endothelzellen freigesetzt. Bei der Regulation des Vasotonus spielt Stickstoffmonoxid als stärkster endogener Dilatator eine entscheidende Rolle. Physiologische Stimuli für eine NO-Freisetzung sind unter anderem Scherstress, Acetylcholin, Bradykinin, Endothelin, Substanz P, Histamin und ADH.⁵⁰ Indirekt hemmt NO die Gefäßkonstriktion durch eine Hemmung von Renin und Norepinephrin.⁵¹ Es gibt je nach Einteilung drei bis vier Isoformen der NO-Synthase: die endotheliale NO-Synthase, die iNOS in Makrophagen und Mikrogliazellen, die nNOS in Neuronen und die mtNOS in den Mitochondrien. Die endotheliale Isoform der NO-Synthase (eNOS, NOSIII) ist ein 135 kDa-großes Protein, welches überwiegend in Zusammenhang mit spezifischen Strukturen des Plasmalemmas der Endothelgefäße gebracht wird. NO entsteht aus L-Arginin und diffundiert zu den glatten Muskelzellen der Gefäße, wo es die Guanylat-Cyclase stimuliert. Dadurch steigt die Konzentration von cGMP und führt über Freisetzung intrazellulären Calciums zu einer Relaxation des Gefäßes.^{52,53} NO verhindert außerdem die Anheftung von Thrombozyten und/oder Leukozyten an das Endothel und hemmt die Proliferation glatter Muskelzellen.^{54,55}

1.4.2. Wirkung der endothelialen NO-Synthase auf die Blutdruckregulation

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die Verringerung der eNOS-Expression eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten wie Bluthochdruck, koronare Herzerkrankungen, Nierenerkrankungen, einschließlich diabetischer Nephropathie, Thrombembolien und Atherosklerose spielt.^{56,57} Das Ausschalten der eNOS-Gene in Mäusen führte zu einer

signifikanten Erhöhung des Blutdrucks.^{58,59} Dagegen wiesen Mäuse, welche zu einer Überexpression der NO-Synthase angeregt wurden, arterielle Hypotension und eine verstärkte NO-abhängige Vasorelaxation auf.^{60,61} Auch die medikamentöse Inhibition des NO-cGMP-Stoffwechsels mit Argininanaloga bewirkte im Tierversuch und beim Menschen einen erhöhten Blutdruck.⁶² Bei Patienten mit essentieller Hypertonie war die basale Nitritoxid-Produktion herabgesetzt.⁶³

1.4.3. Wirkung der endothelialen NO-Synthase auf die Blutdruckregulation in der Schwangerschaft

NO ist ein wichtiger Modulator für die Aufrechterhaltung der maternalen systemischen Vasodilatation und der während einer normalen Schwangerschaft beobachteten reduzierten vaskulären Reaktivität.⁶⁴ In einer Tierstudie wurde bei Hemmung der NO-Produktion in trächtigen Ratten eine positive Korrelation mit Hypertonus, Proteinurie und fetalen Wachstumsstörungen beobachtet.⁶⁵ Man konnte nachweisen, dass die NO-Synthase während der Schwangerschaft in verschiedenen maternalen Geweben erhöht ist.^{15,16} Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass bei Präeklampsie eine reduzierte Aktivität der endothelialen NO-Synthase im plazentaren Gewebe besteht.^{66,67} Des Weiteren kann durch Hemmung der NO-Synthase ein präeklampsieähnliches Syndrom verursacht werden.^{17,18} Diese und andere Studien legen nahe, dass Polymorphismen der endothelialen NO-Synthase (NOS3), welche die NO-Verfügbarkeit vermindern, eine Prädisposition für hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft darstellen.¹⁹

1.4.4. Genpolymorphismus der eNOS Synthase im Intron 4

Die endotheliale NO-Synthase wird von einem Gen codiert, welches auf Chromosom 7q 35-36 liegt und 26 Exons und 25 Introns aufweist. Es umfasst eine Länge von 21 Kilobasen. Als genetischer Polymorphismus wird das regelmäßige Auftreten von zwei oder mehr Allelen eines Gens bezeichnet. In Abgrenzung zur Mutation muss die Frequenz des weniger häufigen Allels mindestens 1% betragen.⁶⁸ Meist handelt es sich hierbei um einen Austausch einzelner Basen („single nucleotid polymorphism“ oder SNP), welche in einer Vielzahl von Introns und Exons des eNOS-Gens gefunden wurden, z.B. in der Promotorregion⁶⁹, in den Introns 2, 6, 18, 23 und in den Exons 6 und 7.⁷⁰ Eine weitere häufige Art genetischer Variabilität sind repetitive Sequenzen. Zu ihnen gehören Tandemreihen (VNTR, variable number of tandem repeats). Dies sind Wiederholungen einer Sequenz aus 12-500 Nukleotiden. Dabei variiert die

Länge der Tandemreihen zwischen den einzelnen Individuen. Tandem Repeat Regionen wurden im eNOS-Gen unter anderem im Intron 2 (32 bp repeats), Intron 4 (27 bp repeats), Intron 8 (32 bp repeats) und Intron 13 (CA repeats) entdeckt.^{71,72} Der 786T>C-Polymorphismus im Promotor des Gens, eine Tandemreihe im Intron 4 und der 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 sind die in Studien am häufigsten untersuchten genetischen Varianten des NOS3-Gens. Bei dem von uns untersuchten Genpolymorphismus handelt es sich um zwei Allele im eNOS Intron 4. Der Wildtyp zeigt fünf Wiederholungen einer Sequenz von 27 Basenpaaren (Allel b) und das kürzere Allel nur vier Wiederholungen (Allel a).⁷³ Die Abfolge der 27 Basen lautet: GAAGTCTAGACCTGCTGC(A/G)GGGGTGAG. Die meisten Arbeitsgruppen amplifizierten die entsprechende DNA nach *Wang et al.* und erhielten für das längere b-Allel ein Produkt von 420 bp und für das seltenere a-Allel ein Produkt von 393 bp.⁷⁴ In dieser Arbeit wurde derselbe Vorwärts-Primer benutzt, jedoch ein anderer Anti-Sense Primer, sodass wir kürzere DNA-Fragmente erhielten. Das b-Allel weist in der vorliegenden Arbeit eine Länge von 273 bp auf und das kürzere a-Allel hat eine Länge von 255 bp. Im b-Allel haben die ersten drei Wiederholungssequenzen eine Adenin-Base (A) an der 19. Stelle, die letzten zwei eine Guanin-Base (G) an Position 19. Das kleinere a-Allel jedoch hat nur in seinen ersten beiden Repeatsequenzen ein A, in den letzten beiden ein G an dieser Stelle.^{75,76} Die Struktur des eNOS-Gens ist in *Abbildung 3* dargestellt.

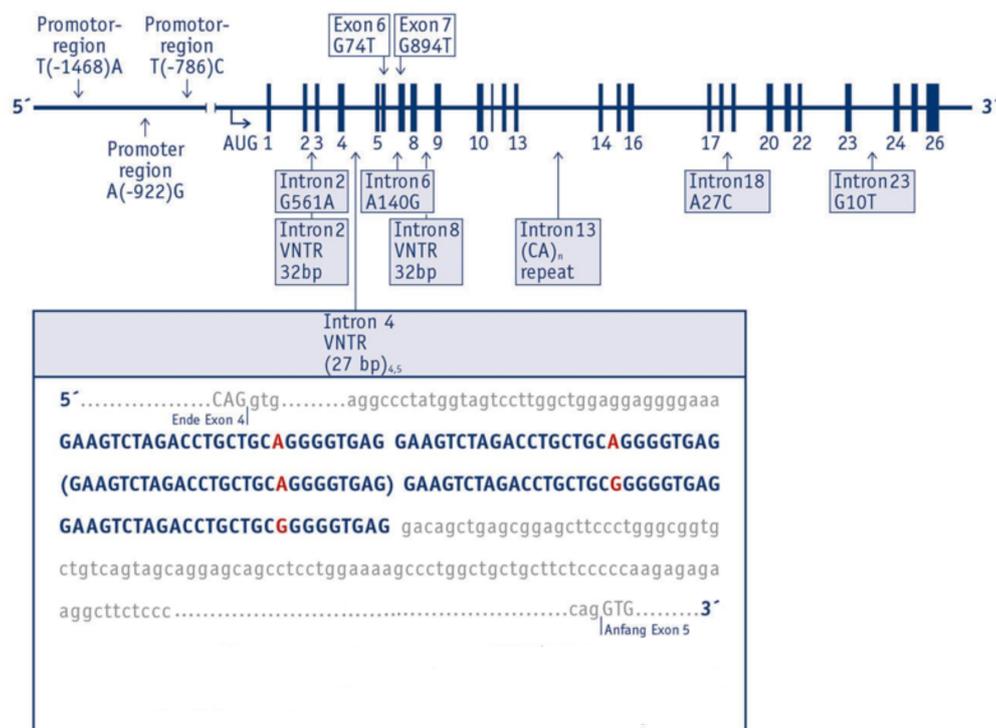


Abb. 3: Struktur des eNOS-Gens mit besonderer Beachtung des Intron 4. Die sich fünfmal im

mit *b* oder viermal im mit *a* bezeichneten Allel wiederholenden Sequenzen aus 27 Basen sind mit dunkelblauen Großbuchstaben gekennzeichnet. Rot gekennzeichnet mit *A*: Adenin-Base an 19. Stelle des VNTR, Rot gekennzeichnet mit *G*: Guanin-Base an 19. Stelle des VNTR.⁷⁷

In einigen Studien wurde eine größere Variabilität der Tandem-Repeatsequenzen beobachtet. Unter anderem wurde ein *c*-Allel mit 6 Repeats detektiert.^{78,79} Des Weiteren entdeckte man bei einzelnen Individuen ein Allel, welches mit leichten Veränderungen nur zweimal die beschriebene Abfolge der 27 Basenpaare aufwies.⁸⁰ Neben diesen eben genannten Varianten fand man in einer Studie unter afrikanischen Amerikanern ein Allel mit 3 Repeatsequenzen.⁸¹

1.4.5. eNOS Intron 4 assoziierte Krankheiten des Herzkreislaufsystems

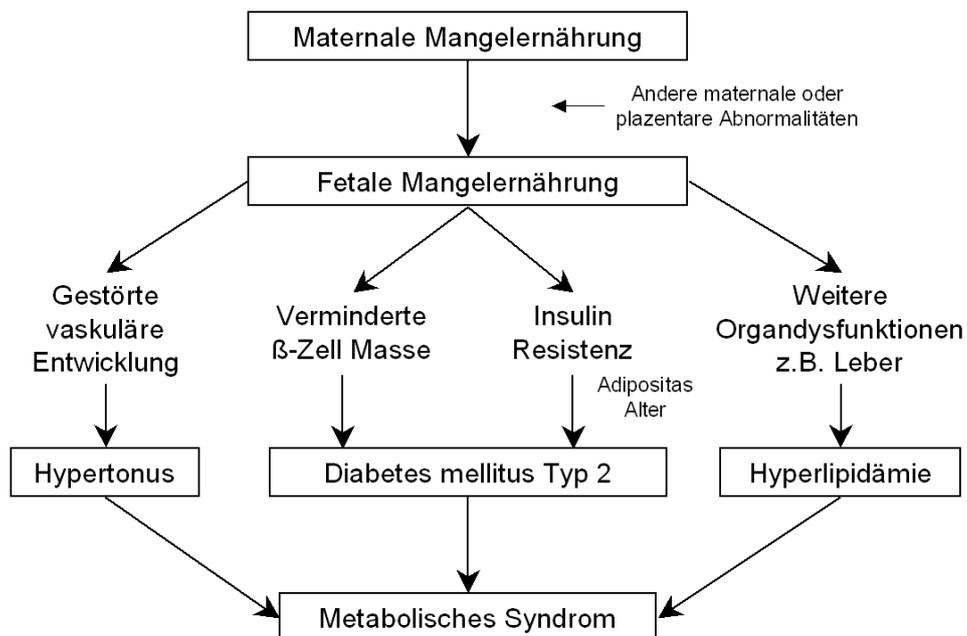
Der Einfluss des Genpolymorphismus der eNOS Synthase im Intron 4 auf Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt⁸², Schlaganfall⁸³ und arterieller Hypertonus^{84,85} wurde in zahlreichen Studien mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. So wurde das Vorhandensein des selteneren *A*-Allel-Polymorphismus im Intron 4 sowohl positiv^{86,87} als auch negativ^{88,89} mit koronarer Herzkrankheit assoziiert.

1.5. Fetale Programmierung kardiovaskulärer Erkrankungen

1.5.1. Konzept der fetalen Programmierung

Der englische Wissenschaftler *David Barker* veröffentlichte 1989 die Hypothese, dass ein vermindertes Geburtsgewicht, verursacht durch mütterliche Malnutrition während der Schwangerschaft, zu einem überproportional häufigen Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen im späteren Leben führt.⁹⁰ Epidemiologische Studien über die Säuglingssterblichkeit zu Beginn des 20. Jahrhunderts in Großbritannien zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht und Säuglingssterblichkeit. *David Barker* fand nach Vergleich der geografischen Verteilungsmuster eine deutliche Übereinstimmung zwischen den Mortalitätsraten für koronare Herzkrankheit in den Jahren 1968 bis 1978 und Regionen, die Anfang des 20. Jahrhunderts eine hohe Säuglingssterblichkeit aufwiesen. Er schloss daraus, dass ein geringes intrauterines Wachstum und damit verbunden ein geringes Geburtsgewicht mit der Entwicklung von koronarer Herzerkrankung im Erwachsenenalter im Zusammenhang steht. Es folgte eine Reihe von retrospektiven Studien, unter anderem mit sehr großen Fallzahlen, welche diese Hypothese der fetalen Programmierung bestätigten.^{91,92} In der Fetalperiode sind spezifische Zeitfenster

von einigen Tagen bis Wochen bekannt, in denen bestimmte Gewebe und Organe sensible Phasen mit schneller Zellteilung durchlaufen.⁹³ „Programming“ beschreibt dabei einen Prozess, bei dem ein bestimmtes Ereignis während dieser empfindlichen Entwicklungsphasen zu irreversiblen morphologischen und funktionellen Veränderungen fetaler Organe und Gewebe führt.⁹⁴ Dabei passt sich der Fetus dem intrauterinen Nahrungs- bzw. Sauerstoffmangel vor allem durch eine verlangsamte Zellteilungsrate an, insbesondere in den Geweben, die gerade eine kritische Phase durchlaufen. Regelsysteme, die z.B. das Insulin/Glukosegleichgewicht oder die Cholesterinsynthese steuern, könnten in diesen Phasen bis ins Erwachsenenalter hinein irreversibel auf falsche Sollwerte eingestellt werden. Bereits 1991 wurde in der sogenannten Hertfordshire-Studie gezeigt, dass Probanden mit einem Geburtsgewicht von 2,5 kg und weniger ein siebenfach erhöhtes Risiko haben, eine gestörte Glukose-Toleranz oder einen Diabetes mellitus Typ II zu entwickeln.⁹⁵ Durch Programming verbessert der Fetus seine Chancen, Mangelsituationen im Mutterleib zu überleben. Andererseits steigt dadurch das Risiko später an kardiovaskulären, endokrinologischen und metabolischen Erkrankungen zu erkranken bzw. zu sterben,⁹⁶ insbesondere dann, wenn die auf Mangel programmierten Organe außerhalb des Mutterleibes auf längere Zeit einer Hyperalimentation ausgesetzt sind. Die von *Barker et al.* entwickelte Hypothese der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist in *Abbildung 4* schematisch dargestellt.



*Abb. 4: Hypothese der fetalen Programmierung.*⁹⁷

Auch andere Faktoren, z.B. Nikotinabusus der Mutter, können eine fetale

Fehlprogrammierung verursachen.^{98,99}

1.5.2. Die „Advanced fetal programming“ Hypothese

Die „advanced fetal programming hypothesis“ besagt, dass nicht nur Umweltfaktoren wie z.B. Ernährung oder Rauchen, sondern auch die maternalen Gene an der fetalen Programmierung Anteil haben.¹⁰⁰ So wirken sich die mütterlichen Gene auf den plazentaren Blutfluss, die Nährstoffversorgung des Feten und somit auf das fetale Wachstum aus.



Abb. 5: *Advanced fetal programming Hypothese*. Modifiziert nach Hocher et al.¹⁰⁰

In einer Studie wurde gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem maternalen 825T-Allel der G-Protein $\beta 3$ -Untereinheit und einem erniedrigten Geburtsgewicht bei Kindern besteht, die sonst keinerlei Risikofaktoren für intrauterine Wachstumsverzögerung aufwiesen. Eine weitere Untersuchung an japanischen Frauen bestätigte die Ergebnisse.^{101,102}

1.6. Aufgabenstellung der Dissertation

Wie bereits im Abschnitt 1. erwähnt, zählen Bluthochdruck und vor allem die Präeklampsie weltweit zu den häufigsten Erkrankungen in der Schwangerschaft und stehen im Zusammenhang mit mütterlicher und kindlicher Morbidität und erhöhter Mortalität. In verschiedenen Untersuchungen wurde der Verdacht geäußert, dass die endotheliale NO-Synthese eine Rolle bei der Entstehung von Präeklampsie spielen könnte. Ziel dieser Dissertation war es, den Einfluss des eNOS Polymorphismus im Intron 4 a/b auf die Blutdruckregulation, die Proteinausscheidung und die Ödembildung in der Schwangerschaft zu untersuchen. Des Weiteren wurde beobachtet, ob der untersuchte Genpolymorphismus Einfluss auf das Geburtsgewicht beim Neugeborenen hat.

2. Material und Methoden

2.1. Methoden

2.1.1. Studiendesign

Frauen, welche vom Januar 2000 bis zum September 2002 in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe der Charité in Berlin geboren hatten, wurden eingeladen, an unserer prospektiven epidemiologischen Studie teilzunehmen. Die zuständige Ethikkommission erteilte die Genehmigung für diese Studie, in welche 2186 kaukasische Frauen und ihre neugeborenen Kinder eingeschlossen wurden. Das Studienprotokoll wurde durch ausführliche Gespräche mit jeder Frau erhoben. Es enthält Faktoren wie mütterliches Alter, Gewicht vor Eintritt und am Ende der Schwangerschaft, Größe, Nationalität, Anzahl der Schwangerschaften und Paritäten, Dauer der Schwangerschaft, Ergebnisse der Urin Stick-Untersuchungen während der Schwangerschaft, Ödeme während der Schwangerschaft, Blutdruck, Raucheranamnese, Familienanamnese in Bezug auf primäre arterielle Hypertonie und metabolische Erkrankungen, vor der Schwangerschaft bestehender arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und anderen mütterlichen Risikofaktoren vor und während der gegenwärtigen Schwangerschaft. Nach eingehender Aufklärung wurde von allen Frauen eine Einwilligung zur Erhebung und Weiterverwendung der Daten schriftlich dokumentiert. Die erhobenen Daten wurden in eine Computerdatenbank eingetragen und gesichert (SPSS, Version 11.5). In dieser Studie bedienten wir uns einer alternativen Vorgehensweise, welche wir auch schon in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe angewendeten.⁹⁷ Die Überlegung

war, dass ein einzelner Polymorphismus vermutlich nur für einen ganz geringen Teil der multifaktoriellen Pathogenese von schwangerschaftsinduzierten hypertensiven Erkrankungen verantwortlich ist. So könnte es schwer werden, den Effekt dieses einen Polymorphismus herauszufiltern, wenn man sich nur auf die binären Endpunkte wie Gestationshypertonus und Präeklampsie konzentrierte. Deshalb entschieden wir uns, den Verlauf einzelner Marker wie Blutdruckverhalten, Proteinausscheidung und Ödementwicklung während der Schwangerschaft zu analysieren, um gegebenenfalls kleine aber signifikante genetische Effekte ausfindig zu machen. Die Blutdruckmessungen der Schwangeren erfolgten bei jedem Besuch des Frauenarztes in sitzender Position durch den Frauenarzt oder durch eine gynäkologische Krankenschwester. So fanden insgesamt zwischen 6 bis 23 Messungen pro Schwangerer in Abhängigkeit von der Anzahl der Arztbesuche statt. Der Blutdruck für jedes Trimester pro Frau ergab sich durch die Mittelung der erfolgten Messungen in diesem Zeitraum. Im Schnitt waren dies 1,8 Messungen für das 1. Trimester, 4,0 für das zweite und 5,5 für das dritte. Die Ermittlung des diastolischen Blutdruckes erfolgte normalerweise nach Korotkoff Phase V. Falls Geräusche bei abgelassener Manschette zu hören waren, wurde Korotkoff Phase IV benutzt. Es wurden nur Urin-Stickergebnisse verwendet, welche Nitrit-negativ waren. Ödeme sind in der aktuellen Klassifikation des Blutdrucks in der Schwangerschaft nicht mehr relevant. Da neu aufgetretene Ödeme in der zweiten Schwangerschaftshälfte bei Präeklampsie häufig zu beobachten sind und möglicherweise derselben Pathophysiologie entspringen, haben wir sie in die Studie integriert. Das Gestationsalter konnte anhand des Auftretens der letzten Menstruationsblutung bestimmt und durch frühzeitige gynäkologische und geburtshilfliche Untersuchung sowie durch Ultraschall-Screening während der Schwangerschaft bestätigt werden. Zusätzlich diente die Sonographie dem Ausschluss eventueller Anomalien der Plazenta oder des Feten. Bei allen Frauen wurde postpartal EDTA-Vollblut aus der Vena cubitalis abgenommen. Sodann isolierten wir aus dem Vollblut von Müttern und Neugeborenen die menschliche DNA.

2.1.2. Isolation der menschlichen DNA aus dem Vollblut

1. Abtrennen des Plasmas, Zentrifugieren des Vollbluts bei 3.000 rpm für 5 min, danach 1:1 verdünnen mit 0,9 % isot. NaCl-Lösung,
2. 50 µl des NaCl-Blutes mit 500 µl TE-Puffer mischen und bei 13.000 rpm für 3 min zentrifugieren,

3. Entfernen des Überstandes und Resuspendieren des Pellet in 500 µl TE-Puffer und erneut zentrifugieren bei 13.000 rpm für 1 min,
4. Wiederholen des vorangegangenen Schrittes so oft, bis das Pellet nicht mehr rot gefärbt ist,
5. Resuspendieren des makroskopisch hämoglobinfreien Pellet in 100 µl K-Puffer,
6. Bei 56 °C für mindestens 45 Minuten im Wasserbad inkubieren,
7. Erhitzen der Suspension für 10 Minuten auf 95 °C, um eventuell vorhandene Proteasen zu zerstören,
8. auf Eis abkühlen lassen und bei -20 °C aufbewahren.

Mit Hilfe der gewonnenen DNA war es nun möglich, eine Typisierung des eNOS Polymorphismus Intron 4a/b mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchzuführen.

2.1.3. PCR-Amplifikation

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren, mit dem es möglich geworden ist, spezifisch DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Dabei wird zunächst die doppelsträngige DNA durch Erhöhen der Temperatur auf ca. 92-98 °C denaturiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen lösen sich, und es entstehen zwei Einzelstränge. Durch Abkühlen lagern sich spezifisch die Primer an die komplementären Enden der beiden Einzelstränge an (annealing). Als Primer werden aus ca. 15 bis 25 Basen bestehende Oligonukleotide bezeichnet, die als Starthilfen für die DNA-Polymerase dienen. Verständlicherweise ist es für die Herstellung der Primer notwendig, dass die Basenfolge des DNA-Abschnittes bekannt ist, an den sich die Primer anlagern sollen. Nach Anlagerung der Primer ist es jetzt der DNA-Polymerase möglich, bei Vorhandensein von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) und Magnesiumchlorid (MgCl₂) unter optimalen Temperatur- und pH-Verhältnissen die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang zu komplementieren. Dieser eben beschriebene Zyklus wird mehrfach wiederholt, um eine exponentielle Zunahme der gewünschten DNA-Sequenz zu erzielen.¹⁰³ Die Vorbereitung der eNOS4 a/b PCR erfolgte nach dem Schema in *Tabelle 1*. Die PCR wurde mit 1,98 µl DNA-Matrize (template) und den Primern eNOS INTRON 4 se und eNOS-INTRON 4 ba (Sequenzen siehe unten) in einem Reaktionsvolumen von 22 µl durchgeführt. Die

Amplifikation vollzog sich über 40 Zyklen, bestehend aus der Denaturation bei 94 °C für 30 Sekunden, Annealing bei 60 °C für 30 Sekunden und Extension bei 72 °C für 1 Minute, gefolgt von der letzten Extension für 10 Minuten. Das PCR Programm zeigt *Tabelle 2*.

Tabelle 1: PCR-Protokoll

Material	Ansatz (50)	Ansatz (22)	Faktor	Ansatz
Wasser	34,2	15,048	50	752,4
10xPCR Puffer	5	2,2	50	110,0
M _g Cl ₂ (100 mM)	1	0,44	50	22,0
dNTPs (Mix)	1	0,44	50	22,0
eNOS INTRON 4se	2	0,88	50	44,0
eNOS INTRON 4 ba	2	0,88	50	44,0
Taq DNA Polymerase	0,3	0,132	50	6,6
Template	4,5	1,98	50	99,0
Total (Summe)	50	22	50	1100,0

Tabelle 2: PCR-Programm

Schritt	T. (°C)	Zeit	Zyklen	Reaktionsschritt
1	94	Pause		
2	94	6 Minuten	.	
3	60	30 Sekunden	.	
4	72	1 Minute	.	
5	94	30 Sekunden	39 x	Zurück zu Schritt 3
6	60	30 Sekunden	.	
7	72	10 Minuten	.	
8	10.	Pause	..	

2.1.4. Elektrophorese

Die gewonnene DNA wird auf 2,5 %iges, hochauflösendes Agarose-Gel aufgetragen und bei 100 Volt bzw. 250 mA und ca. einer Stunde Laufzeit elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgten die Färbung mittels 0,05 % (0,5 µg/ml) Ethidiumbromid und die Auswertung unter ultraviolettem Licht. Anhand einer DNS-Leiter (1000 bp im Abstand von 100 bp) konnte die Größe des PCR-Produkts abgelesen werden. Die mitgelaufene Nativ-DNS stellte sich als hochmolekulare Einzelbande dar. Lag der Wildtyp vor, so stellte sich unter

UV-Licht eine Bande mit einer Länge von 273 Basenpaaren (bp) für das b/b Allel dar. Das a/a Allel zeigte eine Band mit der Länge von 255 bp. Der heterozygote a/b-Genotyp wies dementsprechend zwei Banden auf (bei 255 bp, und 273 bp). Alle Proben wurden doppelt bestimmt. Nur bei Übereinstimmung wurden die entsprechenden Daten verwendet.

Die *Abbildung 6* zeigt das Bild eines Gels unter UV-Licht nach erfolgter Elektrophorese.

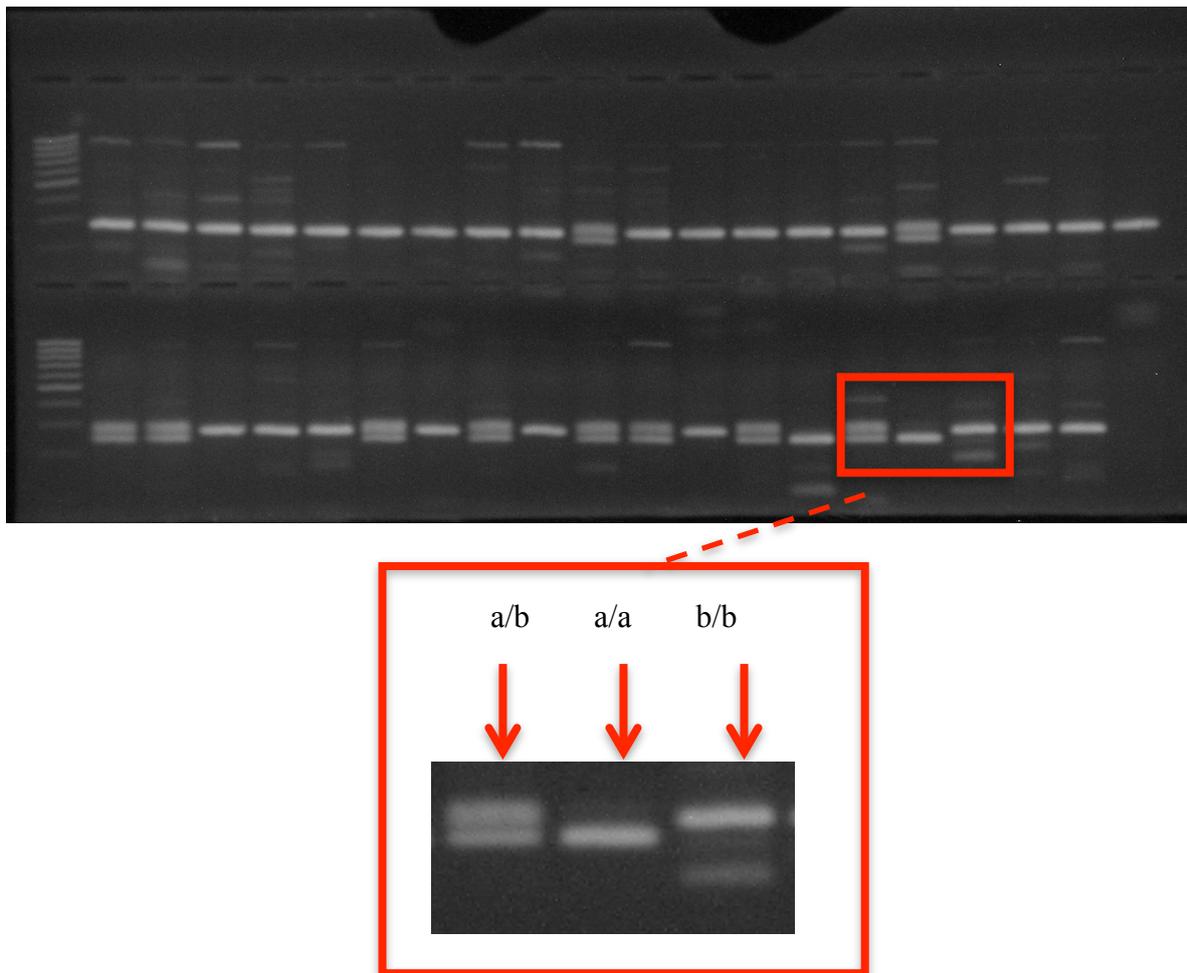


Abb. 6 Gel unter UV-Licht: Am linken Bildrand ist in Form übereinanderliegender Banden der 1:100 bp-Standard erkennbar.

2.2. Verwendete Materialien

2.2.1. Puffer und Lösungen

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

(eingestellt auf einen pH von 7,5)

K-Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris-Cl 2,5 mM MgCl ₂ (eingestellt auf einen pH von 8,3)
10x TBE Puffer	Tris-Base 108 g/l Borsäure 55 g/l 0,5M EDTA 40 ml/l (eingestellt auf einen pH von 8,0)
Blaumarker	0,25 % Bromphenol blau, 250 mg 0,25 % Xylene cyanol, 250 mg 30 % Glycerol, 30 g destilliertes Wasser bis 100 ml hinzufügen
10 × Puffer Y+/ Tango™ (mit BSA) (gelb)	33 mM Tris-Acetat 10 mM Magnesium-Acetat 66 mM Kalium-Acetat 0,1 mg/ml BSA (eingestellt auf einen pH von 7,9 bei 37 °C)
100bp DNA - Basenleiter	Autoklaviertes ultrafiltriertes Wasser, 320 µl Blaumarker, 70µl 100 bp DNA-Basenleiter (0,1 mg DNA/ml), 10 µl aufbewahrt bei -20 °C. (Verwendung von 10 µl)

2.2.2. Reagenzien

- Verwendete Primer:

eNOS INTRON4se(sense) 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT-3'

eNOS INTRON4ba(antisense) 5'-GGG AGA AGC CTT CTC TCT TG-3'

(TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin, Germany)

- SeaKem® LE Agarose, Biozym Diagnostik GmbH, Germany
- GeneRuler™ 100 bp DNA-Leiter, MBI fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Germany
- GeneAmp® 10X PCR Puffer II (1,5 ml), verwendet von Biosystems, Germany
- MgCl₂ Lösung (1,5 mmol/l), verwendet von Bioron, Ludwigshafen, Germany
- Taq DNA-Polymerase (5 Units/µl) von Bioron, Ludwigshafen, Germany

- dNTPs (20 $\mu\text{mol/l}$ von dATP, dCTP, dGTP und dTTP), verwendet von Bioron, Ludwigshafen, Germany
- EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Xylene cyanol ($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$), Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Bromphenol blau, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
- Glycerin ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Ethidiumbromid (10 mg/ml), Amresco Inc., Ohio, USA
- Tris-Base (hydroxymethyl) aminomethane ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (2,5 kg), Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Borsäure (H_3BO_3), Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Proteinase K (100 mg), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- Tween20, SERVA Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Germany

2.2.3. Instrumente

- pH-Messer
- Gelelektrophorese Apparatur Biometra standard power pack P25 (115 V/230 V), max. 400 V, 1000 mA, 200 W, Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Germany
- Thermocycler Biometra T3 Thermocycler, Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Germany
- Ultraviolette Lichtquelle TI 1, 230 V, Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Germany
- $-20\text{ }^\circ\text{C}$ and $4\text{ }^\circ\text{C}$ Kühlschrank Liebherr BSS 2986 Liebherr-Hausgeräte GmbH, Deizisau, Germany
- Thermoblock
- Thermostat TCR 100, Roth, Germany
- $56\text{ }^\circ\text{C}$ und $37\text{ }^\circ\text{C}$ Wasserbad
- Waage SBC 22 balance, Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Germany
- Sartorius BL 600 balance, Sartorius AG, Göttingen, Germany
- Zentrifuge Biofuge 13, Heraeus/Sepatech GmbH, Osterode am Harz, Germany
- Vortex Genie 2-Mixer, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

2.3. Statistik

Die Datenanalyse im Ergebnisteil erfolgte mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 11.5 (Chicago, IL, USA). Die Ergebnisse kontinuierlicher Variablen wurden mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Um die in dieser Arbeit ermittelte Häufigkeit von Allelen für eine Population zu errechnen, wurde das Hardy-Weinberg-Gesetz angewendet. Dieses Gesetz ist geeignet, Allelfrequenzen in einer idealen Population zu ermitteln. Eine ideale Population ist unendlich groß. In ihr findet keine Selektion statt. Die Häufigkeit aller Allele in der Population wird nach Hardy und Weinberg durch folgende Formel beschrieben:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Dabei entspricht 1 der Gesamtheit aller Allele (100 %). Die Unbekannten p und q symbolisieren hier jeweils ein Allel: p^2 entspricht dem homozygoten Allel aa, q^2 dem homozygoten Allel bb, und $2pq$ steht für die heterozygoten Allele ab und ba. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson wurde verwendet, um zu überprüfen, ob die beobachteten und nach Hardy und Weinberg ermittelten Werte der Allelfrequenz sich in ihrer Häufigkeit signifikant unterscheiden bzw. ob Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorliegen. Werte für $p < 0,05$ wurden dabei als signifikant angesehen. Eine Analyse der statistischen Varianz (ANOVA) wurde durchgeführt, um kontinuierliche Variablen zwischen den Gruppen zu vergleichen. Für den Vergleich der kategorialen Daten wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Es ist bekannt, dass Alter, BMI vor der Schwangerschaft, Zwillingsschwangerschaften und Primigravidität den Blutdruck während der Schwangerschaft beeinflussen. Aus diesem Grund durchliefen alle Blutdruckberechnungen zusätzlich eine Analyse der statistischen Kovarianz (ANCOVA) einschließlich der eben genannten Parameter als Merkmale. Die Anzahl der Studienteilnehmer und die Frequenzhäufigkeit der Allele in unserer Studie erlaubte es uns, Blutdruckdifferenzen von 1,5 mmHg zwischen den homozygoten Gruppen für die jeweiligen Allele und die entsprechenden heterozygoten Gruppen aufzuzeigen. Es kamen zweiseitige Tests zur Anwendung.

3. Ergebnisse

3.1. Daten des Studienprotokolls

Tabelle 3: Daten des Studienprotokolls

	Gesamt	b/b	b/a	a/a	p
Anzahl der Frauen (N)	2186	1522	604	60	
Alter (Jahre)	30.1 ± 5.5	30.2 ± 5.5	30.0 ± 5.6	29.8 ± 5.7	0.78
BMI vor der Schwangerschaft (kg/m ²)	22.9 ± 4.1	22.9 ± 4.1	22.8 ± 4.1	22.5 ± 3.7	0.75
Schwangerschaftswoche bei Geburt (Woche)	38.7 ± 2.4	38.7 ± 2.4	38.8 ± 2.4	39.0 ± 2.3	0.28
Geburtsgewicht des Kindes (g)	3310 ± 662	3312 ± 657	3279 ± 676	3377 ± 630	0.65
Zwillingschwangerschaften (%)	5.9	6.1	6.0	1.7	0.72
Primigravida (%)	44.3	44.8	43.4	39.3	0.63
Primipara (%)	56.1	56.5	55.5	50.9	0.68
Hypertonus vor der Schwangerschaft (%)	6.2	6.4	6.0	5.0	0.87
AHM vor/während der Schwangerschaft (%)	1.4 / 2.1	1.3 / 2.0	1.7 / 2.0	1.7 / 3.3	0.8/0.8
Hypertonus in der Familienanamnese (%)	36.5	36.2	37.2	35.7	0.92
DM vor/während der Schwangerschaft (%)	2.0 / 4.2	2.3 / 4.7	1.5 / 3.0	0 / 1.8	0.3/0.1
DM in der Familienanamnese (%)	34.5	34.0	35.6	35.1	0.80
Rauchen vor/während der Schwangerschaft (%)	40.7 / 17.5	39.8 / 17.3	42.9 / 17.8	40.4 / 17.5	0.5/1.0

Die Daten wurden mit mittlerer Standardabweichung ± oder in Prozent angegeben. 2186 kaukasische Frauen wurden in die Studie integriert. Die Gruppen der Frauen mit den verschiedenen Allelkonstellationen sind vergleichbar hinsichtlich ihrer Grundcharakteristika (Rauchen, Alter, BMI etc.). Das Alter der Frauen betrug dabei 30,1±5,5 Jahre. Der BMI vor der Schwangerschaft wurde mit 22,9±4,1 (kg/m²) angegeben. Die Schwangerschaftswoche bei Geburt betrug 38,7±2,4. Die Kinder waren zur Geburt 3310±662 g schwer. Die Rate an Zwillingschwangerschaften betrug 5,9 %. Der Anteil an Primigravidae war 44,3 %. 56,1 % der Frauen waren Erstgebärende. 6,2 % der Studienteilnehmerinnen wiesen einen Hypertonus vor der Schwangerschaft auf. 1,4 % der Frauen nahmen vor der Schwangerschaft antihypertensive Medikamente ein. Während der Schwangerschaft konsumierten 2,1 % der Frauen antihypertensive Medikamente (AHM). Laut Befragung trat zu 36,5 % Hypertonus in der Familienanamnese der Studienteilnehmerinnen auf. 2 % der Befragten erkrankten schon vor der Schwangerschaft an Diabetes mellitus (DM). Während der Schwangerschaft litten insgesamt 4,2 % der Frauen an DM. DM in der Familienanamnese wurde mit 34,5 % angegeben. 40,7 % der Frauen gaben an, vor der Schwangerschaft geraucht zu haben. Während der Schwangerschaft rauchten 17,5 % der befragten Frauen.

3.2. Frequenz der Allele des Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b

Tabelle 4: Frequenz der Allele

	VNTR 4 a/b
b/b	1522 (69,6%)
b/a	604 (27,6%)
a/a	60 (2,7%)

b allele	0,834±0,01
a allele	0,166±0,01
Chi ²	<0,001
p	0,99

Die Studie ergab für den eNOS Genpolymorphismus VNTR 4 a/b folgende Verteilung im untersuchten Kollektiv (n= 2186). 1522 Studienteilnehmerinnen konnten homozygot auf das Wildtypallel b/b getestet werden. Das bedeutet 69,6 % der Frauen wiesen die Variante b/b auf. Für 604 Proben sprich 27,6 % ergab die Untersuchung die heterozygote Variante (b/a). Die Frequenz des Allels (a/a) lag bei den untersuchten Schwangeren bei 2,7 %, also 60 Frauen.

3.3. Systolischer und diastolischer Blutdruck, Proteinausscheidung und Ödeme während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b

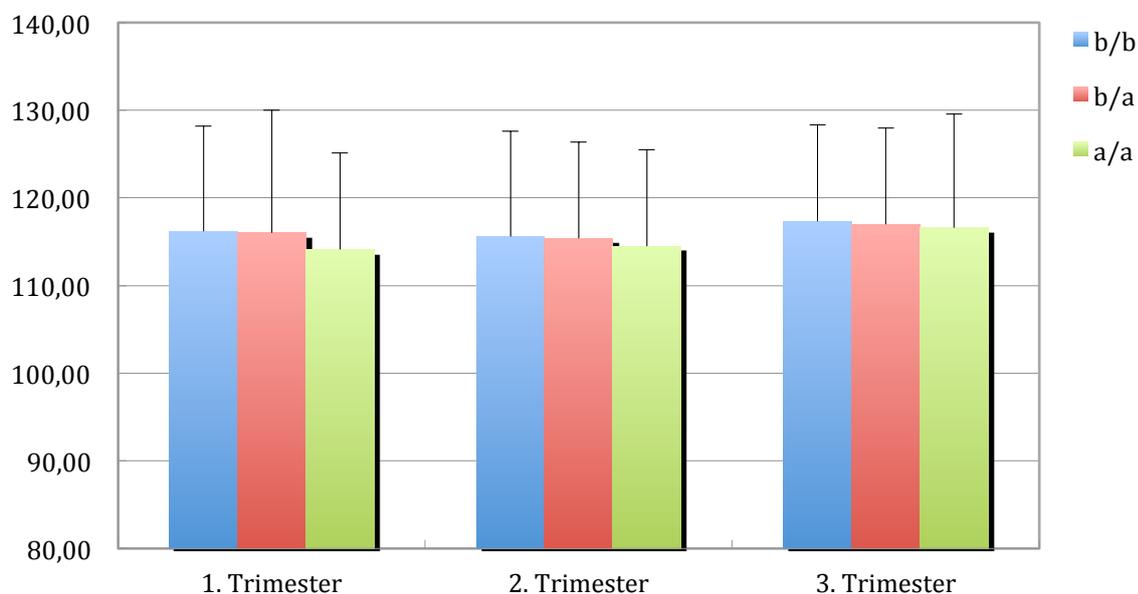
Tabelle 5: Systolischer und diastolischer Blutdruck, Proteinausscheidung und Ödeme während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps

	VNTR 4 a/b			p
	b/b	b/a	a/a	
	1522 (70 %)	604 (28 %)	60 (2,7 %)	
mittlere systolischer Blutdruck ±SD (mmHg)				
1. Trimester	116,2±12	116,0±14	114,1±11	0,85
2. Trimester	115,6±12	115,4±11	114,5±11	0,99
3. Trimester	117,3±11	117,0±11	116,6±13	0,94
mittlerer diastolischer Blutdruck±SD (mmHg)				
1. Trimester	69,5±9	69,2±9	67,0±9	0,34
2. Trimester	68,4±8	67,9±8	66,0±7	0,24
3. Trimester	70,9±8	70,5±8	66,8±7	0,43
Proteinausscheidung (Urin Stick: 0/+/>+ in %)				
1. Trimester	88/11/0,5	90/8/2,5	100/0/0	<0,001
2. Trimester	77/21/1,8	79/19/2,1	90/10/0	0,34
3. Trimester	70/27/3,5	71/24/4,1	80/21/0	0,47
neu aufgetretene Ödeme nach 20. SSW (%)				
	36,6	33,7	36,8	0,45
Schwangerschaftshypertonus (%)				
	5,1	4,3	3,3	0,63
Präeklampsie (einschließlich bei vorbestehendem Hypertonus) (%)				
	3,6	3,6	3,3	0,99

3.3.1. Systolischer Blutdruck während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b

Es konnten keine signifikanten systolischen Blutdruckdifferenzen in den einzelnen Allelgruppen während der drei Schwangerschaftstrimester festgestellt werden. Im ersten Trimester betrug der mittlere systolische Blutdruck für den eNOS Polymorphismus VNTR

4 b/b 116,2±12 mmHg, die Variante b/a 116,0±14 mmHg und für die homozygote Variante a/a 114,1±11 mmHg. Im zweiten Trimester betrug der mittlere systolische Blutdruck für den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b 115,6±12 mmHg, für die Variante b/a 115,4±11 mmHg und für die homozygote Variante a/a 114,5±11 mmHg. Im letzten Schwangerschaftstrimester betrug der mittlere systolische Blutdruck für den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b 117,3±11 mmHg, für die Variante b/a 117,0±11 mmHg und für die homozygote Variante a/a 116,6±13 mmHg. Aus den vorliegenden Daten wird der physiologische Blutdruckanstieg im letzten Schwangerschaftsdrittel ersichtlich. Wie im Kapitel 1.2 erläutert, erreicht der Blutdruck gegen Ende der Schwangerschaft meist die Ausgangswerte vor der Schwangerschaft.

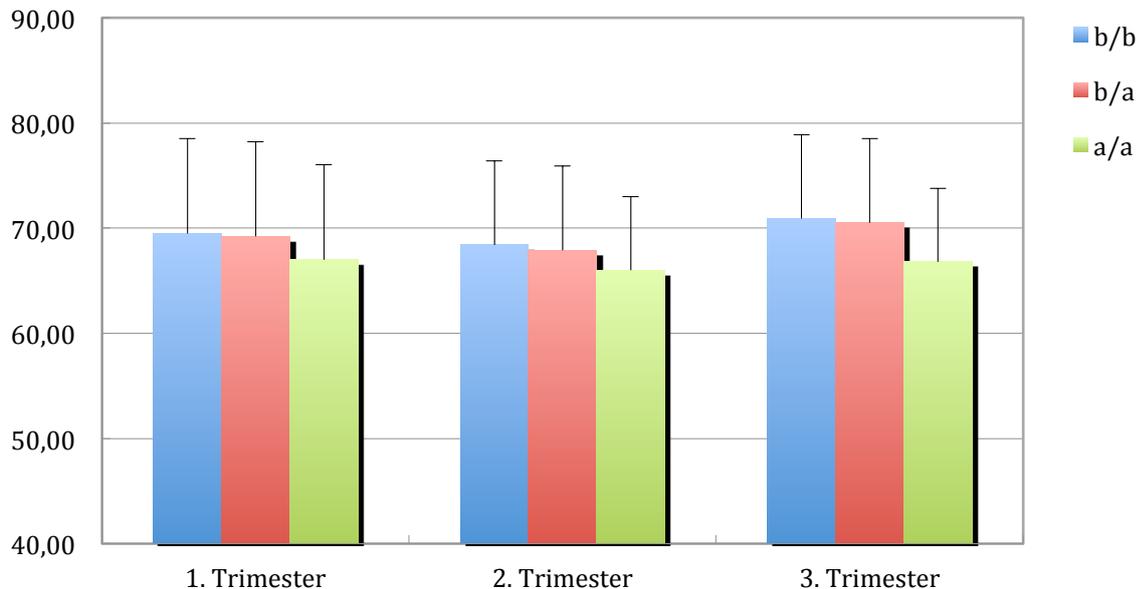


Figur 1: Der mütterliche systolische Blutdruck während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b

3.3.2. Diastolischer Blutdruck während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps

Im ersten Trimester betrug der mittlere diastolische Blutdruck für den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b 69,5±9 mmHg, die Variante b/a 69,2±9 mmHg und für die homozygote Variante a/a 67,0±9 mmHg. Im zweiten Trimester betrug der mittlere diastolische Blutdruck für den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b 68,4±8 mmHg, die Variante b/a 67,9±8 mmHg und für die homozygote Variante a/a 67,9±8 mmHg. Im letzten Schwangerschaftstrimester betrug der

mittlere diastolischen Blutdruck für den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b $70,9 \pm 8$ mmHg, die Variante b/a $70,5 \pm 8$ mmHg und für die homozygote Variante a/a $68,8 \pm 7$ mmHg. Es konnten keine signifikanten diastolischen Blutdruckdifferenzen in den einzelnen Allelgruppen während der drei Schwangerschaftstrimester festgestellt werden.

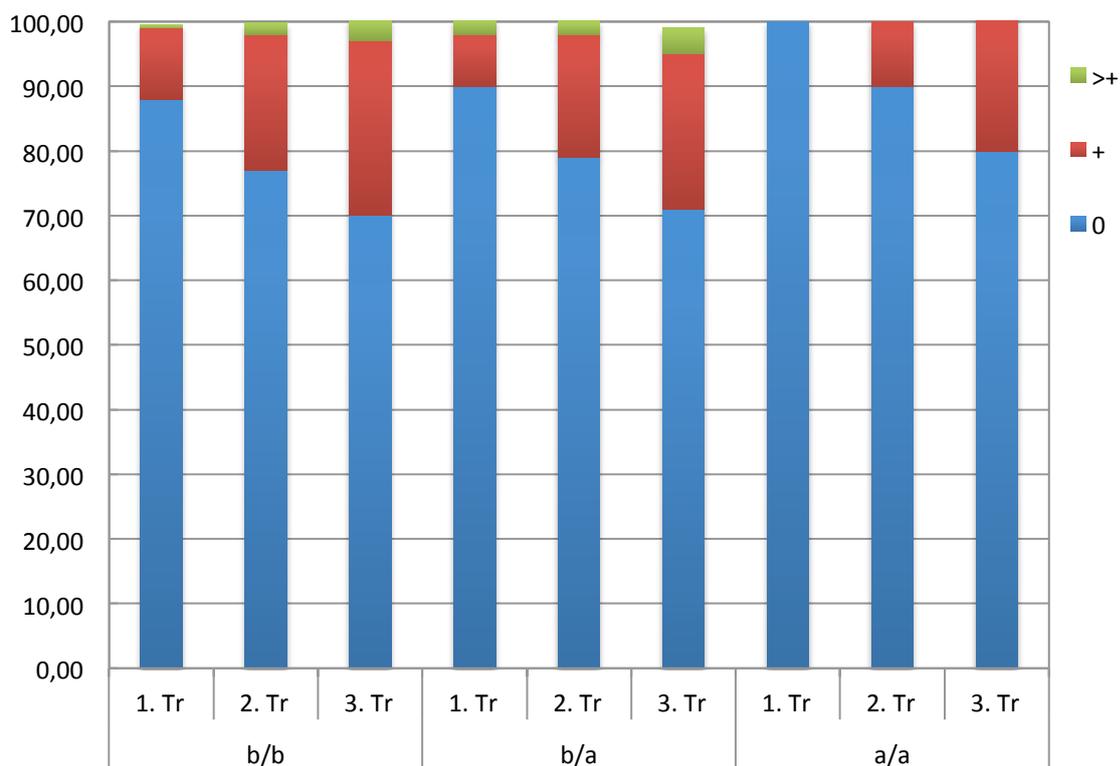


Figur 2: Der mütterliche diastolische Blutdruck während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b

3.3.3. Proteinausscheidung während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps

Die Proteinausscheidung wurde in % angegeben, je nachdem ob der Urin Stick auf Protein negativ, einfach positiv (+) oder mehrfach positiv (>+) war. Es konnte für diese Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem eNOS Polymorphismus im Intron 4 a/b und der Proteinausscheidung während der Schwangerschaft festgestellt werden. Im ersten Trimester hatten 88 % Probandinnen, welche den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b aufwiesen kein Protein im Urin. Bei 11 % der Frauen war der Urin-Stix auf Protein einfach positiv (+) und bei 0,5 % mehrfach positiv (>+). 90 % der Schwangeren mit der Variante b/a waren negativ auf Protein im Urin, 8% der betreffenden Frauen zeigten einfache positive Werte (+) und bei 2,5 % war der Urin Stick mehrfach positiv (>+) auf Protein. Alle Schwangeren mit der homozygoten Variante a/a waren im ersten Trimester auf Protein im Urin negativ. Im zweiten Trimester hatten 77 % Probandinnen, welche den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b

aufwiesen kein Protein im Urin. Bei 21 % der Frauen war der Urin-Stix auf Protein einfach positiv (+) und bei 1,8 % mehrfach positiv (>+). 79 % der Schwangeren mit der Variante b/a waren negativ auf Protein im Urin, 19 % der betreffenden Frauen zeigten einfach positive Werte (+) und bei 2,1 % war der Urin Stick mehrfach positiv (>+) auf Protein. 90 % Schwangeren mit der homozygoten Variante a/a waren im ersten Trimester auf Protein im Urin negativ. Bei den restlichen 10 % der Frauen war der Urin-Stix auf Protein einfach positiv (+). Im dritten Trimester hatten 70 % Probandinnen, welche den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b aufwiesen kein Protein im Urin. Bei 27 % der Frauen war der Urin-Stix auf Protein einfach positiv (+) und bei 3,5 % mehrfach positiv (>+). 71 % der Schwangeren mit der Variante b/a waren negativ auf Protein im Urin, 24 % der betreffenden Frauen zeigten einfach positive Werte (+) und bei 4,1 % war der Urin Stick mehrfach positiv (>+) auf Protein. 80 % Schwangeren mit der homozygoten Variante a/a waren im ersten Trimester auf Protein im Urin negativ. Bei den restlichen 21 % der Frauen war der Urin Stick auf Protein einfach positiv (+).



Figur 3: Proteinausscheidung Urin Stick: 0/+/>+ in %) während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b

3.3.4. Ödeme während der Schwangerschaft in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps

Frauen mit dem eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b entwickelten nach der 20.SSW zu 36,6 % Ödeme. Schwangere mit der heterozygoten Variante b/a zeigten zu 33,7 % Ödeme. Bei Frauen mit der Variante a/a waren 36,8 % betroffen. Der eNOS Polymorphismus im Intron 4 a/b zeigte in dieser Studie keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von Ödemen nach der 20. SSW.

3.3.5. Schwangerschaftshypertonus und Präeklampsie in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps

5,1 % der Frauen mit dem eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b entwickelten ein Schwangerschaftshypertonus. Bei Frauen mit der Variante b/a zeigten 4,3 % einen Schwangerschaftshypertonus und Frauen mit der Variante a/a waren es 3,3 %. 3,6 % der Frauen mit dem eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b entwickelten eine Präeklampsie. Bei Frauen mit der Variante b/a waren es 3,6 % und bei Frauen mit der Variante a/a waren es 3,3 %. Es konnte für diese Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem eNOS Polymorphismus im Intron 4 a/b und der Entwicklung einer Präeklampsie festgestellt werden.

3.4. Geburtsgewicht in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps

Tabelle 6. Geburtsgewicht in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps

VNTR 4 a/b			
b/b	b/a	a/a	
1522 (70 %)	604 (28 %)	60 (2,7 %)	<i>p</i>
3312±657 g	3279±676 g	3377±630 g	0,56

Die P-Werte wurden durch ANCOVA in Bezug auf das mütterliche Alter bei Geburt, das Geschlecht des Neugeborenen, Zwillingsschwangerschaften, mütterlichen Hypertonus, mütterlichen Diabetes mellitus, den mütterlichen BMI und etwaigen Nikotinabusus während der Schwangerschaft angeglichen.

Die Kinder deren Mütter den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b aufwiesen hatten ein mittleres Geburtsgewicht von 3312±657 g. Die Kinder deren Mütter den eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/a aufwiesen hatten ein mittleres Geburtsgewicht von

3279±676 g. Die Kinder deren Mütter den eNOS Polymorphismus VNTR 4 a/a aufwiesen hatten ein mittleres Geburtsgewicht von 3377±630 g.

4. Diskussion

4.1. Häufigkeit der Allelfrequenz im Vergleich zu anderen Studien

Die Studie ergab für den eNOS Genpolymorphismus VNTR 4 a/b folgende Verteilung im untersuchten Kollektiv (n= 2186): 69,6 % Wildtyp (b/b) und 27,6 % für die Variante (b/a). Die Frequenz des Allels (a/a) lag bei 2,7 %. Die Häufigkeitsverteilung der Allele des eNOS4 a/b VNTR Polymorphismus variiert stark in den einzelnen Studien in Abhängigkeit der untersuchten ethnischen Gruppen. So wurde das homozygote aa-Allel bei afrikanisch stämmigen Amerikanern deutlich häufiger gefunden als bei anderen Volksgruppen.^{85,104,105} In der Arbeitsgruppe *Benedetto et al.* an einem europäischen Studienkollektiv ergab sich, ähnlich unserer Studie, folgende Verteilung: 66,7 % Wildtyp (b/b), 31,3 % für die Variante (b/a) und 2 % für die Variante (a/a).¹⁰⁶

4.2. Genetische Prädisposition der schwangerschaftsinduzierten hypertensiven Erkrankungen am Beispiel der Präeklampsie

Wir konnten dem von uns untersuchten eNOS Genpolymorphismus VNTR 4 a/b keinen Einfluss auf die Entstehung von hypertensiven Krankheiten wie der Präeklampsie nachweisen. Es zeigten sich keine signifikanten Blutdruckdifferenzen, weder systolisch noch diastolisch, zwischen den einzelnen Allelgruppen des eNOS Polymorphismus im Intron 4 während der drei Schwangerschaftstrimester. Rein rechnerisch zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Allelgruppen im Bezug auf die Proteinausscheidung im ersten Trimester. In der Allelgruppe b/b zeigten 11% der Frauen im ersten Trimester einfach positive U-Stix-Werte und 0,5% mehrfach positive Werte. In der Allelgruppe b/a waren 8% einfach positiv auf Proteine im Urin und 2,5% mehrfach positiv. Im Gegensatz dazu waren alle Frauen der Allelgruppe a/a im ersten Trimester negativ auf Proteine im Urin. Allerdings betrug die Gesamtzahl der Frauen mit der Allelgruppe a/a nur 60, die Fallzahl der Gruppe b/b 1522 und 604 Frauen wiesen die Allelkonstellation b/a auf. Eine Erklärung könnte in der Wertung des Dipstick Testes liegen. Es wurden zwar nur Urin-Stickergebnisse verwendet, welche Nitrit-negativ waren. Allerdings können nicht korrekt durchgeführte Mittelstrahlurinproben durch Verunreinigungen durch z.B. Vaginalsekret zu

falsch positiven Proteinwerten führen.^{26,27} Laut Definition der Präeklampsie wäre mit einer neu auftretenden Proteinurie erst ab dem zweiten Schwangerschaftstrimester zu rechnen, so dass wir eigentlich keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Allelgruppen im ersten Trimester erwartet hätten. Allerdings ist die genaue Wirkung des a-Allels immer noch nicht hinreichend geklärt. Zahlreiche Studien kamen zu kontroversen Ergebnissen.^{120,121}

Die kontroversen Studienergebnisse werden im folgenden Kapitel (4.3.) durch verschiedene Erklärungsmodelle erläutert.

Des Weiteren konnte für diese Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem untersuchten Polymorphismus und der Proteinausscheidung während der Schwangerschaft oder auf die Entwicklung von Ödemen nach der 20. SSW festgestellt werden. Einzelne Polymorphismen sind höchstwahrscheinlich nur für einen geringen Teil der multifaktoriellen Pathogenese hypertensiver Erkrankungen in der Schwangerschaft verantwortlich. Jedoch gilt eine genetische Prädisposition für die Entwicklung einer hypertensiven Schwangerschaftserkrankung als bewiesen.^{48,107,108} In mehreren Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass Töchter von Müttern mit Präeklampsie ein signifikant höheres Risiko hatten, selbst eine Präeklampsie zu entwickeln, als Töchter von Müttern ohne Präeklampsie.¹⁰⁹ In eine schwedischen Studie mit großer Fallzahl (N>1.100.000) hatten Frauen, deren Schwestern an Präeklampsie litten, ein mehr als dreimal höheres Erkrankungsrisiko als Frauen, deren Schwestern nicht an Präeklampsie erkrankten.¹¹⁰ Bestätigt wurde diese Aussage u.a. in einer amerikanischen Studie (N>10.000). Es wurde gezeigt, dass eine positive Familienanamnese in Bezug auf SIH und Präeklampsie ein erhöhtes Risiko für Schwestern betroffener Frauen darstellt.¹¹¹ Eine positive Familienanamnese für Präeklampsie ist mit einem zwei- bis fünffach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie verbunden.¹¹² Gene die beispielweise die Blutdruckregulation beeinflussen, könnten an der Entstehung der Präeklampsie beteiligt sein. Eines der am häufigsten untersuchten Kandidatengene ist das eNOS-Gen. Verschiedene Pathomechanismen könnten für die Entstehung der Präeklampsie verantwortlich sein. In Verdacht steht eine reduzierte Synthese von eNOS durch DNA-Polymorphismen, Alterationen in der Expression von eNOS durch geminderte Gentranskription oder reduzierte Halbwertszeit der eNOS-mRNA. Eine gesteigerte Verstoffwechslung von NO, eine erhöhte Konzentration von endogenen Inhibitoren der eNOS, sowie eine geminderte Sensibilität gegenüber NO stehen ebenfalls zur Diskussion.^{113,114}

4.3. Einfluss des Genpolymorphismus eNOS Intron 4 a/b auf schwangerschaftsinduzierte hypertensive Erkrankungen

Zahlreiche Studien, welche die Rolle des eNOS Intron 4-Polymorphismus auf schwangerschaftsinduzierte Blutdruckerkrankungen wie Präeklampsie untersuchten, ergaben widersprüchliche Ergebnisse. In unserer Studie an 2186 Frauen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem betreffenden Genpolymorphismus und Präeklampsie hergestellt werden. 3,6 % der von uns untersuchten Frauen mit dem eNOS Polymorphismus VNTR 4 b/b entwickelten eine Präeklampsie. Bei Frauen mit der Variante b/a waren es 3,6 % und bei Frauen mit der Variante a/a waren es 3,3 %. Die Werte unserer Studie entsprechen der Inzidenz der Präeklampsie in der Normalbevölkerung.² Studien aus Italien, Brasilien und Deutschland postulierten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus im Intron 4 und dem Auftreten von Präeklampsie oder schwangerschaftsassoziierter Hypertonie.^{77,115,116} Eine Studie an kolumbianischen Frauen mit Präeklampsie fand ebenfalls keinen Zusammenhang mit dem Auftreten des Intron 4-Polymorphismus, wohl aber mit dem Auftreten des Asp-298-Polymorphismus im Exon 7.¹¹⁷ In einer weiteren Studie an amerikanischen Frauen, allerdings mit deutlich kleiner Fallzahl, war wiederum der eNOS Intron 4-Polymorphismus mit einem signifikant größeren Risiko verbunden, an Präeklampsie zu erkranken. Außerdem war dieser mit einem höheren Blutdruck assoziiert.¹¹⁸ Eine Studie an einem spanischen Kollektiv bestätigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem selteneren Allel a des eNOS-Polymorphismus-Intron 4 und Präeklampsie.¹¹⁹ Widersprüchliche Ergebnisse fanden sich in Studien, welche den Einfluss von eNOS VNTR 4 a/b auf den NO-Plasmalevel untersuchten.^{120,121} Es existieren verschiedene Ansätze, um diese gegensätzlichen Ergebnisse zu erklären. Zu kleine Fallzahlen können zur Verfälschung von Ergebnissen führen, was für unsere Studie mit einer Fallzahl von 2186 Frauen nicht zutreffen dürfte. Es ist weiter denkbar, dass ethnische Differenzen in der phänotypischen Expression des eNOS Polymorphismus existieren, sodass eine ethnische Gruppe mit der eNOS 4 a-Variante eher Marker der Präeklampsie ausbildet als eine andere ethnische Gruppe mit der selben Genvariante. Es gilt als erwiesen, dass es signifikante ethnische Unterschiede in der Inzidenz und der Manifestation von hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen wie Präeklampsie gibt.^{105,122} Im Gegensatz dazu postulierte eine aktuelle Studie aus 2013 einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Allel 4 a des eNOS Intron 4 a/4 b Polymorphismus und der Entwicklung einer Präeklampsie unabhängig von der ethnischen Zugehörigkeit. Untersucht wurden 250 Kaukasierinnen und 220 Frauen aus Ghana.¹²³ Von

den Studienteilnehmerinnen entwickelten 74 Kaukasierinnen und 84 Afrikanerinnen eine Präeklampsie. Die Ergebnisse könnten allerdings durch zu kleine Fallzahlen verfälscht sein. Wahrscheinlich gelingt es erst durch die Analyse von Markern der Präeklampsie im Zusammenhang mit Polymorphismus-Kombinationen an ausreichend großen Studienpopulationen ggf. kleine aber signifikante genetische Effekte herauszufiltern.¹⁰⁶ In unserer Arbeitsgruppe wurden im Rahmen anderer Dissertationen weitere Polymorphismen der endothelialen NO-Synthase in Bezug auf Marker der Präeklampsie an großen Fallzahlen untersucht. Auch hier zeigten sich keine Auswirkungen der eNOS Polymorphismen G894T, T786C und Intron 4 a/b, weder einzeln noch als Haplotypen auf Marker der Präeklampsie.¹²⁴ Eine aktuelle Meta-Analyse aus dem Jahr 2013 konnte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem eNOS Polymorphismus des Intron 4 a/b und Präeklampsie finden.¹²⁵ Eine weitere Meta-Analyse aus dem Jahre 2013 zur Rolle der eNOS Polymorphismen welche 11 Studien zum Intron 4 a/b Polymorphismus, 11 Studien zum -786T>C Polymorphismus und 22 Studien zum G894T Polymorphismus untersuchte, postuliert einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem eNOS Polymorphismus des Intron 4 a/b und dem 786 T>C Polymorphismus bei der Entstehung von Präeklampsie. Des Weiteren besagt diese Meta-Analyse, dass eine niedrige NO-Serumkonzentration das Risiko einer Präeklampsie erhöht.¹²⁶ Eine Analyse aus China aus dem Jahr 2012 zeigte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem von uns untersuchten Polymorphismus und Präeklampsie.¹²⁷ Die Rolle des eNOS Polymorphismus des Intron 4 a/b bei der Entstehung der Präeklampsie bleibt weiterhin unklar. Polygenetische Erkrankungen werden durch eine Vielzahl von genetischen und nicht genetischen Einflussfaktoren verursacht, die wiederum miteinander interagieren. Wahrscheinlich tragen mehrere Gene an unterschiedlichen Genorten und unterschiedliche Allele innerhalb eines Gens zur Krankheitsentstehung bei (Multilokus-Multiallel-Modell).¹²⁸ Die sogenannte „threshold theory“ besagt, dass bei einer polygenetischen Erkrankung das Vorhandensein einer polymorphen Risikovariante die Schwelle für eine Erkrankung senkt. Eine aktuelle Theorie geht davon aus, dass polygenetische Erkrankungen eher von vielen Polymorphismen mit jeweils geringen bis moderaten phänotypischen Effekten als von wenigen Polymorphismen mit starken Effekten auf den Phänotyp verursacht werden. Auch in den momentan vorliegenden Ergebnissen aus genetischen Assoziationsstudien zu Präeklampsie zeichnet sich ab, dass mehrere Gene mit moderaten bis geringen Effekten im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren die Prädisposition für eine Präeklampsie erhöhen.¹²⁹ Diese Theorie konnte in Studien an komplex vererbten Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt und dem ischämischen Schlaganfall untermauert werden.¹³⁰

4.4. Multifaktorielle Ursachen in der Pathogenese der schwangerschaftsbedingten hypertensiven Erkrankungen insbesondere der Präeklampsie

Ein Beispiel für das Zusammenwirken von Genpolymorphismen und nichtgenetischen Einflussfaktoren z.B. Umwelteinflüssen macht eine Studie von *Wang et al.* deutlich. Für das polymorphe Intron 4 der eNOS wurde bei Rauchern beobachtet, dass die Einschränkung der endothelialen NOS-Aktivität im plazentaren Gewebe nur bei Trägern der selteneren Allele (eNOS Intron 4 b/a und a/a) im Vergleich zu den Trägern des Wildtyp-Allels (eNOS Intron 4 b/b) vorhanden war.¹³¹ Ein weiterer Ansatzpunkt in der Pathogenese der schwangerschaftsinduzierten Bluthochdruckerkrankungen ist der Einfluss des fetalen Genoms. In einzelnen Studien wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Präeklampsie und fetalen Aneuploidien wie z.B. der Triploidie, der Trisomie 13¹³² oder einer Blasenmole¹³³ herausgearbeitet. Auch ein paternaler Einfluss wird diskutiert. Frauen, die von einem Mann schwanger wurden, welcher zusammen mit der vorherigen Partnerin eine präeklampsische Schwangerschaft hatte, wiesen ein zweifach höheres Risiko auf an einer Präeklampsie zu erkranken.¹³⁴ In einer weiteren Studie zeigte sich, dass Schwägerinnen von Präeklampsiepatientinnen signifikant häufiger eine Präeklampsie erlitten als Schwägerinnen gesunder Frauen.¹³⁵ Männer, deren Mütter eine Präeklampsie hatten, waren häufiger Vater einer präeklampsischen Schwangerschaft als Männer, die nach einer normalen Schwangerschaft geboren wurden.¹³⁶ In der vorliegenden Studie fand keine Befragung der Väter im Hinblick auf Präeklampsie in deren Familien statt, da zum Befragungszeitpunkt die Väter meist nicht anwesend waren. Ein immunologisches Mitwirken bei der Entstehung schwangerschaftsassoziierter hypertensiver Erkrankungen wird deutlich bei der Beobachtung, dass das Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie durch Primiparität, durch einen Partnerwechsel zwischen zwei Geburten, durch den Gebrauch von Kondomen, durch in-vitro-Fertilisation und durch Schwangerschaften nach Oozytendonation erhöht wird.^{137,138} Der Kontakt mit Sperma eines Partners über einen längeren Zeitraum hinweg scheint dagegen das Risiko einer Präeklampsie zu minimieren.¹³⁹ Ebenso kann eine gestörte mütterliche Immuntoleranz gegenüber dem Fötus zu Aborten, Frühgeburten, Schwangerschaftshypertonus, Präeklampsie und Eklampsie führen.¹⁴⁰ NO-hemmende Substanzen, ein Substratmangel, z.B. ein Arginin-Mangel, ein Kofaktor-Mangel, ein gesteigerter Abbau von NO durch Sauerstoffradikale sowie Diffusionshemmnisse für NO durchs Endothel werden ebenfalls mit der Beeinträchtigung des NO-Stoffwechsels bei Präeklampsie in Zusammenhang gebracht.^{38,62,66} Letztendlich könnte die Beeinträchtigung des

NO-Stoffwechsels bei Präeklampsie nicht nur die Ursache, sondern auch eine Folge der pathologischen Alteration der Endothelfunktion darstellen. Die aktuelle Studienlage deutet darauf hin, dass die schwangerschaftsinduzierten Erkrankungen, insbesondere die Präeklampsie, multifaktorielle und polygenetische Erkrankungen sind. Eine Störung des endothelialen NO-Stoffwechsels ist Teil der Pathogenese der Präeklampsie und wahrscheinlich genetisch bedingt. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass genomweite Kopplungsuntersuchungen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung des Chromosoms 7 als Locus für ein Kandidatengen der Präeklampsie zeigten. Es bleibt trotz allem die Möglichkeit bestehen, dass in Zukunft ein einzelnes oder mehrere Gene mit einem stärkeren Effekt auf das Erkrankungsrisiko für schwangerschaftsinduzierte hypertensive Erkrankungen wie die Präeklampsie identifiziert werden könnten.

4.5. Einfluss des maternalen Genpolymorphismus eNOS Intron 4 a/b auf das Geburtsgewicht

In unserer Studie konnten wir keinen Zusammenhang zwischen dem untersuchten maternalen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b und dem kindlichen Geburtsgewicht im Sinne der „advanced fetal programming hypothesis“ feststellen. Im Gegensatz dazu postulierte eine Studie mit kleiner Fallzahl ein geringeres Geburtsgewicht der Neugeborenen bei Frauen mit wenigstens einem a-Allel.¹⁴¹ Wie schon im Kapitel 1.5.2 beschrieben, besagt die „advanced fetal programming hypothesis“, dass nicht nur Umweltfaktoren wie z.B. Ernährung oder Rauchen, sondern auch die maternalen Gene an der fetalen Programmierung Anteil haben.¹⁰⁰ So wirken sich die mütterlichen Gene auf den plazentaren Blutfluss, die Nährstoffversorgung des Feten und somit auf das fetale Wachstum aus. Im Gegensatz zu unserer Studie konnte in verschiedenen Arbeitsgruppen der Einfluss anderer mütterlicher Genpolymorphismen auf das Geburtsgewicht des Kindes nachgewiesen werden.^{101,102} Ein Beispiel stellen die Mutationen im Glukokinasegen dar.¹⁴² Glukokinase ist ein Enzym der Glykolyse. Es fungiert in der Bauchspeicheldrüse gleichzeitig als Glukoserezeptor und Sensor des Blutzuckerspiegels. Die durch Mutationen veränderten Rezeptoren messen einen falsch-erniedrigten Glukosewert im Blut, woraus eine verminderte Insulinsekretion und somit erhöhte Blutzuckerwerte resultieren. Bei Schwangeren führt die genannte Mutation zu erhöhten Glukosewerten im Blut der Mutter und des Feten. Die daraufhin vermehrte Insulinausschüttung der kindlichen Bauchspeicheldrüse stimuliert das fetalen Wachstum. Somit bringen Mütter mit einer bestimmten Mutation im Glukokinasegen, verglichen mit der Kontrollgruppe, schwerere Babys zur Welt. Besteht dagegen diese

Mutation beim Feten, resultiert daraus aufgrund einer inkorrekt erniedrigt gemessenen Glukosekonzentration eine verminderte Insulinausschüttung und damit ein vermindertes Wachstum. Weisen sowohl die Mutter als auch der Fetus diese Mutation auf, gleichen sich die beiden gegensätzlichen Effekte aus, und das Baby zeigt ein normales Geburtsgewicht. Der von uns untersuchte maternale Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b scheint allein nicht stark genug zu sein, um sich auf das Geburtsgewicht auszuwirken. Der Einfluß von monogenetischen Mutationen auf das Geburtsgewicht wie zum Beispiel die bereits erwähnte Mutation im Glukokinasegen gilt als bewiesen. Es ist jedoch auch denkbar, dass viele Polymorphismen mit jeweils geringen bis moderaten phänotypischen Effekten Auswirkungen auf das Geburtsgewicht haben könnten. Das niedrigere Geburtsgewicht der Neugeborenen präeklaptischer Mütter entspricht nicht nur einer iatrogen verkürzten Schwangerschaftsdauer, sondern auch einer intrauterinen Wachstumsverzögerung in Relation zum Gestationsalter. Eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) als häufige Komplikation bei den Kindern präeklaptischer Mütter wurde in zahlreichen Untersuchungen festgestellt.^{143,144} Die IGUR ist auch heute noch mit einer erhöhten perinatalen Morbidität sowie Mortalität assoziiert, und stellt einen Risikofaktor für Erkrankungen im Erwachsenenalter dar.⁹⁰ IUGR ist dabei definiert als ein Zustand, bei welchem der Fetus sein genetisch determiniertes Wachstumspotential zu einem vorgegebenen Schwangerschaftsalter nicht erreicht hat.¹⁴⁵ Ursächlich für die intrauterine Wachstumsretardierung ist eine plazentare Mangelversorgung des Fötus. In der vorliegenden Arbeit konnten wir keinen Zusammenhang zwischen dem untersuchten maternalen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b und Präeklampsie nachweisen. Demzufolge wären im Gegensatz zu einer präeklaptischen Situation der plazentare Blutfluss und die Nährstoffversorgung des Feten nicht gestört, welches das im Durchschnitt normale Geburtsgewicht unserer Studienteilnehmer erklären würde.

4.6. Theorien zur Wirkungsweise eines Introns

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass der Genpolymorphismus eNOS VNTR 4 a/b allein keinen signifikanten Einfluss auf die Blutdruckregulation, die Proteinausscheidung, die Entwicklung von Ödemen und das Geburtsgewicht während der Schwangerschaft ausübt. Wie schon im Abschnitt 1.4.4 erwähnt, wird die endotheliale NO-Synthase von einem Gen codiert, welches auf Chromosom 7q 35-36 liegt und 26 Exons und 25 Introns aufweist. Der von uns untersuchte Genpolymorphismus ist im Intron 4 lokalisiert. Unter dem Begriff Transkription versteht man die Herstellung einer Kopie eines Gens in

Form eines einzelsträngigen RNA-Moleküls. Bei der Herstellung der mRNA werden die Intron-Sequenzen entfernt. Dieser Vorgang wird Spleißen genannt.¹⁴⁶ Demzufolge könnte man annehmen, ein Polymorphismus in einem Intron, wie der von uns Untersuchte habe keinen Einfluss auf die Gentranskription und Gentranslation. Jedoch existieren verschiedene Erklärungsmodelle, inwieweit eine Veränderung im Genom des Introns die Transkriptionsregulation beeinflussen könnte.¹⁴⁷ Noch nicht geklärt ist, ob Polymorphismen im Intron selbst eine grundlegende Wirkung haben oder nur Marker für andere funktionelle Varianten sind. Ein Hauptproblem bei der Transkription ist das Auffinden der korrekten Startstelle, so dass möglichst nur der für die Funktion des betreffenden Gens benötigte DNA-Abschnitt transkribiert wird. Um dies zu ermöglichen, verfügen Gene über eine zum Teil sehr umfangreiche Promotorregion. Ein vorstellbarer Mechanismus wäre z.B. eine Assoziation des Polymorphismus im Intron mit einer Mutation in einer kodierenden Genregion oder im Promotor. In einer Studie wurde ein Zusammenhang zwischen dem a-Allel im Intron 4 des eNOS Gens mit einem T→C Polymorphismus (g.-786T>C) in der Promotorregion gefunden. Hierdurch wird die Transkription des Gens beeinflusst. Bei C-Allel-Trägern ist die Promotoraktivität weniger als halb so stark wie bei T-Allel-Trägern.¹⁴⁸ Einer koreanischen Arbeitsgruppe zufolge zeigte der T→C-Promotor-Polymorphismus des eNOS-Gens die gleiche Allel-Verteilung wie der Intron 4-Polymorphismus in kultivierten humanen Endothelzellen (HUVEC). Der mittlere eNOS-Proteinlevel der kultivierten HUVEC-Zellen mit dem 4 a/4 b-Genotyp war signifikant niedriger als der Proteinlevel der 4 b/4 b-Zellen. Auch die Enzymaktivität war in der 4 a/4 b-Gruppe geringer.¹⁴⁹ Denkbar wäre ebenfalls der Einfluss auf ein benachbartes Gen, welches bei der Pathogenese der Präeklampsie beteiligt ist. Vielleicht verändern bestimmte Polymorphismen in Intronregionen den Vorgang des Spleißens, was wiederum zu Modifikationen im Transkriptionsprodukt führt. Die veränderte Genexpression kann die Ausbildung von Phänotypen beeinflussen. Des Weiteren wird der Einfluss auf ein noch unbekanntes Enhancer-/Suppressorelement diskutiert.¹⁵⁰ Hypothesen, nach denen Introns bedeutungslos für die Proteinsynthese sind, gelten mittlerweile als widerlegt. Einzelnen Introns wird inzwischen eine Rolle bei der Genregulation zugeschrieben.^{151,152} Beispielsweise können Introns Sequenzen enthalten, die cis-regulatorische Elemente bestimmter Gene darstellen.^{153,154} Bei diesen Elementen handelt es sich um Sequenzen der Promotorregion, die durch Interaktion mit weiteren Strukturen die Transkription beeinflussen. Cis-regulatorische Elemente ermöglichen die Bindung der RNA-Polymerasen an den Transkriptionsstartpunkt und können Informationen darüber geben, mit welcher Effizienz ein Gen transkribiert wird bzw. wie seine Transkription reguliert ist. 2002

postulierte eine Arbeitsgruppe einen Haplotyp-abhängigen cis-regulatorischen Effekt des Polymorphismus im Intron 4 auf den Promotor und damit auf die Transkriptionseffektivität. Beim 4 a/4 b-Genotyp war die Transkriptionseffektivität signifikant niedriger als bei der Genvariante 4 b/4 b.¹⁵⁵ In der Literatur wird vermerkt, dass einzelne Introns für Proteine kodieren können.¹⁵⁶ Es wird vermutet, dass die Ausprägung eines Phänotyps nicht nur von den proteinkodierenden Sequenzen eines Genoms abhängt, sondern wesentlich von der Regulation der Genexpression bestimmt wird. Die Regulation der Genexpression wird u. a. von Informationen, die in Introns enthalten sind, beeinflusst. Neben Veränderungen, die funktionelle Elemente der Introns beeinflussen, ist auch denkbar, dass durch Varianten strukturelle Änderungen der mRNA entstehen, die weitere Schritte der Proteinsynthese, wie den Transport zu den Ribosomen, die Regulation des Spleißens oder die Bindung von mRNA an Ribosomen beeinflussen.

5. Zusammenfassung

Man vermutet, dass hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft unter anderem durch Störungen der Plazentaentwicklung und -perfusion ausgelöst werden. Ziel dieser Dissertation war es, den Einfluss des eNOS 4 a/b Genpolymorphismus auf die Blutdruckregulation, die Proteinausscheidung und die Ödembildung in der Schwangerschaft zu untersuchen. Um gegebenenfalls kleine aber signifikante genetische Effekte ausfindig zu machen konzentrierten wir uns nicht auf die binären Endpunkte wie Gestationshypertonus und Präeklampsie. Stattdessen analysierten wir den Verlauf einzelner Marker wie Blutdruckverhalten, Proteinausscheidung und Ödementwicklung während der Schwangerschaft. Zusätzlich untersuchten wir, ob der eNOS 4 a/b Genpolymorphismus Einfluss auf das Geburtsgewicht des Neugeborenen hat. Menschliche DNA wurde aus dem Vollblut von Müttern und Neugeborenen isoliert. Daraufhin wurde eine Typisierung des eNOS Polymorphismus im Intron 4 a/b mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Mittels elektrophoretischer Auftrennung der gewonnenen DNA und anschließender Färbung mit 0,05 %igem Ethidiumbromid erfolgte die Auswertung der Bandengröße der PCR-Produkte unter ultraviolettem Licht. Alle Proben wurden doppelt bestimmt und nur bei Übereinstimmung verwendet. Die Datenerhebung erfolgte durch ausführliche Gespräche mit jeder Frau mittels eines Studienprotokolls und der Verwendung von Daten aus dem Mutterpass. Die Studie ergab für den eNOS Genpolymorphismus VNTR 4 a/b folgende Verteilung im untersuchten Kollektiv (n=2186): 69,6 % Wildtyp (b/b) und 27,6 % für die Variante (b/a). Die Frequenz des Allels (a/a) lag bei den untersuchten

Schwangeren bei nur 2,7 %. Es konnte anhand einer großen Teilnehmerzahl an schwangeren Kaukasierinnen gezeigt werden, dass der untersuchte Genpolymorphismus eNOS VNTR 4 a/b allein keinen signifikanten Einfluss auf die Blutdruckregulation, die Proteinausscheidung und die Entwicklung von Ödemen während der Schwangerschaft ausübt. Des Weiteren konnten wir in unserer Studie keinen Zusammenhang zwischen dem untersuchten maternalen Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase Intron 4 a/b und dem kindlichen Geburtsgewicht im Sinne der „advanced fetal programming hypothesis“ feststellen. Im Gegensatz zu pathophysiologischen Gesichtspunkten und den Ergebnissen von zahlreichen kleineren Studien, scheinen die Auswirkungen des eNOS Genpolymorphismus VNTR 4 a/b allein nicht stark genug zu sein, um messbare Veränderungen bei Schwangeren und ihren Neugeborenen zu verursachen.

6. Abkürzungsverzeichnis

IUGR	intrautine growth restriction
SSW	Schwangerschaftswoche
SIH	schwangerschaftsinduzierter Hypertonus
BMI	body mass index
DM	Diabetes mellitus
eNOS	endotheliale Nitritoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
ADH	Antidiuretisches Hormon
sFlt-1	löslicher VEGF-Rezeptor 1, der löslichen fms-like Tyrosinkinase
VNTR	„variable number of tandem repeats“
SNP	„single nucleotid polymorphismus“
ANCOVA	analysis of variance
AHM	antihypertensive Medikation

7. Literaturverzeichnis

-
- ¹ Hypertension in pregnancy. Journal of the American Society of Hypertension. 2008; Volume 2, Issue 6: 484-94.
- ² Barton JR, Sibai BM. Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 2008; 112(2 Pt 1): 359-72.
- ³ Roberts JM, Redman CW. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet.* 1993; 341 (8858):1447-51.
- ⁴ Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation.* 2004; 109 (11): 1359-65.
- ⁵ Brown DW, Dueker N, Jamieson DJ, Cole JW, Wozniak MA, Stern BJ, et al. Preeclampsia and the risk of ischemic stroke among young women: results from the Stroke Prevention in Young Women Study. *Stroke.* 2006; 37(4): 1055-9.
- ⁶ World Health Organization: The world health report: 2005: make every mother and child count. Online im Internet: URL: <http://www.who.int/whr/2005/en/> (Stand 15.5.2008)
- ⁷ Goldenberg RL, Rouse DJ. Prevention of premature birth. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339(5): 313-20.
- ⁸ Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension* 2003; 41(3): 437-45.
- ⁹ Duley L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Semin. Perinatol.* 2009; 33: 130-7.
- ¹⁰ Verloren S, Dudenhausen J. Präeklampsie und hypertensive Schwangerschaftserkrankungen. *Frauenheilkunde up2date.* 2009; 6: 461-4.
- ¹¹ Barker DJ. Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann. Med.* 1999; 31 Suppl 1: 3-6.
- ¹² Arngrimsson R, Hayward C, Nadaud S, Baldursdottir A, Walker JJ, Liston WA, et al. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61(2): 354-62.
- ¹³ Benjafeld AV, Morris BJ. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2000; 13(9): 994-8.
- ¹⁴ Fatini C, Sticchi E, Gensini F, Genuardi M, Tondi F, Gensini GF, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene influences the risk of pre-eclampsia, the recurrence of negative pregnancy events and the maternal-fetal flow. *J. Hypertens.* 2006; 24 (9): 1823-9.
- ¹⁵ Weiner CP, Knowles RG, Moncada S. Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994; (Band 171), Nr. 3: 838-43.
- ¹⁶ Goetz RM, Morano I, Calovini T, Studer R, Holtz J. Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1994; 205(1): 905-10.
- ¹⁷ Podjarny E, Baylis C, Losonczy G. Animal models of preeclampsia. *Semin. Perinatol.* 1999; (Band 23), Nr. 1: 2-13.

-
- ¹⁸ Tsukimori K, Komatsu H, Fukushima K, Kaku T, Nakano H, Wake N. Inhibition of nitric oxide synthetase at mid-gestation in rats is associated with increases in arterial pressure, serum tumor necrosis factor-alpha, and placental apoptosis. *Am. J. Hypertens.* 2008; (Band 21), Nr. 4: 477-81.
- ¹⁹ Kobashi G, Yamada H, Ohta K, Kato E, Ebina Y, Fujimoto S. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am. J. Med. Genet.* 2001; .103(3): 241-4.
- ²⁰ Report of the „National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy“. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000; 183 (1) :1- 22.
- ²¹ Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension.* 2003; 41(3): 437-45.
- ²² Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet Met al. The classification and diagnosis oft the hypertensive disorders of pregnancy: statment from the Internazional Sociaty fort he Study of Hypertension in Pregnancy(ISSHP). *Hypertens. Pregnancy.* 2001; 20 : 9-14.
- ²³ Duckitt, K., & Harrington, D . Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2005; 330(7491): 565.
- ²⁴ Sibai BM. Diagnosis, prevention and management of eclampsia. *Obstet. Gynecol.* 2005; 105(2): 402-10.
- ²⁵ <http://www.jwatch.org/fw108159/2013/11/15/acog-proteinuria-no-longer-necessary-preeclampsia#sthash.2GpVz47k.dpuf>
- ²⁶ Bühling KJ, Friedemann W, Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe, Urban und Fischer. 2004; 1. Auflage: 122-125.
- ²⁷ Gangaram R, Ojwang PJ, Moodley J, Maharaj D. The accuracy of urine dipsticks as a screening test for proteinuria in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens. Pregnancy.* 2005; 24(2): 117-23.
- ²⁸ Pridjian G and Puschett J B. Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2002; 57(9): 598-618.
- ²⁹ Caniggin I, Winter J, Lye SJ , Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia, Samuel Lunenfeld Research Institute, Department of Obstetrics and Gynaecology, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada. 2000; *Placenta. Suppl A:* 25-30.
- ³⁰ Sohn C, Voigt H, Vetter K. Kursbuch Dopplersonographie in Gynäkologie und Geburtshilfe. 1999; Thieme: 41-42.
- ³¹ Pijnenborg R, Vercruysse L, Verbist L, Van Assche FA. Interaction of interstitial trophoblast with placental bed capillaries and venules of normotensive and preeclamptic pregnancies. *Placenta* 1998; 19(8): 569-75.
- ³² Granger JP; Alexander, BT; Llinas M T; Bennett WA, Khalil R A. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; (Band 38), Nr. 3 Pt 2:718- 22.
- ³³ 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: 950-6.

-
- ³⁴ Kublickiene KR, Lindblom B, Krüger K, Nisell H. Preeclampsia: Evidence for impaired shear stress-mediated nitric oxide release in uterine circulation. *Am J Obstet Gynaecol* 2000; 183:160-166.
- ³⁵ Pfab T. Genetische und epigenetische Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen bei Schwangeren und ihren Kindern. Charité Centrum für Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin (CC10), Medizinische Klinik für Nephrologie - Campus Benjamin Franklin, 2009; Habilitationsschrift : 6-8.
- ³⁶ Knofler M, Pollheimer J. IFPA Award in Placentology Lecture: Molecular regulation of human trophoblast invasion. *Placenta*. 2012; 33: 55–62.
- ³⁷ Maynard SE, Min JY, Merchan J et al. Express placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 649-58.
- ³⁸ Levine RJ, Lam C, Qian C et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 992-1005.
- ³⁹ Erlebacher A. Immunology of the Maternal-Fetal Interface. *Annu. Rev. Immunol.* 2013; 31: 387–411.
- ⁴⁰ Soto E, Romero R, Kusanovic JP, Ogge G, Hussein Y, et al. Late- onset preeclampsia is associated with an imbalance of angiogenic and anti-angiogenic factors in patients with and without placental lesions consistent with maternal underperfusion. *J Matern-Fetal Neo M.* 2012; 25(5): 498–507.
- ⁴¹ Modifiziert nach Granger et al., 01. TNF- α , Tumor Nekrose Faktor- α ; TBX, Thromboxan; ET, Endothelin; PGI2, Prostaglandin I2; NO, Stickoxid. Schema entnommen aus: Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction, *Hypertension* (Band 38), 2001, Nr. 3 Pt 2: 718-722.
- ⁴² Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Preeclampsia. 2005; *Lancet* (Band 365), Nr. 9461: 785-99.
- ⁴³ Khalil, RA, Granger JP. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002; (Band 283), Nr. 1 : 29-45.
- ⁴⁴ Axt-Flidner R, Schröer A, Diedrich K. Molekulare Mechanismen der Präeklampsie. *Der Gynäkologe* 2004; 37:132-9.
- ⁴⁵ Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta*. 2009; 30(Suppl A): 32–7.
- ⁴⁶ Huppertz B . Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 2008; 51(4): 970–5.
- ⁴⁷ Huppertz B, Sammar M, Chefetz I, Neumaier-Wagner P, Bartz C, Meiri H. Longitudinal determination of serum PP13 during development of preeclampsia. *Fetal. Diagn. Therapy*. 2008; 24 (3): 230-6.
- ⁴⁸ Arngrimsson R, Bjornsson S, Geirsson RT, Bjornsson H, Walker JJ, Snaedal G. Genetic and familial predisposition to eclampsia and preeclampsia in a defined population. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1990; 97(9): 762-9.

-
- ⁴⁹ Mutze S, Rudnsik-Schoneborn S, Zerres K, Rath W. Genes and the preeclampsia syndrome. *J. Perinat. Med.* 2008; 36 (1): 38–58.
- ⁵⁰ Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329 (27): 2002-12.
- ⁵¹ Greenberg SS, Diecke FP, Cantor E, Peevy K, Tanaka TP. Inhibition of sympathetic neurotransmitter release by modulators of cyclic GMP in canine vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; 187(3): 409-23.
- ⁵² Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329(27): 2002-12.
- ⁵³ Dudzinski DM, Igarashi J, Greif DM, Michel T, The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006; 46: 235-76.
- ⁵⁴ Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, et al. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS. Lett.* 1992; 307(3): 287-93.
- ⁵⁵ Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991; 88(11): 4651-5.
- ⁵⁶ Miyamoto Y, Saito J, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998; 32: 3-8.
- ⁵⁷ Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, et al. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11(3): 229-41.
- ⁵⁸ Noiri E, Satoh H, Taguchi J, Brodsky S, Nakao A, Ogawa Y, Nishijima S, Yokomizo T, Tokunaga K, Fujita T. Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. From the Department of Nephrology and Endocrinology, Diabetes Mellitus and Metabolism, Human Genetics, Biochemistry and Molecular Biology. 2002; University of Tokyo, Japan : 535-55.
- ⁵⁹ Landau R, Xie H, Dishy V, Wood A, Stein CM, Smiley RM. No Association of the ASP298 variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with preeclampsia. *American. J. of Hypertension.* 2004; 17: 391-4.
- ⁶⁰ Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, et al. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 1998; 102 (12): 2061-71.
- ⁶¹ Hirooka Y, Kishi T, Sakai K, Shimokawa H, Takeshita A. Effect of overproduction of nitric oxide in the brain stem on the cardiovascular response in conscious rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2003; 41(Suppl 1): 119- 26.
- ⁶² Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989; 2(8670): 997-1000.
- ⁶³ Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet.* 1997; 349(9055): 837-42.
- ⁶⁴ Williams D J, Vallance P J, Neild G H, Spencer J A, Imms F J. Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy, 1997; *Am. J. Physiol (Band 272), Nr. 2 Pt 2: H748-H752.*

-
- ⁶⁵ Edwards D, Arora C, Bui D, Castro L. Long-term nitric oxid blockade in the pregnant rat. Effects on blood pressure and plasma level of endothelin-1. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1996; 175: 484-8.
- ⁶⁶ Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, Yoo HS. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta.* 2006; (Band 27), Nr. 4-5: 438-44.
- ⁶⁷ Hakli T, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2003; 10 (3): 154-7.
- ⁶⁸ Dunnen JT den, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum. Genet.* 2001; 109(1): 121-4.
- ⁶⁹ Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T- 786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999; 99 (22): 2864-70.
- ⁷⁰ Serrano NC, Casas JP, Diaz LA, Paez C, Mesa CM, Cifuentes R, et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension.* 2004; 44 (5):702-7.
- ⁷¹ Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (23): 17478-88.
- ⁷² Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(6): 987-92.
- ⁷³ Reiterova J, Merta M, Tesar V, Stekrova J. Endothelial nitric oxide synthase affects the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease, departments of nephrology and molecular genetics. Charles University, Prague, Czech Republic, *Kidney Blood Res.* 2002;;25 : 87-90.
- ⁷⁴ Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat. Med.* 1996; 2:41-45.
- ⁷⁵ Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, et al. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem* 1994; 223: 719-26.
- ⁷⁶ Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 198:1027-33.
- ⁷⁷ Thomas K. Bedeutung des Intron 4-Polymorphismus im eNOS-Gen bei hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen. 2008; Dissertation an der FU Berlin :12-14. (modifizierte Darstellung)
- ⁷⁸ Yunden D et al. Positive Association oft he Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms With High-Atitude Pulmonary Edema. *Circulation.* 2002; 106: 826-30.
- ⁷⁹ Sigusch HH, Surber R, Lehmann MH, et al. Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2000; 60: 229-36.

-
- ⁸⁰ Freedman BI, Yu H, Anderson P, Roh BH, Rich SS, Bowden DW. Genetic analysis of nitric oxide and endothelin in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1794-800.
- ⁸¹ Hooper WC, Lally C, Austin H, et al. The Relationship Between Polymorphisms in the Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase Gene and the Platelet GPIIIa Gene with Myocardial Infarction and Venous Thromboembolism in African Americans. *Chest* 1999; 116: 880-6.
- ⁸² Park JE, Lee WH, Hwang TH et al. Aging affects the association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction in the Korean male population. *Korean J Intern Med.* 2000, 15 (1): 65-70
- ⁸³ Yao YS, Chang WW, Jin YL, He LP. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with ischemic stroke. *Gene.* 2013; 10, 528(2): 84-92.
- ⁸⁴ Uwabo J, Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K. Association of a Variable Number of tandem Repeats in the Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene With Essential Hypertension in Japanese. *Am. J. Hypertens.* 1998; 11: 125-8.
- ⁸⁵ Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igho-Pemu P, Lankford B, Morgan J et al. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function and blood pressure in African Americans. *Am. J. Hypertens.* 2004; 17(7): 560-7.
- ⁸⁶ Rao S, Austin H, Davidoff MN, Zafari AM. Endothelial nitric oxide synthase intron 4 is a marker for coronary artery disease in African-American and Caucasian men. *Ethn. Dis.* 2005; 15:191-7.
- ⁸⁷ Sigusch HH, Surber R, Lehmann MH, et al. Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2000; 60: 229-36.
- ⁸⁸ Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, et al. Genetic and Environmental Determinants of Plasma Nitrogen Oxides and Risk of Ischemic Heart Diseases. *Hypertension* 2001; 38:1054-61.
- ⁸⁹ Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet. Genomics* 2005; 15: 565-70.
- ⁹⁰ Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds S J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989; (Band 2), Nr. 8663: 577-80.
- ⁹¹ Frankel S, Elwood P, Sweetnam P, Yarnell J, Smith GD. Birthweight, body-mass index in middle age and incident coronary heart disease. *Lancet.* 1996; 348 (9040):1478-80.
- ⁹² Gennser G, Rymark P, Isberg PE. Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *Br. Med. J. (Clin.Res.Ed).* 1988, 296 (6635):1498-500.
- ⁹³ Widdowson M, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr.Res.* 1975; 9 (3): 154-6.

-
- ⁹⁴ Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch. Dis. Child.* 1994; 71 (4):288-90.
- ⁹⁵ N. Hales, D. J. Barker, P. M. Clark, L. J. Cox, C. Fall, C. Osmond, and P. D. Winter. Fetal and infant growth and impaired Glukose tolerance at age 64. *BMJ* 303 (6809):1019-1022, 1991
- ⁹⁶ Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 1995; 25 (7):457- 63.
- ⁹⁷ Pfab T, Stirnberg B, Sohn A, Krause K, Slowinski T, Godes M, Guthmann F, Wauer R, Halle H, Hocher 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; 25:1255-1261.
- ⁹⁸ Hellerstedt W L, Himes J H, Story M, Alton I R, Edwards L E. The effects of cigarette smoking and gestational weight change on birth outcomes in obese and normal-weight women. *Am. J. Public Health.* 1997; 87 (4): 591-6.
- ⁹⁹ Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizan JM, Kafury-Goeta AC. Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999;181(4): 1026-35.
- ¹⁰⁰ Hocher B, Slowinski T, Bauer C, Halle H. The advanced fetal programming hypothesis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001; (Band 16), Nr. 6: 1298-9.
- ¹⁰¹ Hocher B, Slowinski T, Stolze T, Pleschka A, Neumayer HH, Halle H. Association of maternal G protein beta3 subunit 825T allele with low birthweight. *Lancet.* 2001; 355 (9211): 1241-2.
- ¹⁰² Masuda K, Osada H, Iitsuka Y, Seki K, Sekiya S. Positive association of maternal G protein beta3 subunit 825T allele with reduced head circumference at birth. *Pediatr. Res.* 2002; 52 (5):687-91.
- ¹⁰³ Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986; 51 Pt 1: 263-73.k
- ¹⁰⁴ Rongling Li et al. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function and blood pressure in african americans. *A. J. of Hypertension* 2004; 17:560-7.
- ¹⁰⁵ Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics.* 2001; 11:719-25.
- ¹⁰⁶ Benedetto C, Marozio L, Ciccone G, Chieppa G, Quaglia M, Matullo G, Bertola L, Guarrera S, Carturan S, Stratta P. Synergistic effect of renin-angiotensin system and nitric oxide synthase genes polymorphisms in pre-eclampsia. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2007; (Band 86), Nr. 6: 678-82.
- ¹⁰⁷ Axt-Flidner R, Schröer A, Diedrich K. Molekulare Mechanismen der Präeklampsie. *Gynakologe.* 2004; 37:132-9.
- ¹⁰⁸ Arngrimsson R, Bjornsson S, Geirsson RT, Bjornsson H, Walker JJ, Snaedal G. Genetic and familial predisposition to eclampsia and preeclampsia in a defined population. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1990; 97(9): 762-9.

-
- ¹⁰⁹ Cooper D W, et al. Genetic control of susceptibility to eclampsia and miscarriage. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1988; 95(7): 644-53.
- ¹¹⁰ Nilsson E, Salonen Ros H, Cnattingius S, Lichtenstein P. The importance of genetic and environmental effects for preeclampsia and gestational hypertension: a family study. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 2004; 111: 200-6.
- ¹¹¹ Carr DB, Epplein M, Johnson CO, Easterling TR, Crichtlow CW. A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 2005; 193: 965-72.
- ¹¹² Lachmeijer A M, Dekker G A, Pals G, Aarnoudse J G, Kate L P, Arngrimsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2002; (Band 105), Nr. 2: 94-113.
- ¹¹³ Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 1994; 171: 944-8.
- ¹¹⁴ Maxwell JA. Mechanisms of Dysfunction of the Nitric Oxide Pathway in Vascular Diseases. *Nitric Oxide* 2001; 6:101-24.
- ¹¹⁵ Grandone E, Colaizzo D, Martinelli P, et al. Does Endothelial Nitric Oxide Gene Variation Play a Role in the Occurrence of Hypertension in Pregnancy? *Hypertens. Pregnancy.* 2003; 22: 149-55.
- ¹¹⁶ Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol. Hum. Reprod.* 2010; 16 (7): 506–10.
- ¹¹⁷ Serrano NC, Casas JP, Diaz AL, Paez C. Endothelial NO Synthase Genotype and Risk of Preeclampsia. *Hypertension* 2004; 44: 702-7.
- ¹¹⁸ Tempfer CB, Dorman K, Deter RL, O'Brien WE, Gregg AR. An endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism is associated with Preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy.* 2001; 20: 107-18.
- ¹¹⁹ Bashford MT, Hefler LA, Vertrees TW, Roa BB, Gregg AR. Angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms among Hispanic patients with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 2001; 184:1345-51.
- ¹²⁰ Wang XL et al. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 3147-53.
- ¹²¹ Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 1998; 245: 190-3.
- ¹²² Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet.* 2003; 361(9360): 865-72.
- ¹²³ Groten T, Schleussner E, Lehmann T, Reister F, Holzer B, Danso KA, Zeillinger R. eNOS Intron 4 and EPHX1 polymorphisms affect maternal susceptibility to preeclampsia: analysis of five polymorphisms

predisposing to cardiovascular disease in 279 Caucasian and 241 African women. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2013; DOI.10.1007/s00404-013-29991-9

¹²⁴ Hocher B, Chen Y-P, Hügle S, Reichelt J, Krause K, Slowinski T, Godes M, Guthmann, Wauer R, Halle H, Gossing G, Dudenhausen J, Pfab T. Impact of maternal endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy. *J. Hum. Hypertens.* 2008; Nr.22: 641-7.

¹²⁵ Qi HP, Fraser WD, Luo ZC, Julien P, Audibert F, Wei SQ. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of preeclampsia. *Am. J. Perinatol.* 2013; 30(10):795-804.

¹²⁶ Dai B, Lui T, Zhang B, Zhang X, Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis. *Gene.* 2013; 519(1):187-93.

¹²⁷ Chen H, Zhao G, Sun M, Wang H, Liu J, Gao W, Meng T. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4b/a and T-786C) and preeclampsia: meta-analysis of 18 case-control studies. *DNA. Cell. Biol.* 2012 ; 31(6):1136-45.

¹²⁸ Terwilliger JD, Weiss KM. Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9(6):578-94.

¹²⁹ Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet.* 2003; 361(9360): 865-72.

¹³⁰ Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L, et al. Large-scale test of hypothesised associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaborators. *Lancet* 2000;355(9202):434-42.

¹³¹ Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS. Lett.* 2000; 471(1): 45-50.

¹³² Boyd PA, Lindenbaum RH, Redman C. Preeclampsia and trisomy 13: A possible association. *Lancet.* 1987; 2:425-7.

¹³³ Goldstein DP, Berkowitz RS. Current management of complete and partial molar pregnancy. *J. Reprod. Med.* 1994; 39:139-46.

¹³⁴ Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM. Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *Br. Med. J.* 1998; 316:1343-7.

¹³⁵ Arngrimsson R, Bjornsson S, Geirsson RT, Bjornsson 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.

¹³⁶ Esplin MS, Fauser MB, Fraser A, et al. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 867-72.

¹³⁷ Pearson H. Reproductive immunology: Immunity's pregnant pause. *Nature.* 2002; 420 (6913): 265-6.

-
- ¹³⁸ Dekker GA. Risk factors for preeclampsia. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1999; (Band 42), Nr. 3: 422-35.
- ¹³⁹ Robillard PY, Dekker GA, Hulsey TC. Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia: primigravidity or primipaternity? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1999; (Band 84), Nr. 1: 37-41.
- ¹⁴⁰ McIntyre JA, Faulk W. Trophoblast antigens in normal and abnormal human pregnancy. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1986; (Band 29), Nr. 4: 976-98.
- ¹⁴¹ Huber A, Grimm C, Jirecek S, Heim K, Zeillinger R, Husslein P, Hefler L. Polymorphisms of the Nos3 gene and unexplained late intrauterine fetal death. *Eur J Obstet Reprod Biol.* 2005;122:151-155.
- ¹⁴² T. Hattersley, F. Beards, E. Ballantyne, M. Appleton, R. Harvey, and S. Ellard. Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. *Nat. Genet.* 19 (3):268-270, 1998.
- ¹⁴³ Lau TK, Pang MW, Sahota DS, Leung TN. Impact of hypertensive disorders of pregnancy at term on infant birth weight. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2005; 84(9): 875-7.
- ¹⁴⁴ Lain KY, Krohn MA, Roberts JM. Second pregnancy outcomes following preeclampsia in a first pregnancy. *Hypertens. Pregnancy.* 2005; 24(2): 159-69.
- ¹⁴⁵ Steer P. The management of large and small for gestational age fetuses. *Semin. Perinatol.* 2004; 28 (1): 59-66.
- ¹⁴⁶ Seyffert W. Genexpression: Von der Information zum Produkt: Die Prozessierung eukaryotischer mRNA. In Seyffert W: *Lehrbuch der Genetik.* 2003; 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 66f
- ¹⁴⁷ Wang XL, Wang J. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Sequence Variations and Vascular Disease. *Mol. Genet. Metab.* 2000; 70: 241-51.
- ¹⁴⁸ Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat. Med.* 1996; 2: 41-5.
- ¹⁴⁹ Song J, Yoon Y, Park KU, et al. Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentrations and enzyme activity in cultured human endothelial cells. *Clin. Chem.* 2003; 49: 847-52.
- ¹⁵⁰ Tempfer CB, Unfried G, Zeillinger R, Hefler LA, Nagele F, Huber JC. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 2001; 16:1644-7.
- ¹⁵¹ Sironi M, Menozzi G, Comi GP, Cagliani R, Bresolin N, Pozzoli U. Analysis of intronic conserved elements indicates that functional complexity might represent a major source of negative selection on non-coding sequences. *Hum. Mol. Genet.* 2005; 14(17): 2533-46.
- ¹⁵² Suen TC, Goss PE. Identification of a novel transcriptional repressor element located in the first intron of the human BRCA1 gene. *Oncogene.* 2001; 20(4): 440-50.
- ¹⁵³ Beohar N, Kawamoto S. Transcriptional regulation of the human nonmuscle myosin II heavy chain-A gene. Identification of three clustered cis- elements in intron-1 which modulate transcription in a cell type- and differentiation state-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(15): 9168-78.

¹⁵⁴ Newman EA, Muh SJ, Hovhannisyan RH, Warzecha CC, Jones RB, McKeehan WL, Carstens RP. Identification of RNA-binding proteins that regulate FGFR2 splicing through the use of sensitive and specific dual color fluorescence minigene assays. *RNA* 2006. 12(6): 1129-41.

¹⁵⁵ Wang J, Dudley D, Wang XL. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1-4.

¹⁵⁶ Strachan T, Read AP: Organisation. Verteilung und Funktion der proteincodierenden Gene des Menschen. In Strachan T, Read AP: *Molekulare Humangenetik*. 2005; Übersetzung Seidler L, 3. Aufl., Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München : 296.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Jenny Repey, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Der Zusammenhang zwischen dem eNOS Polymorphismus im Intron 4 a/b und dem Blutdruck und der Eiweißausscheidung der Schwangeren, sowie dem Geburtsgewicht des Kindes“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen dem URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Jenny Repey

9. Lebenslauf

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

10. Veröffentlichungen

Hoche B, Chen Y-P, Hügle S, Reichelt J, Krause K, Slowinski T, Godes M, Guthmann, Wauer R, Halle H, Gossing G, Dudenhausen J, Pfab T. Impact of maternal endothelial nitric oxid synthase gene polymorphisms on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy. *J. Hum. Hypertens.* 2008; Nr. 22: 641-7.

11. Danksagung

Diese Arbeit widme ich meinem Ehemann Marc Repey und meinen Eltern Monika und Klaus Reichelt, die immer für mich da waren und sind.