

Seite 1

Aus der Klinik für Geburtsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genetische Variation im Exon 7 des endothelialen NO-Synthase-Gens  
und ihre Bedeutung für Präeklampsie

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathrin Dreves

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

2. Prof. Dr. rer. nat. H. Neitzel

3. Prof. Dr. E. Beinder

Datum der Promotion: 27.03.2009

Meinen Eltern

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
1.1	Epidemiologie .....	9
1.2	Ätiologie .....	10
1.2.1	Risikofaktoren und protektive Faktoren.....	10
1.2.2	Modelle der Genese.....	11
1.2.3	Pathogenetische Sequenz .....	11
1.3	Präeklampsie als genetische Erkrankung .....	12
1.3.1	Epidemiologische Familienuntersuchungen.....	12
1.3.2	Kopplungsstudien.....	13
1.3.3	Präeklampsie und assoziierte genetische Alterationen .....	13
1.4	Nitritoxid.....	14
1.4.1	Molekulare Wirkung von Nitritoxid.....	14
1.4.2	Rolle Nitritoxids zur Blutdruckregulation.....	14
1.4.3	Rolle Nitritoxids in der gesunden Schwangerschaft.....	14
1.4.4	Rolle Nitritoxids bei Präeklampsie.....	15
1.5	Endotheliale Nitritoxid-Synthase.....	15
1.5.1	Enzymatische Funktion .....	15
1.5.2	Genetische Alterationen des NOS3-Gens.....	16
1.6	Der 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens.....	16
1.6.1	Der 894G>T-Polymorphismus und kardiovaskuläre Erkrankungen .....	17
1.6.2	Der 894G>T-Polymorphismus und Präeklampsie .....	18
1.6.3	Funktionelle Auswirkungen des 894G>T-Polymorphismus.....	18
1.6.4	Zusammenspiel verschiedener Polymorphismen .....	20
1.7	Synopsis.....	21
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
2.1	Studienteilnehmerinnen .....	22
2.1.1	Rekrutierung der Patientinnen.....	22
2.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien.....	22
2.1.3	Klinische Daten .....	23

<b>2.2</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Arbeitsmethoden</b> .....	<b>24</b>
2.3.1	Extraktion der DNS .....	25
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	25
2.3.3	Primer .....	26
2.3.4	Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	26
2.3.5	PCR-Protokoll .....	26
2.3.6	Agarosegelelektrophorese .....	27
2.3.7	Aufreinigung des PCR-Produkts .....	27
2.3.8	Automatische Sequenzierung des Exon 7 .....	28
<b>2.4</b>	<b>Material und Reagenzien</b> .....	<b>30</b>
2.4.1	Lösungen und Puffer .....	30
2.4.2	Gele .....	31
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Klinische und anamnestische Daten</b> .....	<b>34</b>
3.1.1	Alter und Ethnizität .....	34
3.1.2	Risikofaktoren für Präeklampsie .....	34
3.1.3	Komplikationen bei Präeklampsie .....	35
<b>3.2</b>	<b>Der 894G&gt;T-Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens</b> .....	<b>40</b>
3.2.1	Genotyp- und Allelfrequenzen .....	40
3.2.2	Merkmale in Abhängigkeit vom Genotyp in Fall- und Kontrollgruppe .....	42
3.2.3	Elektropherogramm Exon 7 des NOS3-Gens .....	43
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Risikofaktoren der Präeklampsie</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Komplikationen der Präeklampsie</b> .....	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>Distribution und statistischer Vergleich der Genotyp- und Allelfrequenzen</b> .....	<b>47</b>
<b>4.4</b>	<b>Diskussion der Bedeutung des 894G&gt;T-Polymorphismus</b> .....	<b>47</b>
4.4.1	Vergleich mit den Ergebnissen anderer Assoziationsstudien .....	47
4.4.2	Möglicher kleiner Effekt des T-Allels des 894G>T-Polymorphismus? .....	49
4.4.3	Der 894G>T-Polymorphismus und Komplikationen der Präeklampsie .....	51
4.4.4	Funktionalität des 894G>T-Polymorphismus .....	54

---

<b>4.5</b>	<b>Kritische Einschätzung der Methodik.....</b>	<b>54</b>
4.5.1	Phänotypisierung.....	54
4.5.2	Ethnische Heterogenität der Studienpopulation .....	56
4.5.3	Stichprobengröße und Statistische Power .....	57
4.5.4	Studiendesign .....	57
<b>4.6</b>	<b>Präeklampsie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen .....</b>	<b>58</b>
<b>4.7</b>	<b>Perspektiven .....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>61</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>63</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>77</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>78</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>79</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

95%KI	95%iges Konfidenzintervall
Abb.	Abbildung
ALT	Alaninaminotransferase
APGAR	Punkteschema zur Beurteilung des Zustandes Neugeborener
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AST	Aspartataminotransferase
BMI	Body Mass Index (Gewicht in kg / Körperlänge in Meter <sup>2</sup> )
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c.894 G>T	Basenaustausch von Guanin zu Thymin an Nukleotidposition 894 der kodierenden DNA
cDNA	copy-DNA
CTG	Cardiotokogramm
d <sup>^</sup> NTP`s	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dd <sup>^</sup> NTP`s	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
Glu298Asp	Aminosäureaustausch von Glutamin- zu Asparaginsäure in der Aminosäuresequenz des Proteins entsprechend dem Kodon 298
Hb	Hämoglobinkonzentration
HELLP	Haemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets
IQB	Interquartilbereich
i.S.	im Sinne
kg	Kilogramm
Km	Michaeliskonstante
LDH	Lactatdehydrogenase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
µl	Mikroliter
mM	Millimolar (mmol/l)

---

mmHg	mm Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
mV	Millivolt
n	Anzahl der Patientinnen
NaCl <sub>2</sub>	Natriumchlorid
NADP+	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NOS3	Endotheliale Nitritoxid-Synthase (alte Abkürzung eNOS)
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio (Quotenverhältnis)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase chain reaction ( Polymerase-Kettenreaktion)
PI	Pulsatilitätsindex nach Gosling ( $PI = V_{\max} - V_{\min} / V_{\max \text{ mean}}$ )
RI	Resistance Index nach Pourcelot ( $RI = V_{\max \text{ Systole}} - V_{\max \text{ Enddiastole}} / V_{\max \text{ Systole}}$ )
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	Standardfehler des Mittelwertes ( $se = s / \sqrt{n}$ )
SIH	Schwangerschafts-induzierte Hypertonie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzel-Nukleotid-Polymorphismus)
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus (hitzestabiler Bakterienstamm)
Tris-Base	Trishydroxymethylaminomethan
Tris-HCL	Trishydroxymethylaminomethan-hydrochlorid
TBE	Trisborat-EDTA
Tm	Schmelztemperatur
U/l	Units pro Liter
Vmax	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
vs.	versus
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach



# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Präeklampsie ist ein schwangerschafts-spezifisches Syndrom, welches seit mehr als einem Jahrhundert die Forschung beschäftigt. Aufgrund der ungeklärten Pathogenese der Erkrankung wurde sie die „Krankheit der Theorien“ genannt. Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen kommen laut Weltgesundheitsorganisation weltweit in bis zu 8 % der Schwangerschaften vor [138]. Nach Angaben der deutschen Perinatalstatistiken liegt die Häufigkeit schwangerschafts-assoziiertes hypertensiver Erkrankungen in Deutschland bei 5 - 7 % [7]. Die Präeklampsie betrifft 3 - 5 % aller Schwangerschaften [106]. Die Krankenhausfallzahl der Patientinnen mit der Diagnose Präeklampsie betrug im Jahr 2006 in Deutschland 12 680 [40]. Weltweit sind Präeklampsie und Eklampsie mit einem Anteil von 12 % die dritthäufigste Ursache maternaler Mortalität [138]. In den Industrieländern, in denen die maternale Mortalität stark gesunken ist, stellt die Präeklampsie vor allem ein Risikofaktor für den Fötus dar. Dies zeigt sich in einer intrauterinen Wachstumsverzögerung, einer vorzeitigen Entbindung und einem niedrigen Geburtsgewicht [43]. 15 % aller Frühgeburten sind indizierte frühzeitige Entbindungen aufgrund einer Präeklampsie [105]. Die Langzeitprognose der betroffenen Mütter und ihrer Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht ist durch das höhere Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen im späteren Leben gekennzeichnet [116, 8]. Folgende Krankheitsbilder werden nach den diagnostischen Kriterien der „Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy“ [105] unterschieden:

### Chronische Hypertension:

Chronische Hypertension wird durch eine Erhöhung des Blutdrucks  $\geq 140$  mm Hg systolisch oder  $\geq 90$  mm Hg diastolisch vor Beginn der Schwangerschaft oder innerhalb der ersten 20 Schwangerschaftswochen (SSW) definiert. Eine Hypertension, die erstmals während der Schwangerschaft auftritt und sich post partum nicht normalisiert, wird auch als chronische Hypertension bezeichnet.

### Präeklampsie

Die Präeklampsie wird durch die Kombination von zwei Kriterien diagnostiziert:

- (1) Eine zweimalig gemessene Erhöhung des Blutdrucks um  $\geq 140$  mmHg systolisch oder  $\geq 90$  mmHg diastolisch im Abstand von mindestens sechs Stunden bei einer Frau, die vor der 20. SSW normotensiv war.

(2) Proteinurie ab 300 mg im 24-Stunden-Sammelurin bzw. eine zweimalige Ausscheidung von  $\geq 30$  mg/dl Proteine in einer zufälligen Urinportion. Dies entspricht etwa einem 2-fach positiven Urinstix.

Eklampsie bezeichnet das zusätzliche Auftreten von Krämpfen, die keine andere neurologische oder metabolische Ursache haben.

#### HELLP-Syndrom:

Beim HELLP-Syndrom (Haemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelet Count) entwickeln sich eine Leberbeteiligung und mikroangiopathische Hämolyse mit dem Ansteigen der Hämolyseparameter, der Leberenzyme (AST, ALT), einem Abfall der Thrombozytenzahl  $< 100\,000/\mu\text{l}$  und einer Proteinurie [136].

#### Pfropfgestose:

Als Pfropfgestose bezeichnet man eine bereits bestehende chronische Hypertonie, die durch das zusätzliche Auftreten einer Proteinurie und einen weiteren, unkontrollierten Blutdruckanstieg in der Schwangerschaft gekennzeichnet ist.

#### Gestationshypertonie:

Frauen mit schwangerschafts-induzierter Hypertonie (SIH) zeigen erstmals nach der 20. SSW einen erhöhten Blutdruck, der sich post partum innerhalb von zwölf Wochen normalisiert.

## **1.2 Ätiologie**

### **1.2.1 Risikofaktoren und protektive Faktoren**

Eine Reihe maternaler Faktoren begünstigt die Erkrankung an Präeklampsie: Nulliparität, Präeklampsie in einer früheren Schwangerschaft bei Multipara, Mehrlingsschwangerschaften, ein hoher Body Mass Index (BMI) vor Beginn der Schwangerschaft sowie ein niedriges und hohes Lebensalter der Mutter. Vorbestehende mütterliche Erkrankungen (Hypertension, Diabetes mellitus, Insulinresistenz, Nierenerkrankungen, Hyperhomo-cysteinämie), angeborene Gerinnungsstörungen (Faktor-V-Leiden-Mutation, Prothrombin-20210G>A-Mutation, 677C>T-Mutation im Methylentetrahydrofolatreduktase-Gen, Protein-S-, Protein-C- und Antithrombin-III-Mangel) sowie erworbene Störungen der Blutgerinnung (Antiphospholipid- und Anticardiolipinantikörper, Lupus Antikoagulanzen) prädisponieren für eine Präeklampsie [30, 7].

Die Exposition mit paternalen und anderen Antigenen wirkt protektiv. In Übereinstimmung damit sind eine längere Dauer der Kohabitation, ein Partnerwechsel bei multiparen Frauen, eine zurückliegende Bluttransfusion, eine stattgehabte Fehlgeburt und oraler Geschlechtsverkehr protektive Faktoren für eine Präeklampsie [100].

### 1.2.2 Modelle der Genese

Voraussetzung für eine Präeklampsie ist die Präsenz der Plazenta. Nur eine vorzeitige Geburtseinleitung und damit Entfernung der Plazenta aus dem Organismus der Mutter beendet den Symptomenkomplex der Präeklampsie. Vier Modelle der Genese der Präeklampsie wurden bislang diskutiert. Heute wird angenommen, dass alle vier Mechanismen miteinander interagieren.

1. Plazentaischämie-Modell
2. Immunologisches Modell
3. Generalisierte Endotheldysfunktion
4. Genetisches Modell

### 1.2.3 Pathogenetische Sequenz

Präeklampsie ist eine zweiphasige Erkrankung. In beiden Phasen der Erkrankung ist eine gestörte Endothelzellfunktion das Schlüsselereignis [106]. Diese ist ursächlich für die klinische Symptomatik der Präeklampsie und lässt sich histologisch-anatomisch nachweisen. Die glomeruläre Endotheliose ist ein für die Präeklampsie typischer histologischer Befund der Niere [35]. Weitere vaskulopathische Veränderungen finden sich in histologischen Präparaten aus Leber, Gehirn und Plazenta [104].

Die Schwangerschaft induziert einen Umbau der Spiralarterien des Uterus. Während dieses Prozesses in der frühen Schwangerschaft wandern fetale Zytotrophoblasten entlang der mütterlichen Spiralarterien retrograd in die uterine Muskulatur ein. Dabei werden die Spiralarterien zu weitlumigen Gefäßen mit niedrigem Gefäßwiderstand transformiert [98]. Dies gewährleistet eine erhöhte plazentare Perfusion zur Versorgung des Fötusses. Da der Umbau der Spiralarterien bei der Präeklampsie ausbleibt, entwickeln sich eine **plazentare Ischämie** und Hypoxie [98].

Dopplersonographisch zeigen sich bei Präeklampsie korrelierend zur Widerstandserhöhung im fetomaternalen Gefäßbett typischerweise Flussveränderungen der mütterlichen Gefäße (Aa. uterinae, Aa. arcuatae) mit Notch-Bildung und in einem späteren Stadium der Erkrankung auch Flussveränderungen der A. umbilicalis.

Die **immunologische Hypothese** sieht eine gestörte Immuntoleranz zwischen mütterlichem und fetalem Gewebe als auslösendes Ereignis für die Störung der Plazentation zu Beginn der Erkrankung.

Der Zusammenhang zwischen plazentarer Hypoxie in der Frühschwangerschaft und der sich im zeitlichen Verlauf später manifestierenden **generalisierten mütterlichen Endotheldysfunktion** ist ungeklärt. Lange bestand die Hypothese eines spezifischen Faktors X, welcher vom placentaren Gefäßbett in die maternale Zirkulation gelangt und die mütterlichen Gefäße direkt schädigt [106]. Aktuell werden sowohl Zytokine, Wachstumsfaktoren als auch im mütterlichen Blut vorhandene Partikel von apoptotischen Synzytiotrophoblasten aus der Plazenta, welche direkt oder indirekt zur systemischen Endothelzellfunktion führen könnten, in diesem Zusammenhang erörtert.

Die **genetische Hypothese** beruht auf der Annahme, dass Gene in verschiedenen Stadien der Erkrankung Einfluss nehmen. Gene, welche zum Erhalt der Integrität der Gefäßwand und -funktion beitragen, könnten die Grundlage der mütterlichen Prädisposition für eine Störung der Endothelzellfunktion bilden. Auch die Störung im Umbau der Spiralarterien während der Plazentation könnte zum Teil durch die genetische Konstitution von Mutter und Kind bedingt sein.

## 1.3 Präeklampsie als genetische Erkrankung

### 1.3.1 Epidemiologische Familienuntersuchungen

Obwohl die meisten Fälle von Präeklampsie sporadisch auftreten, gibt es in zahlreichen epidemiologischen Familienstudien starke Hinweise auf eine familiäre Komponente [4]. Verschiedene Vererbungsmodi wurden in der Vergangenheit mit genetischen Modellen getestet. Weitläufig akzeptiert ist heute das Vorliegen einer polygenetischen Erkrankung, wobei mehrere Gene die individuelle Prädisposition für eine Präeklampsie festlegen [16]. Sehr wahrscheinlich gibt es auch einen fetalen und paternalen genetischen Einfluss [74].

Welche Gene zu Kandidatengen der Forschung wurden, entschieden zum einen Überlegungen pathophysiologischer Plausibilität und zum anderen Hinweise aus genetischen Untersuchungen.

### **1.3.2 Kopplungsstudien**

Mit Kopplungsstudien (Linkage Analyse) wird die Vererbung einer Krankheit mit genetischen Markern in Familien untersucht. Zwei genomweite Kopplungsstudien unterstützten die Annahme eines Suszeptibilitätslokus für schwangerschafts-induzierte Hypertension in der Region des endothelialen Nitritoxid-Synthase-Gens (NOS3) auf Chromosom 7q36 [5, 48]. Eine Untersuchung am gleichen Patientenkollektiv und weitere Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen [6, 68, 73].

### **1.3.3 Präeklampsie und assoziierte genetische Alterationen**

Genetische Assoziationsstudien untersuchen, ob eine genetische Variante in einer Population von Kranken überproportional häufiger oder seltener vorkommt als in einer Population von Gesunden. Unter anderem wurden durch Assoziationsstudien die Faktor-V-Leiden-Mutation, das Prothrombin-Gen (20210G>A), das Methylenetetrahydrofolatreduktase-Gen (677C>T), das Angiotensinogen-Gen (704T>C) und Varianten im Langketten-3-Hydroxyacyl-Coenzym A-Dehydrogenase-Gen, im Liproteinlipase-Gen und in den mitochondrialen Transfer-RNA-Genen mit dem Auftreten einer Präeklampsie in Zusammenhang gebracht [66, 7]. Besonders thrombophile Mutationen zeigten eine gehäufte Prävalenz bei Frauen, die an Präeklampsie erkrankten.

Ein weiteres Kandidatengen ist die endotheliale Nitritoxid-Synthase (NOS3). Eine Reihe von Hinweisen spricht für die Annahme, dass (1) eine Störung im NO-Stoffwechsel zur Pathogenese der Präeklampsie beiträgt und (2) die Störung im NO-Stoffwechsel eine genetische Ursache hat.

## **1.4 Nitritoxid**

### **1.4.1 Molekulare Wirkung von Nitritoxid**

Nitritoxid (NO) ist ein Molekül mit sehr kurzer Halbwertszeit. In der Gefäßwand diffundiert NO aus dem Endothel in die darunter liegende Schicht glatter Gefäßmuskelzellen und verursacht via cGMP-Bildung aus GTP die Freisetzung intrazellulären Calciums, welches eine Relaxation hervorruft [75]. Darüber hinaus hemmt Nitritoxid die Plättchenaggregation [101], die Zelladhäsion ans Endothel [65] und die Proliferation glatter Muskelzellen [38].

Physiologische Stimuli für eine NO-Ausschüttung sind: Scherstress, Acetylcholin, Bradykinin, Endothelin, Substanz P, Histamin und Vasopressin [87]. Indirekt hemmt NO die Gefäßkonstriktion durch eine Hemmung von Renin und Norepinephrin [46].

### **1.4.2 Rolle Nitritoxids zur Blutdruckregulation**

Im Endothel produziertes Nitritoxid reguliert den basalen Gefäßtonus. Genetisch veränderte „knock-out“-Mäuse ohne NOS3-Gen hatten einen signifikant höheren Blutdruck im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen [115]. Dagegen wiesen Mäuse, welche zu einer Überexpression der NO-Synthase angeregt wurden, arterielle Hypotension und eine verstärkte NO-abhängige Vasorelaxation auf [92]. Auch die medikamentöse Inhibition des NO-cGMP-Stoffwechsels mit Argininanaloga bewirkte im Tierversuch und beim Menschen einen erhöhten Blutdruck [127]. Bei Patienten mit essentieller Hypertonie war die basale Nitritoxid-Produktion herabgesetzt [34].

### **1.4.3 Rolle Nitritoxids in der gesunden Schwangerschaft**

Während einer gesunden Schwangerschaft besteht im Rahmen der physiologischen Schwangerschaftsadaptation eine systemische Vasodilatation mit erniedrigtem peripheren Widerstand und verminderter Reagibilität auf vasopressorische Substanzen [47]. Diese Alteration der Gefäßfunktion wird auf die Wirkung von NO zurückgeführt [42]. Metabolite des NO-Stoffwechsels wie die Plasmakonzentration des second messengers cGMP und die Urinkonzentration der Abbauprodukte Nitrat und Nitrit waren während der Schwangerschaft erhöht. Neben der Hypothese, dass vermehrt gebildetes NO aus den Endothelzellen der peripheren mütterlichen Gefäße stammt, gibt es Hinweise auf eine NO-Bildung im fetalen und plazentaren Gewebe [26]. Da Östrogene die Transkription des NOS3-Gens erhöhen, wird dies als ein möglicher Mechanismus der gesteigerten NO-Bildung in der Schwangerschaft erwogen [135].

#### **1.4.4 Rolle Nitritoxids bei Präeklampsie**

Während einer Schwangerschaft mit Präeklampsie bleiben die oben genannten physiologischen Veränderungen der Gefäßfunktion aus. Im Gegensatz dazu bestehen eine systemische Vasokonstriktion und erhöhte Sensitivität des Endothels auf Vasopressoren [37]. Experimentelle Inhibition von NO bei schwangeren Ratten führte zu einem der Präeklampsie ähnlichen Symptomenspektrum mit Hypertension, Thrombopenie und Proteinurie [139].

Messungen der systemischen Konzentration von NO-Stoffwechselmetaboliten bei Präeklampsiepatientinnen zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Ebenso wurden im placentaren Gewebe präeklampsischer Mütter eine Verminderung [15], eine Erhöhung [91] sowie eine gleich bleibende NOS3-Aktivität beobachtet [26, 12]. An Arterien von hypertensiven Schwangeren ließ sich eine reduzierte endothelabhängige Vasodilatation, ein NO-abhängiger Prozess, nachweisen [82].

Zusammenfassend weisen diese Beobachtungen auf einen NO-Mangel als Bestandteil der pathophysiologischen Veränderungen bei Präeklampsie hin.

### **1.5 Endotheliale Nitritoxid-Synthase**

#### **1.5.1 Enzymatische Funktion**

Es gibt drei verschiedene NO-synthetisierende Isoenzyme, welche durch unterschiedliche Gene einer Genfamilie kodiert werden.

1. die induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS2) auf Chromosom 17 [39]
2. die neuronale NO-Synthase (nNOS oder NOS1) auf Chromosom 12 [89]
3. die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS3) auf Chromosom 7 [80, 79]

Die neuronale und die endotheliale NO-Synthase sind konstitutiv exprimierte Enzyme, während die induzierbare NO-Synthase durch inflammatorische Stimuli induziert wird. NO-Synthasen katalysieren die NO-Bildung, wobei L-Arginin zu Citrullin oxidiert wird. Dabei werden NADPH und molekularer Sauerstoff verbraucht. Zu den Kofaktoren der Enzyme gehören Häm, L-Arginin und Tetrahydrobiopterin [81].

## 1.5.2 Genetische Alterationen des NOS3-Gens

Das endotheliale NO-Synthase-Gen (NOS3-Gen) liegt auf Chromosom 7q35-36 und umfasst eine Länge von 21 Kilobasen. Das Gen besteht aus 26 Exons und 25 Introns. Ein Polymorphismus ist eine Position in der DNA-Sequenz, an der zwei oder mehr Allele in der Bevölkerung existieren. Diese Definition entspricht dem englischen Begriff Sequenzvariation [28]. In Abgrenzung zur Mutation beträgt die Frequenz des minoren Allels (weniger häufiges Allel) mindestens 1 %.

Eine besonders häufige Sequenzvariation im menschlichen Genom sind Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP, Single Nucleotide Polymorphism). Dabei unterscheiden sich zwei Allele durch die Veränderung nur eines Nukleotids voneinander. Die veränderte Sequenz kann die gleiche Aminosäure (neutrale Mutation) oder eine andere Aminosäure (Missense oder „Falschsinn“ Mutation) kodieren. Eine weitere häufige Art genetischer Variabilität sind repetitive Sequenzen, welche aus kurzen, sich mehrfach hintereinander wiederholenden Sequenzmotiven bestehen. Zu ihnen gehören Tandemreihen (VNTR, variable number of tandem repeats). Dies sind Wiederholungen (repeats) einer Sequenz aus 12 - 500 Nukleotiden. Dabei variiert zwischen den einzelnen Individuen die Länge der Tandemreihen.

Im NOS3-Gen wurden verschiedene Polymorphismen identifiziert. Sollten diese die NO-Verfügbarkeit reduzieren, könnten sie zu einer erhöhten Prädisposition für Präeklampsie beitragen. Der -786T>C- Polymorphismus im Promotor des Gens, eine Tandemreihe im Intron 4 und der 894G>T- Polymorphismus im Exon 7 sind die häufigsten untersuchten genetischen Varianten in Assoziationsstudien des NOS3-Gens. Eine von drei Varianten im Promotor, der -786T>C- Polymorphismus, ist ein Einzel-Nukleotid-Polymorphismus, welcher experimentell die Transkription des NOS3-Gens beeinflusst [90]. Die zwei Allele des Introns 4 (A und B) unterscheiden sich durch die Anzahl der Wiederholungen der Tandemreihe. Das A-Allel umfasst vier und das B-Allel fünf Tandemreihen aus jeweils 27 Basenpaaren.

## 1.6 Der 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens

Im Exon 7 des NOS3-Gens befindet sich ein möglicherweise funktioneller Einzel-Nukleotid-Polymorphismus. Dabei handelt es sich um den Austausch einer einzelnen Base von Guanin zu Thymin an Nukleotidposition 894 der kodierenden Abschnitte der NOS3-DNA (c.894G>T). Durch die veränderte Basensequenz kodiert das Kodon 298 der NOS3-mRNA für eine andere Aminosäure.



Es resultiert eine Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins von Glutaminsäure zu Asparaginsäure (Glu298Asp). Die Nummerierung bezieht sich auf die von Marsden et al. (1993) veröffentlichte Sequenz einer humanen NOS3-cDNA [79].

Abb. 1: Der 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens

**G-Allel**                    GACGCCAGATGAGCCCCCGAACTCTTCTTCCTTCTG

Glutaminsäure

**T-Allel**                    GACGCCAGATGATCCCCCGAACTCTTCTTCCTTCTG

Asparaginsäure

Legende: schwarz unterstrichen ist das Basentriplett des Kodons 298

### 1.6.1 Der 894G>T-Polymorphismus und kardiovaskuläre Erkrankungen

Das T-Allel des Exon 7-Polymorphismus zeigte eine Assoziation mit diversen kardiovaskulären Erkrankungen: koronare Herzerkrankung [24, 53], Koronarspasmus [141], Hypertension [86] und Myokardinfarkt [50].

Dem widersprachen eine Reihe Studien ohne Assoziation dieses Allels mit koronarer Herzerkrankung [131, 45] und Hypertension [67, 10, 14, 137]. Eine französische Studie zeigt sogar eine höhere Frequenz des G-Allels bei Infarktpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe [99]. Zwei prospektive Studien fanden keinen signifikanten Effekt des T-Allels des 894G>T-Polymorphismus auf das Krankheitsrisiko für die koronare Herzerkrankung [107, 57].

Kontrovers dazu sind die Ergebnisse einer Meta-Analyse mit 23 028 Probanden aus 26 Studien, welche zeigte, dass das T-Allel mit einem leicht erhöhten Risiko (OR 1.31 [95 % KI 1.1 - 1.5] für die koronare Herzerkrankung einherging [20].

Da kardiovaskuläre Erkrankungen und hypertensive Erkrankungen der Schwangerschaft zum einen mit ähnlichen Risikofaktoren einhergehen und zum anderen beide eine gestörte Endothelzellfunktion aufweisen, könnte eine gemeinsame genetische Ursache zugrunde liegen [111, 52].

## **1.6.2 Der 894G>T-Polymorphismus und Präeklampsie**

Bis Oktober 2007 wurden 14 Assoziationsstudien, die einen Zusammenhang zwischen der 894G>T-Variante des NOS3-Gens und Präeklampsie untersuchten, veröffentlicht. Zwei Studien aus Japan sowie eine Studie aus Kolumbien fanden einen Zusammenhang zwischen dem T-Allel des 894G>T-Polymorphismus und der Präeklampsie [63, 114, 143]. Eine Erhöhung des Risikos für Schwangerschaftskomplikationen bei präeklampsischen T-Allel-Trägerinnen (erneute Präeklampsie, Geburtsgewicht < 10. Perzentile) dokumentierte eine Studie aus Italien [32].

Die anderen Studien an kaukasischen und ethnisch gemischten Populationen zeigten keinen Zusammenhang zwischen der Präeklampsie und dem T-Allel des 894G>T-Polymorphismus [134, 49, 142, 70, 93, 121, 145, 51, 62]. Eine chinesische Studie zeigte sogar einen protektiven Effekt des T-Allels gegen die Präeklampsie [22].

## **1.6.3 Funktionelle Auswirkungen des 894G>T-Polymorphismus**

### **1.6.3.1 Funktion des vaskulären Systems**

Einige Studien untersuchten den genotypischen Effekt der 894G>T-Varianten auf die Funktion des Endothels. Diese erbrachten konträre Ergebnisse bezüglich eines relevanten genotypischen Effekts des 894G>T-Polymorphismus auf die endothelabhängige Vasodilatation und die vaskuläre Reaktivität unter dem Einfluss vasoaktiver Substanzen [97, 112, 94]. Eine funktionelle Studie zeigte, dass schwangere T-Allel-Trägerinnen bei einem Gestationsalter von zwölf Wochen eine reduzierte endothelabhängige Vasodilatation aufwiesen [111].

### **1.6.3.2 Genexpression**

Quantitative Effekte des 894G>T-Polymorphismus auf die Genexpression wurden durch die Messung von mRNA- und Enzymkonzentrationen untersucht. Die genotypabhängige Expression der endothelialen NO-Synthase in kultivierten Endothelzellen zeigte bei T-Allel-Trägern höhere mRNA-Level, erniedrigte NOS3-Proteinlevel und eine erniedrigte NOS3-Aktivität im Vergleich zur Gruppe der G-Allel-Träger [113]. Die Studie von Veldmann et al. (2002) demonstrierte eine reduzierte basale Plasma-NO-Konzentration bei T-Allel-Trägern [128].

### 1.6.3.3 Gen-Umwelt-Interaktionen

Gen-Umwelt-Interaktionen bedeuten, dass der funktionelle Einfluss eines polymorphen Genabschnittes von spezifischen Umweltfaktoren abhängt. Die Studie von Leeson et al. (2002) zeigte, dass Zigarettenkonsum nur bei T-Allel-Trägern mit einer gestörten endothelialen Funktion assoziiert war, während die Nahrungsaufnahme großer Mengen an dreifach ungesättigten Fettsäuren besonders bei T-Allel-Trägern einen förderlichen Effekt auf die Endothelfunktion ausübte [72]. Für das polymorphe Intron 4 wurde bei Rauchern beobachtet, dass die Einschränkung der NOS3-Aktivität im plazentaren Gewebe nur bei Trägern des selteneren Allels (NOS3 5/4 und NOS3 4/4) im Vergleich zu den Trägern des Wildtyp-Allels (NOS3 5/5) vorhanden war [132].

### 1.6.3.4 Proteinstruktur und –funktion

Die endotheliale NO-Synthase ist ein Protein und gehört zur Gruppe der Enzyme. Es gibt drei mögliche Genotypen in Nukleotidposition 894 des NOS3-Gens: GG, GT und TT respektive Glu/Glu, Glu/Asp und Asp/Asp. Verschiedene Studien beschäftigten sich mit der Kinetik und Aktivität, dem proteolytischen Abbau und der Proteinstruktur der NOS3-Varianten.

#### Enzymaktivität und –kinetik

Rekombinante NOS3-Asp/Asp- und NOS3-Glu/Glu-Enzyme zeigten keinen Unterschied der Michaeliskonstanten ( $K_m$ ) oder der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten ( $V_{max}$ ) [44]. Joshi et al. (2007) zeigte bei Asp-Trägern eine reduzierte intrazelluläre Anreicherung und eine herabgesetzte Scherstress-induzierte Aktivierung des Enzyms [60].

#### Proteolytischer Abbau

Tesaro et al. (2000) zeigte, dass die 894G>T-Variante einem erhöhten proteolytischen Abbau *in vitro* unterliegt, so dass der Steady-state-Blutspiegel von NO aufgrund eines erhöhten Abbaus bei T-Allel-Trägern erniedrigt sein könnte [123].

Im Gegensatz dazu argumentierte Fairchild et al. (2001), dass der aufgezeigte proteolytische Abbau auf die Art der Probenpräparation *in vitro* zurückzuführen sei [31].

#### Proteinstruktur

Das Codon 298 ist Teil der katalytischen Hämdomäne des Proteins und liegt nahe der Bindungsstelle für L-Arginin und Tetrahydrobiopterin [103]. Möglich wäre eine Beeinflussung der Bindungseigenschaften des Enzyms für diese Kofaktoren [64].

Der Austausch von Glutaminsäure mit Asparaginsäure verursacht einen tight turn der alpha-Helix, welcher funktionelle Konsequenzen haben könnte [96]. Joshi und Bauer (2008) zeigten mithilfe eines theoretischen Computermodells einen möglichen Einfluss des Aminosäureaustauschs in Position 298 auf eine Protein-Protein-Interaktion an dieser Stelle [59].

Die genannten Studienergebnisse lassen einen funktionellen Effekt des 894G>T-Polymorphismus in vivo vermuten.

#### **1.6.4 Zusammenspiel verschiedener Polymorphismen**

Die Voraussetzung einer genetischen Fall-Kontroll-Studie ist entweder die direkte Untersuchung einer funktionellen Variante oder die indirekte Untersuchung eines Marker-Polymorphismus. Eine Assoziation zwischen zwei Allelen, die in enger räumlicher Nachbarschaft auf einem Chromosom liegen, bezeichnet man als Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium).

Zwischen dem -786T>C-Polymorphismus in der Promotorregion des NOS3-Gens und dem 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 bestand in einigen Studien bei Kaukasiern ein Kopplungsungleichgewicht [57, 120, 107]. Dies bedeutet, dass die minoren Allele beider Polymorphismen, das C-Allel des Promotor-Polymorphismus und das T-Allel des 894G>T-Polymorphismus, gemeinsam auftraten. Da das C-Allel des -786T>C-Polymorphismus die Genexpression um 50% reduziert [90], könnte der Exon 7-Polymorphismus lediglich ein Marker des ungünstigen C-Allels im Promotor sein.

Neuere Studien untersuchten Haplotypen des NOS3-Gens. Dabei handelt es sich um eine Kombination der Allele mehrerer Polymorphismen. Der -786C-894T-4b-Haplotyp, eine Kombination der minoren Allele von drei Polymorphismen des NOS3-Gens, war in der Studie von Serrano et al. (2004) mit einem erhöhten Risiko für Präeklampsie assoziiert [114]. In einer italienischen Studie zeigte die Kombination zweier homozygoter Genotypen (-786CC und 894TT) einen Zusammenhang mit einer Präeklampsie ohne Effekt der einzelnen Polymorphismen [32]. Auch mit hypertensiven Erkrankungen zeigten spezifische Haplotypen des NOS3-Gens eine Assoziation, welche bei der Untersuchung der einzelnen Polymorphismen nicht nachgewiesen werden konnte [109].

Korrelierend dazu konnte ein genotypabhängiger Effekt von NOS3-Varianten auf die NO-Bildung (gemessen als Plasmanitrat- und cGMP-Konzentration) in einigen Studien nur bei Haplotypen festgestellt werden ohne nennenswerten Effekt der einzelnen Polymorphismen [85].

## 1.7 Synopsis

Präeklampsie ist eine multifaktorielle und polygenetische Erkrankung. Eine Störung des endothelialen NO-Stoffwechsels ist Teil der Pathogenese der Präeklampsie und wahrscheinlich genetisch bedingt. Genomweite Kopplungsuntersuchungen zeigten widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung des Chromosoms 7 als Locus für ein Kandidatengen der Präeklampsie. Im Exon 7 des endothelialen NO-Synthase-Gens befindet sich an Nukleotidposition 894 ein Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (G>T). Dieser könnte funktionell sein oder als Marker für den Promotor-Polymorphismus (-768G>C) infrage kommen.

Assoziationsstudien bestätigten einen Zusammenhang des 894G>T-Polymorphismus mit der Präeklampsie bei zwei japanischen und einem kolumbianischen Studienkollektiv sowie einen Zusammenhang mit kindlichen und mütterlichen Komplikationen der Präeklampsie bei einem kaukasischen Studienkollektiv. Fraglich ist, welche Bedeutung der 894G>T-Polymorphismus als Risikofaktor für die Präeklampsie in einer deutsch-türkischen Studienpopulation hat.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, bei einer Gruppe von deutschen und türkischen Patientinnen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom und einer Kontrollgruppe gesunder Schwangerer einen Polymorphismus an Nukleotidposition 894 im Exon 7 des endothelialen NO-Synthase-Gens molekularbiologisch zu untersuchen. Dabei sollen die Genotyp- und Allelhäufigkeiten in beiden Gruppen festgestellt und statistisch verglichen werden. Zusammen mit den anamnestischen und klinischen Befunden sollen diese Daten hinsichtlich ihrer Bedeutung als Risikofaktoren für die Präeklampsie evaluiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienteilnehmerinnen

#### 2.1.1 Rekrutierung der Patientinnen

Die Studienteilnehmerinnen wurden Dezember 1997 bis Januar 2006 in der Klinik für Geburtsmedizin, Charité, Campus Virchow-Klinikum, nach erfolgter Aufklärung und Zustimmung zur Aufnahme in die Studie rekrutiert. Dabei wurden 5 ml EDTA-Blut asserviert und beim ärztlichen Aufnahmegespräch mit Hilfe eines Fragebogens Vorerkrankungen, Risikofaktoren der Patientinnen und klinische Daten zum Schwangerschaftsverlauf erfasst. Ein Teil der Blutproben konnte aus einer Sammlung, die im Rahmen eines DFG-geförderten Projektes in Assoziation mit Prof. F. Luft, Charité, Campus Buch, angelegt worden war, verwendet werden. Ab 2003 wurden für diese Studie weitere Probandinnen rekrutiert. Insgesamt wurden 69 Patientinnen mit Präeklampsie, elf Patientinnen mit HELLP-Syndrom und 80 Patientinnen der Kontrollgruppe in die Studie eingeschlossen. Die klinischen Angaben zur Entbindung und zum Kind wurden aus dem Gebdat-Dokumentationssystem gewonnen. Alle Patientinnen erhielten bei Aufnahme eine Ultraschalluntersuchung mit Dopplersonographie der fetomaternalen Gefäße. Diese Daten wurden aus dem Viewpoint-Dokumentationssystem übernommen.

#### 2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie wurden in Anlehnung an die diagnostischen Kriterien der „Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy“ aus dem Jahr 2000 bzw. an die im Verlauf der Studie aktualisierte Version aus dem Jahr 2003 [105] formuliert.

Eine Präeklampsie wird durch die Kombination der folgenden zwei Symptome diagnostiziert:

1. Eine nach der 20. SSW neu aufgetretene Hypertonie mit diastolischen Werten  $\geq 90$  mmHg und/oder systolischen Werten  $\geq 140$  mmHg, die zweimalig im Abstand von mindestens sechs Stunden gemessen wurden.
2. Eine Proteinurie von  $\geq 300$  mg im 24-Stunden-Sammelurin oder ein mindestens zweifach positiver Urinstix.

Ein HELLP-Syndrom wird zusätzlich zur Hypertonie durch die Veränderung folgender Laborparameter diagnostiziert: Anstieg von freiem Hb, LDH, AST, ALT, Harnsäure und Abfall der Thrombozyten.

Voraussetzung für die Aufnahme in die Kontrollgruppe war ein unauffälliger Schwangerschaftsverlauf ohne Erkrankung an einer Präeklampsie, einer SIH oder einem HELLP-Syndrom. Schwere Vorerkrankungen wie eine essentielle Hypertonie, ein Diabetes mellitus, eine Thrombose oder andere vaskuläre Erkrankungen galten dabei ebenfalls als Ausschlusskriterien.

### 2.1.3 Klinische Daten

Folgende klinische Informationen wurden mittels Fragebögen und Geburtenprotokollen erhoben:

- Alter
- BMI und Gewicht zu Beginn und Ende der Schwangerschaft
- Anzahl der vorangegangenen Schwangerschaften
- Fehlgeburten
- Raucherstatus
- Hypertonie, Schilddrüsenerkrankungen, Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen oder vaskuläre Erkrankungen in der Vorgeschichte
- Medikamentenanamnese
- Auffälligkeiten während der Schwangerschaft: Ödeme, Gestationsdiabetes, Hypertonie, rechtsseitiger Oberbauchschmerz zusammen mit einem Abfall der Thrombozyten
- Geschlecht und Gewicht des Kindes
- Geburtsmodus und Schwangerschaftswoche bei Geburt
- Dopplersonographie der fetomaternalen Gefäße: PI (Pulsatilitätsindex) und RI (Resistance Index) der A. umbilicalis, der A. cerebri media und der Aa. uterinae beidseits

Der Pulsatilitätsindex nach Gosling ( $PI = V_{\max} - V_{\min} / V_{\max \text{ mean}}$ ) und der Resistance Index nach Pourcelot ( $RI = V_{\max \text{ Systole}} - V_{\max \text{ Enddiastole}} / V_{\max \text{ Systole}}$ ) steigen bei Zunahme des peripheren Widerstandes an.

Es wurden die Perzentilenkurven des Geburtsgewichts von Voigt et al. (1996) verwendet, die bundesweit für die Datenanalyse in der Perinatal- und Neonatalerhebung benutzt werden [130].

## 2.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Medizinischen Fakultät Charité. Es wurde das SPSS-Programm (Version 13.0) verwendet.

Die Genotyp- und Allelfrequenzen der Fallgruppe wurden mit denen der Kontrollgruppe durch die Anwendung des 4-Felder- $\chi^2$ -Tests bzw. des exakten Tests nach Fisher verglichen. Die Genotypfrequenzen wurden dabei sowohl unter Annahme eines dominanten wie auch rezessiven Vererbungsmodus analysiert. Wenn sinnvoll, wurde die statistische Auswertung um eine Risikoschätzung mit Berechnung des Quotenverhältnisses (Odds Ratio) erweitert. Die Testung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts erfolgte mit dem  $\chi^2$ -Test.

Die Nebenzielkriterien (Raucherstatus, Primiparität, Body Mass Index, SSW bei Geburt, Gewicht des Neugeborenen, Gewichtsperzentile bei Geburt, Nabelschnurarterien-pH, Apgarwert 1. Lebensminute < 7) wurden deskriptiv interpretiert. Zur Testung der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. Für normalverteilte kontinuierliche Variablen wurden Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (+/-SE), für nicht normalverteilte kontinuierliche Variablen Median-Werte und Interquartilbereiche (IQB) angegeben. Proportionen wurden als Absolut- und Prozentwerte dokumentiert. Für parametrische Daten kamen der Students T-Test und der Welch-Test, für nicht-parametrische Daten der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Für kategoriale Daten wurde der 4-Felder- $\chi^2$ -Test bzw. der exakte Test nach Fisher verwendet. Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.

## 2.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Die molekulargenetischen Arbeiten wurden im Zeitraum von Februar 2003 bis April 2006 im Labor für Perinatalmedizin des Virchow-Klinikums durchgeführt. Die Analyse des 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 erfolgte bei den 160 Studienteilnehmerinnen mit einer automatischen Sequenzierung eines 248 Basenpaare langen Abschnittes des NOS3-Gens.



### 2.3.1 Extraktion der DNS

Die Isolierung genomischer DNS aus menschlichem Vollblut wurde nach der Methode der Chloroform-Ethanol-Extraktion durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde zur Erythrozytenlyse 1 ml EDTA-Blut mit 15 ml der Lösung A (Inhaltsdeklaration siehe Seite 30) versetzt. Danach wurde die Lösung bei 2800 rpm für 5 min zentrifugiert.

Nach der vorsichtigen Dekantierung des Überstands wurde das entstandene Pellet nach Zugabe von 350 µl der Lösung B (Inhaltsdeklaration siehe Seite 30) vollständig resuspendiert. Dabei lysierten die Zellen. Nach der Überführung der Lösung in ein 2 ml-Eppendorf-Microtube erfolgte die Deproteinisierung durch Zugabe von 100 µl der Lösung C (Inhaltsdeklaration siehe Seite 30). Durch vorsichtiges Über-Kopf-Schütteln und anschließendes Versetzen der Lösung mit 600 µl Chloroform wurde die DNS extrahiert. Die Zentrifugation bei 6000 rpm ließ eine zweiphasige Lösung entstehen. Nach Abpipettieren der wässrigen Phase wurde der Überstand zur Präzipitation der DNS mit Isopropanol versetzt. Die DNS wurde danach durch eine zweimalige Waschung mit 70%igem Ethanol gereinigt. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols und Trocknen des DNS-Pellets bei 37 °C wurde dieses in TE-Puffer resuspendiert. Dabei wurde eine DNS-Konzentration von 100 ng/µl angestrebt. Bei einem Teil der Blutproben wurde die DNS mit einem Quiagen-Kit extrahiert.

Zur Quantifizierung und Qualitätskontrolle der extrahierten DNS wurden die DNS-Konzentration und der Quotient aus optischer Dichte bei 260 nm und 280 nm spektrophotometrisch bestimmt. Dieser Wert sollte bei mindestens 1,7 liegen. Der DNS-Gehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{OD } 260 \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} = \mu\text{g DNS}/\mu\text{l}$$

### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Untersuchung des SNP im Exon 7 des NOS3-Gens mittels automatischer Sequenzierung wurde zunächst eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) durchgeführt [88]. Dabei wird ein DNS-Abschnitt mit Hilfe zweier Primer, die jeweils aufwärts und abwärts der gesuchten Region liegen, vervielfältigt. Durch eine Denaturierung bei 94 °C werden die Doppelstränge der DNS in Einzelstränge aufgetrennt. Die Primer können dann bei einer ihnen spezifischen Bindungstemperatur an die DNS-Erkennungsstelle binden. Durch enzymatische Anheftung der Desoxyribonukleosidtriphosphate d`ATP, d`GTP, d`CTP und d`TTP mithilfe einer Taq-DNS-Polymerase an das 3`Ende des Primers wird ein komplementä-

rer DNS-Strang synthetisiert. Die Wiederholung der drei Reaktionsschritte Denaturierung, Annealing (Anheftung) und Elongation in einer zyklischen Reaktion im Thermocycler bewirkt die exponentielle Vermehrung der entsprechenden Sequenz.

### 2.3.3 Primer

Primer sind etwa 20 Basen lange Oligonukleotide, die an eine bestimmte Zielsequenz der DNS binden. Es wurden zwei Primer, die bereits von Miyamoto et al. (1998) zur Analyse des 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens verwendet wurden, für diese Studie ausgewählt [86]. Sie umschließen einen 248 Basenpaare langen Abschnitt des NOS3-Gens, welcher das gesamte Exon 7 sowie Anteile des Intron 6 und 7 enthält.

Primer sense 5` AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A 3`

Primer antisense 5` CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA 3`

Die spezifische Bindungstemperatur eines Primer sollte etwa 2 °C unter seiner Schmelztemperatur liegen. Als Orientierungswert für die Bindungstemperatur wurde der durch die Synthesefirma (TIB MOLBIOL) vorgeschlagene Wert verwendet.

### 2.3.4 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die Primer wurden in einer Konzentration von 50 pmol/µl, Nukleotide in einer Konzentration von 1 mmol/l eingesetzt. Um die Menge und Reinheit des PCR-Produktes zu maximieren, wurden die Konzentration der Magnesiumionen und die Bindungstemperatur in parallelen Reaktionen aufeinander abgestimmt.

Bindungstemperatur: 68 °C

Magnesiumkonzentration: 1 mM

### 2.3.5 PCR-Protokoll

Die DNS-Proben wurden zu Beginn auf eine Ausgangskonzentration von etwa 100 ng/µl verdünnt. 2 µl (entspricht 200 ng) wurden dann für einen 50 µl PCR-Ansatz im Thermocycler eingesetzt. Bei jeder PCR diente eine Probe mit destilliertem Wasser als Negativkontrolle.

Tab. 1: PCR-Ansatz

Chemikalien für PCR	Menge für 1 x Ansatz à 50 µl	Konzentration im Ansatz
Aqua dest.	22,2 µl	
10 mM Mg-freier Puffer	5 µl	1 mmol/l
1 mM d`NTP	7 µl	140 µmol/l
Primer Exon sense	0,7 µl	35 pmol = 0,7 µmol/l
Primer Exon antisense	0,7 µl	35 pmol = 0,7 µmol/l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl	1mmol/l
Taq Polymerase 5U/µl	0,4 µl	2 units in 50 µl
Q-solution (Quiagen)	10 µl	
Template-DNS	2 µl	200 ng in 50 µl

PCR-Programm

1. 1 Zyklus 94 °C 2 min initiale Denaturierung
2. 40 Zyklen:
  - 94 °C 1 min Denaturierung
  - 68 °C 1 min Annealing
  - 72 °C 2 min Elongation
3. 1 Zyklus 72 °C 2 min terminale Elongation

**2.3.6 Agarose-Gel-Elektrophorese**

Zur Qualitätskontrolle und Quantifizierung der amplifizierten DNS wurde im Anschluss an die PCR 5 µl des PCR-Produkts auf ein 0,9%iges Agarose-Gel aufgetragen und dieses wurde bei einer Spannung von 80 mV aufgetrennt. Als Gel- und Ladepuffer wurde 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Anhand einer DNS-Leiter (1000 bp im Abstand von 100 bp) konnte die Größe des PCR-Produkts abgelesen werden. Nach einer Laufzeit von einer Stunde wurde das Gel unter UV-Licht fotodokumentiert. Die mitgelaufene Nativ-DNS stellte sich als hochmolekulare Einzelbande dar.

**2.3.7 Aufreinigung des PCR-Produkts**

Vor der Sequenzierung wurden 25 µl des PCR-Produkts mit Millipore-Säulen aufgereinigt. Selektiv wurden dabei unter Zentrifugation bei 13 000 rpm DNS-Moleküle von 100 bp bis 10 kbp an einer Silikagel-Membran adsorbiert.

Überschüssige Primer, Nukleotide und Verunreinigungen wie Salze und Enzyme wurden dabei abzentrifugiert. Das Elutionsvolumen enthielt die gereinigte DNS.

## 2.3.8 Automatische Sequenzierung des Exon 7

### 2.3.8.1 Kettenabbruchmethode nach Sanger

Die automatische Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger [110]. Hierbei werden folgende Substanzen verwendet: einzelsträngige DNS-Moleküle des zu sequenzierenden DNS-Abschnittes, eine Taq-DNS-Polymerase, ein Primer (10 pmol/ $\mu$ l) und ein Big Dye Terminator. Der Big Dye Terminator ist ein Gemisch aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (d`NTPs) und Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (dd`NTPs), welche mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Analog zur PCR kann sich nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 96 °C ein Primer bei seiner spezifischen Bindungstemperatur an die DNS-Erkennungsstelle anlegen und anschließend den Aufwärts- bzw. Abwärtsstrang der DNS unter der Anheftung von d`NTPs replizieren. Jeder zufällige Einbau eines Didesoxyribonukleotids in den wachsenden DNS-Strang führt zum Kettenabbruch. Aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am dritten Kohlenstoffatom des Ribosemoleküls kann keine Phosphoresterbindung zur Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids geknüpft werden. So entstehen beim zyklischen Sequenzieren (cycle sequencing) Synthesestränge unterschiedlicher Länge, die sich um jeweils ein Nukleotid unterscheiden und an ihrem 3` Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Zur Sequenzierung des Abwärtsstrangs wie auch des Aufwärtsstrangs des zu untersuchenden DNS-Abschnittes wurden zwei verschiedene Ansätze mit dem jeweiligen Primer vorbereitet und im Thermocycler amplifiziert.

Tab. 2: Sequenzierungs-Ansatz

Chemikalien	Menge für 1 x Ansatz à 10 $\mu$ l
Deionisiertes Wasser	0,4 $\mu$ l
Primer 10 pM (Aufwärts- bzw. Abwärtsprimer)	0,6 $\mu$ l
Big Dye Terminator Pre-mix	2 $\mu$ l
Big Dye Sequencing Buffer	1 $\mu$ l
Template (etwa 100ng/ $\mu$ l)	6 $\mu$ l

### Zyklisches Sequenzier-Programm

1. 1 Zyklus 96 °C 3 min initiale Denaturierung
2. 25 Zyklen
  - 96 °C 35 sec Denaturierung
  - 56 °C 15 sec Annealing
  - 60 °C 3 min Elongation
3. 4 °C Kühlen

#### **2.3.8.2 Aufreinigung des zyklischen Sequenzier-Produktes**

Mit Sephadex-Säulen der Firma Amersham wurden 10 µl des zyklischen Sequenzier-Produktes aufgereinigt. Zur Vorbereitung der Säulen wurde eine Lösung aus 55 mg Sephadex-Pulver und 700 ml Aqua dest. pro Probe hergestellt und eine halbe Stunde zum Quellen stehen gelassen. Anschließend wurden 700 ml der Sephadex-Lösung pro Röhrchen pipettiert. Das gebrauchsfertige Säulenbett erhielt man durch die Abzentrifugation des Wassers bei 300 rpm für 1 min. In die Mitte des Säulenbetts wurde jeweils eine Probe aus 10 µl Sequenzier-Produkt + 10 µl Aqua dest. pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation (2min) enthielt das Eluat das aufgereinigte Sequenzier-Produkt. Dieses konnte in einer 1:10-Verdünnung (mit Aqua ad iniectabilia) zur automatischen Sequenzierung im Sequenzierautomaten eingesetzt werden.

#### **2.3.8.3 Automatische Sequenzierung**

Die Nukleotidsequenz der ursprünglichen DNS ergibt sich aus der Reihenfolge der Synthesestränge in einem Gel nach elektrophoretischer Auftrennung. Während der automatischen Sequenzierung mit dem Sequenzierautomaten wandern die DNS-Fragmente im elektrischen Feld an einem Laserstrahl vorbei. Dabei werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laser angeregt, deren Signale detektiert und durch ein Computerprogramm interpretiert. Das Ergebnis ist eine Folge von Fluoreszenz-Peaks, die den Nukleotiden, eine Farbe für jede Base, zugeordnet werden können. Die Nukleotidsequenzen wurden anschließend mit der in der Gen-Bank veröffentlichten Referenzsequenz (NM\_000603.3) verglichen.

## 2.4 Material und Reagenzien

### 2.4.1 Lösungen und Puffer

Lösung A	109,5 g Sucrose in 600 ml Aqua dest. auflösen 5,0 ml 1,0 M MgCl <sub>2</sub> 10,0 ml Triton X 100 10,0 ml 1,0 M Tris-HCL, pH 8,0 ad 1000,0 ml Aqua dest. und autoklavieren
Lösung B	40,0 ml 1,0 M Tris-HCL, pH 8,0 12,0 ml 0,5 M Na-EDTA 15,0 ml 1,0 M NaCl <sub>2</sub> ad 100,0 ml Aqua dest. und autoklavieren im Wasserbad 5,0 ml 20 % SDS hinzufügen
Lösung C	100,0 g Na-perchlorat in 60,0 ml Aqua dest. auflösen ad 142 ml Aqua dest. und autoklavieren
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	10,0 mM Tris-Base 1,0 mM EDTA ph 8,0

---

10 x TBE-Puffer	108,0 g Tris-Base 55,0 g Borsäure 40,0 ml 0,5 M EDTA ad 1000 ml Aqua dest. und autoklavieren
0,6 x TBE	120,0 ml 10 x TBE plus 1880,0 ml Aqua dest.
0,5 x TBE	50,0 ml 10 x TBE plus 950,0 ml Aqua dest.
Probenpuffer Agarosegele	5,0 ml Glycerol 0,025 g Bromphenolblau 0,025 g Xylencyanol 20,0 µl 0,5 M EDTA ad 10,0 ml steriles Aqua dest.

### 2.4.2 Gele

1,2%iges Agarose- Gel	100,0 ml 0,5 x TBE-Puffer und 1,2 g Agarose in der Mikrowelle aufgekocht (600 W, 100 s) Zugabe von 2,0 µl Ethidiumbromid
0,8%iges Agarose- Gel	50,0 ml 0,5 M TBE-Puffer 0,4 g Agarose in der Mikrowelle aufgekocht (600 W, 100 s) Zugabe von 1,0 µl Ethidiumbromid

Tab. 3: Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
6x Gel Loading Buffer	Cembrex, über Biozym, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, über Biozym
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aqua dest.	Selbst autoklaviert
BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems UK, Warrington, UK
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Blue Dextran	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Borsäure pro analysii	MERCK KgaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenol Blue	Sigma
Centrifuge 5416	Eppendorf
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Chloroform p.a.	MERCK
DNA Ladder 100 bp	Cembrex, über Biozym
d <sup>+</sup> NTP-Set 100 mM	Biozym Diagnostik GmbH, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA, 250 g	Sigma
Ethanol 70 % p.a.	Riedel de Haën Laborchemikalien & Co KG, Seelze, Deutschland
Ethidium Bromide Solution 10 mg/ ml 10ml	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Falcon-Röhrchen mit Deckel 50 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Fotopapier	Diagramm Hallbach GmbH & Co.KG, Schwerte, Deutschland
Gel-Elektrophorese-Kammer ComPhor L Mini und Gel-Elektrophorese-Kämme	Biozym
Genetic Analyzer Septa für 0,5 ml Tubes und 0,5 ml Sample Tubes	Applied Biosystems
Glycerol	Sigma
Isopropanol	MERCK
Kühlschrank + Gefrierschrank – 20°C	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Kurzzeitwecker	Kleinfeld Labortechnik, Deutschland
Labor-pH-Meter 766 Calimatic und pH-Einstabmesskette SE 100	Knick, Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin, Deutschland
Latex-freie Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Lauryl sulfate SDS Sodium Salt	MERCK
Magnesiumchlorid-Hexahydrat p.a.	MERCK
Magnetrührwerk MR 2 000, Heizgerät HG 2 002	Heidolph-Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland



<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
MetaPhor Agarose 125 g	Biozym
Mg-freier Puffer für PCR	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Microtubes 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Microtubes 2 ml	Eppendorf
Millipore-Säulen	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Multi-Reaktionsgefäße 1,7 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl <sub>2</sub> 1 M	MERCK
Natriumperchlorat-Monohydrat p.a.	MERCK
PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym
Peltier Thermal Cycler mit Gradienten-Funktion, PTC-200	Biozym
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Power Supply für Gelelektrophorese	Biozym
Primer Exon 7 sense und antisense 50 pmol/µl	TibMolBiol Syntheselabor, Berlin, Deutschland
Q-Solution, 5x	QIAGEN
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Reaktionsgefäße mit Deckel : 0,65 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Sephadex TM G-50 Fine DNA- Grade	Amersham Biosciences Europe GmbH, Deutschland
Sephadex-Säulen	Amersham Biosciences
Sucrose	Sigma
Spin columns G-50 Centri Sep	Applied Biosystems
SPSS-Programm, Version 13.0	SPSS Inc., Chicago, USA
Taq DNA Polymerase 5U/µl	Quiagen
Tris-Base, 10 mM	MERCK
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	MERCK
Uvette® für Photometer	Eppendorf
UV-Transilluminator TI 3	Biometra GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waage SAC 51	SCALTEC INSTRUMENTS GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Wärmebad	Medax GmbH & Co. KG, Rendsburg, Deutschland
Xylene cyanole	Sigma

### 3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 80 Präeklampsiepatientinnen, darunter elf Patientinnen, die ein HELLP-Syndrom entwickelten, und 80 Kontrollpatientinnen bezüglich des 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens mit einer automatischen Sequenzierung genotypisiert. Daten zu Geburt und Schwangerschaft wurden von allen Probandinnen, Dopplerultraschallbefunde von einem Teil der Probandinnen erhoben.

#### 3.1 Klinische und anamnestische Daten

##### 3.1.1 Alter und Ethnizität

Der Altersdurchschnitt der Präeklampsiepatientinnen lag bei 29 Jahren [ $\pm$  1] und in der Kontrollgruppe bei 30 Jahren [ $\pm$  1]. Die Gruppe der Präeklampsiepatientinnen bestand aus 61 (76 %) Patienten deutscher, zehn (13 %) Patienten türkischer und neun (11 %) Patientinnen anderer Herkunft. Die Kontrollgruppe bestand aus 45 (56 %) Patientinnen deutscher, 22 (28 %) Patientinnen türkischer und 13 (16 %) Patientinnen anderer Herkunft. Werden Patientinnen türkischer und deutscher Herkunft als Gruppe der Kaukasierinnen zusammengefasst, setzte sich die Präeklampsiegruppe aus 71 (89 %) Kaukasierinnen und neun (11 %) Patientinnen anderer Ethnizität zusammen, während in der Kontrollgruppe 67 (84 %) Kaukasierinnen und 13 (16 %) Patientinnen anderer Ethnizität vertreten waren. Präeklampsie- und Kontrollgruppe unterschieden sich nicht bezüglich Alter ( $p = 0,51$ ) und Ethnizität ( $p = 0,36$ ).

##### 3.1.2 Risikofaktoren für Präeklampsie

###### Raucherstatus

Eine positive Anamnese bezüglich des aktuellen Raucherstatus hatten 13 von 72 (18 %) Präeklampsiepatientinnen und 22 von 77 (29%) Kontrollpatientinnen. Es gab eine leichte Häufung von Nichtraucherinnen in der Präeklampsiegruppe, die jedoch statistisch nicht signifikant war ( $p = 0,25$ ).

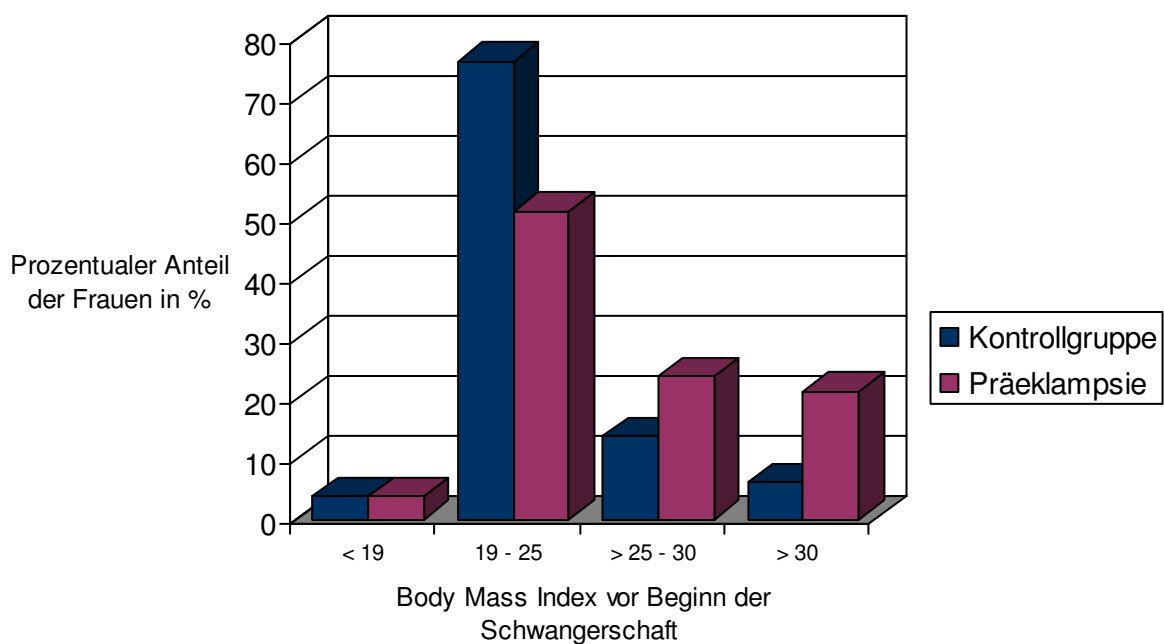
###### Primiparität

Erstgebärende waren 63 von 80 (79 %) Präeklampsiepatientinnen und 35 von 80 (44 %) Patientinnen der Kontrollgruppe. Primiparität war in dieser Studie signifikant mit Präeklampsie assoziiert ( $p < 0,0005$ ).

### Body Mass Index vor Beginn der Schwangerschaft

Der Median des Body Mass Index (BMI) der Präeklampsiepatientinnen lag in dieser Studie bei 24 (IQB 20,2 - 27,8) und in der Kontrollgruppe bei 22,4 (IQB 20,5 - 24,3). Ein höherer BMI war in dieser Studie mit Präeklampsie assoziiert ( $p = 0,005$ ). Übergewichtig ( $\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$ ) waren 35 von 80 (44 %) Präeklampsiepatientinnen im Vergleich zu 16 von 80 (20 %) Patientinnen der Kontrollgruppe ( $p = 0,001$ ).

Abb. 2: Body Mass Index vor Beginn der Schwangerschaft



### **3.1.3 Komplikationen bei Präeklampsie**

#### Ultraschall während der Schwangerschaft

In der Präeklampsiegruppe zeigten 25 von 47 (53 %) Patientinnen im Vergleich zu drei von 47 (6 %) Patientinnen der Kontrollgruppe einen pathologischen Ultraschallbefund der maternalen Gefäße (A.uterina einseitig und/oder beidseitig) und/oder fetalen Gefäße (A. umbilicalis, A. cerebri media). Ein pathologischer Ultraschallbefund der fetalen und/oder maternalen Gefäße war in dieser Studie signifikant mit einer Präeklampsie assoziiert ( $p < 0,0005$ ).

In der Präeklampsiegruppe betraf diese Pathologie am häufigsten ausschließlich die maternalen Gefäße bei 15 von 47 (32 %) Patientinnen, beide (fetale + maternale) Gefäße in neun von 47 (19 %) Patientinnen und ausschließlich die fetalen Gefäße bei einer von 47 (2 %) Patientinnen.

#### Schwangerschaftswoche bei Geburt

Der Median der Schwangerschaftsdauer betrug 37 Wochen (IQB 34 - 40) bei den Präeklampsiepatientinnen und 39 Wochen (IQB 38 - 40) bei den Frauen mit unauffälligen Schwangerschaften ( $p < 0,0005$ ). Der Anteil der Frühgeborenen (Entbindung vor Beendigung der 37. SSW) betrug bei den präeklampsischen Müttern 50 % (40 von 80), während er bei den gesunden Müttern 6 % (5 von 80) betrug. Präeklampsie war in dieser Studie mit Frühgeburtlichkeit assoziiert ( $p < 0,0005$ ).

#### Geburtsmodus

53 von 80 (66 %) Präeklampsiepatientinnen und 20 von 80 (25 %) Kontrollpatientinnen wurden mit einem Kaiserschnitt entbunden. Ein Kaiserschnitt wurde signifikant häufiger bei den Patientinnen der Präeklampsiegruppe durchgeführt ( $p < 0,0005$ ). Die drei häufigsten Gründe für eine Sectio waren bei den Präeklampsiepatientinnen an erster Stelle ein pathologisches CTG (32 %) gefolgt von Exazerbation des mütterlichen Blutdrucks (26%) und HELLP-Syndrom (19 %). Die Frauen der Kontrollgruppe wurden hauptsächlich wegen fehlendem Progress im Geburtsverlauf (42 %), einem vorzeitigem Blasensprung (21 %) und an dritter Stelle wegen einem pathologischen CTG (11 %) oder wegen einer Mehrlingsgeburt (11 %) per Kaiserschnitt entbunden.

#### Körpergewicht des Neugeborenen

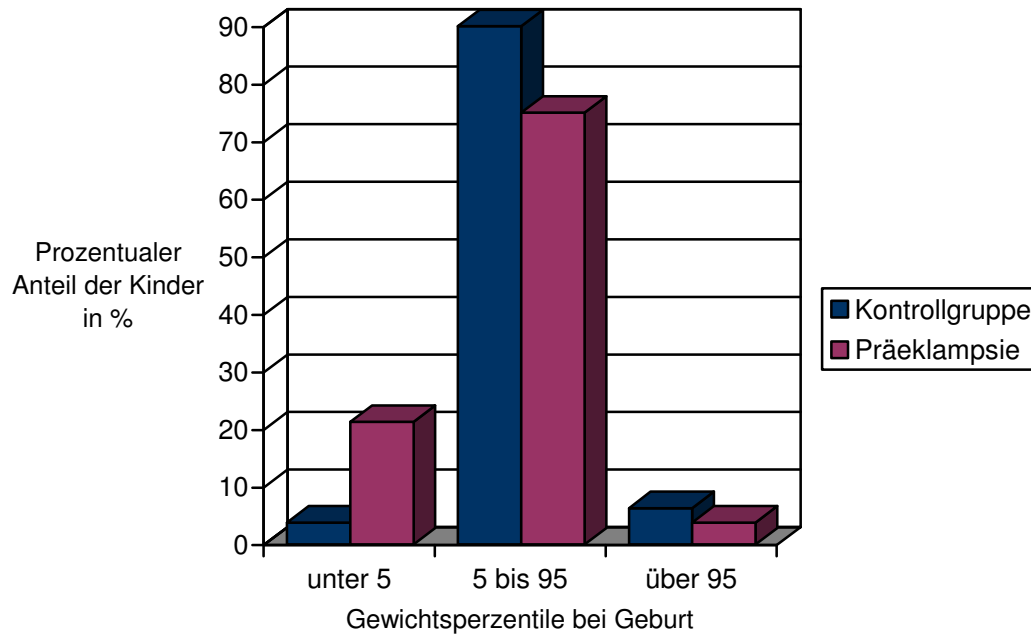
Das durchschnittliche Geburtsgewicht betrug in der Präeklampsiegruppe 2329 g [ $\pm$  115] und in der Kontrollgruppe 3302 g [ $\pm$  67]. Die Präeklampsie war in dieser Studie signifikant mit einem niedrigen Geburtsgewicht assoziiert ( $p < 0,0005$ ).

#### Gewichtspersentile des Neugeborenen

Der Median der Gewichtspersentilen bei Geburt lag in der Präeklampsiegruppe bei 15 (IQB 1 - 30) und in der Kontrollgruppe bei 49 (IQB 22 - 77). Die Gewichtspersentilen der Neugeborenen präeklampsischer Mütter waren signifikant niedriger als die Gewichtspersentilen der Neugeborenen von Müttern der Kontrollgruppe ( $p < 0,0005$ ).

17 von 80 (21 %) Neugeborene präeklampsischer Mütter hatten ein zu niedriges Geburtsgewicht in Relation zum Gestationsalter (< 5. Perzentile), während dies nur für drei von 80 (4 %) Neugeborene gesunder Mütter zutraf ( $p = 0,001$ ).

Abb. 3: Gewichtsporzente bei Geburt



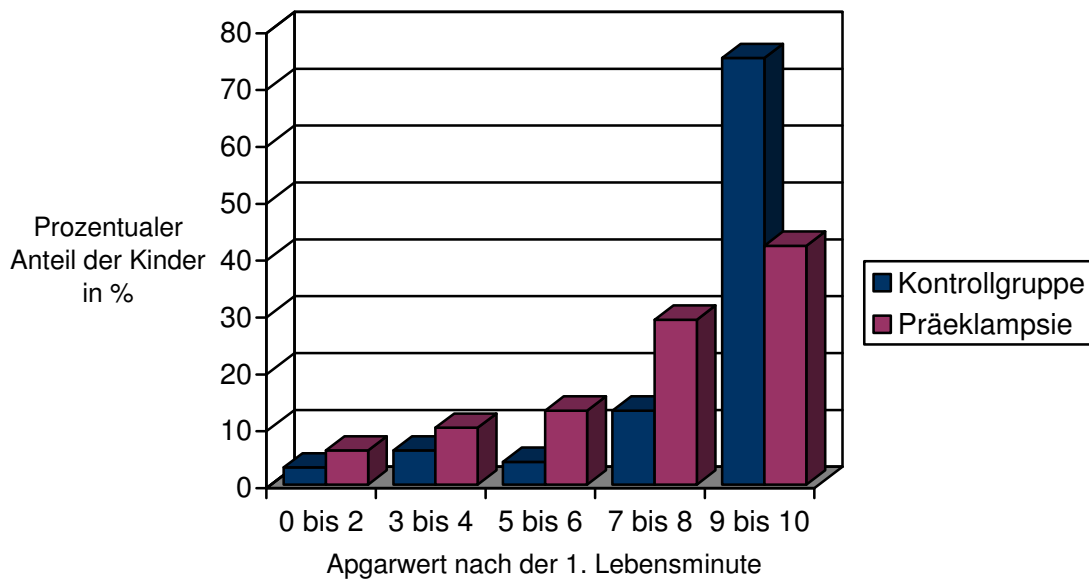
### Nabelschnurarterien- pH

Der Median des pH-Werts des Nabelschnurarterienbluts betrug in der Präeklampsiegruppe 7,28 (IQB 7,24 - 7,33) und in der Kontrollgruppe 7,26 (IQB 7,22 - 7,31). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Nabelschnurarterien-pH zwischen den Neugeborenen der Mütter der Präeklampsie- und Kontrollgruppe ( $p = 0,19$ ).

### Apgarwert nach der 1. Lebensminute

In der Präeklampsiegruppe hatten 20 von 69 (29 %) Neugeborene einen Apgarwert nach der 1. Lebensminute < 7, während zehn von 79 (13 %) Neugeborene gesunder Mütter davon betroffen waren. In dieser Studie war ein Apgarwert nach der 1. Lebensminute < 7 signifikant mit einer Präeklampsie assoziiert ( $p = 0,014$ ).

Abb. 4: Apgarwert nach der 1. Lebensminute



Legende: 0 – 2 schwere Depression, 3 – 4 mittelschwere Depression, 5 – 6 leichte Depression, 7 – 8 noch lebensfrisch, 9 – 10 lebensfrisch

Tab. 4: Zusammenfassung maternaler und kindlicher Daten

	Präeklampsiegruppe n = 80	Kontrollgruppe n = 80	p-Wert <sup>c</sup>
Maternales Alter <sup>b</sup> (Jahre)	29 [+/- 1]	30 [+/- 1]	n.s.
Kaukasier (%)	71/80 (89 %)	67/80 (84 %)	n.s.
Raucherstatus (%)	13/72 (18 %)	22/77 (29 %)	n.s.
Primiparität (%)	63/80 (79 %)	35/80 (44 %)	p < 0,0005
BMI <sup>a</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	24 (20,2 – 27,8)	22,4 (20,5 – 24,3)	p = 0,005
BMI > 25 kg/m <sup>2</sup> (%)	35/80 (44 %)	16/80 (20 %)	p = 0,001
Gemini (%)	7/80 ( 9 %)	6/80 (8 %)	n.s.
Pathologischer Doppler	25/47 (53 %)	3/47 (6 %)	p < 0,0005
SSW bei Geburt <sup>a</sup>	37 (34 – 40)	39 (38 – 40)	p < 0,0005
Frühgeburlichkeit (%)	40/80 (50 %)	5/80 (6%)	p < 0,0005
Sectio (%)	53/80 (66 %)	20/80 (25 %)	p < 0,0005
Geburtsgewicht <sup>b</sup> (g)	2329 [+/- 115]	3302 [+/- 67]	p < 0,0005
Gewichtspersentile <sup>a</sup>	15 (1 – 30)	49 (22 – 77)	p < 0,0005
Geburtsgewicht < 5.P (%)	17/80 (21 %)	3/80 (4 %)	p = 0,001
Apgar 1. min. < 7 (%)	20/69 (29 %)	10/79 (13 %)	p = 0,014
Nabelarterien-pH <sup>a</sup>	7,28 (7,24 – 7,33)	7,26 (7,22 – 7,31)	n.s.

<sup>a</sup> Median (Interquartilbereich)

<sup>b</sup> Mittelwert [+/- SE]

<sup>c</sup> p-Werte wurden für kategoriale Variablen mit dem Qui-Quadrat-Test und für stetige Variablen mit dem Exakten Test nach Fisher bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet

## 3.2 Der 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens

### 3.2.1 Genotyp- und Allelfrequenzen

In dieser Studie zeigte sich folgende Verteilung der Genotypen an Nukleotidposition 894 im Exon 7 des NOS3-Gens in der Präeklampsiegruppe: 56 % (45 von 80) GG, 41 % (33 von 80) GT und 3 % (2 von 80) TT im Vergleich zu den Patientinnen der Kontrollgruppe: 63 % (50 von 80) GG, 35 % (28 von 80) GT und 3 % (2 von 80) TT.

Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen in allen drei Gruppen (Präeklampsiegruppe, Kontrollgruppe und gesamtes Kollektiv) war in Vereinbarung mit der erwarteten Verteilung unter Annahme eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (beobachtete versus erwartete Genotypfrequenzen  $p > 0,05$ ).

Unter der Annahme eines rezessiven Vererbungsmodus (TT vs. GT + GG) zeigte sich kein statistischer Unterschied zwischen Präeklampsie- und Kontrollgruppe (OR 1 [95 % KI 0,1 - 7,3],  $p = 1$ ).

Unter Annahme eines dominanten Vererbungsmodus (GT + TT vs. GG) war eine leichte Häufung der Genotypen GT und TT in der Präeklampsiegruppe festzustellen. Es bestand ein auf 1,3 erhöhtes Quotenverhältnis (Odds Ratio) für die homo- und heterozygote Mutante (GT + TT) in der Präeklampsiegruppe gegenüber den Patientinnen der Kontrollgruppe. Dies war statistisch jedoch nicht signifikant (OR 1,3 [95 % KI 0,7 - 2,4],  $p = 0,42$ ). Gleiches galt für eine leichte Häufung des T-Allels (T-Allel vs. G-Allel) in der Präeklampsiegruppe (OR 1,2 [95 % KI 0,7 - 2],  $p = 0,5$ ).

Die genotypische Verteilung getrennt nach ethnischer Zugehörigkeit (Deutsche, Türkinnen und Nicht-Kaukasierinnen) wies keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf ( $p = 0,82$ ). Bei deutschen, türkischen und nicht-kaukasischen Studienteilnehmerinnen bestanden ähnliche Genotyp- und Allelfrequenzen in der Präeklampsie- und Kontrollgruppe (siehe Tabelle 6).



Tab. 5: Effekt des 894G&gt;T-Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens für das Risiko, an Präeklampsie zu erkranken, unter Annahme verschiedener Vererbungsmodi

Vererbungsmodell	Genotypfrequenz Präeklampsie- gruppe n = 80	Genotypfrequenz Kontrollgruppe n = 80	Quoten- verhältnis (OR)	p
<b>Rezessives Modell</b>				
TT vs. GT + GG	<b>TT</b> 2 (3 %) <b>GT + GG</b> 78 (98 %)	<b>TT</b> 2 (3 %) <b>GT + GG</b> 78 (98 %)	OR 1 [95 % KI 0,1 - 7,3]	p = 1
<b>Dominantes Modell</b>				
GT + TT vs. GG	<b>GT+ TT</b> 35 (44 %) <b>GG</b> 45 (56 %)	<b>GT+TT</b> 30 (38 %) <b>GG</b> 50 (63 %)	OR 1,3 [95 % KI 0,7 - 2,4]	p = 0,42
	<b>Allelfrequenz Fallgruppe</b>	<b>Allelfrequenz Kontrollgruppe</b>	<b>Quoten- verhältnis OR)</b>	<b>p</b>
<b>Allel-Vergleich</b>				
G vs. T	<b>G</b> 123 (77 %) <b>T</b> 37 (23 %)	<b>G</b> 128 (80 %) <b>T</b> 32 (20 %)	1,2 [95 % KI 0,7 - 2]	p = 0,5

Tab. 6: Genotypische Distribution aufgeteilt nach ethnischer Zugehörigkeit

<b>Deutsche</b>	<b>Präeklampsiegruppe n = 61</b>	<b>Kontrollgruppe n = 45</b>
GG	34 (56 %)	27 (60 %)
GT	25 (41 %)	16 (36 %)
TT	2 (3 %)	2 (5 %)
T-Allelfrequenz	24 %	22 %
<b>Türkinnen</b>	<b>Präeklampsiegruppe n = 10</b>	<b>Kontrollgruppe n = 22</b>
GG	6 (60 %)	15 (68 %)
GT	4 (40 %)	7 (32 %)
TT	0 (0 %)	0 (0 %)
T-Allelfrequenz	20 %	16 %
<b>Nicht-Kaukasierinnen</b>	<b>Präeklampsiegruppe n = 9</b>	<b>Kontrollgruppe n = 13</b>
GG	5 (56 %)	8 (62 %)
GT	4 (44 %)	5 (38 %)
TT	0 (0 %)	0 (0 %)
T-Allelfrequenz	23 %	19 %

### 3.2.2 Merkmale in Abhängigkeit vom Genotyp in Fall- und Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe unterschieden sich die Frauen mit dem Genotyp GG (Wildtyp) im Vergleich zu den Frauen mit den Genotypen GT und TT (homozygote und heterozygote Mutante) nicht in den Merkmalen Alter ( $p = 0,24$ ), Anteil der Primiparae ( $p = 0,38$ ), Body Mass Index vor Beginn der Schwangerschaft ( $p = 0,75$ ), Geburtsgewicht ( $p = 0,62$ ), Gewichtsperzentile bei Geburt ( $p = 0,41$ ) und Schwangerschaftswoche bei Geburt ( $p = 0,86$ ).

Bei Präeklampsiepatientinnen waren Frühgeburtlichkeit ( $p = 0,04$ ), ein niedriges Geburtsgewicht ( $p = 0,01$ ) sowie eine niedrige Gewichtsperzentile bei Geburt ( $p = 0,04$ ) signifikant mit dem Genotyp GT + TT assoziiert.

Es gab keinen genotypabhängigen Unterschied bezüglich der Merkmale Alter ( $p = 0,28$ ), Anteil der Primipara ( $p = 0,16$ ) und Body Mass Index vor Beginn der Schwangerschaft ( $p = 0,37$ ) zwischen den GT + TT-Trägerinnen und den GG-Trägerinnen in der Präeklampsiegruppe.

Tab. 7: Merkmale in Abhängigkeit vom 894G>T-Genotyp in der Präeklampsiegruppe

	GT/TT (n = 35)	GG (n = 45)	p-Wert <sup>c</sup>
BMI <sup>a</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	22,4 (18,1 - 26,7)	26 (22,8 – 29,2)	n.s.
Geburtsgewicht <sup>a</sup> (g)	1778 (925 - 2613)	2800 (2140 - 3460)	p = 0,01
Gewichtsperzentile <sup>b</sup>	20 [+/- 4]	32 [+/- 5]	p = 0,04
Geburtsgewicht < 5.P (%)	10/35 (29 %)	7/45 (16 %)	n.s.
SSW bei Geburt <sup>a</sup>	35 (32 – 39)	38 (36 – 41)	p = 0,02
Frühgeburtlichkeit (%)	22/35 (63 %)	18/45 (40 %)	p = 0,04

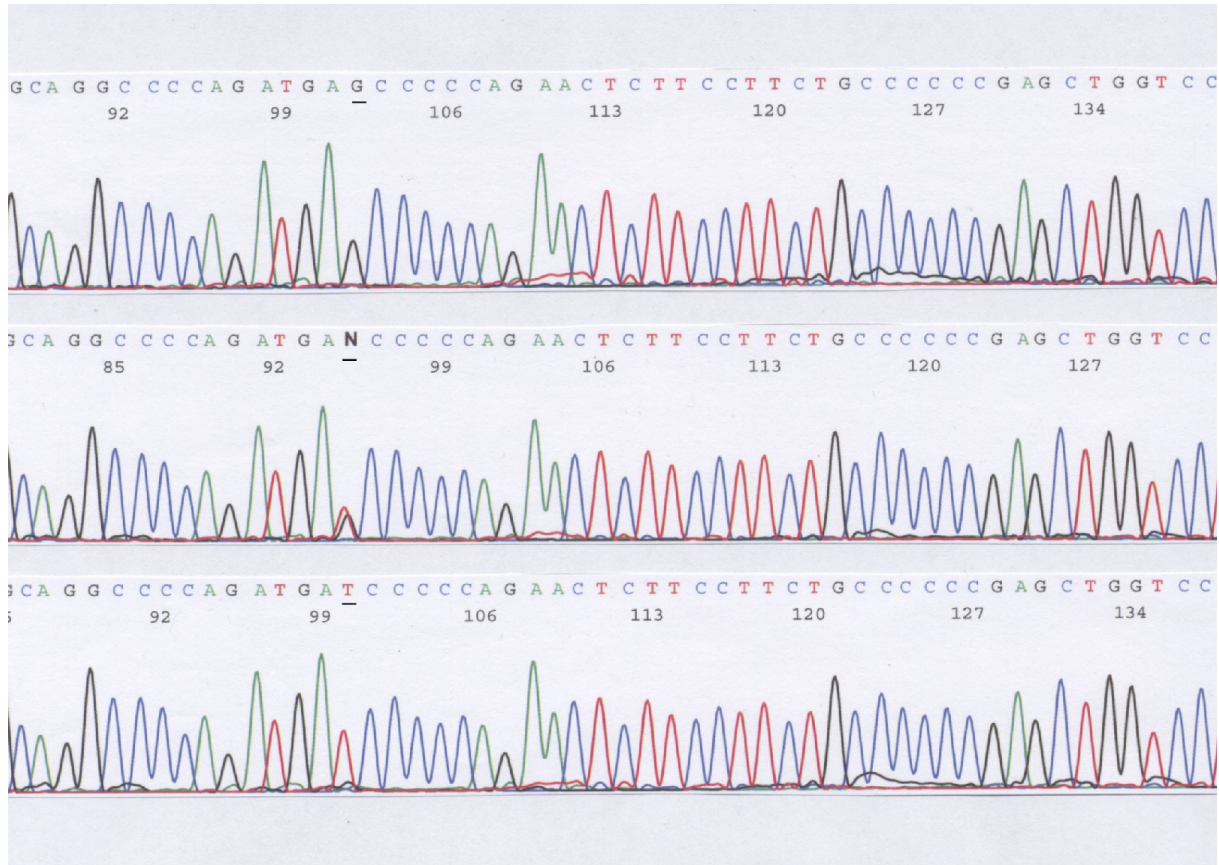
<sup>a</sup> Median (Interquartilbereich)

<sup>b</sup> Mittelwert [+/- SE]

<sup>c</sup> p-Werte wurden für kategoriale Variablen mit dem Qui-Quadrat-Test und für stetige Variablen mit dem Exakten Test nach Fisher bzw. Mann-Whitney-U-Test berechnet

### 3.2.3 Elektropherogramm Exon 7 des NOS3-Gens

Abb. 5: Ausschnitte des Exon 7-NOS3-Gens



Legende: schwarz unterstrichen ist die Nukleotidposition 894, Zeile 1: Genotyp GG, Zeile 2: Genotyp GT, Zeile 3: Genotyp TT

## 4 Diskussion

### 4.1 Risikofaktoren der Präeklampsie

#### Primiparität

Die Präeklampsie gilt als eine Erkrankung der Erstschwangerschaft. Auch in dieser Studie war die Präeklampsie signifikant mit Primiparität assoziiert ( $p < 0,0005$ ). Dies entspricht den Beobachtungen einer Vielzahl von Studien [129, 30]. Als ursächlich für die Häufung der Präeklampsie bei primiparen Schwangeren wird eine mütterliche Immunreaktion auf paternale Antigene der fetoplazentaren Einheit gesehen (Immunmaladaptation-Hypothese).

#### Body Mass Index vor Schwangerschaftsbeginn

Übergewichtigkeit ( $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ ) vor Eintritt der Schwangerschaft wurde in dieser Studie als Risikofaktor für eine Präeklampsie identifiziert ( $p = 0,001$ ). Dies bestätigten zahlreiche Studien [93, 63, 49, 13]. Eine Verletzung des Endothels wird als ursächlicher Pathomechanismus angesehen. Die bei Übergewichtigen vorhandene Hyperlipidämie mit der vermehrten Entstehung von Lipidperoxiden und ein erhöhtes Blut- und Schlagvolumen werden als Ursachen der Endothelschäden diskutiert [118].

#### Raucherstatus

Rauchen als protektiver Faktor gegen Präeklampsie ließ sich in dieser Studie nicht bestätigen. Es zeigte sich eine leichte Häufung von Nichtraucherinnen in der Präeklampsiegruppe ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,25$ ). Im Widerspruch dazu zeigte eine systematische Review von 48 epidemiologischen und klinischen Studien von 1959 bis 2006 eine Reduktion des Erkrankungsrisikos für Präeklampsie durch Rauchen bis zu 50 % mit einer dosis-abhängigen Komponente [29]. Die aktuelle Literatur gibt keine klare Erklärung, welche Mechanismen für den protektiven Effekt des Rauchens verantwortlich sind. Diskutiert werden Effekte auf Faktoren der Angiogenese, die Endothelfunktion und das Immunsystem [29].

## 4.2 Komplikationen der Präeklampsie

### Frühgeburtlichkeit

Präeklampsie war in dieser Studie mit Frühgeburtlichkeit assoziiert ( $p < 0,0005$ ). Präeklampsiepatientinnen gebären im Mittel zwei Wochen früher als gesunde Schwangere (37 SSW vs. 39 SSW). Der Anteil der Frühgeborenen betrug bei den präeklampsischen Müttern 50 % und bei den Müttern mit einem unkomplizierten Schwangerschaftsverlauf 6 %. Dies entspricht den erhobenen Daten anderer Assoziationsstudien [49, 114, 93, 63, 143].

Die Frühgeburtlichkeit ist bei Präeklampsie meist iatrogen verursacht, zum Teil auch durch eine frühe spontane Wehentätigkeit. Eine ärztliche Entscheidung zur Sectio oder frühzeitigen medikamentösen Geburtseinleitung als derzeit einzige kausale Therapie der Präeklampsie stellt eine Abwägung zwischen der Prognose des Kindes und der Gefahr für die Mutter dar.

### Kindliche Wachstumsretardierung

Die Präeklampsie war in dieser Studie signifikant mit einem niedrigen Geburtsgewicht assoziiert ( $p < 0,0005$ ). Die Neonaten der Präeklampsiegruppe waren durchschnittlich 973 g leichter als die Neonaten der Kontrollgruppe (2329 g vs. 3302 g). Diese Werte entsprechen in etwa den erhobenen Daten anderer Studien [121, 49, 71, 69, 129].

Des Weiteren waren die Perzentilen der Geburtsgewichte Neugeborener präeklampsischer Mütter signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,0005$ ). Eine fetale Wachstumsretardierung (Geburtsgewicht  $< 5$ . Perzentile) bestand signifikant häufiger bei den Neugeborenen der präeklampsischen Mütter im Vergleich zu den Müttern mit unauffälligem Schwangerschaftsverlauf ( $p = 0,001$ ).

Das niedrigere Geburtsgewicht der Neugeborenen präeklampsischer Mütter entspricht somit nicht nur einer iatrogen verkürzten Schwangerschaftsdauer, sondern auch einer intrauterinen Wachstumsverzögerung in Relation zum Gestationsalter. Eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR = intrauterine growth retardation) als häufige Komplikation bei den Kindern präeklampsischer Mütter wurde in Übereinstimmung mit dieser Studie in zahlreichen Untersuchungen festgestellt [30, 71, 69]. Ursächlich für die intrauterine Wachstumsretardierung ist eine plazentare Mangelversorgung des Fötusses.

### Ultraschall der maternalen und fetalen Gefäße

Ein pathologischer Ultraschallbefund der mütterlichen Gefäße (Aa. uterinae) und/oder der fetalen Gefäße (A. umbilicalis, A. cerebri media) war in dieser Studie signifikant mit Präeklampsie assoziiert ( $p < 0,0005$ ).

Da der Abfall des peripheren Widerstandes im uteroplazentaren Kreislauf während der frühen Schwangerschaft bei Präeklampsie ausbleibt, zeigt sich eine erhöhte Impedanz im peripheren vaskulären System [95]. Dies kann mit einer Dopplersonographie des uteroplazentaren Kreislaufs während der Schwangerschaft bei Präeklampsiepatientinnen nachgewiesen werden [3] und gilt als potentieller Screeningtest für Präeklampsie und eine intrauterine Wachstumsretardierung [33]. Pathologische Dopplerformen der Aa. uterinae von präeklampsischen Schwangeren gehen dabei mit einer reduzierten NO-Bildung im Plazentabett einher [9].

### Apgarwert nach der 1. Minute

Der Apgarwert ist ein Punkteschema zur Beurteilung der Adaptation des Neugeborenen an das extrauterine Leben unmittelbar eine Minute, fünf Minuten und zehn Minuten nach der Geburt. Bei Werten  $< 7$  nach der 1. Lebensminute spricht man von einer Depression. In dieser Studie war Präeklampsie mit einem niedrigen Apgarwert nach der 1. Lebensminute  $< 7$  assoziiert ( $p = 0,014$ ). Dies entspricht dem Ergebnis der Studie von Serrano et al. (2004) [114]. Das Risiko für eine eingeschränkte Kreislaufadaptation des Neugeborenen präeklampsischer Mütter ist auf die mit Präeklampsie häufig einhergehende Frühgeburtlichkeit und intrauterine Wachstumsretardierung zurückzuführen.

### pH-Wert des Nabelschnurarterienblutes

In dieser Studie gibt es keinen Unterschied des pH-Werts des Nabelschnurarterienblutes zwischen Präeklampsie- und Kontrollgruppe ( $p = 0,19$ ). Dies spricht für eine suffiziente ärztliche Überwachung der Schwangerschaft nach Diagnosestellung und der zeitgerechten Indikation zur Entbindung, so dass ein akuter Sauerstoffmangel des Fötusses bei der Geburt vermieden werden konnte.

### **4.3 Distribution und statistischer Vergleich der Genotyp- und Allelfrequenzen**

Es gab keinen Unterschied der prozentualen Verteilung der Genotypen GG, GT und TT in Nukleotidposition 894 des NOS3-Gens zwischen Präeklampsiepatientinnen (56 % GG, 41 % GT und 3 % TT) und den Patientinnen der Kontrollgruppe (63 % GG, 35 % GT und 3 % TT) in dieser Studie. Die T-Allelhäufigkeit betrug 23 % in der Präeklampsiegruppe versus 20 % in der Kontrollgruppe.

Die Verteilung der Genotypen in der Präeklampsie- und Kontrollgruppe sowie im gesamten Kollektiv entsprach der erwarteten Verteilung unter Annahme eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts ( $p > 0,05$ ). Statistisch verglichen wurden die erwarteten Genotypfrequenzen unter Annahme eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts mit den beobachteten Genotypfrequenzen in der Studienpopulation. Ein bestehendes Hardy-Weinberg-Gleichgewicht spricht im Einklang mit dem Ergebnis dieser Studie gegen eine Akkumulation von prädisponierenden Genotypen in der Präeklampsiegruppe.

Die statistische Auswertung unter Annahme eines rezessiven Vererbungsmodus (TT vs. GG + GT) zeigte keine Assoziation zwischen Genotyp und Präeklampsie (OR 1 [95 % KI 0,1 - 7,3],  $p = 1$ ). Bei Frauen, die homozygot oder heterozygot für das T-Allel waren (GT + TT), betrug das Quotenverhältnis für Präeklampsie 1,3 gegenüber den homozygoten Trägern des G-Allels (GG). Diese leichte Risikoerhöhung war statistisch jedoch nicht signifikant (OR 1,3 [95 % KI 0,7 - 2,4],  $p = 0,42$ ).

### **4.4 Diskussion der Bedeutung des 894G>T-Polymorphismus**

#### **4.4.1 Vergleich mit den Ergebnissen anderer Assoziationsstudien**

Bei kaukasischen Studienpopulationen aus Finnland, Österreich und Italien fand sich im Einklang mit dieser Studie an einem deutsch-türkischen Patientenkollektiv bislang kein Hinweis für einen bedeutenden Einfluss der Genvariante im Exon 7 des NOS3-Gens auf das Erkrankungsrisiko für Präeklampsie [49, 121, 32]. Die finnische Studie von Hakli et al. (2003) zeigte im Widerspruch zu den pathophysiologischen Überlegungen einer eingeschränkten NO-Bildung bei T-Allel-Trägern sogar eine tendenzielle Häufung des Wildtyp-Allels (G-Allel) in der Präeklampsiegruppe [49].

Auch sieben weitere Assoziationsstudien, darunter vier aus Asien [134, 93, 62, 142], eine aus dem afro-karibischen Raum [51] und zwei Studien mit ethnisch gemischten Studienkollektiven aus England [70, 145] wiesen in Übereinstimmung mit dem Ergebnis dieser Studie keine Assoziation zwischen dem T-Allel des 894G>T-Polymorphismus und Präeklampsie auf.

Im Gegensatz dazu fanden zwei japanische Studien und eine kolumbianische Studie eine positive Assoziation zwischen Präeklampsie und dem T-Allel des 894G>T-Polymorphismus [143, 63, 114]. Die japanische Studie von Yoshimura et al. (2000) zeigte eine positive Assoziation zwischen schweren Verlaufsformen der Präeklampsie (definiert durch eines der folgenden Kriterien: Blutdruck  $\geq 160/110$  mmHg, Proteinurie  $\geq 2\text{g}/24$  h, Thrombozyten  $< 100\ 000/\text{mm}^3$  oder Anstieg der Leberenzyme) und den TG + TT-Genotypen ( $p < 0,01$ ), jedoch keine Assoziation in der Gruppe der milden Präeklampsie ( $p = 0,57$ ) und der Pfropfgestose ( $p = 0,51$ ) [143]. Eine zweite Studie aus Japan von Kobashi et al. (2001) zeigte eine positive Assoziation zwischen den TG + TT-Genotypen und der schwangerschafts-induzierten Hypertonie (SIH) sowie der Präeklampsie ungeachtet des Schweregrades der Erkrankung ( $p < 0,001$ ) [63].

Auch eine multizentrische Studie aus Kolumbien mit ethnisch gemischtem Studienkollektiv bestätigte eine positive Assoziation, allerdings zwischen dem homozygoten TT-Genotyp und Präeklampsie ( $p = 0,002$ ), während der heterozygote TG-Genotyp nicht mit Präeklampsie assoziiert war ( $p = 0,14$ ) [114]. Diese Studie zeigte auch eine Assoziation zwischen dem -786C-894T-4b-Haplotyp und Präeklampsie.

Das gleichzeitige Vorkommen zweier homozygoter Risikovarianten, der NOS3 894TT-Genotyp und der -786-CC-Genotyp, erhöhte das Risiko für eine Präeklampsie bei Kaukasiern ohne Effekt der einzelnen Polymorphismen [32].

Hillermann et al. (2005) zeigte bei präeklampsischen T-Allel-Trägerinnen ein erhöhtes Risiko für eine vorzeitige Plazentalösung gegenüber präeklampsischen G-Allel-Trägerinnen [51]. Eine vorzeitige Plazentalösung, die unabhängig von einer Präeklampsie auftritt, war in zwei Studien aus Japan und Südafrika mit dem T-Allel assoziiert [51, 144]. Im Gegensatz dazu fand eine Studie aus Finnland keinen Zusammenhang zwischen dem T-Allel und einer vorzeitigen Plazentalösung [126].

Zusammenfassend fällt auf, dass sowohl die Prävalenz als auch der Effekt des T-Allels populationsabhängig sind.



Die Allelfrequenz einer allgemeinen Population (Kontrollgruppe) betrug in den japanischen Studien für das T-Allel zwischen 5 - 9 % [143, 63, 50, 86], bei US-Amerikanern zwischen 15 - 21 % [70] und in Studienpopulationen kaukasischer Herkunft zwischen 17 - 44 % [49, 53, 56, 11, 137, 67, 32]. Studien über die populationsabhängige Verteilung von NOS3-Polymorphismen bestätigten ein signifikant selteneres Vorkommen des T-Allels des 894G>T-Polymorphismus bei Asiaten im Vergleich mit Kaukasiern [78, 120].

Die Allel- und Genotypfrequenzen der Kontrollgruppe dieser Studie ähnelten den angegebenen Häufigkeiten in vergleichbaren Studienpopulationen kaukasischer Herkunft. Auffällig war jedoch die niedrigere T-Allelfrequenz der Kontrollgruppe von 20 % in dieser Studie im Vergleich zu den Kollektiven anderer europäischer Studien (33 % in Finnland [49], 31% in UK [53], 25 % in der Tschechischen Republik [56], 17 % in der Türkei [11], 29 % in Deutschland [137], 44 % in Frankreich [67] und 31 % in Italien [32]). Dies könnte an der ethnisch gemischten Zusammensetzung des Studienkollektivs dieser Studie liegen, so dass die T-Allelfrequenz insgesamt niedriger liegt als bei den ethnisch homogeneren Populationen anderer Studien.

Obwohl das T-Allel des 894G>T-Polymorphismus in Asien seltener vorkommt, zeigten sich stärkere Krankheitseffekte bezüglich des Erkrankungsrisikos für Präeklampsie. Eine mögliche Hypothese wäre, dass die Genvariante im Exon 7 des NOS3-Gens bei Personen asiatischer Abstammung zur Prädisposition für Präeklampsie beiträgt ohne Einfluss bei Kaukasiern.

Dies entspräche einer genetischen Heterogenität, was bedeutet, dass dieselbe genetische Variante in unterschiedlichen ethnischen Populationen unterschiedliche Effekte bewirkt. Möglich wäre auch ein populationsabhängiges Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium) mit dem -786 T>C-Polymorphismus in der Promotorregion des NOS3-Gens.

#### **4.4.2 Möglicher kleiner Effekt des T-Allels des 894G>T-Polymorphismus?**

Diese Studie zeigte eine leichte Häufung der GT + TT-Genotypen bei den Präeklampsiepatientinnen. Der Unterschied in der prozentualen Häufigkeit der Risikogenotypen GT + TT betrug 6 % zwischen der Präeklampsie- und Kontrollgruppe (44 % vs. 38 %). Könnte dieser kleine Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der Genotypen zwischen den Gruppen dennoch eine pathogenetische Relevanz beinhalten?

Bei einer polygenetischen Erkrankung senkt die Präsenz einer polymorphen Risikovariante die Schwelle für eine Erkrankung („threshold theory“). 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 [23]. Dies konnte beispielhaft an komplex vererbten Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt und dem ischämischen Schlaganfall gezeigt werden [61, 21]. Casas et al. (2004) detektierte in einer Metastudie mit 3 513 Probandinnen nur wenige Gene mit kleinen bis moderaten Effekten (OR 1,2 - 1,45), die mit dem Erkrankungsrisiko für den ischämischen Schlaganfall assoziiert waren [21].

Die momentan vorliegenden Ergebnisse aus genetischen Assoziationsstudien zu Präeklampsie weisen darauf hin, dass mehrere Gene mit moderaten bis geringen Effekten im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren die Prädisposition für eine Präeklampsie erhöhen. Prinzipiell ist natürlich nicht auszuschließen, dass in Zukunft ein einzelnes oder mehrere Gene mit einem substanzielleren Effekt auf das Erkrankungsrisiko für Präeklampsie identifiziert werden könnten.

Eine Metaanalyse aus England, welche die Daten aus insgesamt zwölf der vorliegenden Assoziationsstudien mit 1 334 Präeklampsiepatientinnen und 2 894 Kontrollpatientinnen einschloss, errechnete für die 894G>T-Variante in der Präeklampsiegruppe eine OR von 1,28 [95 % KI 0,8 - 2,2] (rezessiver Vererbungsmodus) bzw. 1,12 [95 % KI 0,8 - 1,5] (dominanter Vererbungsmodus) gegenüber der Kontrollgruppe [145].

Eine weitere Metaanalyse aus Slowenien, die neun Studien mit 1055 Probandinnen und 1 788 Kontrollpatientinnen umfasste, errechnete korrespondierend dazu eine OR von 1,24 [95 % KI 0,9 - 1,7] (rezessiver Vererbungsmodus) bzw. eine OR von 1,72 [95 % KI 0,9 - 3,5] (dominanter Vererbungsmodus) [83].

Obwohl in beiden Metaanalysen die Quotenverhältnisse für die 894G>T-Variante mit beiden Vererbungsmodellen für eine leichte Erhöhung des Erkrankungsrisikos an Präeklampsie sprechen, zeigen die Konfidenzintervalle einen nicht signifikanten Befund an. Die Autoren der Studien diskutierten einen möglichen kleinen bis moderaten Effekt der 894G>T-Variante im NOS3-Gen auf das Erkrankungsrisiko für Präeklampsie, der jedoch nur mit einer noch größeren Stichprobenzahl von > 5000 Probandinnen detektiert worden wäre [83, 145].

Zusammenfassend gibt es in dieser Studie keinen Hinweis für eine Bedeutung des T-Allels des 894G>T-Polymorphismus als bedeutsamer Risikofaktor für eine Präeklampsie. Ein kleiner bis moderater phänotypischer Effekt des T-Allels auf das Erkrankungsrisiko für Präeklampsie kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die leichte Häufung der TG + TT-Genotypen bei den Präeklampsiepatientinnen, wie sie sich in einer leichten Erhöhung der Odds Ratio auf 1,3 widerspiegelte, spräche dafür.

#### **4.4.3 Der 894G>T-Polymorphismus und Komplikationen der Präeklampsie**

Werden innerhalb der Kontrollgruppe GG-Trägerinnen mit GT + TT-Trägerinnen verglichen, finden sich keine Unterschiede bezüglich Alter, Anteil der Primipara, BMI, SSW bei Geburt, Geburtsgewicht sowie Gewichtsperzentile bei Geburt.

Ebenso bestand innerhalb der Präeklampsiegruppe kein genotypischer Unterschied bezüglich der Merkmale Alter, Primiparität und BMI. Die Genotypen GT + TT schienen jedoch Frühgeburtslichkeit zu begünstigen und das intrauterine Wachstum zu beeinträchtigen. Präeklampsiepatientinnen mit den GT- und TT-Genotypen gebären im Vergleich zu den präeklampsischen Frauen mit dem GG-Genotyp im Mittel drei Wochen früher (35. SSW vs. 38. SSW,  $p = 0,02$ ), signifikant häufiger vor Abschluss der 37. SSW (63 % vs. 40 %,  $p = 0,04$ ) und Kinder mit einem niedrigen Geburtsgewicht ( $p = 0,01$ ) und niedriger Gewichtsperzentile ( $p = 0,04$ ). Der Anteil wachstumsretardierter Kinder (Geburtsgewicht < 5. Perzentile) war bei den T-Allelträgerinnen nicht signifikant erhöht (29 % vs. 16 %,  $p = 0,11$ ).

Einen genotypabhängigen Einfluss des 894G>T-Polymorphismus auf den Verlauf der Präeklampsie zeigte auch eine Studie aus Italien, ohne dass das Erkrankungsrisiko für eine Präeklampsie per se erhöht war. Präeklampsiepatientinnen mit zwei T-Allelen zeigten gegenüber Präeklampsiepatientinnen mit einem oder zwei G-Allelen ein erhöhtes Risiko für eine fetale Wachstumshemmung (dort definiert als Geburtsgewicht < 10. Perzentile) oder für eine erneute Erkrankung an Präeklampsie in einer folgenden Schwangerschaft ( $p = 0,01$ ) [32].

Schwere Verlaufsformen der Präeklampsie sind in der Literatur durch eine früher einsetzende Hypertension, einen höheren Bluthochdruck > 160/110 mm Hg, eine frühzeitig einsetzende und schwerwiegendere Proteinurie sowie eine häufiger vorkommende intrauterine Wachstumsretardierung charakterisiert [25]. Es ist bekannt, dass bei einer frühzeitig einsetzenden Präeklampsie (Early onset preeclampsia) eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) und eine erneute Präeklampsie in einer nächsten Schwangerschaft häufiger vorkommen als bei einer spät beginnenden Präeklampsie [116, 76].

Des Weiteren zeigte eine norwegische Studie, dass präeklampsische Frauen, bei denen die Hypertonie vor der 37. SSW begann, eine erhöhte Sterblichkeit an kardiovaskulären Erkrankungen im späteren Leben im Vergleich zu Frauen mit späterer Hypertonie aufwiesen [55].

Eine mögliche Hypothese dieser Studie wäre, dass das T-Allel Einfluss auf den Schweregrad einer Präeklampsie und damit auf die Häufigkeit fetaler Komplikationen (z.B. Frühgeburtlichkeit, niedriges Geburtsgewicht) ausübt.

Tab. 8: Assoziationsstudien (veröffentlicht bis 10/2007) zwischen NOS3-894G&gt;T-Genotyp und Präeklampsie

Autor/Jahr/Land	n Fälle/ Kontrollen	Grenzwerte Proteinurie und Blutdruck	Ausschluss- kriterien	T-Allelfrequenz in % Fälle vs. % Kontrollen	Genotypfrequenz in % Fälle vs. % Kontrollen	p-Wert
<b>Kaukasier</b>						
Häkli et al. 2003, Finnland	132 PE, 113 K	0,3 g/24 h RR 140/90	HT	T 25/32	GG 55/46 GT 39/43 TT 6/11	n.s.
Tempfer et al. 2004, Österreich	24 schwere PE, 24 K	5 g/24 h oder 3 + RR 160/110	HT, K, D, N, T, MS, A, RPL	T 29/50	GG 46/62 GT+TT 54/38	n.s.
Fatini et al. 2006, Italien	106 PE, 106 K	0,3 g/24h RR 140/90	K, D, N, LE, T	T 37/31	GG 40/46 GT 47/45 TT 13/9 -786CC/894TT	n.s. p = 0,03
<b>Asiatisch</b>						
Yoshimura et al. 2000, Japan	152 PE, 170 K Schweregrade: 35 mild, 80 schwer, 37 Pfropfgestose	0,3 g/L RR 140/90 Erhöhung ≥ 30/15 s/d	K, D, N, LE, MS	T 15/7	GG 71/86 GT 28/13 TT 1/1	schwere PE: p < 0,01 milde PE: n.s. Pfropfgestose: n.s.
Kobashi et al. 2001, Japan	112 PE, 335 K	0,3 g/L oder 1 + RR 140/90 Erhöhung ≥ 30/15 s/d	HT, D, N, MS, F, HELLP	T 12/6	GG 77/88 GT 23/12 TT 0/0	p < 0,001
Watanabe et al. Japan, 2001	96 schwere PE, 96 K	2 g/24 h RR 160/110	HT, N	T 13/12	GG 70/80 GT 17/17 TT 4/3	n.s.
Ohta et al. 2003, Japan	69 schwere PE, 191 K	2 g/24 h oder 2 + RR 160/110	HT, D, N MS, F		GG 83/88 GT + TT 17/12	n.s.
Kim et al. 2005, Korea	126 PE, 166 K	0,3 g/L RR 140/90	HT, D, N MS, PL, RPL		GG 83/82 GT + TT 18/18	n.s.
Yoshimura et al. 2003, Bangladesh	112 schwere PE, 119 K	3 + RR 160/110	HT, K, D, N, LE, MS	T 20/19	GG 65/65 GT 31/32 TT 4/3	n.s.
Chen et al. 2007, China	92 PE, 256 K	0,3 g/L oder 2+ RR 140/90	D, LE, K, HELLP, schwere PE	T 9/18	GG 85/71 GT 12/22 TT 3/7	p < 0,05
<b>Afro-Karibisch</b>						
Hillermann et al. 2005, Südafrika	48 PE, 42 K	0,3 g/L oder 2 + RR -/90	HT, K, D, N	T 8/8	GG 86/78 GT 12/19 TT 2/2	n.s.
<b>Gemischte Ethnien</b>						
°Landau et al. 2004, USA	64 PE, 397 K	0,3 g/l oder 2 + RR 140/90	HT	T 20/21	GG 67/63 GT 25/31 TT 8/5	n.s.
°Yu et al. 2004, UK	89 PE, 349 K	0,3 g/24 h oder 2 + RR 140/90	HT, K, D, N, LE, MS, F	T 19/25	GG 67/67 GT 27/26 TT 6/7	n.s.
°Serrano et al. 2004, Kolumbien	322 PE, 522 K	0,3 g/24 h RR 140/90	HT, K, D, N, MS, LE, A	T 20/12	GG 67/77 GT 26/22 TT 7/1 894T/-786C/4b- Haplotyp	p = 0,002 p = 0,001

Legende: °**Ethnisch gemischte Studienpopulation:** Landau: hispanische und weiße Amerikaner, Yu: Afro-Karibisch, Kaukasier und Asiaten, Serrano: Hispanisch und Afro-Karibisch, °° **Ausschlusskriterien:** HT Hypertension, K Kardiale Erkrankung, D Diabetes, N Nierenerkrankung, MS Multiple Schwangerschaft, LE Lupus Erythematodes, A Autoimmunerkrankungen, F Fetale Anomalien, RPL recurrent early pregnancy loss, T Thrombophilie, PE Präeklampsie, K Kontrolle, SIH Schwangerschafts-assoziierte Hypertonie, n.s. nicht signifikant, s systolisch, d diastolisch

#### 4.4.4 Funktionalität des 894G>T-Polymorphismus

Eine Reihe von Hinweisen spricht für einen funktionellen Effekt des 894G>T-Polymorphismus, wie er sich in einer reduzierten Genexpression [113, 128, 60], einer veränderten Proteinstruktur und -funktion [64, 96, 59] und einer reduzierten endothelabhängigen Vasodilatation [111] niederschlägt. Ob er zu einem verstärkten proteolytischen Abbau führt, wird kontrovers diskutiert [123, 31]. Alternativ könnte auch ein bestehendes Kopplungsungleichgewicht zwischen dem 894G>T-Polymorphismus und dem -786 T>C-Polymorphismus in der Promotorregion des NOS3-Gens indirekt für phänotypische Effekte verantwortlich sein [57, 120, 107].

Natürlich kann auch die Möglichkeit anderer Ursachen für die Beeinträchtigung des NO-Stoffwechsels bei Präeklampsie nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise werden 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 diskutiert. Schließlich könnte die Beeinträchtigung des NO-Stoffwechsels bei Präeklampsie nicht nur die Ursache, sondern auch eine Folge der pathologischen Alteration der Endothelfunktion darstellen.

### 4.5 Kritische Einschätzung der Methodik

#### 4.5.1 Phänotypisierung

Eine akkurate Phänotypisierung ist bei genetischen Studien entscheidend. Da die Diagnose der Präeklampsie auf sekundären, sich spät im Krankheitsverlauf manifestierenden Symptomen (Hypertonie und Proteinurie) beruht, ist sie anfällig für diagnostische Messfehler [16]. In der Präeklampsie-Forschung der letzten Jahre wurden verschiedene Definitionen der Präeklampsie und variierende Ein- und Ausschlusskriterien verwendet. Vor allem eine strenge Abgrenzung zur schwangerschafts-induzierten Hypertonie (SIH) wurde in einigen Studien nicht realisiert. Dies resultierte in widersprüchlichen Studienergebnissen.

Die Präeklampsie stellt kein einheitliches Krankheitsbild dar. Gegenstand zahlreicher Diskussionen war die Unterscheidung von Präeklampsie in einer Erstschwangerschaft und in einer zweiten Schwangerschaft als möglicherweise distinkte Krankheitsentitäten mit unterschiedlichen Pathomechanismen. Idealerweise sollten sich genetische Studien daher auf Frauen konzentrieren, die an Präeklampsie in der Erstschwangerschaft erkrankten.

Im Folgenden sollen Fehlerquellen bei der Feststellung von Hypertonie und Proteinurie aufgezeigt werden. Bei Frauen am Ende der Schwangerschaft zeigen sich signifikante Blutdruckunterschiede sowohl zwischen der aufrecht sitzenden und links-seitlich liegenden Position [119] als auch zwischen den auskultatorisch gemessenen Druckwerten, die in Korotkoff-Phase 4 (gedämpfter Ton) und 5 (Verschwinden des Tons) gemessen wurden [18].

Das frühere Präeklampsie-Kriterium einer Blutdruckerhöhung des systolischen Wertes  $> 30$  mmHg und/oder des diastolischen Wertes  $> 15$  mmHg, wie es in einigen Studien noch verwendet wurde [143, 63], war problematisch, weil es im zweiten Trimester der Schwangerschaft physiologisch zu einer Blutdruckerhöhung kommt, wenn sich der im ersten Trimester gesunkene Blutdruck wieder normalisiert. Ebenso kann eine bereits bestehende chronische Hypertension durch einen bei den betroffenen Frauen besonders ausgeprägten Blutdruckabfall im ersten Trimester der Schwangerschaft maskiert werden. Streng genommen kann eine endgültige diagnostische Klassifizierung hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen erst zwölf Wochen post partum vorgenommen werden, um einerseits zwischen chronischer Hypertonie und SIH und andererseits zwischen Pfropfgestose und Präeklampsie sicher zu unterscheiden. Für die Durchführung von wissenschaftlichen Studien bedeutet dies die Forderung nach einer zwölfwöchigen Beobachtungszeit nach Entbindung.

Eine Proteinurie wird als Ausscheidung von  $\geq 0,3$  g Proteinen in 24 Stunden definiert. Dies korreliert normalerweise mit  $\geq 30$  mg/dl Proteinen in einer einzelnen Urinprobe bzw. mit einem mindestens 2-fach positiven Urinteststreifen unter der Voraussetzung, dass es keine Hinweise für eine Harnwegsinfektion gibt. Einige Studien zeigten jedoch Diskrepanzen zwischen den Messwerten aus einem 24-Stunden-Urin und den Messwerten aus einer einzelnen Urinprobe [1, 36]. Als Goldstandard sollte daher eine 24-Stunden-Urin-Messung durchgeführt werden [105].

In dieser Studie wurde die aktuell gültige Definition der Präeklampsie laut den diagnostischen Kriterien der „Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy“ angewendet [105]. Damit war eine Abgrenzung zur SIH nach den aktuellsten wissenschaftlichen Standards gewährleistet. Im Virchow-Klinikum wurde eine Blutdruckmessung nach einschlägigen Empfehlungen angestrebt. Diese beinhalten eine aufrechte sitzende Position, eine Messung des diastolischen Blutdrucks in Korotkoff-Phase 5 [18] und die wiederholte Blutdruckmessung mit einer Zeitdifferenz von mindestens sechs Stunden [105]. Da Verlaufswerte des Blutdrucks (zwölf Wochen nach Entbindung) für diese Studie nicht erhoben wurden, besteht die Möglichkeit, dass es sich in einigen Präeklampsiefällen um unerkannte Pfropfgestosen handelte, wenn eine schon vor Beginn der Schwangerschaft bestehende chronische Hypertonie unerkannt blieb.

Die Messung der Proteinurie erfolgte mit der Teststreifenmethode, im Zweifel zusätzlich durch eine 24-Stunden-Urinmessung.

Primiparität war kein gefordertes Einschlusskriterium. Vielmehr zeigte sich wie zu erwarten eine statistisch signifikante Häufung primiparer Frauen in der Präeklampsiegruppe. In dieser Studie entsprach die Häufigkeitsverteilung der drei Genotypen GG, GT und TT der primiparen Frauen in Präeklampsie- und Kontrollgruppe den Häufigkeiten bei multiparen Frauen. Vergleicht man primipare Präeklampsiepatientinnen mit primiparen gesunden Schwangeren, ließ sich kein Unterschied in der Verteilung der Genotypen feststellen.

Ein Einfluss der genannten Kritikpunkte auf das Ergebnis dieser Studie ist zwar theoretisch möglich, wird aber als minimal eingeschätzt.

#### **4.5.2 Ethnische Heterogenität der Studienpopulation**

Die in dieser Studie untersuchte Population war ethnisch heterogen. Idealerweise sollten genetische Studien an einer ethnisch homogenen Studienpopulation durchgeführt werden, da ethnische Variabilität zwischen Fall- und Kontrollgruppe zur Verfälschung des Ergebnisses einer Assoziationsstudie führen kann [23]. Diese Art von Verzerrung eines Studienergebnisses bezeichnet man als Stratifizierungsfehler. Neuere Studien zeigten, dass eine ethnisch gemischte Studienpopulation genetische Effekte eher auswäscht als verstärkt [133].

So drohe vor allem die Gefahr, die Alternativhypothese abzulehnen, obwohl ein Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe vorhanden ist (Fehler 2. Ordnung). Die Wahrscheinlichkeit einer fälschlicherweise angenommenen Assoziation sei dagegen wesentlich geringer (Fehler 1. Ordnung).



Bezogen auf den genotypischen Vergleich zwischen Präeklampsie- und Kontrollgruppe ist daher davon auszugehen, dass keine wesentliche Beeinflussung des statistischen Ergebnisses stattgefunden hat. In dieser Studie waren die Genotypen des NOS3-894G>T-Polymorphismus bei den deutschen, türkischen und nicht-kaukasischen Studienteilnehmerinnen ähnlich verteilt ( $p = 0,82$ ). Die Subgruppen der Studienteilnehmerinnen mit türkischer Nationalität ( $n = 32$ ) und anderer Nationalität ( $n = 22$ ) waren so klein, dass eine separate statistische Auswertung nicht sinnvoll erschien. Ein Kritikpunkt dieser Studie war eine zu geringe Probandinnenzahl in den einzelnen ethnischen Gruppen, um interethnische Differenzen in der genotypischen Verteilung zu erfassen.

### 4.5.3 Stichprobengröße und Statistische Power

Assoziationsstudien können zufällige Assoziationen bei geringen Stichprobengrößen begünstigen [19]. Andererseits ist es möglich, dass eine Assoziationsstudie aufgrund einer zu geringen Stichprobengröße und daher eingeschränkter Power eine kleine, aber wichtige Erhöhung der Suszeptibilität für Präeklampsie nicht detektiert. Wie oben bereits erwähnt werden heute bei komplex genetisch vererbten Erkrankungen, wie sie die Präeklampsie darstellt, mehrere Kandidatengene mit kleinem bis moderatem Effekt verantwortlich gemacht [23]. Dies könnte sich in einem erhöhten Quotenverhältnis von 1,2 bis 1,44 für das einzelne Gen niederschlagen, wie eine Metaanalyse zum ischämischen Schlaganfall beispielgebend zeigte [21]. Geht man von einer so kleinen, aber dennoch relevanten Effektgröße eines einzelnen Polymorphismus aus, sollte eine Assoziationsstudie Tausende von Probanden einschließen, um eine ausreichend große Power der Studie zu gewährleisten [145].

Eine Schwäche dieser Studie besteht somit in einer zu kleinen Stichprobenzahl, um kleine genetische Effekte zu detektieren.

### 4.5.4 Studiendesign

Die Ergebnisse von Assoziationsstudien komplexer genetischer Erkrankungen waren in der Vergangenheit nicht nur auf dem Gebiet der Präeklampsie widersprüchlich und häufig nicht reproduzierbar. Als Gründe dafür wurden u.a. phänotypische Komplexität, genetische Heterogenität, Stratifizierungsfehler bei ethnisch gemischten Studienkollektiven und eine zu geringe Power der Studien diskutiert [23].

Daher stellt sich die Frage, ob eine Assoziationsstudie überhaupt genetische Determinanten einer komplexen Erkrankung detektieren kann?

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) [122].

Die Untersuchung nur eines einzelnen SNP wird der Komplexität möglicher Einflussvariablen nicht gerecht und kann angesichts einer Größenordnung von über 3 Millionen SNP's im menschlichen Genom mit der „Suche nach der Nadel im Heuhaufen“ verglichen werden.

Eine aktuelle Studie aus England, die GOPEC-Studie (Genetics of Pre-Eclampsia) war die erste Studie, die eine Vielzahl von Polymorphismen (28 SNP's in 7 verschiedenen Kandidatengenomen) bei über 1000 präeklampsischen Frauen und ihren Familien untersucht hat. Keine der Varianten inklusive der Varianten im NOS3-Gen zeigte eine Assoziation mit Präeklampsie [124]. Diese Studie hatte eine 85%ige Power ein genotypisches relatives Risiko von 1,6 zu detektieren. Auch eine noch umfangreichere Assoziationsstudie, welche 775 SNP's in 190 verschiedenen Kandidatengenomen bei 394 präeklampsischen Frauen und ihren Neugeborenen untersuchte, fand keine Assoziation zwischen Präeklampsie und den bisher untersuchten Genen inklusive NOS3 [41]. Sie gab jedoch Hinweise für die Bedeutung von bisher nicht untersuchten Varianten (COL1A1 und IL1A). Diese Studie hatte eine 80%ige Power ein genotypisches relatives Risiko von 1,6 – 1,9 zu detektieren.

Beide Studien konnten trotz größerer Stichprobenzahl und Anzahl der untersuchten SNP's keine assoziierten Varianten detektieren, was verdeutlicht, dass die für Präeklampsie prädisponierenden Genotypen höchstwahrscheinlich noch kleinere phänotypische Effekte mit relativem Risiko  $< 1,6$  ausüben und andere bisher nicht untersuchte Gene eine Rolle spielen. Ein effektiveres Studiendesign, um kleine genetische Effekte zu detektieren, sind genomweite Assoziationsstudien, wie sie bereits bei einigen komplexen genetischen Erkrankungen mit Erfolg durchgeführt wurden [125, 102].

#### **4.6 Präeklampsie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen**

Die Langzeitprognose der Präeklampsie ist durch die häufigere Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei den betroffenen Frauen getrübt. Zahlreiche Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen einer Präeklampsie und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im späteren Leben. Dazu gehören beispielsweise die Hypertension [2, 77], die koronare Herzerkrankung [58, 117] und der Schlaganfall [17, 55].

Eine Studie aus Norwegen, welche Daten aus dem Geburtenregister verwendete, zeigte ein 8-faches Risiko für einen späteren kardiovaskulären Tod bei Müttern mit Präeklampsie, die frühgeborene Kinder zur Welt brachten [55]. Aufgrund gemeinsamer Risikofaktoren wie auch aufgrund der Störung der Endothelzellfunktion als Schlüsselereignis wird für kardiovaskuläre Erkrankungen und Präeklampsie eine gemeinsame genetische Grundlage postuliert [111, 52].

Die Entdeckung der ursächlichen Risiko-Polymorphismen für Präeklampsie hat somit eine prognostische Bedeutung für das kardiovaskuläre Risikoprofil der betroffenen Frauen. Eine wiederholte diagnostische Abklärung und Reduktion vorhandener Risikofaktoren (Rauchen, Hypercholesterinämie, Fettleibigkeit, Diabetes und physische Inaktivität) ist bei Frauen, welche bereits an Präeklampsie erkrankten, besonders zu empfehlen, um eine zusätzliche Aggravierung des bereits erhöhten kardiovaskulären Risikos zu verhindern.

#### **4.7 Perspektiven**

Verbunden mit der genetischen Forschung auf dem Gebiet der Präeklampsie ist die Hoffnung auf ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse, die zu dieser Erkrankung führen und die Verbesserung prädiktiver, präventiver und therapeutischer Strategien [23]. Im idealen Fall könnte ein genetischer Test Hochrisikopatientinnen identifizieren, die dann einem spezifischen Präventionsprogramm zugeführt werden. Ein weiteres Potential der genetischen Forschung liegt darin, Genvarianten mit differentiellem Ansprechen auf medikamentöse Therapien zu entdecken.

Momentan gibt es noch keine allgemein akzeptierten Möglichkeiten, eine Präeklampsie vorzubeugen. Die Morbidität und Mortalität der Präeklampsie können jedoch durch die frühe Stellung der Diagnose und eine qualifizierte medizinische Betreuung in der Schwangerschaft vorbeugend beeinflusst werden. Die Suche nach einem idealen Screeningtest oder prädiktiven Test für Präeklampsie führte bisher zu keinem Erfolg, da die prädiktiven Werte der untersuchten Tests zu gering waren [33]. Ein genetischer Test könnte als prädiktiver Marker idealerweise schon vor einer Schwangerschaft eingesetzt werden. Aufgrund der Annahme, dass eine Vielzahl von Polymorphismen mit geringem phänotypischen Effekt im Zusammenspiel mit anderen Risikofaktoren zu Präeklampsie führen, ist die prädiktive Aussagekraft einer einzelnen genetischen Variante jedoch minimal. Ein Test, welcher mehrere Genotypen mit unterschiedlichen Risiko-Allelen in Kombination mit etablierten Risikofaktoren untersucht, könnte zukünftig als prädiktiver Marker sinnvoll sein [140].

Die pharmakologischen Möglichkeiten der Prävention einer Präeklampsie sind leider bis dato gering. Der Einsatz von NO-Donatoren wie Glyceryltrinitrat und L-Arginin und den Antioxidantien Vitamin E und C kann laut der aktuellen Cochrane Reviews nicht empfohlen werden [84, 108], während niedrig-dosiertes ASS und Calcium einen leicht schützenden Effekt vor Präeklampsie zeigten [27, 54].

Genetische Determinanten der Präeklampsie sollten in Zukunft im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie erforscht werden. Eine Forderung an die Forschung ist, dass zukünftige Studien einige tausend Probanden einschließen müssen, um Allele mit kleiner bis moderater Effektgröße zu identifizieren. Diese Dimension ist nur in einer multizentrischen Studie zu erreichen. Einheitliche Kriterien des Ein- und Ausschlusses von Probanden (Primiparität, strenge Kriterien der Messung für Blutdruck und Proteinurie) und der Datengewinnung sollten festgelegt werden. Da die aktuellen Forschungsergebnisse zunehmend auf einen fetalen genetischen Einfluss und die Interaktion zwischen maternalen und fetalen Genen hinweisen, sollten genetische Studien mütterliche und kindliche Gene untersuchen [41]. Anschließend sollte in funktionellen Studien festgestellt werden, ob sich für die assoziierten Varianten Auswirkungen auf die Genexpression, die Proteinfunktion und physiologische Parameter nachweisen lassen. Die Entwicklung von Methoden zur Untersuchung komplexer, multigener Erkrankungen, insbesondere die Entwicklung effektiver Studiendesigns und statistischer Verfahren, sollte weiter vorangetrieben werden.

Der Benefit der bisherigen genetischen Forschung auf dem Gebiet der Präeklampsie liegt eher bei der Identifizierung von Krankheitsmechanismen. Eine risikoadaptierte Prävention in der Schwangerschaft wie auch die Suche nach Therapieoptionen für an Präeklampsie erkrankte Frauen sind die Ziele der weiteren Forschung.

## 5 Zusammenfassung

Die Pathophysiologie der Präeklampsie bleibt trotz intensiver Forschung ungeklärt. Da sie 3 - 5 % der Schwangerschaften betrifft, zu einer erhöhten Mortalität und Morbidität von Mutter und Kind führt und es bisher keine vorbeugenden Behandlungsoptionen gibt, bleibt sie weiterhin ein wichtiges Gesundheitsproblem und damit Forschungsgegenstand.

Eine generalisierte Endothelzell dysfunktion bildet die Grundlage der klinischen Symptomatik der Präeklampsie. Eine genetische Grundlage der Erkrankung konnte in Familienstudien gezeigt werden. Welche Gene eine ursächliche oder prädisponierende Rolle spielen, bleibt bisher jedoch unklar. Ergebnisse aus Studien, welche eine eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit bei Präeklampsiepatientinnen aufzeigten, sowie die Hinweise aus genomweiten Kopplungsstudien unterstützen die Theorie des polymorphen endothelialen NO-Synthase-Gens (NOS3) als Kandidatengen für Präeklampsie.

Eine häufig untersuchte Variante ist ein Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens (894G>T). Dies ist eine möglicherweise funktionelle missense-Variante, die zum Austausch von Glutaminsäure durch Asparaginsäure im Kodon 298 führt. Studien zeigten bei T-Allelträgerinnen in der Schwangerschaft eine reduzierte endothelabhängige Vasodilatation. Das T-Allel wird außerdem mit einem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert, für welche auch die Präeklampsie einen Risikofaktor darstellt.

Diese Studie genotypisierte 80 Präeklampsiepatientinnen, darunter 11 Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom, und 80 Kontrollpatientinnen bezüglich des 894G>T-Polymorphismus. Des Weiteren wurden klinischen Daten zu Schwangerschaft und Geburtsverlauf erfasst und zusammen mit dem T-Allel als Risikofaktoren für eine Präeklampsie evaluiert.

In Übereinstimmung mit anderen Studien wurden auch in dieser Studie Primiparität und Übergewichtigkeit als Risikofaktoren für eine Präeklampsie identifiziert. Durch eine Präeklampsie erhöhte sich das Risiko für Frühgeburtlichkeit, eine Entbindung durch Kaiserschnitt, eine intrauterine Wachstumsretardierung mit niedrigem Geburtsgewicht, einen erhöhten Gefäßwiderstand der fetomaternalen Gefäße in der Dopplersonographie und eine gestörte postpartale Adaptation mit einem Apgarwert nach der 1. Lebensminute < 7. Kein Zusammenhang bestand zwischen Raucherstatus sowie dem Nabelschnurarterien-pH und Präeklampsie.

Die Genotyp- und Allelfrequenzen des 894G>T-Polymorphismus zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Präeklampsie- und Kontrollgruppe. Diese Studie gibt somit keinen Hinweis für einen Einfluss des T-Allels als Risikofaktor für Präeklampsie bei Kaukasiern. Mögliche Erklärungen für abweichende Ergebnisse in anderen Assoziationsstudien sind eine bestehende genetische Heterogenität dieses Polymorphismus mit phänotypischen Effekten in asiatischen Populationen und ohne Einfluss bei Kaukasiern als auch eine zu geringe Power dieser Studie, kleine genetische Effekte zu detektieren.

Der jetzige wissenschaftliche Kenntnisstand spricht dafür, dass die Krankheitsdisposition für Präeklampsie durch eine Vielzahl von Polymorphismen mit geringem phänotypischen Effekt jedes einzelnen im Zusammenspiel mit anderen Risikofaktoren erhöht wird.

Auch wenn sich in dieser Studie kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem 894G>T-Polymorphismus des NOS3-Gens und Präeklampsie zeigte, kann ein geringer Effekt auf das Erkrankungsrisiko nicht ausgeschlossen werden. Dafür spricht eine leichte Häufung der GT- und TT- Genotypen bei den Präeklampsiepatientinnen.

Diese Studie gab zusätzlich Hinweise für einen möglichen Zusammenhang zwischen den GT- und TT-Genotypen des 894G>T-Polymorphismus im Exon 7 des NOS3-Gens und einem schwereren Krankheitsverlauf bei Präeklampsie verbunden mit einem stärkeren Risiko für Frühgeburtlichkeit und eine niedrige Gewichtsperzentile des Neugeborenen.

Zukünftig sollten eine systematische Suche nach krankheitsassoziierten Genorten der Präeklampsie im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie durchgeführt werden.

---

## Literaturverzeichnis

1. Abuelo JG. Validity of dipstick analysis as a method of screening for proteinuria in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169(6):1654.
2. Adams EM, Macgillivray I. Long-term effect of preeclampsia on blood-pressure. *Lancet* 1961;2(7217):1373-5.
3. Albaiges G, Missfelder-Lobos H, Lees C, Parra M, Nicolaides KH. One-stage screening for pregnancy complications by colour Doppler assessment of the uterine arteries at 23 weeks' gestation. *Obstet Gynecol* 2000;96(4):559-64.
4. 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(9):762-9.
5. 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.
6. Arngrimsson R, Sigurardottir S, Frigge ML, Bjarnadottir RI, Jonsson T, Stefansson H, et al. A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13. *Hum Mol Genet* 1999;8(9):1799-805.
7. Axt-Fliedner R, Schröder A, Diedrich K. Molekulare Mechanismen der Präeklampsie. *Der Gynäkologe* 2004;37:132-139.
8. Barker DJ. Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med* 1999;31 Suppl 1:3-6.
9. Beinder E, Mohaupt MG, Schlembach D, Fischer T, Sterzel RB, Lang N, et al. Nitric oxide synthase activity and Doppler parameters in the fetoplacental and uteroplacental circulation in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1999;18(2):115-27.
10. Benjafeld AV, Morris BJ. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2000;13(9):994-8.
11. Berdeli A, Sekuri C, Sirri CF. Association between the eNOS (Glu298Asp) and the RAS genes polymorphisms and premature coronary artery disease in a Turkish population. *Clin Chim Acta* 2005;351:87-94.

12. Boccardo P, Soregaroli M, Aiello S, Noris M, Donadelli R, Lojcono A, et al. Systemic and fetal-maternal nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103(9):879-86.
13. Bodnar LM, Ness RB, Markovic N, Roberts JM. The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index. *Ann Epidemiol* 2005;15(7):475-82.
14. Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P, Soubrier F. Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation* 1995;91(1):96-102.
15. Brennecke SP, Gude NM, Di Iulio JL, King RG. Reduction of placental nitric oxide synthase activity in pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)* 1997;93(1):51-5.
16. Broughton Pipkin F. What is the place of genetics in the pathogenesis of pre-eclampsia? *Biol Neonate* 1999;76(6):325-30.
17. 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.
18. Brown MA, Buddle ML, Farrel T, Davis G, Jones M. Randomised trial of management of hypertensive pregnancies by Korotkoff phase IV or V. *Lancet* 1998.
19. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003;361(9357):598-604.
20. 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.
21. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol* 2004;61(11):1652-61.
22. Chen LK, Huang CH, Yeh HM, Lee CN, Shyu MK, Hsieh FJ, et al. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene may be protective against preeclampsia in a Chinese population. *Reprod Sci* 2007;14(2):175-81.
23. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003;361(9360):865-72.



24. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart* 2002;87(6):525-8.
25. 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.
26. Conrad KP, Davis AK. Nitric oxide synthase activity in placentae from women with preeclampsia. *Placenta* 1995;16(8):691-9.
27. Duley L, Henderson-Smart DJ, Meher S, King JF. Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007(2):CD004659.
28. Dunnen JT den, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001;109(1):121-4.
29. England L, Zhang J. Smoking and risk of preeclampsia: a systematic review. *Front Biosci* 2007;12:2471-83.
30. Eskenazi B, Fenster L, Sidney S. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *Jama* 1991;266(2):237-41.
31. Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2001;276(28):26674-9.
32. 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.
33. Fayyad AM, Harrington KF. Prediction and prevention of preeclampsia and IUGR. *Early Hum Dev* 2005;81(11):865-76.
34. 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.
35. Gaber L, Solez K. Renal allograft pathology: crossing over to the new millennium. *Pediatr Transplant* 1999;3(4):249-51.

36. 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.
37. Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest* 1973;52(11):2682-9.
38. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83(5):1774-7.
39. Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(8):3491-5.
40. Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000. Online im Internet: URL: <http://www.gbe-bund.de> (Stand 15.5.2008).
41. Goddard KA, Tromp G, Romero R, Olson JM, Lu Q, Xu Z, et al. Candidate-gene association study of mothers with pre-eclampsia, and their infants, analyzing 775 SNPs in 190 genes. *Hum Hered* 2007;63(1):1-16.
42. 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.
43. Goldenberg RL, Rouse DJ. Prevention of premature birth. *N Engl J Med* 1998;339(5):313-20.
44. Golser R, Gorren AC, Mayer B, Schmidt K. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. *Nitric Oxide* 2003;8(1):7-14.
45. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk* 2001;8(4):235-41.
46. 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.

47. Groenendijk R, Trimbos JB, Wallenburg HC. Hemodynamic measurements in pre-eclampsia: preliminary observations. *Am J Obstet Gynecol* 1984;150(3):232-6.
48. Guo G, Lade JA, Wilton AN, Moses EK, Grehan M, Fu Y, et al. Genetic susceptibility to pre-eclampsia and chromosome 7q36. *Hum Genet* 1999;105(6):641-7.
49. 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.
50. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32(3):521-6.
51. Hillermann R, Carelse K, Gebhardt GS. The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio placentae in pre-eclampsia. *J Hum Genet* 2005;50(8):415-9.
52. Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis* 2001;154(3):521-7.
53. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999;100(14):1515-20.
54. Hofmeyr GJ, Atallah AN, Duley L. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(3):CD001059.
55. Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *Bmj* 2001;323(7323):1213-7.
56. Jachymova M, Horky K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284(2):426-30.
57. Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P, et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension* 2001;38(5):1054-61.

58. Jonsdottir LS, Arngrimsson R, Geirsson RT, Sigvaldason H, Sigfusson N. Death rates from ischemic heart disease in women with a history of hypertension in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74(10):772-6.
59. Joshi MS, Bauer JA. Preliminary computational modeling of nitric oxide synthase 3 interactions with caveolin-1: influence of exon 7 Glu298Asp polymorphism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40(1):47-54.
60. Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *Faseb J* 2007;21(11):2655-63.
61. 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.
62. Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, et al. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta* 2006;27(4-5):438-44.
63. 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.
64. Kone BC. Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiol Scand* 2000;168(1):27-31.
65. 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.
66. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340(1):9-13.
67. Lacolley P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens* 1998;16(1):31-5.
68. Lade JA, Moses EK, Guo G, Wilton AN, Grehan M, Cooper DW, et al. The eNOS gene: a candidate for the preeclampsia susceptibility locus? *Hypertens Pregnancy* 1999;18(1):81-93.

69. Lain KY, Krohn MA, Roberts JM. Second pregnancy outcomes following preeclampsia in a first pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2005;24(2):159-69.
70. Landau R, Xie HG, Dishy V, Wood AJ, Stein CM, Smiley RM. No association of the Asp298 variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with preeclampsia. *Am J Hypertens* 2004;17(5 Pt 1):391-4.
71. 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.
72. Leeson CP, Hingorani AD, Mullen MJ, Jeerooburkhan N, Kattenhorn M, Cole TJ, et al. Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function. *Circ Res* 2002;90(11):1153-8.
73. Lewis I, Lachmeijer G, Downing S, Dekker G, Glazebrook C, Clayton D, et al. Failure to detect linkage of preeclampsia to the region of the NOS3 locus on chromosome 7q. *Am J Hum Genet* 1999;64(1):310-3.
74. 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. *Bmj* 1998;316(7141):1343-7.
75. Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation* 1990;81(6):1762-7.
76. Long PA, Abell DA, Beischer NA. Fetal growth retardation and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1980;87(1):13-8.
77. Marin R, Gorostidi M, Portal CG, Sanchez M, Sanchez E, Alvarez J. Long-term prognosis of hypertension in pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2000;19(2):199-209.
78. Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, Nagasaki S, Sandrim VC, Correa RX, et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide* 2005;12(3):177-82.
79. 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.

80. 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.
81. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 1997;22(12):477-81.
82. McCarthy AL, Woolfson RG, Raju SK, Poston L. Abnormal endothelial cell function of resistance arteries from women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168(4):1323-30.
83. Medica I, Kastrin A, Peterlin B. Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;131(2):115-26.
84. Meher S, Duley L. Nitric oxide for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(2):CD006490.
85. 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.
86. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32(1):3-8.
87. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329(27):2002-12.
88. 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.
89. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993;316(2):175-80.
90. 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.
91. Napolitano M, Miceli F, Calce A, Vacca A, Gulino A, Apa R, et al. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial

nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(6):2318-23.

92. 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.

93. Ohta K, Kobashi G, Hata A, Yamada H, Minakami H, Fujimoto S, et al. Association between a variant of the glutathione S-transferase P1 gene (GSTP1) and hypertension in pregnancy in Japanese: interaction with parity, age, and genetic factors. *Semin Thromb Hemost* 2003;29(6):653-9.

94. Paradossi U, Ciofini E, Clerico A, Botto N, Biagini A, Colombo MG. Endothelial function and carotid intima-media thickness in young healthy subjects among endothelial nitric oxide synthase Glu298-->Asp and T-786-->C polymorphisms. *Stroke* 2004;35(6):1305-9.

95. Pearce JM, Campbell S, Cohen-Overbeek T, Hackett G, Hernandez J, Royston JP. Reference ranges and sources of variation for indices of pulsed Doppler flow velocity waveforms from the uteroplacental and fetal circulation. *Br J Obstet Gynaecol* 1988;95(3):248-56.

96. 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.

97. Philip I, Plantefevre G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, et al. G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation* 1999;99(24):3096-8.

98. Pijnenborg R, Vercruyse L, Verbist L, Van Assche FA. Interaction of interstitial trophoblast with placental bed capillaries and venules of normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 1998;19(8):569-75.

99. Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest* 1999;29(4):284-90.

100. Pridjian G, Puschett JB. Preeclampsia. Part 2: experimental and genetic considerations. *Obstet Gynecol Surv* 2002;57(9):619-40.

101. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12(3):87-8.
102. Raelson JV, Little RD, Ruether A, Fournier H, Paquin B, Van Eerdewegh P, et al. Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(37):14747-52.
103. Raman CS, Li H, Martasek P, Kral V, Masters BS, Poulos TL. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 1998;95(7):939-50.
104. Richards A, Graham D, Bullock R. Clinicopathological study of neurological complications due to hypertensive disorders of pregnancy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51(3):416-21.
105. 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.
106. Roberts JM, Redman CW. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1993;341(8858):1447-51.
107. Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L, et al. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(6):930-7.
108. Rumbold A, Duley L, Crowther CA, Haslam RR. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(1):CD004227.
109. Sandrim VC, Coelho EB, Nobre F, Arado GM, Lanchote VL, Tanus-Santos JE. Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. *Atherosclerosis* 2006;186(2):428-32.
110. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
111. Savvidou MD, Vallance PJ, Nicolaides KH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hypertension* 2001;38(6):1289-93.



112. Schneider MP, Erdmann J, Delles C, Fleck E, Regitz-Zagrosek V, Schmieder RE. Functional gene testing of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial NO synthase. *J Hypertens* 2000;18(12):1767-73.
113. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, al. e. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol* 2005;24(4):218-24.
114. 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.
115. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(23):13176-81.
116. Sibai BM, el-Nazer A, Gonzalez-Ruiz A. Severe preeclampsia-eclampsia in young primigravid women: subsequent pregnancy outcome and remote prognosis. *Am J Obstet Gynecol* 1986;155(5):1011-6.
117. Smith GC, Pell JP, Walsh D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet* 2001;357(9273):2002-6.
118. Stone JL, Lockwood CJ, Berkowitz GS, Alvarez M, Lapinski R, Berkowitz RL. Risk factors for severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1994;83(3):357-61.
119. Svensson A. Hypertension in pregnancy. *J Hypertens Suppl* 1985;3(3):S395-403.
120. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001;11(8):719-25.
121. Tempfer CB, Jirecek S, Riener EK, Zeisler H, Denschlag D, Hefler L, et al. Polymorphisms of thrombophilic and vasoactive genes and severe preeclampsia: a pilot study. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11(4):227-31.
122. Terwilliger JD, Weiss KM. Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? *Curr Opin Biotechnol* 1998;9(6):578-94.
123. Tesouro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of

cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(6):2832-5.

124. The GOPEC consortium. Disentangling fetal and maternal susceptibility for pre-eclampsia: a British multicenter candidate-gene study. Am J Hum Genet 2005;77(1):127-31.

125. The Wellcome Trust Case Control Consortium 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. Nature 2007;447(7145):661-78.

126. Toivonen S, Keski-Nisula L, Romppanen EL, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism is not associated with placental abruption in Finnish women. Fetal Diagn Ther 2005;20(6):508-11.

127. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. Lancet 1989;2(8670):997-1000.

128. Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PW, et al. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. J Hypertens 2002;20(10):2023-7.

129. Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D, Ba'aqeel H, et al. Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? Am J Obstet Gynecol 2006;194(4):921-31.

130. Voigt M, Schneider KT, Jährig K. Analyse des Geburtsgutes des Jahrgangs 1992 der Bundesrepublik Deutschland. Teil 1: Neue Perzentilwerte für die Körpermaße von Neugeborenen. Geburtsh. u. Frauenheilk. 1996; 56:550-558.

131. Wang CL, Hsu LA, Ko YS, Ko YL, Lee YH. Lack of association between the Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease among Taiwanese. J Formos Med Assoc 2001;100(11):736-40.

132. 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.

133. Wang Y, Localio R, Rebbeck TR. Evaluating bias due to population stratification in case-control association studies of admixed populations. Genet Epidemiol 2004;27(1):14-20.

134. Watanabe H, Hamada H, Yamakawa-Kobayashi K, Yoshikawa H, Arinami T. Evidence for an association of the R485K polymorphism in the coagulation factor V gene with severe preeclampsia from screening 35 polymorphisms in 27 candidate genes. *Thromb Haemost* 2001;86(6):1594-5.
135. Weiner CP, Knowles RG, Moncada S. Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171(3):838-43.
136. Weinstein L. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142(2):159-67.
137. Wolff B, Grabe HJ, Schluter C, Popowski K, Volzke H, Ludemann J, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism, blood pressure and hypertension in a general population sample. *J Hypertens* 2005;23(7):1361-6.
138. 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).
139. Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169(5):1316-20.
140. Yang Q, Khoury MJ, Botto L, Friedman JM, Flanders WD. Improving the prediction of complex diseases by testing for multiple disease-susceptibility genes. *Am J Hum Genet* 2003;72(3):636-49.
141. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998;103(1):65-9.
142. Yoshimura T, Chowdhury FA, Yoshimura M, Okamura H. Genetic and environmental contributions to severe preeclampsia: lack of association with the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp variant in a developing country. *Gynecol Obstet Invest* 2003;56(1):10-3.
143. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2000;7(4):238-41.
144. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Yasue H, Okamura H. The missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with placental abruption. *Hum Genet* 2001;108(3):181-3.

- 
145. Yu CK, Casas JP, Savvidou MD, Sahemey MK, Nicolaides KH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* 2006;6:7.

---

## **Anhang**

In der Arbeitsgruppe „Molekulargenetik in der Geburtsmedizin und Frauenheilkunde“ wurde der Intron 4-Polymorphismus des NOS3-Gens am gleichen Patientenkollektiv und an einer Gruppe von Frauen mit schwangerschafts-induzierter Hypertonie molekularbiologisch untersucht. Des Weiteren wurde eine Mutation des Mineralkortikoidrezeptors an einem Kollektiv von Frauen mit schwangerschafts-induzierter Hypertonie untersucht.

## Danksagung

Bei Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen möchte ich mich für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Korrektur meiner Doktorarbeit bedanken. Besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. med. Annette Schmider-Ross, die meine Doktorarbeit betreute.

Prof. Dr. med. Andreas Plagemann danke ich für die Nutzung des Labors seiner Arbeitsgruppe „Experimentelle Geburtsmedizin“. Seinen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen, speziell den Medizinisch Technischen Assistentinnen Josy Charandang und Frau Marion Marksteiner, danke ich für die Unterstützung im Laboralltag. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Heidemarie Neitzel für ihre Diskussionsbereitschaft methodischer Fragen und die Erlaubnis zur Nutzung des Sequenzierautomaten. Ihren Mitarbeitern des Instituts für Human-genetik der Charité danke ich für die Überlassung des Protokolls zur DNA-Extraktion.

Dem Institut für Biometrie der Charité danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse, Herrn Dipl.- Ing. Joachim Grünhagen für die Hilfe bei PC-Problemen.

Für die finanzielle Unterstützung der Studie danke ich ausdrücklich der Stiftung Sonnenfeld.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin und Mitdotorandin Katrin Thomas für die schöne gemeinsame Studienzeit. Meinen Eltern Gudrun und Jürgen Dreves und meiner Schwester Kristina Dreves danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung während des gesamten Studiums; meiner Freundin Eva Schöllhorn fürs Dasein in schwierigen Zeiten und meinem Freund Thomas Kaup und unserem Sohn Jacob für ihre Geduld in der letzten Phase der Promotion.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Patientinnen, die zum Gespräch und zur Teilnahme an der Studie bereit waren.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

**Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Kathrin Dreves, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema Genetische Variation im Exon 7 des NOS3-Gens und ihre Bedeutung für Präeklampsie selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“