

**Klinische und experimentelle  
Untersuchungen zur Bedeutung des  
Autoimmunantikörpers gegen den  
AT1-Rezeptor im ersten Trimester der  
Schwangerschaft zur Prädiktion der  
Präeklampsie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Andrea Logar,

geboren am 17.11.1981 in Berlin

angefertigt an:

der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Walther

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 23.06.2015

# Inhalt

<b>Inhalt.....</b>	<b>III</b>
<b>Bibliographische Beschreibung.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einführung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Präeklampsie, eine hypertensive Erkrankung während der Schwangerschaft.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Hypothesen zur Ätiologie der Präeklampsie .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Das Renin-Angiotensin-System .....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Aufbau und Funktion des Renin-Angiotensin-Systems .....	7
1.3.2 Veränderungen im Renin-Angiotensin-System während der Schwangerschaft .....	9
1.3.3 Veränderungen im Renin-Angiotensin-System bei Schwangeren mit..... Präeklampsie .....	10
<b>1.4 Der agonistisch wirkende Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor .....</b>	<b>11</b>
1.4.1 Die Rolle des AT1-AA in der Ätiologie der Präeklampsie.....	12
1.4.1.1 Die Beziehung zwischen dem AT1-AA und sFlt1 .....	13
1.4.1.2 Die Beziehung zwischen AT1-AA, sEng und TNF $\alpha$ .....	13
1.4.1.3 Die Beziehung zwischen AT1-AA und Plasminogenaktivator Inhibitor-1 .....	14
1.4.1.4 Die Beziehung zwischen AT1-AA, reaktiven freien Radikalen und NF- $\kappa$ B .....	15
1.4.1.5 Die Beziehung zwischen AT1-AA und erhöhter Kalziumfreisetzung.....	15
1.4.1.6 Die Beziehung zwischen AT1-AA und „Tissue Factor-production“.....	16
<b>1.5 Aufgabenstellung.....</b>	<b>16</b>
<b>2 Material.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Bakterien- und Zelllinien.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Vektoren .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Vektoren zur Klonierung.....	17
2.2.2 Vektoren mit klonierten Fragmenten .....	17
<b>2.4 Chemikalien .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5 Peptide und ihre Sequenzen .....</b>	<b>18</b>
<b>2.6 Medien für Zellkulturen .....</b>	<b>19</b>

<b>2.7 Stammlösungen, Puffer und Gele .....</b>	<b>19</b>
<b>2.8 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....</b>	<b>20</b>
<b>2.9 Geräte .....</b>	<b>20</b>
<b>3 Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Zellkultur .....</b>	<b>21</b>
3.1.1 Das Auftauen der Zellen .....	21
3.1.2 Die Kultivierung der HEK293A-Zelllinie.....	21
3.1.3 Trypsinisieren der Zellen .....	21
3.1.4 Einfrieren der Zellen .....	21
3.1.5 Das Dual-Luciferase® Reporter Assay System .....	22
<b>3.2 Erster Tag: Kultivierung der HEK293A Zellen.....</b>	<b>22</b>
3.2.1 Zweiter Tag: Transfektion.....	23
3.2.2 Dritter Tag: Stimulation und Luciferase-Aktivitäts-Messung .....	23
<b>3.3 Allgemeine Beschreibung des Patientenkollektivs .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4 Durchführung der klinischen Studie .....</b>	<b>24</b>
3.4.1 Blutentnahme und Uringewinnung im 1. Trimester der Schwangerschaft .....	24
3.4.2 Beschriftung des gewonnen Materials: Blut und Urin .....	24
3.4.3 Ermittlung der Daten der jeweiligen Schwangeren.....	25
3.4.4 Messung des AT1-AA.....	26
<b>3.5 Statistische Auswertung.....</b>	<b>28</b>
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Ergebnisse der klinischen Studie .....</b>	<b>30</b>
4.1.1 Ausprägung schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen im Gesamtkollektiv.....	30
4.1.2 Das Kollektiv, in dem der AT1-AA gemessen wurde .....	30
4.1.3 Der AT1-AA in Abhängigkeit von schwangerschaftsassozierten Pathologien .....	31
4.1.4 AT1-AA in Abhängigkeit von der Gravidität .....	32
4.1.5 AT1-AA in Abhängigkeit von der Parität .....	34
4.1.6 AT1-AA in Abhängigkeit vom Alter der Mutter .....	35
4.1.7 AT1-AA in Abhängigkeit vom Zigarettenrauchen .....	37
4.1.8 AT1-AA in Abhängigkeit von mütterlichen Erkrankungen.....	39
4.1.8.1 AT1-AA in Abhängigkeit von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreis....	39
4.1.8.2 AT1-AA in Abhängigkeit von Allergien .....	41
4.1.8.3 AT1-AA in Abhängigkeit von Asthma bronchiale .....	42

## Inhalt

4.1.8.4 AT1-AA in Abhängigkeit von Hypothyreose .....	44
4.1.8.5 AT1-AA in Abhängigkeit vom arteriellen Hypertonus.....	45
4.1.8.6 AT1-AA in Abhängigkeit von Diabetes mellitus.....	46
4.1.9 AT1-AA in Abhängigkeit von der mütterlichen Medikamenteneinnahme.....	48
4.1.9.1 AT1-AA in Abhängigkeit von Folsäure.....	49
4.1.9.2 AT1-AA in Abhängigkeit von Magnesium.....	50
4.1.9.3 AT1-AA in Abhängigkeit von Eisen.....	51
4.1.9.4 AT1-AA in Abhängigkeit von L-Thyroxin.....	52
4.1.9.5 AT1-AA in Abhängigkeit von Vitaminen.....	53
4.1.9.6 AT1-AA in Abhängigkeit von Kalzium.....	55
4.1.9.7 AT1-AA in Abhängigkeit von Jod.....	56
4.1.10 AT1-AA in Abhängigkeit von den biometrischen Daten zur Geburt .....	57
4.1.10.1 AT1-AA in Abhängigkeit von der Längen-Perzentile des Kindes .....	57
4.1.11 AT1-AA in Abhängigkeit von den Doppleruntersuchungen .....	58
4.1.11.1 AT1-AA in Abhängigkeit des Perfusions-Index der rechten A. uterina.....	58
4.1.11.2 AT1-AA in Abhängigkeit des Perfusionsindex der linken A. uterina .....	59
4.1.12 AT1-AA in Abhängigkeit von der Perzentile des Gewichtes des Kindes.....	60
4.1.13 Einzelbetrachtung hoher AT1-AA-Werte .....	61
<b>4.2 Experimente zum Verständnis der Wirkungsweise des AT1-AA.....</b>	<b>61</b>
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>64</b>
<b>5.1 Variierende Inzidenz der Präeklampsie.....</b>	<b>65</b>
<b>5.2 Mögliche pathophysiologische Rolle des AT1-AA in der Pathogenese der Präeklampsie.....</b>	<b>67</b>
<b>5.3 Assoziation der gemessenen AT1-AA-Werte im ersten Trimester der Schwangerschaft mit klinischen und biochemischen Parametern .....</b>	<b>68</b>
5.3.1 AT1-AA-Werte im Zusammenhang mit rheumatologischen Erkrankungen .....	68
5.3.2 Effekte der Kalziumsubstitution auf die AT1-AA-Werte.....	69
5.3.3 Essentieller arterieller Hypertonus im Zusammenhang mit gemessenen AT1-AA-Werten .....	70
5.3.4 Einzelbetrachtung AT1-AA-Werte $\geq 20$ U/ml.....	71
<b>5.4 Assoziation zwischen Präeklampsie und weiterer Faktoren .....</b>	<b>72</b>
5.4.1 Der Zusammenhang zwischen Rauchen und Präeklampsie.....	72
5.4.2 Der Zusammenhang zwischen dem Gewicht der Mutter und PE .....	72
5.4.3 Der Zusammenhang zwischen dem Alter der Mutter und PE.....	73

## Inhalt

<b>5.5 Experimenteller Ansatz .....</b>	<b>73</b>
<b>5.6 Evaluierung des kommerziellen Assays als Prädiktor hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen.....</b>	<b>74</b>
<b>5.7 Mögliche Triggerfaktoren für die Entstehung des AT1-AA .....</b>	<b>75</b>
<b>5.8 Aussichten präventiver Maßnahmen .....</b>	<b>77</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
<b>Literatur.....</b>	<b>82</b>
<b>Selbständigkeitserklärung....</b>	<b>94</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>95</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>97</b>

## **Bibliographische Beschreibung**

Logar, Andrea

Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung des Autoimmunantikörpers gegen den AT1-Rezeptor im ersten Trimester der Schwangerschaft zur Prädiktion der Präeklampsie

**Universität Leipzig, Dissertation**

**97 Seiten, 142 Literaturangaben, 25 Abbildungen, 14 Tabellen**

### **Referat:**

In den letzten Jahren belegten zahlreiche Studien die bedeutende Rolle des Autoimmunantikörpers gegen den AT1-Rezeptor (AT1-AA) und seine Interaktion mit nachfolgender Aktivierung des AT1-Rezeptors innerhalb der Pathogenese der Präeklampsie (PE). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des AT1-Rezeptors durch den AT1-AA auf unterschiedlichsten Zellen, verschiedene für die PE charakteristische pathophysiologische Reaktionen verursacht. Trotz vieler Forschungsarbeiten und Studienergebnisse zur PE, ist es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich, die PE bereits im ersten Trimester der Schwangerschaft, vor Eintreten der klinischen Symptomatik, sicher zu prädiktieren. Entsprechend ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Erkenntnisse aus der klinischen Studie zu Ersttrimesterschwangerschaften, die Frauen mit späterer Schwangerschaftspathologie eingeschlossen hat, mit deren Werten zum AT1-AA zu vergleichen, um zu evaluieren, inwieweit die Konzentration des AT1-AA in der Zirkulation der Schwangeren zur Prädiktion der PE und anderer Schwangerschaftserkrankungen genutzt werden kann. Hierbei steht die Messung des AT1-AA in Serumproben schwangerer Frauen im ersten Trimester mittels eines kommerziell verfügbaren Assays und deren Korrelation mit klinischen und biometrischen Parametern im Mittelpunkt der Untersuchung.

## Abkürzungsverzeichnis

<i>A. uterina</i>	Arteria uterina
ACE	„Angiotensin Converting Enzyme“
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AT1-AA	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-I-Autoantikörper
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
BMI	„Body-Mass-Index“
cDNA	komplementäre („copy“) Desoxyribonukleinsäure
D-MEM	Dulbecco's MEM Komplettmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDHF	„Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymatische Immunadsorptionsverfahren
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
<i>et al.</i>	und andere
FBS	fötale Kälberserum
FFA	freie Fettsäuren
Flt-1	„FMS-like-tyrosine kinase“
FTS	„First-Trimester-Screening“
ggf.	gegebenenfalls
GTE	Glukose-Tris-EDTA
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution
HCL	Chlorwasserstoff
HEK293A-Zellen	„Human embryonic kidney“ Zellen
HELLP	„Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet counts“
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethanolsulfonsäure
HLA-G	Humanes Leukozyten-Antigen G
IgG	Immunglobulin G

## Abkürzungsverzeichnis

IgM	Immunglobulin M
IUGR	intrauterine Wachstumsrestriktion
Lsg.	Lösung
MW	Mittelwert
NADPH-Oxidase	Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NaOH	Natriumhydroxid
NFAT	„nuclear factor of activated T cells“
NF- $\kappa$ B	„nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells“
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor-1
PE	Präeklampsie
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PIG <sub>2</sub>	Prostazyklin
PIGF	„placental growth factor“
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
RAS	Renin-Angiotensin-System
RE	Restriktionsenzym
RL	Renilla Luciferase
RLU	„relative light units“
ROS	„Reactive oxygen species“
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	„standard error of the mean“
sEng	„soluble Endoglin“
sFlt-1	„soluble fms-like tyrosine kinase-1“
s.o.	siehe oben
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Faktor
SSL	Scheitelsteißlänge
SSW	Schwangerschaftswoche
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TF	„tissue factor“



## Abkürzungsverzeichnis

TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
uPA	„urokinase-like-plasminogen activator“
v.a.	vor allem
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
VLDL-Partikel	„very low-density-Partikel“
vs.	versus
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einführung

## 1.1 Präeklampsie, eine hypertensive Erkrankung während der Schwangerschaft

Die Präeklampsie (PE), eine lebensgefährliche Komplikation in der Schwangerschaft, ist weltweit mit einer hohen fetalen und mütterlichen Morbidität und Mortalität assoziiert (Greer *et al.*, 1994; 2000; Walker, 2000; Duley, 2003). Abhängig von der untersuchten Bevölkerungsgruppe und der Definition von PE, beträgt die Inzidenz der PE zwischen 2-7 % aller Nullipara und sinkt auf 0,5 % bei Mehrgebärenden (Durig *et al.*, 1999; Sibai, 2003). Als Diagnosekriterien für dieses Syndrom gelten ein Hypertonus und eine Proteinurie nach der 20. Schwangerschaftswoche (Sibai *et al.*, 2005).

Die PE ist ursächlich für die Entwicklung von gravierenden Komplikationen. Besonders zu nennen sind hier zum einen die Eklampsie mit generalisierten Krampfanfällen, zum anderen das HELLP-Syndrom („*Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet counts*“). Vorangehende Symptome einer Eklampsie können Schwindel, Ohrensausen, Augenflimmern, Kopfschmerzen, motorische Unruhe und Hyperreflexibilität sein (Dekker und Sibai, 1998; Sibai, 2003). Im Falle des HELLP-Syndroms manifestieren sich erhöhte leberspezifische Transaminasen, eine Hämolyse und eine Thrombozytopenie (VanWijk *et al.*, 2000). Die Eklampsie trifft als Endstadium nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,005 % auf (Sibai *et al.*, 2005), das HELLP Syndrom hingegen mit einer deutlich höheren Wahrscheinlichkeit von 10-15 % aller PE-Fälle (Sibai, 2004). Folge beider Krankheitsbilder können zerebrale Blutungen, Lungenödem, vorzeitige Plazentalösung oder andere schwerwiegende mütterliche Organstörungen sein.

Daneben werden auch iatrogene Frühgeburtslichkeit und intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) häufig mit PE assoziiert. Diese führen beim Neugeborenen zu Anpassungsdefiziten, die in früher kindlicher Sterblichkeit und langfristiger neurologischer Morbidität enden können (Johnson *et al.*, 1993). Hier sind insbesondere die mangelnde Lungenreife und neurologische Störungen zu nennen. Schließlich ist im Zusammenhang mit einer PE sowohl für Mütter als auch für deren Kinder das Risiko eine kardiovaskuläre Erkrankung im späteren Leben zu entwickeln erhöht (Sibai *et al.*, 1986; Haukkamaa *et al.*, 2004; Ness und Hubel, 2005).

## Einleitung

Mit den Risikofaktoren zur Entwicklung einer PE haben sich in den letzten Jahrzehnten verschiedene Arbeitsgruppen auseinandergesetzt (Sibai, 2003; Duckitt und Harrington, 2005). Einige dieser Risikofaktoren seien im Folgenden erwähnt:

- positive Familienanamnese für PE
- Alter über 40 Jahre
- Präeklampsie in der Vorschwangerschaft (Wiederholungsrisiko bis zu 45 %)
- Primipaternität
- Harnwegsinfekt
- Nulliparität
- Faktor-V-Leiden-Mutation
- Protein S-Mangel
- Antiphospholipid-Antikörper
- Hyperhomocysteinämie
- Diabetes mellitus, chronische Nierenerkrankungen, essentieller arterieller Hypertonus, signifikant erhöhter „Body-Mass-Index“ (BMI)

Derzeit werden verschiedene Ansätze der Prävention diskutiert, mit denen die komplikationsreiche Erkrankung PE vermieden werden soll. So versucht die primäre Prävention, die einzelnen Risikofaktoren (s.o.) zu identifizieren und ggf. zu reduzieren. Die sekundäre Prävention hingegen macht es sich zur Aufgabe, die PE durch potentiell prädiktive Tests möglichst frühzeitig zu erkennen. Zu diesen Tests gehören regelmäßige Blutdruckmessungen, 24h-Sammelurin, Urinteststreifen und Doppleruntersuchungen der *A. uterina*. Des Weiteren werden derzeit verschiedene Biomarker auf ihre Eigenschaft als Mittel zur Früherkennung einer PE untersucht. Zu diesen zählen u.a. der Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor (AT1-AA) und Endoglin. sFlt-1 („soluble fms-like tyrosine kinase-1“) wurde zu diesem Zweck bereits auf dem Markt etabliert (Wallukat *et al.*, 1999; Sibai *et al.*, 2005; Youssef *et al.*, 2011). Darüber hinaus wird durch Medikamentengabe von ASS und Calcium versucht, ein Fortschreiten der PE zu verhindern (Sibai, 2001). Die tertiäre Prävention behandelt die Symptome der PE und versucht sowohl maternale als auch neonatale Komplikationen zu vermeiden. Insgesamt sind die therapeutischen Möglichkeiten zu diesem Zeitpunkt begrenzt, sie bestehen im Wesentlichen in der Intensivüberwachung und symptomatischen Therapie. Eine kausale Therapie ist derzeit nur durch Beendigung der Schwangerschaft möglich.

## 1.2 Hypothesen zur Ätiologie der Präeklampsie

Gegenwärtig wird eine komplexe und multifaktorielle Pathogenese für die Entwicklung einer PE angenommen. Die Ätiologie ist dennoch weiterhin ungeklärt. Dabei scheinen u.a. mütterliche und kindliche Dispositionen eine große Rolle zu spielen. Studien weisen allerdings darauf hin, dass auch paternales Mitwirken und Umweltbedingungen nicht unterschätzt werden sollten (Pridjian und Puschett, 2002). Dekker und Sibai (Dekker und Sibai, 1998) stellen 1998 vier Hypothesen auf, die jeweils einzelne potentiell für die Ätiologie der PE relevante Faktoren zum Gegenstand haben. Vermutet wird, dass diese Faktoren gemeinsam das klinische Bild der PE bewirken sollen, allerdings in jeweils unterschiedlich starker Ausprägung. Damit wäre zum einen ein Erklärungsansatz für die stark variierenden symptomatischen Ausprägungen des Krankheitsbildes gefunden. Zum anderen wird aus dieser Perspektive deutlich, weshalb die PE zunehmend als Syndrom verstanden wird. Im Folgenden werden die vier von Dekker und Sibai hypothetisch benannten Faktoren für die Ätiologie der PE einzeln betrachtet und mittels neuerer Studienerkenntnisse erweitert.

### *1. Hypothetischer Faktor für Präeklampsie: Plazentare Ischämie*

Eine gestörte Plazentation in der frühen Schwangerschaft stellt das Schlüsselereignis in der Pathogenese der PE dar (Steegers *et al.*, 2010). Grundsätzlich ist die Entwicklung der PE auf zwei Stadien zurückzuführen. Das frühe schließt die defekte Plazentation und Erschließung der Spiralarterien ein. Hierbei ist die Trophoblasteninvasion beeinträchtigt und die Veränderung der Spiralarterien in ein maximal dilatiertes, mit geringem Widerstand ausgebildetes Gefäßbett unzureichend. Erhalten bleibt sowohl die endotheliale Zell- und Muskelschicht als auch die Kontraktionsfähigkeit. Redman und seine Arbeitsgruppe zeigten, dass die inadäquaten Spiralarterienveränderungen zu einer um 50 % verminderten Flussrate in der *Arteria uterina* (*A. uterina*) führen. Dies führt letztlich zu dem Zustand einer chronischen Plazentaischämie oder im besten Fall ist ein intermittierender Fluss feststellbar, der aber möglicherweise ein Ischämie-/Reperfusionen-Phänomen induziert (Redman und Sargent, 2009). 1999 beschrieben Caniggia und Kollegen (Caniggia *et al.*, 1999) einen Wechsel vom proliferativen extravillösen Trophoblasten ohne Zufuhr von mütterlichem oxygeniertem Blut in den nicht-proliferativen und invasiven Typ. Dieser Wechsel ist erforderlich, um die äußere Schicht des Trophoblasten aufzubrechen und den nötigen mütterlichen Bluteinstrom für die Versorgung des Feten mit Sauerstoff und Nährstoffen in den intervillösen Raum zu ermöglichen. Es konnte das unterschiedliche Verhalten von 5 - 8 Wochen alten Trophoblastzellen in Kultur bei

## Einleitung

physiologischem (20 %) und niedrigem (2 %) Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) gezeigt werden (Genbacev *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2000). Kulturen mit niedrigem  $pO_2$  zeigten zum einen eine deutlich gesteigerte Trophoblastproliferation und Fibronektinsynthese, zum anderen aber keinen Wechsel in den invasiven Phänotypen. Folglich hemmt ein geringer Sauerstoffpartialdruck die nötige Trophoblast-Differenzierung. Die Folge ist eine unzureichende Blutversorgung der Plazenta mit Hypoperfusion und Ischämie. Diese wiederum führt zu abnorm geformten Mikrovilli und lokalen Nekrosen. Dementsprechend konnte anschließend in der mütterlichen Blutbahn eine ungewöhnlich hohe Ausschwemmung von Synzytiotrophoblasten nachgewiesen werden.

Die aus dieser Kette resultierenden systemischen Effekte bilden das zweite Stadium. Synzytiotrophoblasten produzieren Thromboxan  $A_2$  ( $TXA_2$ ), einen aktiven Vasokonstriktor und Plättchenaggregator. Ein Ungleichgewicht zwischen vasodilatativen (Prostazyklin (PIG<sub>2</sub>), Stickstoffmonoxid (NO), „*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*“ (EDHF) und atriales natriuretisches Peptid (ANP)) und vasokonstriktiven Substanzen ( $TXA_2$ , Endothelin, „*Vascular Endothelial Growth Factor*“ (VEGF), Aldosteron, Angiotensin II und Katecholamine) entsteht. Daraus resultieren neben endothelialen Dysfunktionen und Anschwellen der Endothelzellen auch die bereits oben erwähnten Organschäden an Niere, Leber, Auge und ZNS (zentrales Nervensystem) durch Mikrogefäßverschlüsse. Diese systemischen Effekte fördern die plazentare Dysfunktion, es stellt sich ein *circulus vitiosus* ein. Allerdings muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass jeder sich entwickelnde Trophoblast vor seiner Implantation in einer physiologisch sauerstoffarmen Umgebung ruht und sich aus eigenen Zellreserven versorgt. Dennoch besteht im Allgemeinen der Verdacht, dass durch die ischämische Plazenta freigesetzte toxische Faktoren, wie ROS, „*Reactive oxygen species*“, und Zytokine, die einen systemischen oxidativen (Rodie *et al.*, 2004) und inflammatorischen (Redman und Sargent, 2009) Zustand begünstigen, zu dem Syndrom PE führen können. Einige Faktoren sind der klinischen Manifestation einer PE (Symptome) vorangestellt und eignen sich aus diesem Grund sehr gut als Prädiktoren. Eine Studie von 2010 konnte eine große Anzahl von Biomarkern bereits im ersten Trimester der Schwangerschaft nachweisen (Giguere *et al.*, 2010). Insbesondere angiogenetische Faktoren, wie z.B. VEGF und PlGF und ihre entsprechenden Rezeptoren wie „*FMS-like-tyrosine kinase*“ (Flt-1) und VEGF-Rezeptor-2 sind u.a. in der Plazenta nachweisbar und erwiesen sich als Schlüsselkomponenten in der Regulierung bezüglich Überleben und Funktion der Trophoblasten (Verlohren *et al.*, 2010). Bereits 2004 konnte eine hohe Assoziation zwischen der PE und der löslichen Form des Rezeptors Flt-1 (sFlt-1)

festgestellt werden (Karumanchi und Bdolah, 2004; McKeeman *et al.*, 2004). Mittlerweile ist sFlt1 bereits in der Funktion als Prädiktor auf dem Markt.

### ***2. Hypothetischer Faktor für Präeklampsie: Gesteigerte Zirkulation von „very low-density“ Lipoproteinen und freien Fettsäuren***

Im Rahmen einer Studie konnte bei einer Gruppe von Schwangeren mit späterer klinischer Manifestation einer PE bereits 15 - 20 Wochen vor der Manifestation erhöhte Werte von freien Fettsäuren (FFA) im Serum gemessen werden (Lorentzen und Henriksen, 1998). Zudem besitzen sie eine erhöhte lipolytische Aktivität, die wiederum zusätzlich zu einer vermehrten Aufnahme freier Fettsäuren in die Endothelzellen führt, wo sie letzten Endes verestert werden. Die in der Folge im Serum befindlichen FFA binden an Albumin. Damit nehmen sie diesem die Kapazität, toxische Produkte, insbesondere VLDL-Partikel („very low-density“), zu binden. Folglich akkumulieren diese an und in den Epithelzellen der Gefäße und schädigen diese. Das Resultat sind schließlich systemische Effekte.

Es bleibt jedoch anzumerken, dass grundsätzlich jede schwangere Frau aufgrund eines für die Schwangerschaft physiologisch erhöhten Energiebedarfes einen leichten Anstieg der VLDL-Fraktion zeigt. Daher ist auch diese Hypothese letztlich kein hinreichender Ansatz zur Klärung der Ätiologie. Nichtsdestotrotz bleibt die Tatsache zu vermerken, dass dieser erhöhte Energiebedarf im Falle einer PE bereits im ersten Trimester so enorm ansteigt, dass es zu toxischen Ungleichgewichten kommt (Dekker und Sibai, 1998).

### ***3. Hypothetischer Faktor für Präeklampsie: Immunologische Maladaptation***

Physiologischerweise werden körperfremde Zellen (z.B. Organtransplantate) durch das Histokompatibilitätssystem mit der Fähigkeit zur Antigenpräsentation für immunkompetente Abwehrzellen identifiziert. Demnach folgt auf die Antigenpräsentation eine Immunkaskade, die in einem Abstoßungsprozess endet. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass der sich entwickelnde Embryo zur Hälfte für die Mutter körperfremde Allele trägt. Folglich ist die Immunreaktion der Mutter während der Schwangerschaft supprimiert.

Bei Frauen mit PE hingegen ist die Aktivität der zirkulierenden Killerzellen, neutrophiler Granulozyten und Zytokinen gegenüber fetalen Zellen im Vergleich zu normalen Schwangerschaften gesteigert (Dekker und Sibai, 1999). Diese erhöhte Aktivität bedingt die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Elastasen und beeinträchtigt die endotheliale Funktion (VanWijk *et al.*, 2000). Folglich können nicht selten Ablagerungen immunkompetenter Zellen (IgM

(Immunglobulin-M), Komplementfaktoren, Fibrin, Granulosazellen) in den Spiralarterien gefunden werden, deren histomorphologisches Bild den Ablagerungen im Rahmen von *allograft*-Abstoßungsreaktionen ähnelt.

Eine bedeutungsvolle Aufgabe hat diesbezüglich das HLA-G (Humanes Leukozyten-Antigen G), das ausschließlich im extravillösen Trophoblasten an der maternofetalen Grenzfläche exprimiert wird. Es besitzt die Fähigkeit, die Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und großen uterinen Granulozyten, die sich gegen die Trophoblastzellen richtet, zu inhibieren (Shorter *et al.*, 1993). Diese Tatsache führt zur Annahme, dass HLA-G eine entscheidende Funktion in der Immuntoleranz während der Schwangerschaft besitzt. Wird HLA-G in zu geringem Maße exprimiert, fehlt der Schutzmechanismus vor NK-Zellen und die Trophoblastdifferenzierung sowie –invasion ist gestört. Vor diesem Hintergrund erscheint es beachtenswert, dass laut Studien in präeklampsischen Plazenten die HLA-G-Expression hinunterreguliert ist (Colbern *et al.*, 1994; Lim *et al.*, 1997; Yie *et al.*, 2004). Darüber hinaus unterstreichen epidemiologische Untersuchungen das Vorhandensein von Immunmechanismen bei der Entstehung von Präeklampsien. Häufig betroffen sind junge Erstgebärende (Sibai, 2003). Hingegen mindern eine vorausgehende Schwangerschaft, Abtreibung und Abort deutlich das Risiko einer Präeklampsie, jedoch nur, wenn ein Partnerwechsel zwischen den Schwangerschaften vorliegt (Trupin *et al.*, 1996). Auch häufiger Geschlechtsverkehr ohne mechanische Barriere (Kondom), Oralsex (Koelman *et al.*, 2000) und Bluttransfusionen vermindern das Präeklampsierisiko. In Kombination bieten die erwähnten Studien der vorliegenden Arbeit einen ersten hypothetischen Anhaltspunkt: Es ist zu vermuten, dass eine zuvor stattgefundene Immunreaktion gegen väterliche Antigene vor dem Auftreten einer Präeklampsie potentiell schützen kann.

Es muss jedoch festgehalten werden, dass bei Abwägung aller bis hierhin diskutierten Studienergebnisse nicht unterschieden werden kann, ob diese Maladaptation eher als Folge oder als Ursache der PE angesehen werden muss. Eine Maladaptation des Immunsystems an eine Schwangerschaft erklärt einige bei einer PE auftretenden Symptome. Allerdings können Ansammlungen von Immunglobulinen, Immunkomplexen, Komplement und Fibrinablagerungen auch als das Resultat eines Gefäßverschlusses angesehen werden.

#### **4. Hypothetischer Faktor für Präeklampsie: Präeklampsie als genetisch bedingte Krankheit**

Chesley und seine Mitarbeiter konnten bereits im Jahr 1968 eine familiäre Häufung von PE-Fällen feststellen (Chesley *et al.*, 1968). Dabei zeigte sich, dass Töchter, deren Mütter eine PE hatten, in 26 % der Fälle ebenfalls eine PE während ihrer Schwangerschaft entwickelten. De-

ren Schwiegertöchter hingegen entwickelten nur zu 8 % eine PE (Chesley *et al.*, 1968). Eine erst kürzlich vorgestellte Studie von Williams und Mitarbeitern im Jahr 2011 geht davon aus, dass die PE mit einer Erblichkeit von 55 % einhergeht (Williams und Broughton Pipkin, 2011). Ebenso konnten regionale Unterschiede gezeigt werden, wobei in nordischen Ländern das PE-Risiko höher ist (Ros *et al.*, 1998).

Einige mütterliche Gendefekte scheinen mit gehäufterem Auftreten einer Präeklampsie zu korrelieren. Zu nennen sind hier z.B. eine Veränderung des Angiotensinogen-Gens, ein auf Chromosom 7 lokalisiertes endotheliales NO-Synthese-Gen und von Genen, die die TNF $\alpha$ -Produktion beeinflussen. Somit scheint es eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer PE und einem bestehenden maternalen Gendefekt zu geben, ein definiertes „PE-Gen“ gibt es aber nicht (VanWijk *et al.*, 2000; Lachmeijer *et al.*, 2002).

Es bestätigt sich zudem immer mehr die Vermutung, dass ein besonderer Einfluss vom Genotyp des Embryos ausgeht. So zeigen oft Kinder von Frauen mit PE bei Komplikation durch ein HELLP-Syndrom metabolische Störungen. Auch ist das Vorkommen von PE bei Schwangerschaften mit chromosomalen Aberrationen (z.B. Trisomien) häufiger als bei gesunden Feten (Dekker und Sibai, 1998).

### **1.3 Das Renin-Angiotensin-System**

Die angeführten Hypothesen von Sibai und Dekker (1.2) unterstreichen die Komplexität der pathophysiologischen Ereignisse im Rahmen der PE, bieten aber keinen Erklärungsansatz für die bei allen PE-Patientinnen nachgewiesenen Veränderungen im Renin-Angiotensin-System (Luft, 2000).

#### **1.3.1 Aufbau und Funktion des Renin-Angiotensin-Systems**

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist eine koordinierte Hormon-Enzym-Kaskade. Es steht im Mittelpunkt des vaskulären, hypertensiven Geschehens und spielt eine Schlüsselrolle zur Erhaltung der Elektrolytbalance. Zudem beeinflusst das RAS die Expression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen. Aktiviert wird es im Wesentlichen durch zwei Faktoren, zum einen durch einen niedrigen Natriumserumgehalt und zum anderen durch eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate.

Die verminderte glomeruläre Filtrationsrate wird durch eine verminderte Nierendurchblutung bedingt. Infolgedessen wird Renin vom juxtaglomerulären Apparat der Niere freigesetzt und bewirkt die Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I (Ang I). Letzteres wird



## Einleitung

durch das vor allem in der Lunge gebildete „*Angiotensin Converting Enzyme*“ (ACE) zu Angiotensin II (Ang II), ein Peptidhormon, entfaltet seine Wirkung über die AT-Rezeptoren-Subtypen, AT1 und AT2, beide der G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie zugehörig.

Diese beiden Rezeptoren lassen sich pharmakologisch aufgrund ihrer Bindungseigenschaften gegenüber Nichtpeptid-Antagonisten identifizieren. Laut des Komitees „*The High Blood Pressure Council*“ von 1990 ist der AT1-Rezeptor Subtyp im Gegensatz zu AT2-Rezeptor-Subtyp durch Losartan selektiv hemmbar (Bumpus *et al.*, 1991). Viele der Angiotensin II-Effekte über die beiden beschriebenen Rezeptor-Subtypen sind entgegengesetzt. Am AT1-Rezeptor initiiert Ang II zum einen kardiovaskuläre Effekte, wie Vasokonstriktion und Veränderungen im Herz-Kreislaufsystem (Schiffrin und Touyz, 2003; Hunyady *et al.*, 2004). Zum anderen scheint es aber auch Einfluss auf Zelltod und Überleben von Zellen zu haben (Li *et al.*, 2006). Mit diesen pathophysiologischen Geschehnissen werden u.a. Erkrankungen wie arterieller Hypertonus (Schiffrin und Touyz, 2003), Herzhypertrophie (Hunyady und Turu, 2004) und renale Fibrosierung (Maric *et al.*, 2006) in Verbindung gebracht. Hingegen werden über den AT2-Rezeptor antiproliferative Prozesse vermittelt (Unger, 1999).

Neben dem oben beschriebenen systemischen RAS wurde in verschiedenen Organen wie Herz, Nebenniere, Uterus, Ovarien, Plazenta und Gehirn eine lokale Synthese von Komponenten des RAS gefunden (Hagemann *et al.*, 1994; Poisner, 1998). Die funktionelle Bedeutung dieses als extrarenales RAS bezeichneten Systems ist Gegenstand aktueller Forschung. Eines der wichtigsten extrarenalen Renin-Angiotensin-Systeme befindet sich in der Plazenta. Bereits 1967 beschrieben Hodari *et al.* eine in menschlichem Plazentagewebe gefundene, „reninähnliche“-Substanz (Hodari *et al.*, 1967). Seitdem konnte eine Reihe von Experimenten den Nachweis von Renin, ACE, Angiotensinogen und AT1-Rezeptor in der humanen Dezidua liefern (Shaw *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2000); Shaw für das erste und Li für das dritte Trimester der Schwangerschaft.

Des Weiteren wurden diese Komponenten in den in der Dezidua befindlichen Spiralarterien nachgewiesen (Morgan *et al.*, 1998). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die mütterliche Dezidua als auch der fetale Anteil der Plazenta über die für ein funktionierendes RAS notwendigen Komponenten verfügen.

Im Zuge sowohl des klinischen als auch des experimentellen Teils dieser Arbeit wird das Renin-Angiotensin-System (genauer: der AT1-Rezeptor als Bindungsdomäne für den Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor) von besonderer Bedeutung sein.

### **1.3.2 Veränderungen im Renin-Angiotensin-System während der Schwangerschaft**

Physiologischerweise sind alle Komponenten des RAS während der Schwangerschaft erhöht. Erhöhte Werte für Renin gehen vermutlich auf einen extrarenalen Auslöser durch die Ovarien und mütterliche Dezidua zurück (Hsueh *et al.*, 1982). Die wachsende Plazenta produziert zunehmend Östrogen, welches wiederum die Synthese von Angiotensinogen in der Leber stimuliert. Dies scheint letzten Endes die erhöhten Plasmakonzentrationen von Ang II und Aldosteron zu bedingen (Brown *et al.*, 1988).

Die Frage, inwiefern sich diese erhöhten Werte auf das kardiovaskuläre System, insbesondere den Blutdruck, auswirken, konnte eine von Assali *et al.* 1961 durchgeführte Studie beantworten. Diese zeigte, dass schwangere Frauen im Gegensatz zu nicht-schwangeren die doppelte Menge an intravenöser Ang II-Infusion benötigten, um den gleichen vasomotorischen Effekt zu erzielen (Assali und Westersten, 1961). Für dieses Phänomen werden verschiedene Erklärungsansätze diskutiert. Einerseits geht man davon aus, dass die bei Schwangeren auf Grund der wachsenden Plazenta erhöhten Konzentrationen von Progesteron und Prostazyklinen die Ang II-Sensitivität vermindern (Gant *et al.*, 1980). Andererseits könnte der Nachweis von erhöhten Werten von Ang 1-7 eine Erklärung sein. Denn Ang 1-7 gilt als potentieller Gegenspieler von Ang II im Plasma von Schwangeren (Valdes *et al.*, 2001; Merrill *et al.*, 2002).

Eine weitere Veränderung in der Schwangerschaft bezüglich des RAS geht auf Effekte der durch den AT1-Rezeptor ausgelösten intrazellulären Signalkaskaden zurück. Hierbei konnten in den letzten Jahren zahlreiche Studien dem AT1-Rezeptor eine regulative Aufgabe bezüglich multipler spezifischer Genexpressionen zuordnen. Dazu gehören Proteine, die u.a. assoziiert sind mit der Trophoblastinvasion (z.B. „*Plasminogen Activator Inhibitor-1*“, PAI-1) und der Angiogenese („*soluble fms-like tyrosine receptor-1*“, sFlt-1). Außerdem scheint die durch den AT1-Rezeptor ausgelöste Signalkaskade NF- $\kappa$ B (*nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*) zu aktivieren und die Synthese von der NADPH-Oxidase (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase) durch Trophoblasten zu stimulieren (Dechend *et al.*, 2003).

### **1.3.3 Veränderungen im Renin-Angiotensin-System bei Schwangeren mit Präeklampsie**

Die Datenlage legt nahe, dass Renin, Ang I und Ang II bei PE-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Schwangeren reduziert sind (Brown *et al.*, 1997), die Konzentration von ACE annähernd gleich ist und die Werte für Ang 1–7 signifikant reduziert sind (Merrill *et al.*, 2002). Letzteres ist eine vasodilatatorische Komponente des RAS und scheint eine Rolle in der uteroplazentaren Durchblutung zu spielen, auch wenn dies bislang noch nicht abschließend bestätigt ist. Ang 1-7 wird überall im Körper produziert, wie z.B. in der Niere, im Herzen und im Ovar. Zudem wird vermutet, dass Ang 1-7 nicht nur mit den AT1- und AT2-Rezeptoren interagiert, sondern einen eigenen spezifischen Rezeptor besitzt (Handa, 1999; Handa, 2000).

Im Vergleich zu nicht präeklampsischen Schwangeren ist die Sensitivität auf Ang II bei PE-Patientinnen erhöht (Brown *et al.*, 1990; Sanchez-Ramos *et al.*, 1994). Die Ursache dafür könnte in den unterschiedlichen Rezeptorkonfigurationen liegen. Normalerweise bildet der AT1-Rezeptor Homodimere. Hingegen wurde bei präeklampsischen Patientinnen gezeigt, dass eine heterodimere Form der AT1 mit dem Bradykinin-Rezeptor B2 vorliegen kann (Quitterer *et al.*, 2004; AbdAlla *et al.*, 2005). Dieser AT1/B2-Rezeptorkomplex reagiert besonders auf Ang II (AbdAlla *et al.*, 2005; Ariza *et al.*, 2007).

Weiterhin potentiell von Bedeutung für die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit sind Veränderungen während der PE im lokalen uteroplazentaren RAS; hierbei sei darauf hingewiesen, dass die im Folgenden beschriebenen Studienergebnisse variieren und deutlich machen, wie wichtig weitere Untersuchungen zum RAS während der Schwangerschaft sind.

Herse *et al.* (2007) konnten nur eine einzige Veränderung der Komponenten des RAS in der Dezidua und Plazenta während der PE aufzeigen: die Herabregulation des AT1-Rezeptors (Herse *et al.*, 2007). Sie fanden auch keine erhöhte Reninproduktion in der Dezidua von präeklampsischen Plazenten, obwohl Shah *et al.* (2000) bereits Jahre zuvor in der Plazenta von PE-Patientinnen im Vergleich zu normotensiven Schwangeren eine deutliche Expression von Renin nachwies (Shah *et al.*, 2000). Shah *et al.* (2000) gehen davon aus, dass die mütterliche Dezidua möglicherweise eine das RAS ergänzende aktivierte Einheit darstellt (Shah *et al.*, 2000). Demnach ist die kleine Menge an lokal produziertem Ang II in der Lage, über den mütterlichen Kreislauf die Ang II-Produktion in der Leber suffizient herabzusetzen. Allerdings muss erwähnt werden, dass Anton und seine Arbeitsgruppe einen Anstieg der Ang II-Produktion Chorionzotten von präeklampsischen Plazenten im Vergleich zu Plazenten von normotensiven Schwangeren konstatierten (Anton *et al.*, 2008).

Darüber hinaus scheint das RAS im Allgemeinen eine regulatorische Rolle in der fetoplazentaren Durchblutung zu spielen und eine unterstützende Komponente bezüglich einer adäquaten Plazentadurchblutung zu sein, welche letztlich die fetale Oxygenierung und Maturation sicherstellt.

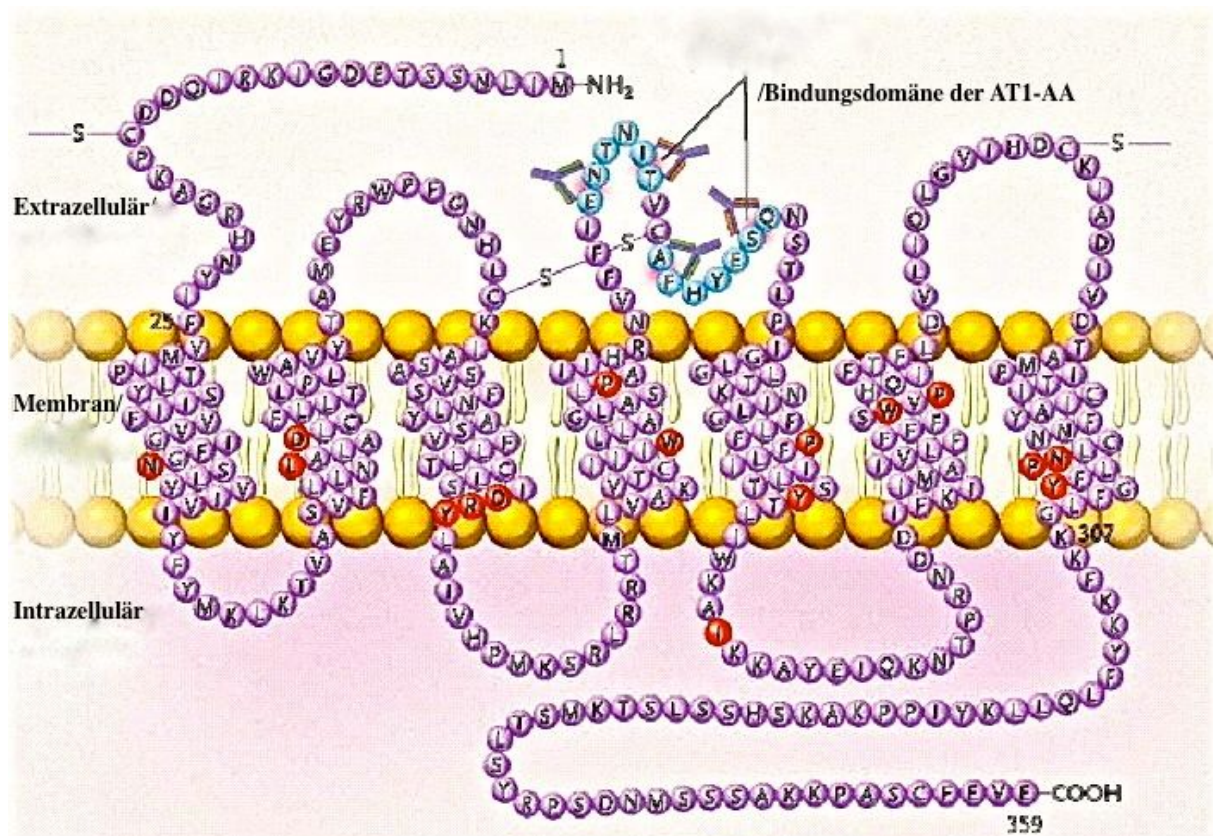
Diese auf humanem Gewebe basierenden Studien wurden durch tierexperimentelle Studien bestätigt. Takimoto und Kollegen paarten männliche, das menschliche Renin-Gen tragende transgene Ratten mit weiblichen, die das menschliche Angiotensin-Gen tragen. Bei den schwangeren Tieren zeigte sich eine Aktivierung der Reningenexpression in Trophoblastzellen zu einem späten Zeitpunkt der Schwangerschaft. Zudem konnte humanes Renin nachgewiesen werden, welches durch die Plazenta in den mütterlichen Kreislauf ausgeschüttet wird. Die weiblichen schwangeren Mäuse entwickelten schließlich PE ähnliche Symptome (Takimoto *et al.*, 1996).

### **1.4 Der agonistisch wirkende Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor**

Innerhalb der Pathogenese der PE könnte der von Wallukat und Kollegen bei präeklampsischen Frauen identifizierte Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor (AT1-AA) eine entscheidende Rolle spielen. Sie verwendeten Kardiomyozyten von Ratten und stimulierten diese mit Serum präeklampsischer Frauen. Dabei zeigte sich eine höhere Kontraktionsfrequenz im Vergleich zu verwendeten Seren gesunder Schwangerer (Wallukat *et al.*, 1999).

Um die Affinität des Autoimmunantikörpers an einen Rezeptor zu spezifizieren, wurde zum einen der AT1-Rezeptorblocker Losartan und zum anderen Prazosin, ein  $\alpha$ -Adrenorezeptorantagonist, verwendet. Dieses Experiment zeigte, dass die erhöhte Frequenz spezifisch durch Losartan gehemmt werden konnte. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die Immunglobuline aus dem Serum präeklampsischer Frauen an den AT1-Rezeptor binden und dabei den Effekt des natürlichen Agonisten, Angiotensin II, imitieren (Wallukat *et al.*, 1999).

Um den letzten Beweis für die Bindung an den AT1-Rezeptor zu erhalten, präinkubierten Wallukat *et al.* die Immunglobuline von PE-Patientinnen mit einem Peptid, welches die gleiche Aminosäuresequenz hat wie die 2. extrazelluläre Schleife des AT1-Rezeptors (AFHYESQ) (Abb. 1). Die gemessene Herzfrequenz der Kardiomyozyten war schließlich niedriger. Dagegen zeigte die Präinkubation der Immunglobuline präeklampsischer Frauen mit Peptiden, die die gleiche Aminosäuresequenz wie die erste und dritte extrazelluläre Schleife hatten keinen erniedrigten stimulativen Effekt (Wallukat *et al.*, 1999).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des AT1-Rezeptors und seine Bindungsdomäne für den AT1-AA an der 2. extrazellulären Schleife (Dechend *et al.*, 2004).

### 1.4.1 Die Rolle des AT1-AA in der Ätiologie der Präeklampsie

Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten den AT1-AA und seine Interaktion mit nachfolgender Aktivierung des AT1-Rezeptors in diversen Studien beweisen. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung des AT1-Rezeptors durch den AT1-AA auf unterschiedlichsten Zellen verschiedene für die PE charakteristische pathophysiologische Reaktionen verursacht (Dechend *et al.*, 2000; Dechend *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008b). In diesem Zusammenhang scheint das lokale uteroplazentare RAS von besonderer Bedeutung. Dabei zeigen Plazenten von präeklampsischen Frauen ein auffälliges Erscheinungsbild. Sie sind oftmals klein, die Trophoblastinvasion ist oberflächlich, das Spiralarterien-„Remodeling“ ist abnormal und die uteroplazentare Durchblutung ist reduziert (Zhou *et al.*, 1997a; Zhou *et al.*, 1997b). Im Folgenden werden zahlreiche Hinweise aufgeführt, die beweisen, dass der AT1-AA mit seinen Auswirkungen auf das RAS als Ursache für die beschriebenen pathologischen Veränderungen der Plazenta zu werten ist und gleichzeitig einen Erklärungsansatz für die verschiedenen für die PE charakteristischen pathophysiologischen Reaktionen bietet.

### 1.4.1.1 Die Beziehung zwischen dem AT1-AA und sFlt1

sFlt-1 („soluble fms-like tyrosine kinase-1“), ein lösliches, extrazelluläres Fragment des VEGF-1-Rezeptors (Levine und Karumanchi, 2005; Tjoa *et al.*, 2007), ist in der Lage, die angiogene Aktivität von „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF) und dem „*placental growth factor*“ (PlGF) durch die Bindung des VEGF-Rezeptors an PlGF zu inhibieren (Kendall und Thomas, 1993; Shibuya, 2001). In hypoxischen Plazenten von präeklampsischen Schwangeren konnte im Gegensatz zu Plazenten von normotensiven Schwangeren ein deutlicher Anstieg von sFlt-1-Produktion nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2002; Maynard *et al.*, 2003). Nagamatsu *et al.* zeigten, dass die von sFlt-1 induzierte Hypoxie in der Plazenta sowohl zellspezifisch ist, als auch durch Hypoxie oder Ischämie der Zytotrophoblastzellen zu einem massiven alleinigen Anstieg von sFlt-1 führt (Nagamatsu *et al.*, 2004). Die Hypoxie als Ursache für die Überproduktion von sFlt-1 innerhalb der PE scheint ein plausibler Erklärungsansatz zu sein, doch es gibt Hinweise, die den AT1-AA in den Mittelpunkt des Geschehens rücken lassen. Während einer normalen Schwangerschaft produziert die Plazenta sFlt-1 nach Ang II-Stimulation auf Trophoblastzellen über den Kalzineurin-NFAT-Weg (NFAT „*nuclear factor of activated T cells*“) (Zhou *et al.*, 2008a). Die Überlegung, dass eine Überstimulation des AT1-Rezeptors durch den AT1-AA zu einer massiven sFlt-1-Produktion führt, überprüften schließlich Zhou *et al.*. Dabei stellte sich heraus, dass der AT1-AA (isoliert aus Serum von PE-Patientinnen) nicht nur sFlt-1-Sekretion in menschlichen Plazentazotten und menschlichen Trophoblastzellen induziert, sondern auch in schwangeren Mäusen (Zhou *et al.*, 2008b). In Anbetracht dieser Erkenntnisse sollte davon ausgegangen werden, dass neben Ang II und einer lokalen Plazentahypoxie der AT1-AA einen möglichen additiven Effekt auf die exzessive sFlt-1-Freisetzung innerhalb der PE hat. Maynard *et al.* erzeugten an schwangeren Ratten durch Gabe von sFlt-1 einen, dem klinischen Bild der PE ähnlichen Phänotyp mit arteriellem Hypertonus und einer Proteinurie. Zudem zeigten die schwangeren Ratten ein ähnliches histopathologisches Bild wie es auch bei Menschen nachweisbar ist. Letzteres präsentierte sich v.a. in einer glomerulären Endotheliosis, als Zeichen für einen Zellschaden (Maynard *et al.*, 2003). Die durch den AT1-AA induzierte Freigabe von sFlt-1 könnte somit zu der in der PE beschriebenen Nierenschädigung führen.

### 1.4.1.2 Die Beziehung zwischen AT1-AA, sEng und TNF $\alpha$

Levine *et al.* zeigten eine signifikante Erhöhung der löslichen Form von Endoglin (sEng) im Kreislauf präeklampsischer Patientinnen im Vergleich zu normotensiven Schwangeren. Zu-

dem lassen sie eine Korrelation zwischen den nachgewiesenen sEng und der Schwere der PE-Erkrankung erkennen (Levine *et al.*, 2006). Endoglin ist ein Zell-Oberflächen-Co-Rezeptor für „transforming growth factor“- $\beta 1$  und  $\beta 3$ , der sich insbesondere auf Endothelzellen und Synzytiotrophoblasten befindet (Cheifetz *et al.*, 1992; Gougos *et al.*, 1992). Zhou *et al.* untersuchten diese Ergebnisse im Zusammenhang mit dem AT1-AA. Dabei bewiesen sie, dass der AT1-AA über die Aktivierung des AT1-Rezeptors zu einer Produktion von sEng in schwangeren Mäusen führt, allerdings nicht bei nicht-schwangeren Mäusen (Zhou *et al.*, 2008b). Vor diesem Hintergrund schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass die Plazenta die Hauptquelle der Induktion der sEng-Produktion durch den AT1-AA *in vivo* darstellt. Im Jahr 2010 identifizierten Zhou *et al.* in einem ähnlichen Experiment wie das bereits von ihnen im Jahr 2008 durchgeführte, den Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) als Präeklampsie-assoziiert. TNF $\alpha$  ist ein bekanntes inflammatorisches Zytokin. Sie konnten erstmals *in vivo* (Maus) und *in vitro* (auf humanen Zellen basierend) die Induktion von sEng und sFlt-1 durch AT1-AA, vermittelt über eine TNF $\alpha$ -Signalkaskade, zeigen. Aus dieser Signalkaskade resultiert eine geschädigte Plazentaangiogenese, die dem klassischen pathologischen Korrelat einer PE entspricht (Zhou *et al.*, 2010).

### 1.4.1.3 Die Beziehung zwischen AT1-AA und Plasminogenaktivator Inhibitor-1

Der Plasminogenaktivator Inhibitor-1 (PAI-1) ist ein weiterer wichtiger Faktor in der Pathogenese der PE. Es scheint die Trophoblasteninvasion zu beeinträchtigen, indem PAI-1 den „urokinase-like-plasminogen activator“ (uPA) inhibiert. Dies wiederum vermindert die Konversion von Plasminogen zu Plasmin. Das hat zur Folge, dass die Fibrinolyse verringert, die Fibrose erhöht, weniger extrazelluläre Matrix über Metallproteasen abgebaut wird (Fay, 2004) und die Trophoblasteninvasion nur oberflächlich verläuft (Xia *et al.*, 2003; Bobst *et al.*, 2005). Eine Verbindung zu dem AT1-AA konstatieren *in vitro*-Studien, die nach Aktivierung des AT1-Rezeptors auf humanen Trophoblastzellen durch den AT1-AA einen Anstieg von PAI-1 zeigten. Über aktiviertes PAI-1 folgte eine reduzierte Trophoblasteninvasion (Xia *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2003; Bobst *et al.*, 2005). Die Kombination aus dem akkumulierendem PAI-1 und den geringen Werten für Plasmin könnte möglicherweise über den verminderten Abbau der extrazellulären Matrix und subendothelialen und subepithelialen Fibrinablagerungen zu einem Nierenschaden führen. Dieses beschriebene pathologische Bild findet sich bei PE-Patientinnen (Petrucco *et al.*, 1974; Packham *et al.*, 1988). Die herabgesetzte Fibrinolyse und

der verminderte Abbau extrazellulärer Matrix könnten sich als die im Rahmen der PE auftretenden renalen Symptome manifestieren.

### **1.4.1.4 Die Beziehung zwischen AT1-AA, reaktiven freien Radikalen und NF- $\kappa$ B**

„Reactive oxygen species“ (ROS) als physiologisches Produkt von Aerobiern reguliert über die sogenannte Redoxreaktion zelluläre Funktionen (Gutteridge und Halliwell, 2000). Hingegen wirkt sich ein zu großer Anteil von ROS negativ aus. Es kann zu Schäden an Lipiden, Proteinen und DNA führen. Vor diesem Hintergrund kann oxidativer Stress während der Schwangerschaft zu einem Gewebeschaden an der Plazenta führen. Der teratogene Effekt von ROS kann für die Entwicklung des Feten schädlich sein, insbesondere in der kritischen Periode der Organentwicklung (Burton *et al.*, 2003; van Tuyl *et al.*, 2005). Hohe Werte für ROS konnten bei Schwangeren mit PE nachgewiesen werden und könnten möglicherweise eine Rolle in der ungewöhnlichen Plazentation spielen (Hubel, 1999). Dechend *et al.* zeigten, dass der AT1-AA intrazelluläre ROS über die NADPH-Oxidase sowohl in Trophoblastzellen der Plazenta als auch in Muskelzellen erhöht. Zudem zeigten sie, dass der AT1-AA zu einer Aktivierung des muskulären Faktors kappa B (NF- $\kappa$ B) in vaskulären Muskel- und Trophoblastzellen führt. NF- $\kappa$ B, ein Transkriptionsfaktor, bestehend aus zwei Proteinuntereinheiten, reguliert die Transkription von multiplen Genen, insbesondere für die Entzündungen und Immunantworten wichtiger Gene (Dechend *et al.*, 2003).

### **1.4.1.5 Die Beziehung zwischen AT1-AA und erhöhter Kalziumfreisetzung**

Die PE ist assoziiert mit Störungen im mütterlichen Kalziumstoffwechsel und erhöhten Konzentrationen von Kalzium in Erythrozyten, Lymphozyten und Thrombozyten (Hojo *et al.*, 1999). Thway *et al.* zeigten, dass das IgG (Immunglobulin-G) präeklampsischer Schwangerer über die Aktivierung des AT1-Rezeptors zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt. Hingegen konnte dies nicht mit IgG normotensiver Schwangerer gezeigt werden. Zudem zeigte dieselbe Arbeitsgruppe, dass eine erhöhte Kalziumkonzentration zu einer Aktivierung des NFAT-Transkriptionsfaktors führt (Thway *et al.*, 2004).



### **1.4.1.6 Die Beziehung zwischen AT1-AA und „Tissue Factor-production“**

Der „Tissue factor“ (TF), ein den extrinsischen Weg der Blutgerinnung aktivierendes Transmembranprotein, konnte ebenfalls in erhöhter Konzentration bei Schwangeren mit PE nachgewiesen werden. Dechend *et al.* zeigten eine durch AT1-AA induzierte TF-Expression in Gefäßmuskelzellen (Dechend *et al.*, 2003), ähnliche Ergebnisse präsentierten Dorffel *et al.* in Monozyten (Dorffel *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse könnten eine Verbindung zwischen der durch AT1-AA ausgelösten Erhöhung von TF und der mit der PE assoziierten Hyperkoagulabilität herstellen.

## **1.5 Aufgabenstellung**

In den letzten Jahren wurden weltweit viele Studien mit dem Ziel der Früherkennung des Syndroms Präeklampsie durchgeführt. Dabei hat sich erst in diesem Jahrzehnt der Schwerpunkt vom zweiten zum ersten Trimester verschoben. Da der AT1-AA bereits vor der klinischen Manifestation einer PE im Serum nachweisbar ist (Walther *et al.*, 2005), stellt er möglicherweise einen potentiellen Marker zur Früherkennung der PE dar. Im Rahmen der durchgeführten klinischen Studie sollten potentielle Zusammenhänge zwischen der PE, der Anamnese der Mutter, veränderter Werte gemessener biochemischer Marker und biometrischen Daten im ersten Trimester der Schwangerschaft aufgedeckt werden. Das besondere Augenmerk dieser Arbeit soll dabei auf den AT1-AA liegen. Es soll eine Alternative zu dem von Wallukat *et al.* (1999) verwendeten Bioassay zur Detektion des AT1-AA im Serum schwangerer Frauen im ersten Trimester getestet werden. Dafür wird ein kommerziell verfügbarer Assay der Firma CellTrend GmbH verwendet. Es ist das Ziel dieser Arbeit, mögliche Zusammenhänge zu identifizieren, die einen Hinweis auf eine PE vor Auftreten der klinischen Symptome liefern können. Dabei sollen die Messungen des AT1-AA und die Korrelationsanalysen mit klinischen, biometrischen und anamnestischen Daten durch experimentelle Arbeiten zur Interaktion von AT1-AA und AT1-Rezeptor flankiert werden.

## 2 Material

### 2.1 Bakterien- und Zelllinien

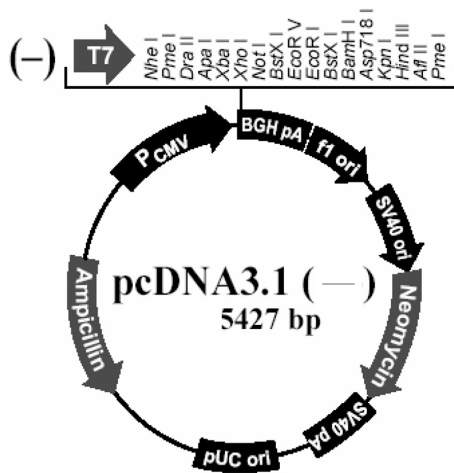
<b>Bakterienstamm</b>	E.coli DH5 $\alpha$	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
<b>Zelllinien</b>	HEK293A-Zellen	MP Biomedicals	Heidelberg, Deutschland

### 2.2 Vektoren

#### 2.2.1 Vektoren zur Klonierung

Für die Expression in den Zelllinien (2.1) wurde der pcDNA3.1(-)-Vektor verwendet.

<b>pcDNA3.1(-)-Vektor</b>		Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
---------------------------	--	------------	------------------------



**Abbildung 2:** Der pcDNA3.1(-)-Vektor und seine Restriktionenzymststellen. Die Skizze wurde aus dem Invitrogen-Katalog (2005) entnommen.

#### 2.2.2 Vektoren mit klonierten Fragmenten

Die Klonierung der cDNA des AT1-Rezeptors in die pcDNA 3.1 erfolgte durch technisches Personal der AG Walther im Vorfeld zu diesem Projekt (die Skizze des Plasmids zeigt die Abb. 2).

## Reportervektoren

Diese zwei Vektoren werden für die Messung der Transkriptionsintensität benutzt.

**pRL-TK**

Beide Vektoren sind ein Geschenk von Herrn Prof. Wieland (Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg; Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Mannheim; Deutschland)

**pSRE-L**

## 2.4 Chemikalien

<b>Agar</b>	Difco	Heidelberg, Deutschland
<b>DMSO</b>	Merck	Darmstadt, Deutschland
<b>FBS</b>	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
<b>GlutaMAX™-I</b>	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
<b>HBSS</b>	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
<b>HEPES Pufferlsg. 1M</b>	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
<b>Lipofectamin™2000</b>	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumhydrogenkarbonat 7,5 %</b>	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
<b>Polyfect®</b>	Qiagen	Hilden, Deutschland
<b>SDS</b>	Serva	Heidelberg, Deutschland
<b>Sucrose</b>	Sigma	München, Deutschland
<b>Tris</b>	Sigma	München, Deutschland
<b>Trypsin-EDTA</b>	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland

## 2.5 Peptide und ihre Sequenzen

<b>Angiotensin II</b>	Bachem AG	Weil am R., Deutschland
Asp1 - Arg2 - Val3 - Tyr4 - Ile5 - His6 - Pro7- Phe8		
<b>Peptid</b>	Biosynthan Gesellschaft für bioorganische Synthese GmbH	Berlin, Deutschland
AFHYESQ-OH x TFA		

## 2.6 Medien für Zellkulturen

<u>Allgemein</u>		
<b>Einfriermedium</b>	FBS, D-MEM, DMSO (1: 8: 1, v/v/v)	
<u>Für HEK</u>		
<b>Basalmedium</b> D-MEM, füssig (4500 mg/l D-Glucose, L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat)	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
<b>Komplettmedium</b>	D-MEM	500 ml D-MEM
	+ Pen/Strep	5 ml Pen/Strep
	+ 10 % FBS	50 ml FBS
		5 ml Glutamax
<b>Transfektionsmedium</b>	D-MEM	500 ml D-MEM
	+ 10 % FBS	50 ml FBS
		5 ml Glutamax
<b>Starvingmedium</b>	D-MEM	50 ml D-MEM
	+ Pen/Strep	5 ml Pen/Strep
	+ 0,5 % FBS	250 µl FBS

## 2.7 Stammlösungen, Puffer und Gele

**GTE-Puffer**

2N Tris/HCl-Lsg.	6,25 ml
Glukose	4,504 g
2N EDTA-Lsg.	10 ml

Auffüllen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 500 ml; pH 8,0

**Natriumacetat** 3M Na-Acetat; pH 5,5

**SDS/NaOH-Lösung**

10 %iges SDS	25 µl
2M NaOH	25 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	200 µl
Tris	242 g

**TAE 50x**

Na-Acetat	68 g
EDTA	18,5g

## Material

Auffüllen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 1000 ml, pH = 7,8

TE 10x

Tris/HCl 100mM

EDTA pH 8,0 10mM

## 2.8 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

<b>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</b>	Promega	Mannheim, Deutschland
---	---------	-----------------------

## 2.9 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Name</u>	<u>Firma</u>	<u>Firmenort</u>
<b>CO<sub>2</sub> –Inkubator</b>	BB16	Heraeus	Hanau, Deutschland
<b>Inkubatoren</b>	Function line	Heraeus	Hanau, Deutschland
<b>Luminometer</b>	Orion	Berthold DS GmbH	Pfordsheim, Deutschland
<b>Mikrobiologische Sicherheitsbank</b>	Hera Safe	Heraeus	Hanau, Deutschland
<b>Mikroskop</b>	DMIL	Leica	Wetzlar, Deutschland
<b>Spektralphotometer</b>	DU 640i	Beckman	Lohof, Deutschland
<b>Thermomixer</b>	Ther. comp.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	Ther. comf.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
<b>Vortex</b>	MS1	IKA Werke	Staufen, Deutschland
	VF2	Jenke & Kunke	
<b>Zentrifugen</b>	5415 D	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	3200	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	1.0R	Heraeus	Hanau, Deutschland

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Das Auftauen der Zellen**

Die Kryoröhrchen (1,8 ml) wurden in einem 37°C-Bad für ca. 30s oder in der Hand aufgetaut. Dann wurde das Zellmedium in 9 ml Dulbecco's MEM Komplettmedium (D-MEM) (2.6) resuspendiert und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Zu dem gewonnenen Zellpellet wurden 10 ml D-MEM Komplettmedium (2.6) gefügt, resuspendiert und die Zelle auf einer Platte ausgesät.

#### **3.1.2 Die Kultivierung der HEK293A-Zelllinie**

Die Kultivierung der HEK293A-Zelllinie erfolgte in Komplettmedium. Dazu wurde D-MEM (2.6) mit 10 % FBS (2.4), 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (2.4) und 1 % Glutamax I (2.4) ergänzt. Anschließend wurden die HEK293A-Zellen bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 %) (2.9) inkubiert. Der Zellkultur-Mediumwechsel und die Teilung der Zellen im Verhältnis 1:3 (106 Zellen/80 cm<sup>2</sup>) erfolgte alle 2 - 3 Tage. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug ca. 35 - 48 Stunden.

#### **3.1.3 Trypsinisieren der Zellen**

Die Konfluenz bewachsenen Platten wurden 1x mit HBSS (2.4) gewaschen. Anschließend wurde 1ml einer bei 37°C vorgewärmten 0,25 %igen Trypsin-EDTA Lösung (2.4) auf die Platte gegeben und für 1 min zurück in den Inkubator gestellt. Die gelösten Zellen wurden auf 40 ml mit frischem Komplettmedium (2.6) aufgefüllt.

#### **3.1.4 Einfrieren der Zellen**

Die Zellen wurden trypsinisiert (3.1.3) und anschließend für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde in Einfriermedium (2.6) resuspendiert (D-MEM + 20 % FBS). Davon wurden 0,9 ml in ein Kryoröhrchen, das zuvor mit Zelltyp, Passagenummer und Datum beschriftet wurde, pipettiert und mit DMSO (2.4) auf 1 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Tubes sofort auf Trockeneis (-80°) gelegt und bei -80° für eine Woche zwischengelagert und dann in Flüssigstickstoff bis zur Wiederverwendung gelagert.

### 3.1.5 Das Dual-Luciferase® Reporter Assay System

Das „Dual Luciferase Reporter Assay“ System (2.8) ist eine einfache Methode zur Analyse der relativen transkriptionellen Aktivität von Genen. Dazu werden die Zellen mit einem chimären Konstrukt, bestehend aus dem zu untersuchenden Gen und einem Luziferase-Gen transfiziert. Das Luziferase-Gen kodiert für ein Enzym, das durch Oxidation von Luziferin Lichtquanten erzeugt. Dieses Phänomen wird als Biolumineszenz bezeichnet. Die Menge des ermittelten Lichtes ist dabei proportional zu der transkriptionellen Aktivität des Gens. Unter dem Begriff „Dual Reporter“ versteht man die Expression und Messung zweier voneinander unabhängiger Reporterenzyme in einem System. Dabei korreliert einer der beiden Reporter mit dem Effekt der spezifischen experimentellen Bedingungen, während die Aktivität des zweiten kotransfizierten Reporters eine interne Kontrolle darstellt, welche die Basalaktivität repräsentiert. Durch die Normalisierung des experimentellen Rezeptors zur Aktivität des Kontrollrezeptors können interne Schwankungen minimiert werden, wie sie z.B. durch Unterschiede in der Zellviabilität oder der Transfektionseffizienz entstehen können. Der „Dual Reporter“ ermöglicht eine verbesserte experimentelle Genauigkeit durch seinen gleichzeitigen Ausdruck und Messung von zwei selbstständigen Reporterenzymen innerhalb eines Systems. Zur Auswertung der Genaktivität wurde als experimenteller Reporter hauptsächlich der pSRE-L-Vektor (2.2.3) verwendet. Dieser Vektor kodiert für das Luziferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* („Firefly“). Dessen Luziferase-Produktion ist abhängig von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Serum Response Faktor“. Als Kontrollreporter wurde der pRL-TK-Vektor (2.2.3) verwendet. Er kodiert für das Luziferase-Gen der Weichkoralle *Renilla reniformis* und seine Luziferase-Produktion ist abhängig von der Transfektionseffizienz. Der korrelierende cDNA-Abschnitt sitzt hinter dem konstitutiv veränderten Thymidin-Kinase-(TK) Promotor.

### 3.2 Erster Tag: Kultivierung der HEK293A Zellen

Die HEK293A werden gewaschen, trypsinisiert (3.1.3), mit Komplettmedium (2.6) resuspendiert und zum Kultivieren je 200 µl in ein Well einer Zellkulturplatte mit 48 Well pipettiert. Anschließend werden die Zellen für ca. 12-24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (2.9) bis die Konfluenz 70 - 80 % beträgt.

### 3.2.1 Zweiter Tag: Transfektion

Das Kulturmedium wird abgesaugt und 2x mit PBS gewaschen. Für die Transfektion werden je ein DNA-Mastermix mit bzw. ohne Zugabe des AT1-Rezeptors ( $c= 50 \text{ ng/ml}$ ), des SREmix ( $c= 50 \text{ ng/ml}$ ) und der pcDNA ( $100 \text{ ng/ml}$  bzw.  $150 \text{ ng/ml}$ ) zubereitet, sodass die Endkonzentration des DNA-Gemisches  $200 \text{ ng/ml}$  und Well beträgt.  $10 \mu\text{l}$  Mastermix werden zusammen mit  $10 \mu\text{l}$  Medium (ohne Zusätze) ins Well pipettiert und  $10 \text{ min}$  bei Raumtemperatur inkubiert (Komplexbildung). Danach wird in jedes Well  $200 \mu\text{l}$  Hungermedium (Kulturmedium, welches anstatt  $10 \%$  FCS nur  $0,5 \%$  FCS enthält) gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.2 Dritter Tag: Stimulation und Luciferase-Aktivitäts-Messung

Das Transfektionsmedium wird abgesaugt. Die Zellen werden mit  $200 \mu\text{M}$  Medium, die die zu untersuchenden Substanzen enthalten, versetzt (2.5) und für sechs bis acht Stunden im Brutschrank inkubiert. Als Positivkontrolle dient Angiotensin II ( $c= 10^{-6}$ ).

Zur Durchführung des „Luciferase-Assays“ wird ein kommerzieller Kit „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“ (2.8) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Zur Messung der Gen-Aktivität wird zunächst das Kulturmedium abgenommen und die transfizierten Zellen einmalig mit HBSS (2.4) gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von  $100 \mu\text{l}$  eines Gemisches aus Passiv Lysis Buffer (PLB) (2.8) und Wasser (1:5) lysiert und für ca.  $10 \text{ min}$  auf den Vortex gestellt, bis sich alle Zellen von dem Boden der Platte lösen. Der Passiv Lysis Buffer wurde speziell für den „Luciferase® Reporter Assay“ entworfen um die schnelle Zellyse zu begünstigen. Er bietet ein Optimum an Leistungsfähigkeit und Stabilität für die Firefly- (FF) und das Renilla-Luziferase- (RL) Enzyme. Im Gegensatz zu anderen Zellyse Produkten löst das PLB nur eine geringe Eigenlumineszenz aus. Zur Messung der Luziferaseaktivität werden nach  $5 \text{ Minuten}$   $5 \mu\text{l}$  des Lysats auf eine 96-Well Platte überführt. Der Platte wird im Luminometer (2.9)  $100 \mu\text{l}$  „Luciferase Assay Reagenz“ (LabII) zugesetzt und nach einer Verzögerung von  $2 \text{ s}$  für  $10 \text{ s}$  die Lichtreaktion luminometrisch gemessen. Der gemessene Wert entspricht der Aktivität des experimentellen Reporters. Nach Abschluss der Messung injiziert die Maschine automatisch „Stop and Glo Reagenz“ und führt erneut nach einer Verzögerung von  $2 \text{ s}$  eine Messung von  $10 \text{ s}$  durch. Dieser Messwert repräsentiert die Aktivität des Kontrollreporters. Die ermittelten Messwerte werden in „relative light units“ (RLU)/ angegeben. Dabei setzt sich RLU zusammen aus dem Quotienten von



RLU (FF)/ RLU (RL). Jedes Transfektionsexperiment wurde in Triplikat durchgeführt, und die gemessenen relativen Lichtwerte gemittelt.

### **3.3 Allgemeine Beschreibung des Patientenkollektivs**

In dem Zeitraum vom 19.10.2006 bis 26.05.2008 wurden 2187 Patientinnen im Rahmen des sogenannten First-Trimester-Screening (FTS), 11. - 13. + 6. Schwangerschaftswoche (SSW), bzw. Scheitelsteißlänge (SSL) 45 – 84 mm der gynäkologischen Praxis von Prof. Dr. med. Rolf Becker, Kurfürstendamm 199 in 10719 Berlin in die Studie eingeschlossen. Weder das Alter der Schwangeren und die Zugehörigkeit zu einer bestimmten ethnischen Gruppe noch Erkrankungen der Schwangeren stellten ein Ausschlusskriterium dar. Bei Gemini-Graviditäten wurde jeweils der erste Fetus untersucht.

### **3.4 Durchführung der klinischen Studie**

#### **3.4.1 Blutentnahme und Uringewinnung im 1. Trimester der Schwangerschaft**

Es wurden je Patientin zwei 9 ml EDTA-Röhrchen mit Vollblut abgenommen und diese unmittelbar im Anschluss daran 12 Minuten bei 800 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Plasma abpipettiert und jeweils 1 ml Plasma in jeweils fünf 1,5 ml Tubes pipettiert. Zudem wurde von jeder Patientin Mittelstrahlurin gewonnen und jeweils fünfmal 1,9 ml Urin in 2 ml Tubes umpipettiert. Das gewonnene Material lagerte bei -80°C.

#### **3.4.2 Beschriftung des gewonnenen Materials: Blut und Urin**

Das jeweils 5. Tube, die sogenannte „Mutterprobe“, wurde aus zweierlei Gründen gesondert gekennzeichnet: Zum einen, falls die Menge < 1 ml und zum anderen, wenn das Material verunreinigt ist. Die Tubes 1 bis 4 jeder Patientin wurden letzten Endes auf Trockeneis aufgetaut und mit dem Vortex (2.9) gemischt, um das Material aus einem 1 ml Tube in 10 Portionen in je 10 µl Tubes aufzuteilen. Diese Portionierung sollte zu einem späteren Zeitpunkt die verschiedenen Untersuchungen ermöglichen, ohne jedes Mal die gesamte Probenmenge von 1 ml aufzutauen. Auch diese wurden bei -80°C gelagert.

Alle Tubes wurden sowohl mit einem Code (bestehend aus Vorname, Nachname, Geburtstag der Patientin und einem A für Berlin), Entnahmedatum und einem praxisinternen Code gekennzeichnet.

### 3.4.3 Ermittlung der Daten der jeweiligen Schwangeren

Die Erhebung der Stammdaten der jeweiligen Schwangeren erfolgte in schriftlicher Form anhand eines standardisierten Formulars und mittels Aktenrecherche. Alle zusammengetragenen Informationen (Vorerkrankungen, Familienanamnese, Schwangerschaftsanamnese, Medikamenteneinnahme, voraussichtlicher Entbindungstermin etc.) wurden in einer Excel-Tabelle angelegt und dem entsprechenden Code zugeordnet.

Die in der Praxis ermittelten Flusswerte der A. uterina und weitere Werte, wie z.B. die Scheitelsteißlänge wurden ebenfalls in die Excel-Tabelle eingetragen. Zwei Wochen nach dem voraussichtlichen Entbindungstermin wurden die Patientinnen telefonisch kontaktiert, um anhand eines standardisierten Fragebogens den Schwangerschafts- und Geburtsverlauf zu ermitteln. Diese gesammelten Informationen und die des Krankenhausentlassungsbriefes wurden in einem praxisinternen Programm und in einer Excel-Tabelle dokumentiert.

Auffällige Pathologien, wie PE, Eklampsie, HELLP, IUGR, Gestationshypertonus und essentieller arterieller Hypertonus wurden persönlich in dem jeweiligen Krankenhaus, in dem die Patientin entbunden hat, mittels Aktenkunde überprüft. Es wurden u.a. folgende Parameter kontrolliert: die Blutdruckwerte bei Aufnahme, im stationären Verlauf, zur Entbindung, nach Entbindung und bei Entlassung; die Ergebnisse durchgeführter Laboruntersuchungen, insbesondere Transaminasen, Thrombozyten, Hämolysezeichen und Infektparameter, wie Leukozyten und CRP; die Kontrolle des Urins auf Proteine und das jeweilige Krankenblatt nach spezifischen Hinweisen auf das jeweilige pathologische Bild durchsucht (Empfinden der Patientin, besondere Angaben zu Schwindel oder Krampfanfällen, Ödeme bzw. Anarsaka etc.). Auch die Medikation (z.B. Antihypertensiva) während des stationären Aufenthaltes und bei Entlassung wurde überprüft. In einigen Krankenhäusern konnten die auffälligen Pathologien durch die zuvor zugesandten Fragen bezüglich der Diagnosestellung und der damit verbundenen zu überprüfenden Parametern geklärt werden, selbstverständlich nach Rücksprache mit dem jeweiligen Chefarzt und Zusendung der Einverständniserklärung der Patientin. Die von uns angeforderten Informationen erhielten wir in schriftlicher Form per Post oder Fax. In zwei Fällen, in denen die Akte nicht in der Klinik aufzufinden war, wurden die Patientinnen aus der statistischen Berechnung entfernt.

Die Diagnosestellung schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen erfolgte anhand allgemeingültiger diagnostischer Kriterien:

- Präeklampsie: Arterieller Hypertonus (Werte  $\geq 140/90$  mmHg) und Proteinurie ( $\geq 0,3$  g/l/24h)

## Methoden

- HELLP: Transaminasenanstieg, Thrombozytopenie ( $< 100\ 000/\mu\text{l}$ ) oder Hämolyzezeichen, arterieller Hypertonus (Werte  $\geq 140/90$  mmHg), Proteinurie ( $\geq 0,3$  g/l/24h)
- Gestationshypertonus: In der Schwangerschaft neu aufgetretener arterieller Hypertonus
- Essentieller arterieller Hypertonus: bereits vor der Schwangerschaft bestandener arterieller Hypertonus

Alle gesicherten Pathologien wurden ebenfalls in der Excel-Tabelle zusammengetragen.

Konnten Parameter zu der jeweiligen Diagnosestellung nicht gefunden werden, bzw. stellte sich bei der Recherche heraus, dass nach obiger Definition die entsprechenden Parameter unauffällig waren, wurde die Diagnose korrigiert. Letzteres betraf drei Patientinnen, wobei bei zwei von ihnen eine vermeintliche Präeklampsie mit ausschließlich erhöhten Blutdruckwerten, diagnostiziert wurde und bei einer weiteren ein HELLP-Syndrom aufgetreten sein soll ohne den Nachweis von erhöhten Transaminasen im Labor oder einer verminderten Thrombozytenzahl. In diesen Fällen wurde die Diagnose Präeklampsie zu einem Gestationshypertonus und das HELLP-Syndrom zu einer Präeklampsie korrigiert.

### 3.4.4 Messung des AT1-AA

Die Messung des AT1-AA wurde mittels eines Antikörper Suchtests der Firma durchgeführt. Das Testprinzip basiert auf an der Mikrotiterplatte gebundenen Angiotensin II- Rezeptoren 1. Während der Inkubation werden die in den Proben vorhandenen anti-Angiotensin-Rezeptor 1-Antikörper an der Platte immobilisiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt mit einem anti-human-IgG-Sekundärantikörper, der mit Peroxidase markiert ist. In der folgenden enzymatischen Substratreaktion bildet sich ein farbiges Produkt, dessen Farbintensität proportional der Konzentration und/oder Avidität der anti-Angiotensin II-Rezeptor 1-Antikörper ist.

Die Testdurchführung erfolgte nach Anleitung des Waschzettels, wie folgt:

- Inkubation der Proben/Standards/Kontrollen: 100  $\mu\text{l}$ , 120 min, bei 4°C
- Waschen
- Inkubation mit anti-human-IgG, Peroxidase-markiert mit anti-human-IgG, 100  $\mu\text{l}$ , 60 min, bei Raumtemperatur
- Waschen
- Substratinkubation: 100  $\mu\text{l}$ /Well 20 min, bei Raumtemperatur
- Stopplösung zusetzen: 100  $\mu\text{l}$ /Well

## Methoden

- Messen bei 450 nm (optional gegen Referenzwellenlänge)

### Testcharakteristika sind:

- Eichkurve: 5 Standards zwischen 2,5 U/ml und 40 U/ml
- cutoff: 20 U/ml
- Probenmaterial: Serum, Plasma
- Intraassay-Variationskoeffizienten: 6,88 %
- Interassay-Variationskoeffizienten: 11,45 %
- **Typische Eichkurve:**

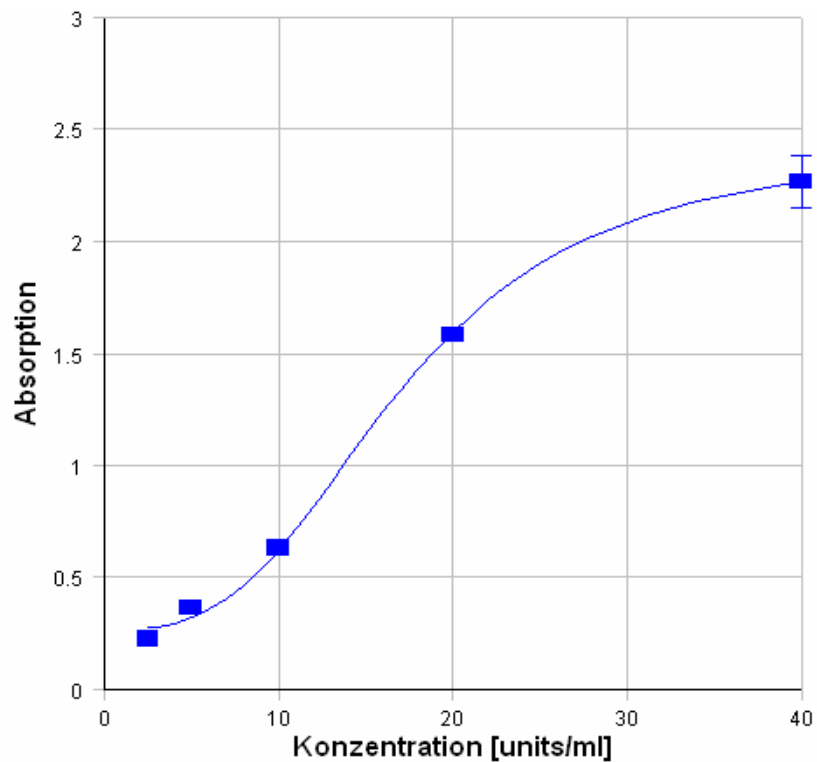


Abbildung 4: Eichkurve des AT1-AA Suchtests der Firma CellTrend

### 3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Herrn PD Dr. rer. nat. Niels Wessel, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Physik.

Die statistischen Analysen wurden mit SPSS Statistics Version 20.0 durchgeführt.

Für nicht normalverteilte Daten, um zwei unabhängige Stichproben zu vergleichen, wurde der Rangtest nach Mann-Whitney (Mann-Whitney-U Test) angewandt.

Bei ordinalskalierten Daten oder intervallskalierten Daten, bei denen die Voraussetzungen für eine Varianzanalyse nicht erfüllt waren und mehr als zwei unverbundene Stichproben miteinander verglichen werden sollten, wurde der Kruskal-Wallis H-Test durchgeführt.

Zur Charakterisierung der Verteilung wurden auf Quartilen beruhende Boxplots verwendet. Der Interquartilabstand wurde als Kasten (*box*) dargestellt. Unterkante und Oberkante der *box* geben die Lage des unteren und oberen Quartil an. Maximum und Minimum wurden gekennzeichnet. Werte, die mehr als das 1,5-fache vom Interquartilabstand entfernt waren, wurden als Ausreißer bezeichnet und sind als Sternchen gekennzeichnet. Werte, die mehr als das 3-fache von der *box* entfernt waren, wurden als Extremwerte bezeichnet und sind als Kreise markiert. Der Median als mittlerer Rang wurde in der *box* als dicker schwarzer Strich markiert. Der Median ist der Wert, der, wenn man alle Messwerte der Größe nach ordnet, genau in der Mitte liegt. Die Antennen an der *box* stellen jeweils den kleinsten bzw. größten Wert dar, der nicht als Ausreißer gilt.

Bei normal verteilten (intervallskalierten) Variablen wurde der Produktmoment-Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet (Korrelationskoeffizient). Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) gilt als Bestimmtheitsmaß und beschreibt den Anteil der gemeinsamen Varianzen von zwei Variablen. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen +1 und -1 annehmen. Ein Wert nahe 1 steht für eine hohe Wahrscheinlichkeit eines linearen Zusammenhanges. Ein positiver Zusammenhang ( $r > 0$ ) bedeutet, dass beide Variablen miteinander größer werden, wohingegen bei einem negativen Zusammenhang eine Variable größer wird, während die andere sich verkleinert.

Um eine Genauigkeit für den Schätzwert des Mittelwertes (MW) anzugeben, wurde an einigen Stellen dieser Arbeit der Standardfehler des Mittelwertes („standard error of the mean“, SEM) verwendet, welcher die Standardabweichung aller möglichen Stichprobenmittelwerte

## Methoden

beschreibt. Dabei ist er ein Maß für die Exaktheit des geschätzten MW der Stichprobe gegenüber der Grundgesamtheit und berechnet sich durch die Standardabweichung (SD). Es gilt: je größer der Stichprobenumfang, desto kleiner der SEM. Und je mehr die Werte der Grundgesamtheit streuen, desto mehr werden die MW möglicher Stichproben streuen.

Statistische Signifikanz wurde als  $p \leq 0,05$  (zweiseitig) definiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der klinischen Studie

#### 4.1.1 Ausprägung schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen im Gesamtkollektiv

Von 2187 Schwangeren wurden im Rahmen des sogenannten First-Trimester-Screening (FTS) Vollblut entnommen und Mittelstrahlurin gewonnen. Die Tabelle 1 zeigt alle im Gesamtkollektiv aufgetretenen schwangerschaftsassozierten Erkrankungen. Die Gesamtanzahl der Frauen weicht allerdings mit 2109 Frauen von den beschriebenen 2187 Schwangeren ab, da bei 43 Frauen keine Abschlussdiagnose evaluiert werden konnte und 35 weitere Frauen einen Abort hatten.

Abschlussdiagnose	Kodierung	Anzahl der Frauen	% vom Gesamtkollektiv
Keine Pathologie	0	1967	93,3
Essentieller arterieller Hypertonus	1	13	0,62
Gestationshypertonus	2	21	1
Präeklampsie	3	21	1
Pfropfgestose	4	2	0,09
Pfropfpräeklampsie	5	0	0,00
Andere hypertensive Erkrankungen	6	1	0,05
HELLP-Syndrom	7	13	0,62
Gestationsdiabetes	8	66	3,13
Vorzeitige Plazentalösung	9	5	0,24

**Tabelle 1:** Darstellung der Abschlussdiagnosen mit entsprechender Kodierung für das Gesamtkollektiv. Es sind die Anzahl der Frauen und der prozentuale Anteil der Frauen mit zugehöriger Abschlussdiagnose des Gesamtkollektivs von 2109 Frauen beschrieben.

#### 4.1.2 Das Kollektiv, in dem der AT1-AA gemessen wurde

Von den 2109 Frauen wurden 181 auf den Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor (AT1-AA) untersucht. Von den 181 Frauen waren 95 Frauen gesund und dienten als Vergleichs- bzw. Kontrollgruppe. Die weiteren 86 Frauen entwickelten eine schwangerschaftsassozierte Pathologie und wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit als erkranktes Kollektiv bezeichnet. Da nicht bei allen der 181 Frauen die zu untersuchenden Parameter

## Ergebnisse

vollständig evaluiert werden konnten, kann die Anzahl der Frauen im gesunden und erkrankten Kollektiv in den Korrelations- bzw. Subgruppenanalysen geringer ausfallen. Eine Gruppengröße  $\leq 10$  Frauen erlaubt keine adäquaten Signifikanztests mit repräsentativen Ergebnissen. Deshalb sind innerhalb des erkrankten Kollektivs die Pfortpfgestose und Pfortpfpräkampsie sowie andere hypertensive Erkrankungen und die vorzeitige Plazentalösung auf Grund der jeweils zu kleinen Gruppengrößen ( $\leq 10$  Frauen) nicht eingeschlossen worden. Daraus ergibt sich ein Gesamtkollektiv von 177 Frauen. Die Tabelle 2 zeigt die Anzahl der Pathologien, die in die AT1-AA-Studie eingeschlossen wurden.

Abschlussdiagnose	Kodierung	Anzahl der Frauen	% vom AT1-AA-Kollektiv
Keine Pathologie	0	95	53,7
Essentieller arterieller Hypertonus	1	13	7,3
Gestationshypertonus	2	11	6,2
Präkampsie	3	14	7,9
HELLP-Syndrom	7	11	6,2
Gestationsdiabetes	8	33	18,6

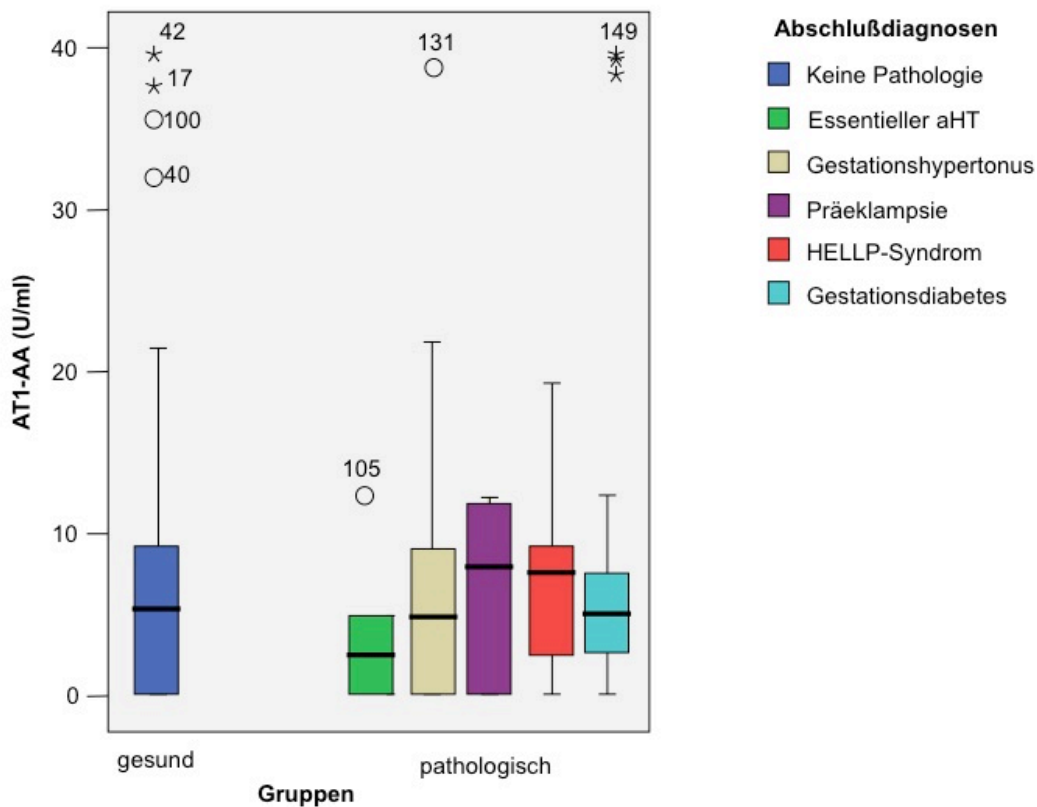
**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Pathologien mit entsprechender Kodierung für das Kollektiv von 177 Frauen, bei dem der AT1-AA gemessen wurde.

### 4.1.3 Der AT1-AA in Abhängigkeit von schwangerschaftsassozierten Pathologien

Als erstes wurden die Werte für den AT1-AA in dem Kollektiv der 177 Frauen untersucht. Diese Untersuchung ergab keinen Zusammenhang zwischen gemessenen Werten für den AT1-AA von gesunden und erkrankten Schwangeren (Vergleich der gesunden Schwangerschaften vs. aller Pathologien: Gesunde: 6,72,  $\pm 0,77$ ; Erkrankte: 7,04,  $\pm 0,95$ ,  $p= 0,832$ , Kruskal-Wallis-Test).



## Ergebnisse



**Abbildung 3:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA (U/ml) im gesunden (95 Frauen) und erkrankten Kollektiv (82 Frauen), eingeteilt in Subgruppen.

Der Box plot (Abb. 3) zeigt AT1-AA-Werte nach Unterteilung in die Gruppe der Pathologien in die einzelnen Subgruppen (rechte Seite), verglichen mit der Kontrollgruppe (linke Seite). Keine der „Pathologien“ unterscheidet sich im Vergleich zur gesunden Gruppe, auch die Betrachtung der Pathologien untereinander zeigt keine Besonderheit auf.

### 4.1.4 AT1-AA in Abhängigkeit von der Gravidität

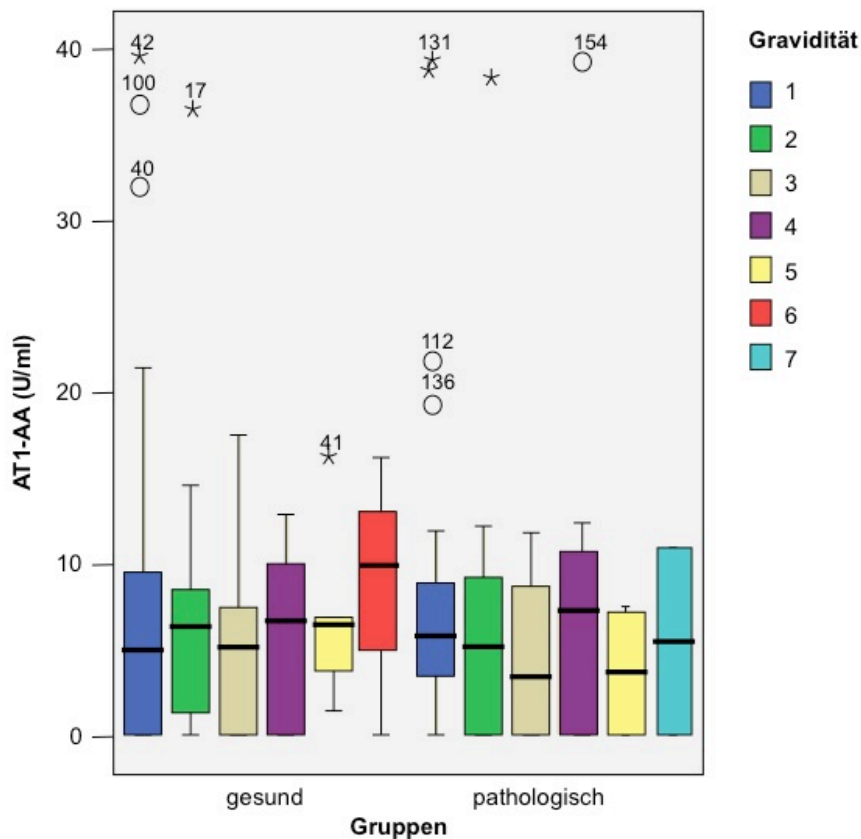
Das Risiko, eine Präeklampsie zu entwickeln ist für Frauen in der ersten Schwangerschaft am größten (Sibai, 2003). Dementsprechend wurde zuerst die durchschnittliche Anzahl der Schwangerschaften in dem jeweiligen Kollektiv berechnet. Das erkrankte Kollektiv mit durchschnittlich 2,39 Schwangerschaften ( $\pm 0,16$ ) unterschied sich nicht von dem gesunden Kollektiv mit durchschnittlich 2,39 Schwangerschaften ( $\pm 0,15$ ). Die Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung von der Anzahl der Schwangerschaften im Gesamtkollektiv, wobei deutlich wird, dass die meisten Frauen in dieser Studie eine Erstschwangerschaft hatten.

## Ergebnisse

Gravidität	Gesundes Kollektiv	Erkranktes Kollektiv	Anzahl der Frauen im Gesamtkollektiv
1	31	26	57
2	27	18	45
3	20	11	31
4	8	11	19
5	5	5	10
6	3	0	3
7	0	2	2
8	0	0	0
9	1	0	1

**Tabelle 3:** Zusammenfassung des gesunden und erkrankten Kollektivs in Abhängigkeit von der Gravidität

Als Nächstes erfolgte die Untersuchung des Gesamtkollektivs auf einen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und der Anzahl der Schwangerschaften. Dabei ergibt die statistische Berechnung allerdings keine Signifikanz (Gesamtkollektiv  $p = 0,963$ , Kruskal-Wallis-Test; Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA des gesunden (95 Frauen) und erkrankten (73 Frauen) Kollektivs in Abhängigkeit von der Gravidität.

## Ergebnisse

Auch die isolierte Untersuchung Schwangerer mit einem gesunden Ausgang der Schwangerschaft zeigt keinen Zusammenhang mit gemessenen Werten des AT1-AA und der Anzahl der Schwangerschaften (Abb. 4 linke Seite; gesunde Schwangere,  $p=0,941$ , Kruskal-Wallis-Test). Gleiches ergibt die Untersuchung der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft, die ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Schwangerschaften und den gemessenen Werten des AT1-AA aufzeigt (Abb. 4 rechte Seite; erkranktes Kollektiv,  $p=0,878$ , Kruskal-Wallis-Test).

### 4.1.5 AT1-AA in Abhängigkeit von der Parität

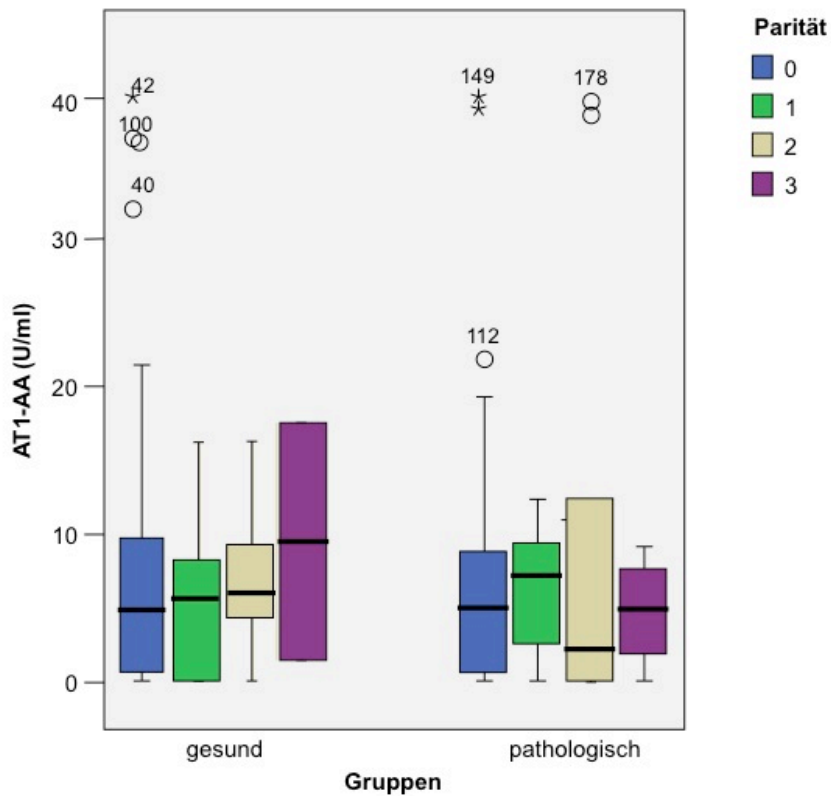
Als bekannter Risikofaktor, eine Präeklampsie zu entwickeln, gilt die Nulliparität (Sibai, 2003). Im Rahmen der klinischen Studie erfolgte zuerst die Berechnung der Anzahl der durchschnittlichen Geburten im gesunden und im erkrankten Kollektiv. Dabei zeigt sich, dass sich die Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft mit durchschnittlich  $0,67 (\pm 0,11)$  Geburten nicht von den gesunden Frauen mit  $0,76 (\pm 0,09)$  Geburten unterscheidet. Die Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der Anzahl der Geburten im Gesamtkollektiv.

Parität	gesunde Schwangere	erkrankte Schwangere	Anzahl der Frauen im Gesamtkollektiv
0	41	42	85
1	42	17	61
2	9	9	18
3	2	4	6
4	0	1	1
5	0	0	0
6	1	0	1

**Tabelle 4:** Zusammenfassung des gesunden und erkrankten Kollektivs in Abhängigkeit von der Parität

Als Nächstes wurde das Gesamtkollektiv auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und der Anzahl der Geburten geprüft. Allerdings konnte die Berechnung keinen entsprechenden Hinweis liefern (Gesamtkollektiv  $p=0,676$ , Kruskal-Wallis-Test; Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse



**Abbildung 5:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in der gesunden (95 Frauen) und erkrankten (73 Frauen) Gruppe in Abhängigkeit von der Parität. Viert-, Fünft- und Sechstpara mit  $N \leq 1$  sind nicht aufgeführt.

Auch die Untersuchung Schwangerer mit einem gesunden Ausgang der Schwangerschaft zeigt keinen Zusammenhang mit gemessenen Werten des AT1-AA und der Anzahl der Geburten (Abb. 5 linke Seite; gesunde Schwangere,  $p = 0,584$ , Kruskal-Wallis-Test). Gleiches wird deutlich bei der Untersuchung der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft (Abb. 5 rechte Seite; erkrankte Schwangere,  $p = 0,440$ , Kruskal-Wallis-Test).

### 4.1.6 AT1-AA in Abhängigkeit vom Alter der Mutter

Innerhalb der klinischen Studie wurde zuerst das Durchschnittsalter des gesunden und des erkrankten Kollektivs berechnet. In der klinischen Studie unterscheidet sich das Durchschnittsalter der gesunden Frauen mit 33,8 Jahren ( $\pm 0,5$ ) nicht von dem durchschnittlichen Alter des erkrankten Kollektivs mit 34,4 Jahren ( $\pm 0,61$ ). Als Nächstes wurde das Alter der Frauen in Bezug auf die jeweils entwickelte Pathologie untersucht (Tabelle 5). Dabei zeigt sich, dass die

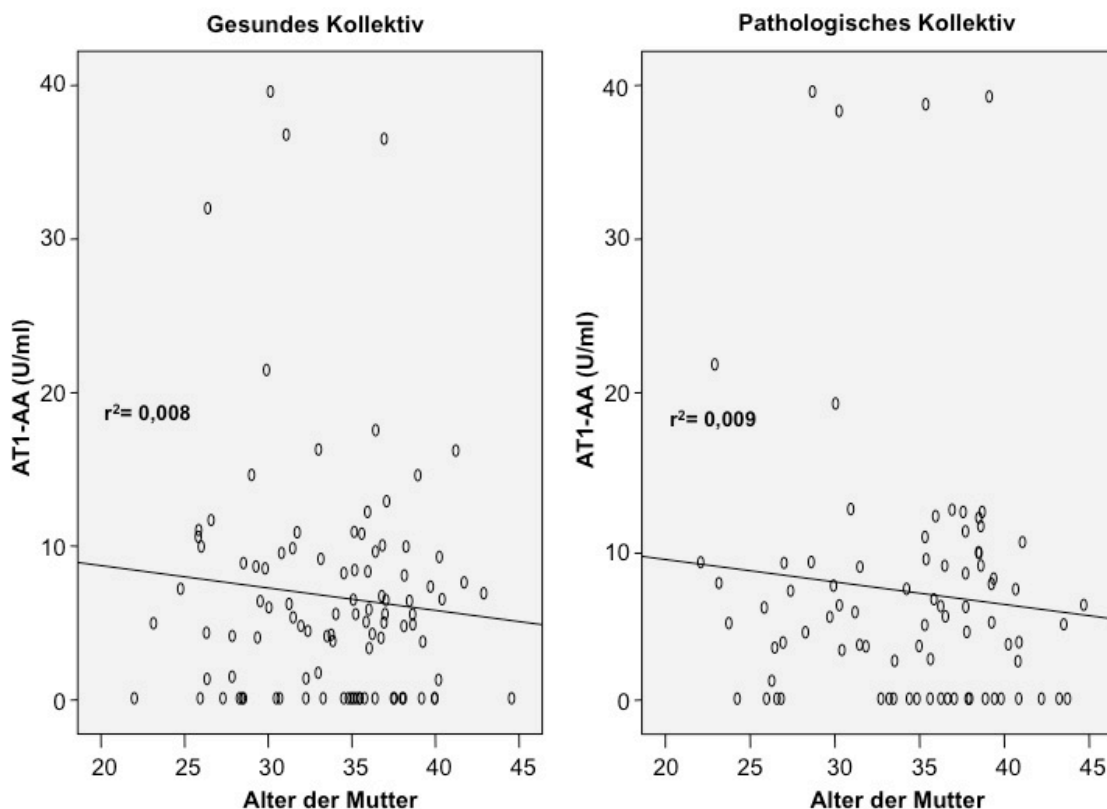
## Ergebnisse

Frauen, die einen essentiellen arteriellen Hypertonus hatten oder eine Präeklampsie entwickelten, mit 37 Jahren deutlich älter waren, als die Frauen in anderen Kollektiven.

Pathologie/Abschlussdiagnose	Durchschnittsalter der Frauen (in Jahren)
Gesunde Frauen	33,4
Essentieller arterieller Hypertonus	37,5
Gestationshypertonus	32,86
Präeklampsie	37,16
HELLP-Syndrom	32,45
Gestationsdiabetes	33,98

**Tabelle 5:** Überblick des Durchschnittsalters der Frauen in Bezug auf die jeweilige schwangerschaftsassozierte Pathologie.

Auch die Korrelationsanalyse des Gesamtkollektivs zeigt keinen Zusammenhang zwischen dem Alter der Mutter und den gemessenen Werten für den Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor (Gesamtkollektiv  $p=0,990$ , Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 6:** Korrelationsanalyse der gemessenen Werte für den AT1-AA in der gesunden Gruppe, N= 95 (linke Abb.) und der erkrankten Gruppe, N= 73 (rechte Abb.) in Abhängigkeit vom Alter der Mutter.

Als Nächstes folgte die getrennte Betrachtung des gesunden und des erkrankten Kollektivs. Das Alter der gesunden Schwangeren korreliert ebenfalls nicht mit den gemessenen Werten

des AT1-AA und dem Alter der Mutter (Abb. 6 linke Seite,  $r^2= 0,008$ ,  $p= 0,553$ ). Gleiches ergab die Korrelationsanalyse der Frauen mit einem pathologischem Ausgang der Schwangerschaft (Abb. 6 rechte Seite,  $r^2= 0,009$ ,  $p= 0,596$ ).

#### 4.1.7 AT1-AA in Abhängigkeit vom Zigarettenrauchen

In den letzten Jahren durchgeführte Studien konnten zeigen, dass das Rauchen von Zigaretten das Risiko, eine PE zu entwickeln, um 30 – 40 % reduziert (Conde-Agudelo und Belizan, 2000). Im Rahmen der klinischen Studie wurde deshalb besonderes Augenmerk auf das Rauchen zum Zeitpunkt der Untersuchung gerichtet. Die Tabelle 6 zeigt eine Zusammenfassung der Anzahl der Raucherinnen und Nichtraucherinnen im Gesamtkollektiv.

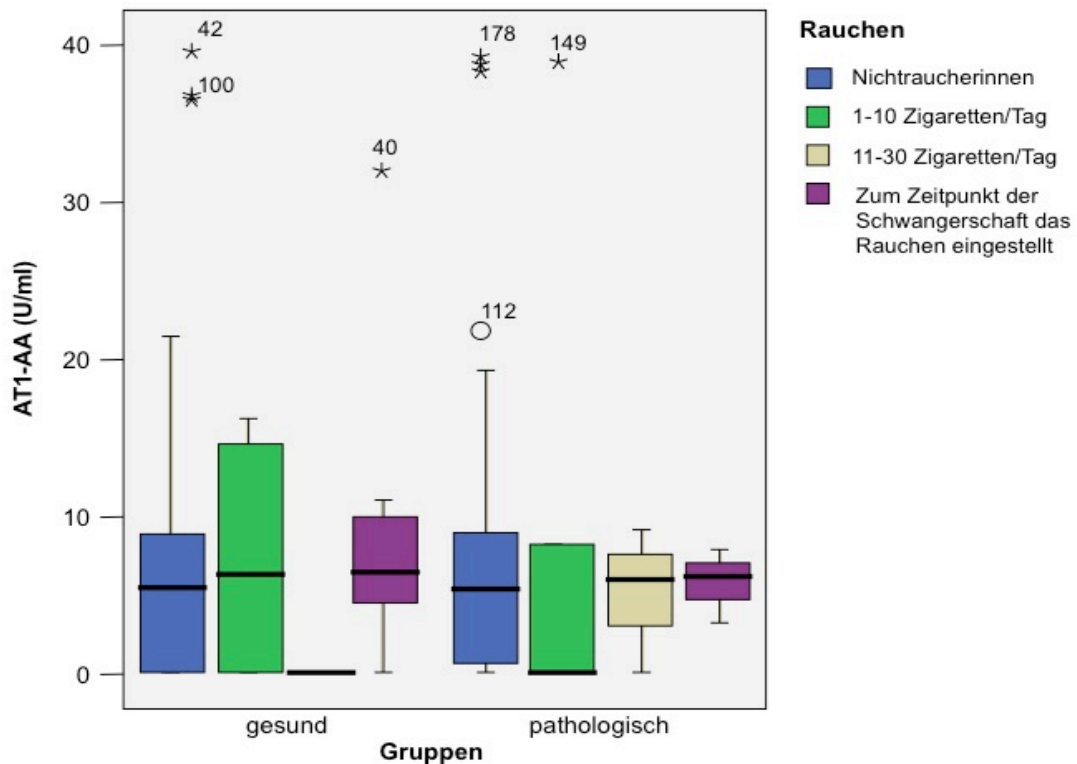
Anamnese	Anzahl der Frauen im Gesamtkollektiv	gesunde Frauen	erkrankte Frauen
Kein Zigarettenkonsum	140	77	63
1 - 10 Zigaretten/Tag	11	6	5
11 - 30 Zigaretten/Tag	3	1	2
Zum Zeitpunkt des Bekanntwerdens der Schwangerschaft den Konsum eingestellt	15	12	3

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der erkrankten und der gesunden Raucherinnen und Nichtraucherinnen im Gesamtkollektiv.

Bei genauerer Betrachtung der 14 aktiven Raucherinnen im Gesamtkollektiv zeigten 7 Frauen einen gesunden und 7 weitere einen pathologischen Ausgang der Schwangerschaft. Von 7 Frauen mit pathologischem Ausgang der Schwangerschaft entwickelten 4 Frauen einen Gestationsdiabetes und 3 Frauen einen Gestationshypertonus. Von den insgesamt 15 Frauen, die zum Zeitpunkt des Bekanntwerdens der Schwangerschaft den Konsum von Zigaretten einstellten, entwickelten 3 Frauen einen Gestationsdiabetes. Keine der ehemaligen und auch keine der aktiven Raucherinnen entwickelte im Verlauf der Schwangerschaft eine Präeklampsie. Als Nächstes wurde das Gesamtkollektiv mit 140 Nichtraucherinnen und 29 Raucherinnen (einschließlich der 15 ehemaligen Raucherinnen) auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und einer positiven oder negativen Anamnese in Bezug auf das Rauchen untersucht. Die statistische Berechnung konnte allerdings keinen Zusammenhang herausstellen (Gesamtkollektiv  $p= 0,836$ , Kruskal-Wallis-Test; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich gesunder Nichtraucherinnen mit den gesunden Raucherinnen konnte ebenfalls keinen Zusammenhang aufzeigen (alle gesunden Nichtraucherinnen vs. alle gesunden Raucherinnen:  $p= 0,441$ , Kruskal-Wallis-Test, Daten nicht gezeigt). Auch die Gegenüberstellung

## Ergebnisse

der AT1-AA-Werte von erkrankten Raucherinnen zeigt im Vergleich zu Werten der kranken Nichtraucherinnen keine signifikante Veränderung der gemessenen Werte für den AT1-AA (alle erkrankten Raucherinnen vs. alle erkrankten Nichtraucherinnen:  $p = 0,828$ , Kruskal-Wallis-Test; Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 7:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in den gesunden (95 Frauen) und erkrankten (74 Frauen) Kollektiven in Abhängigkeit vom Rauchen. Es erfolgte eine Unterteilung in Subgruppen. Gesunde mit 11 - 30 Zigaretten N= 1.

Des Weiteren wurde überprüft, inwieweit die Menge der konsumierten Zigaretten im Zusammenhang mit den gemessenen Werten des AT1-AA stehen könnte. Abb. 7 zeigt die Unterteilung in die Gruppe der gesunden Schwangeren (linke Seite) und die erkrankten Schwangeren (rechte Seite) in jeweils einzelne Subgruppen: die Nichtraucherinnen, Frauen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung 1 - 10 Zigaretten oder 11 - 30 Zigaretten rauchten sowie die Schwangeren, die zum Zeitpunkt des Bekanntwerdens der Schwangerschaft den Konsum von Zigaretten eingestellt hatten. Keine der Gruppen mit pathologischem Ausgang der Schwangerschaft unterscheidet sich von der jeweiligen gesunden Gruppe, auch innerhalb der einzelnen Subgruppen des gesunden und des erkrankten Kollektivs untereinander zeigten sich keine Unterschiede.

## 4.1.8 AT1-AA in Abhängigkeit von mütterlichen Erkrankungen

### 4.1.8.1 AT1-AA in Abhängigkeit von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises

Die Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises stehen im Mittelpunkt der Betrachtung mütterlicher Erkrankungen, denn nach aktueller Studienlage gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von AT1-AA und rheumatischen Erkrankungen (Riemekasten *et al.*, 2011). Dementsprechend war es auch ein Ziel der klinischen Studie, den AT1-AA im Zusammenhang mit dem Auftreten von rheumatischen Erkrankungen zu untersuchen.

Von 177 Frauen gaben 10 Frauen anamnestisch an, unter einer der folgenden rheumatischen Erkrankungen zu leiden: Rheuma, rheumatoide Arthritis, Polyarthritits oder reaktive Arthritis. Die Tabelle 7 zeigt die Verteilung der Frauen mit und ohne rheumatische Erkrankung im gesunden und erkrankten Kollektiv sowie im Gesamtkollektiv. Von den insgesamt 82 Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft haben 2 Frauen (1,1%) eine rheumatische Erkrankung in ihrer Anamnese. Bei genauerer Betrachtung dieser beiden Frauen stellte sich heraus, dass die eine Frau eine Polyarthritits hatte und im Verlauf der Schwangerschaft einen Gestationsdiabetes entwickelte. Die andere Frau litt unter Rheuma und diversen Allergien (Spezifizierung des Rheumas war nicht möglich) und entwickelte ein HELLP-Syndrom. Sie brachte ein gesundes Kind bereits in der 33. SSW zur Welt. Die Tabelle 7 fasst die Anzahl der Rheumatikerinnen und Nichtrheumatikerinnen im gesunden und erkrankten Kollektiv zusammen.

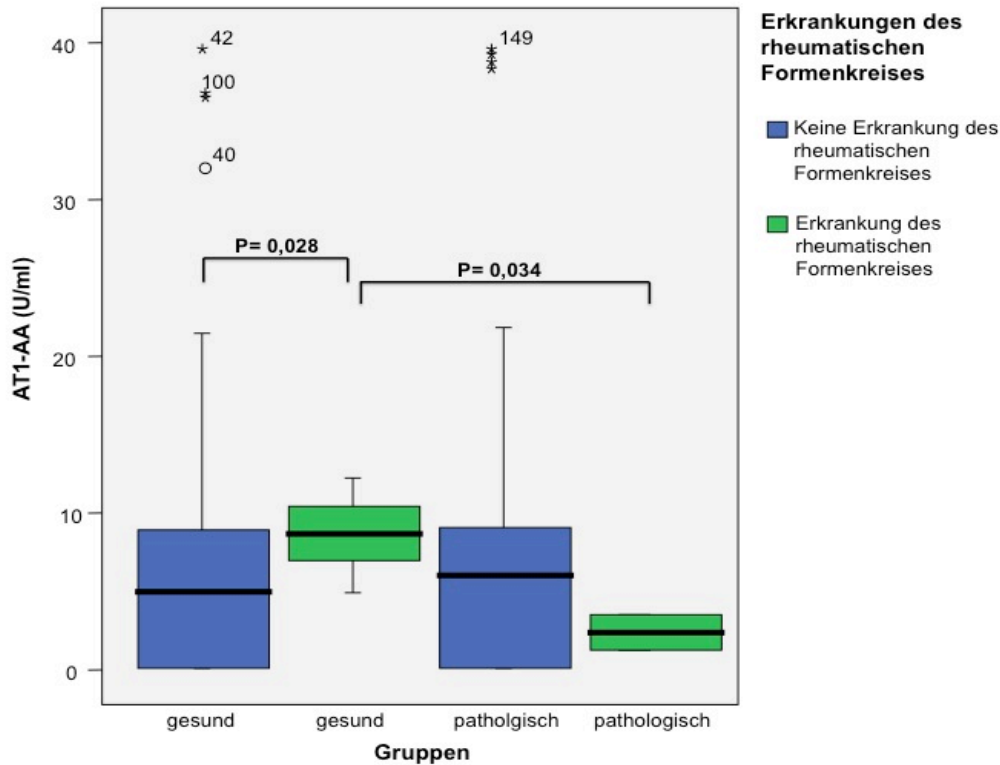
Anamnese	Frauen im Gesamtkollektiv (% vom Gesamtkollektiv)	Frauen mit gesundem Ausgang der Schwangerschaft (% vom Gesamtkollektiv)	Frauen mit pathologischem Ausgang der Schwangerschaft (% vom Gesamtkollektiv)
Keine rheumatische Erkrankung	167 (94,4 %)	87 (49,2 %)	80 (45,2 %)
rheumatische Erkrankung	10 (5,6 %)	8 (4,5 %)	2 (1,1 %)

**Tabelle 7:** Überblick über die Anzahl der erkrankten und gesunden Frauen mit und ohne rheumatische Vorerkrankung.

Als Nächstes erfolgte die Untersuchung des Gesamtkollektivs auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und einer Erkrankung des rheumatischen Formenkreises. Die Berechnung erbrachte keine Signifikanz (Gesamtkollektiv  $p=0,28$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt).



## Ergebnisse



**Abbildung 8:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in den gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Kollektiven in Abhängigkeit von einer rheumatischen Erkrankung.

Allerdings zeigt der Vergleich der gemessenen AT1-AA-Werte bei Schwangeren, die im weiteren Verlauf keine schwangerschaftsassozierte Erkrankung entwickelten und eine positive Anamnese für eine rheumatische Erkrankung haben im Vergleich zu Werten von den Frauen ohne Rheuma im gesunden Kollektiv, einen signifikanten Anstieg der gemessenen Werte für den AT1-AA (Abb. 8 linke Seite; alle Gesunden mit einer rheumatischen Erkrankung vs. alle Gesunden ohne rheumatische Erkrankung:  $p=0,028$ , Mann-Whitney-Test). Dieser signifikante Anstieg blieb bei den Rheumatikerinnen, die eine schwangerschaftsassozierte Erkrankung entwickelten, jedoch aus. Dementsprechend zeigte die Gegenüberstellung der Rheumatikerinnen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft signifikant niedrigere Werte des AT1-AA im Vergleich zu Rheumatikerinnen, die keine Pathologie entwickelten (Abb. 8 grüne Farbmarkierung; alle Rheumatikerinnen mit gesundem Ausgang der Schwangerschaft vs. alle Rheumatikerinnen mit pathologischem Ausgang der Schwangerschaft:  $p=0,34$ , Mann-Whitney-Test). Die Betrachtung der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft, mit oder ohne rheumatischer Grunderkrankung, zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 8 rechte Seite; erkranktes Kollektiv mit Rheuma vs. erkranktes Kollektiv ohne Rheuma:  $p=0,403$ , Mann-Whitney-Test).

#### 4.1.8.2 AT1-AA in Abhängigkeit von Allergien

Es gibt Hinweise darauf, dass Frauen mit einer positiven Anamnese für Allergien ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie haben. Insbesondere eine Studie im Jahr 2008 von Eskild *et al.* zeigte, dass Frauen mit einer nachgewiesenen hohen Konzentration von IgE im ersten und zweiten Trimester der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko haben, eine Präeklampsie zu entwickeln (Eskild *et al.*, 2008). Im Rahmen der klinischen Studie sollte deshalb ein Zusammenhang zwischen gemessenen Werten für den AT1-AA und einer positiven Anamnese für Allergien herausgearbeitet werden. Von den insgesamt 177 Frauen gaben 23 Frauen an, unter einer oder mehrerer Allergien zu leiden (Tabelle 8).

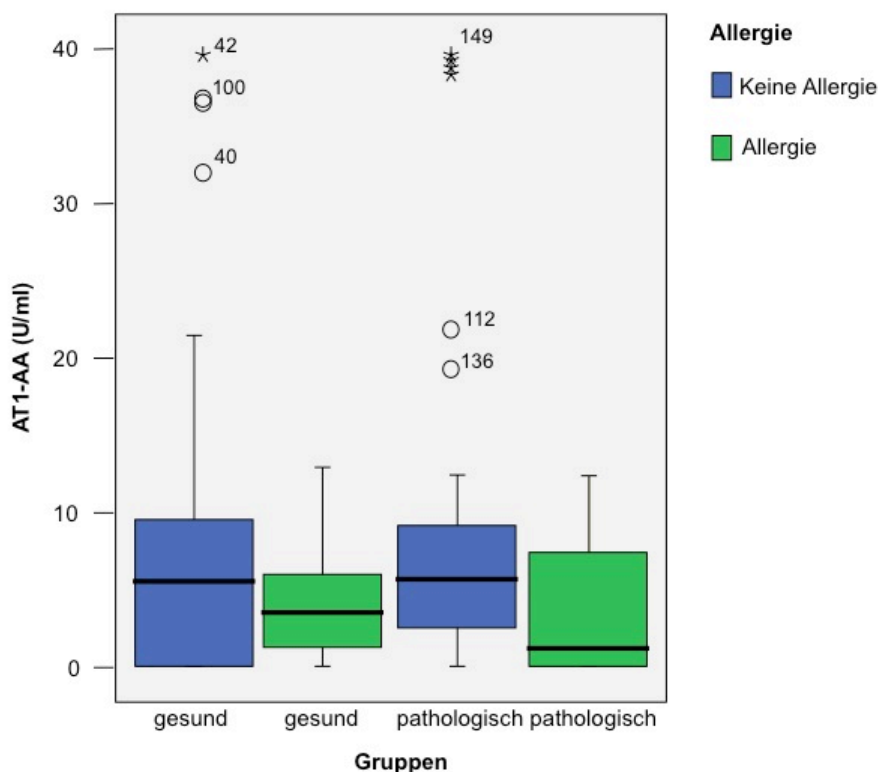
Anamnese	Frauen im Gesamtkollektiv (% vom Gesamtkollektiv)	Frauen mit gesundem Ausgang der Schwangerschaft (% vom Gesamtkollektiv)	Frauen mit pathologischem Ausgang der Schwangerschaft (% vom Gesamtkollektiv)
Keine Allergie	154 (87 %)	85 (48 %)	69 (39 %)
Allergie	23 (13 %)	10 (5,6 %)	13 (7,3 %)

**Tabelle 8:** Überblick über die Anzahl der Allergikerinnen und Nichtallergikerinnen im gesunden und erkrankten Kollektiv sowie deren Anteil am Gesamtkollektiv.

Zuerst wurde das Gesamtkollektiv auf einen Zusammenhang zwischen gemessenen Werten für den AT1-AA und der positiven Anamnese für eine Allergie untersucht, doch ein Hinweis darauf konnte nicht gefunden werden (Vergleich der Schwangeren mit Allergien vs. aller Schwangeren ohne Allergien:  $p=0,070$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt).

Auch der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Allergien mit den Gesunden, die unter Allergien leiden, konnte keinen Zusammenhang mit gemessenen Werten für den AT1-AA aufzeigen (Abb. 9 linke Seite, alle Gesunden mit Allergien vs. aller Gesunden ohne Allergien  $p=0,291$ , Mann-Whitney-Test). Gleiches wird deutlich bei der Untersuchung der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft (Abb. 9 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Allergien vs. erkranktes Kollektiv ohne Allergien:  $p=0,119$ , Mann-Whitney-Test).

## Ergebnisse



**Abbildung 9:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in den gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Kollektiven in Abhängigkeit von einer Allergie.

### 4.1.8.3 AT1-AA in Abhängigkeit von Asthma bronchiale

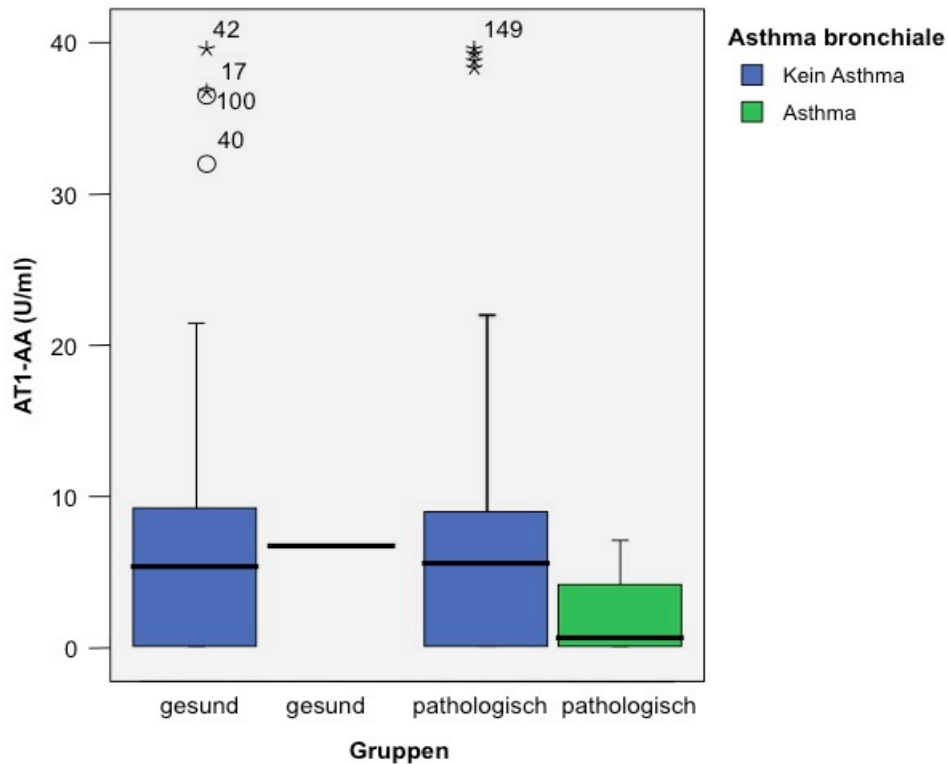
In den vergangenen Jahren untersuchten zahlreiche Studien die Erkrankung Asthma bronchiale als Risikofaktor für die Entwicklung einer Präeklampsie. Mitrshahi und seine Arbeitsgruppe konnten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie bei Schwangeren mit Asthma bronchiale herausarbeiten (Mitrshahi *et al.*, 2003). Eine Studie, die eine Korrelation zwischen dem Auftreten des AT1-AA und der Erkrankung Asthma bronchiale analysierte, gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht. Vor diesem Hintergrund wurde innerhalb der klinischen Studie das Gesamtkollektiv auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und der Erkrankung Asthma bronchiale untersucht. Die Tabelle 9 zeigt die Verteilung der Frauen mit und ohne Asthma bronchiale im gesunden und erkrankten Kollektiv.

Anamnese	Frauen im Gesamtkollektiv (% vom Gesamtkollektiv)	Frauen mit gesundem Ausgang der Schwangerschaft (% vom Gesamtkollektiv)	Frauen mit pathologischem Ausgang der Schwangerschaft (% vom Gesamtkollektiv)
Kein Asthma	172 (97,2 %)	94 (53,1 %)	78 (44,1 %)
Asthma	5 (2,8 %)	1 (0,6 %)	4 (2,3 %)

**Tabelle 9:** Überblick über die Anzahl der Asthmatikerinnen und Nichtasthmatikerinnen im gesunden und erkrankten Kollektiv sowie deren Anteil am Gesamtkollektiv.

## Ergebnisse

Einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Erkrankung Asthma bronchiale und gemessener Werte für den AT1-AA gab es letztlich nicht (Vergleich aller Schwangeren mit Asthma vs. aller Schwangeren ohne Asthma:  $p=0,524$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 10:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in den gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Kollektiven in Abhängigkeit vom Asthma bronchiale.

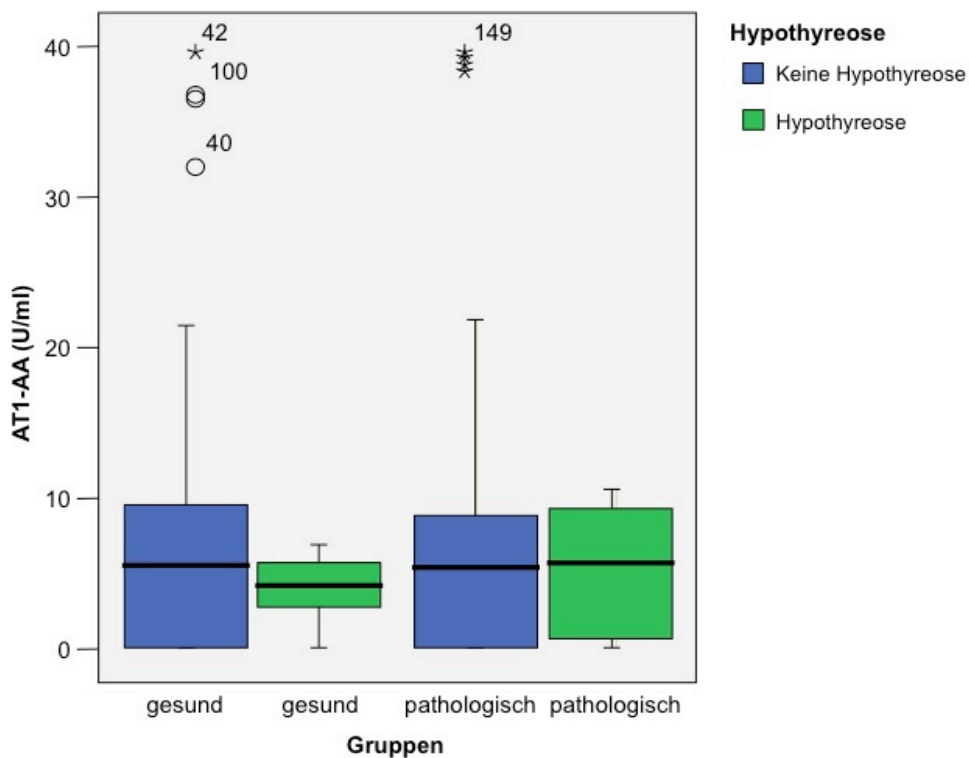
Auch der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Asthma bronchiale mit den Gesunden, die unter Asthma leiden, konnte keinen Zusammenhang aufzeigen, wobei an dieser Stelle darauf hingewiesen werden muss, dass dieses Ergebnis auf Grund der zu kleinen Gruppengröße  $N=1$  keine statistische Berechnung erlaubt (Abb. 10 linke Seite, alle Gesunden mit Asthma vs. aller Gesunden ohne Asthma:  $p=0,747$ , Mann-Whitney-Test). Gleiches wird deutlich bei der Untersuchung der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft. Auch wenn auf den ersten Blick (Abb. 10) die Werte für den AT1-AA bei Asthmatikerinnen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft niedriger zu sein scheinen als bei Frauen ohne Asthma, ist der Unterschied nicht signifikant (Abb. 10 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Asthma vs. erkranktes Kollektiv ohne Asthma:  $p=0,326$ , Mann-Whitney-Test).

#### 4.1.8.4 AT1-AA in Abhängigkeit von Hypothyreose

Im Jahr 2012 konnten Wilson und seine Arbeitsgruppe bei schwangeren Frauen mit einer Hypothyreose ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie feststellen (Wilson *et al.*, 2012). Innerhalb der klinischen Studie hatten 14 Frauen eine Hypothyreose, wobei 7 Frauen im weiteren Verlauf eine schwangerschaftsassozierte Pathologie entwickelten. Die anderen 7 Frauen hingegen hatten einen unkomplizierten Schwangerschaftsverlauf. Die Tabelle 10 zeigt einen Überblick schwangerer Frauen mit und ohne Hypothyreose im gesunden und erkrankten Kollektiv.

Anamnese	Frauen im Gesamtkollektiv (% vom Gesamtkollektiv)	Frauen mit gesundem Ausgang der Schwangerschaft (% vom Gesamtkollektiv)	Frauen mit pathologischem Ausgang der Schwangerschaft (% vom Gesamtkollektiv)
Keine Hypothyreose	163 (92,1 %)	88 (49,7 %)	75 (42,4 %)
Hypothyreose	14 (7,9 %)	7 (4 %)	7 (4 %)

**Tabelle 10:** Überblick über die Anzahl der Frauen mit und ohne Hypothyreose im gesunden und erkrankten Kollektiv sowie deren Anteil am Gesamtkollektiv.



**Abbildung 11:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in den gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Kollektiven in Abhängigkeit von der Hypothyreose.

Die Untersuchung des Gesamtkollektivs auf einen möglichen Zusammenhang gemessener

## Ergebnisse

Werte für den AT1-AA und der Erkrankung Hypothyreose ergab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang (Vergleich der Schwangeren mit Hypothyreose vs. aller Schwangeren ohne Hypothyreose  $p=0,490$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Hypothyreose mit den Gesunden die unter Hypothyreose leiden, konnte keinen Zusammenhang aufzeigen (Abb. 11 linke Seite, alle Gesunden mit Hypothyreose vs. aller Gesunden ohne Hypothyreose:  $p=0,432$ , Mann-Whitney-Test). Gleiches wird deutlich bei der Untersuchung der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft (Abb. 11 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Hypothyreose vs. erkranktes Kollektiv ohne Hypothyreose:  $p=0,895$ , Mann-Whitney-Test).

### 4.1.8.5 AT1-AA in Abhängigkeit vom essentiellen arteriellen Hypertonus

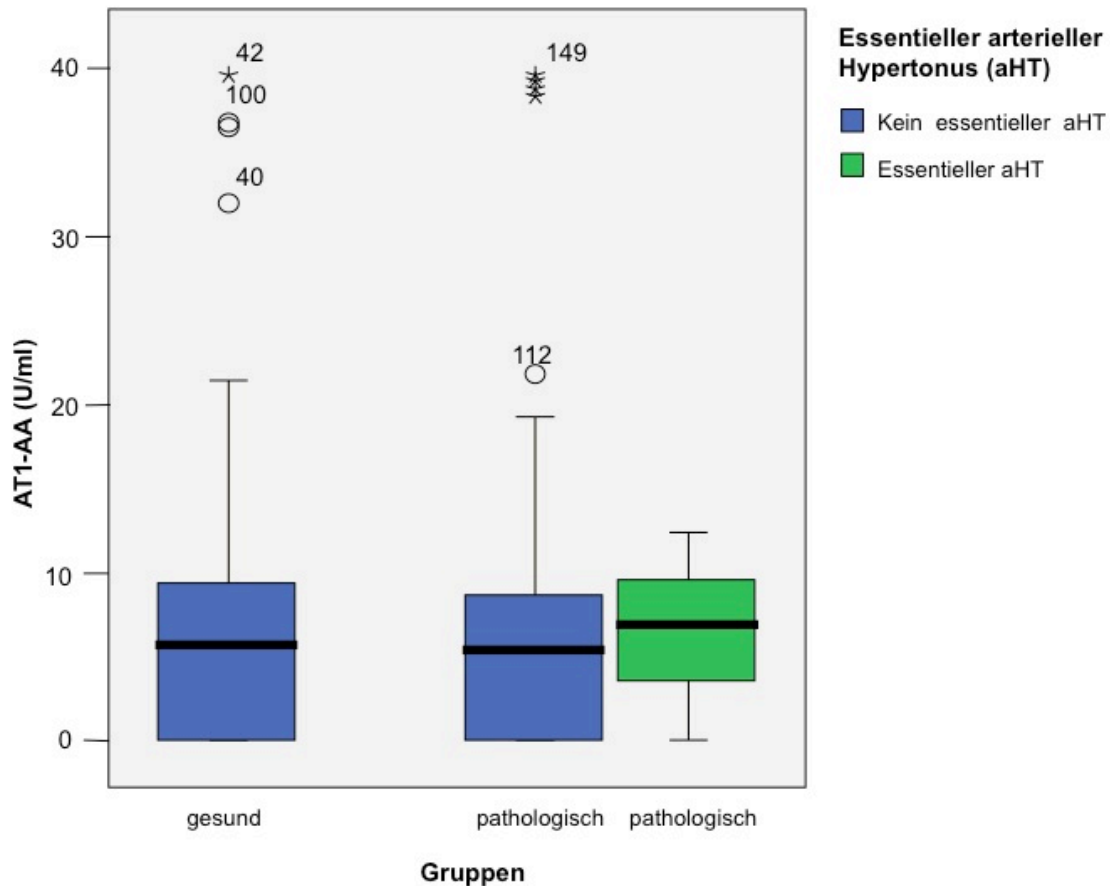
In den letzten Jahren wurden weltweit zahlreiche Studien durchgeführt, die den essentiellen arteriellen Hypertonus als Risikofaktor für die Entwicklung einer Präeklampsie identifizierten. Die im Jahr 2012 von Aksornphusitaphong und Phupong veröffentlichte Studie bestätigt diese Grundannahme (Aksornphusitaphong und Phupong, 2012). Die Tabelle 11 zeigt einen Überblick von schwangeren Frauen mit und ohne essentiellen arteriellen Hypertons im Gesamtkollektiv sowie den Anteil der Hypertonikerinnen im erkrankten Kollektiv.

Anamnese	Frauen im Gesamtkollektiv (% vom Gesamtkollektiv)	Frauen mit pathologischem Ausgang der Schwangerschaft (% vom Gesamtkollektiv)
Kein aHT	164 (92,66 %)	69 (38,98 %)
aHT	13 (7,34 %)	13 (7,34 %)

**Tabelle 11:** Überblick über die Anzahl der Frauen mit und ohne essentiellen aHT im Gesamtkollektiv sowie der Anteil der Hypertonikerinnen im erkrankten Kollektiv.

Innerhalb der klinischen Studie wurde zuerst das Gesamtkollektiv hinsichtlich gemessener Werte für den AT1-AA und dem essentiellen arteriellen Hypertonus (aHT) untersucht und konnte dabei keinen Hinweis auf einen Zusammenhang herausstellen (Vergleich der essentiellen arteriellen Hypertonikerinnen vs. aller Schwangeren ohne essentiellen aHT:  $p=0,202$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse



**Abbildung 12:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in den gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Kollektiven in Abhängigkeit vom essentiellen arteriellen Hypertonus.

Auch innerhalb des erkrankten Kollektivs zeigt der Vergleich der AT1-AA-Werte von Hypertonikerinnen mit Schwangeren ohne einen essentiellen arteriellen Hypertonus keinen signifikanten Anstieg der gemessenen Werte für den AT1-AA (Abb. 12 rechte Seite, Kollektiv mit essentiellm aHT vs. erkranktes Kollektiv ohne essentiellen aHT:  $p=0,586$ , Mann-Whitney-Test).

### 4.1.8.6 AT1-AA in Abhängigkeit von Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus wurde bereits mehrfach als möglicher Risikofaktor für die Entwicklung einer Präeklampsie beschrieben (Sibai, 2003; Duckitt und Harrington, 2005). Im Rahmen der klinischen Studie wurde der Diabetes mellitus und die Entwicklung eines Gestationsdiabetes in Abhängigkeit von gemessenen Werten für den AT1-AA beurteilt. Die Tabelle 12 zeigt einen Überblick über die Anzahl der Frauen mit Diabetes mellitus im gesunden und erkrankten Kollektiv sowie die Anzahl der Gestationsdiabetikerinnen und der Frauen mit einer positiven Familienanamnese für Diabetes mellitus. Wie bereits zu Beginn beschrieben, wird der Gesta-

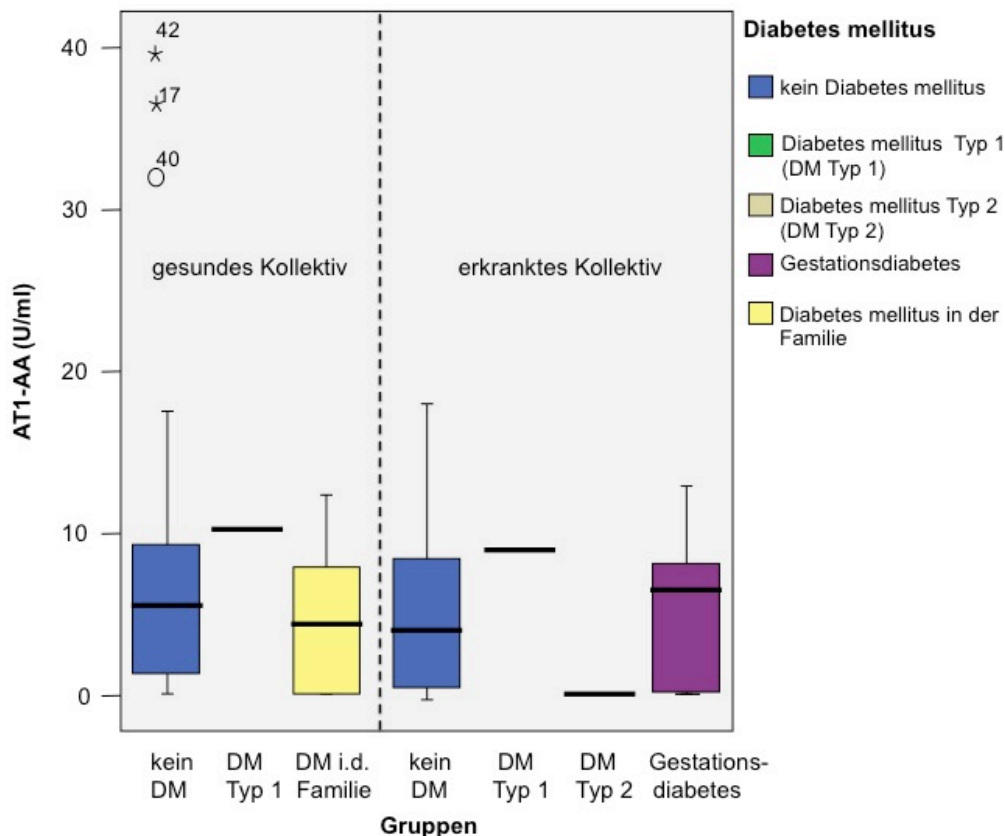
## Ergebnisse

tionsdiabetes im Rahmen der klinischen Studie als pathologischer Ausgang der Schwangerschaft gewertet.

Anamnese	Anzahl der Frauen im Gesamtkollektiv	Anzahl der gesunden Frauen	Anzahl der erkrankten Frauen
Kein Diabetes mellitus	136	89	47
Diabetes Typ 1	2	1	1
Diabetes Typ 2	1	0	1
Gestationsdiabetes	33	0	33
Diabetes mellitus in der Familie	5	5	0

**Tabelle 12:** Überblick über die Anzahl der gesunden und erkrankten Schwangeren mit und ohne Diabetes mellitus.

Als Nächstes wurde das Gesamtkollektiv auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und den Erkrankungen Diabetes mellitus, Gestationsdiabetes sowie einer positiven Familienanamnese für den Diabetes mellitus untersucht.



**Abbildung 13:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA des gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Kollektivs in Abhängigkeit vom Diabetes mellitus. Gesundes und erkranktes Kollektiv mit DM Typ 1 N= 1, gesundes und erkranktes Kollektiv mit DM Typ 2 N≤ 1, erkranktes Kollektiv mit Gestationsdiabetes N< 1.



## Ergebnisse

Die Untersuchung ergab allerdings keinen Hinweis auf einen signifikanten Zusammenhang (Vergleich der Diabetikerinnen, Gestationsdiabetikerinnen und Frauen mit einer positiven Anamnese für den Diabetes mellitus vs. aller Schwangeren ohne Diabetes mellitus:  $p=0,202$ , Kruskal-Wallis-Test; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Diabetes mellitus und ohne positive Familienanamnese für einen Diabetes mellitus mit dem gesunden Kollektiv mit Diabetes mellitus oder einer positiven Familienanamnese für einen Diabetes mellitus konnte ebenfalls keinen Zusammenhang aufzeigen (Abb. 13, alle Gesunden mit Diabetes mellitus oder einer positiven Familienanamnese vs. gesundes Kollektiv ohne Diabetes mellitus oder negativer Familienanamnese:  $p=0,827$ , Kruskal-Wallis-Test). Gleiches wird deutlich bei der Untersuchung der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft (Abb. 13 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Diabetes mellitus oder Gestationsdiabetes vs. erkranktes Kollektiv ohne Diabetes mellitus oder Gestationsdiabetes:  $p=0,353$ , Kruskal-Wallis-Test).

### 4.1.9 AT1-AA in Abhängigkeit von der mütterlichen Medikamenteneinnahme

Im Folgenden sind nur Medikamente, sowie Nahrungsergänzungsmittel berücksichtigt worden, welche von mehr als 10 Frauen von den insgesamt 177 untersuchten Frauen während der Schwangerschaft eingenommen wurden. Die Tabelle 13 zeigt die Anzahl der Frauen im gesunden und erkrankten Kollektiv, sowie deren Anteil am Gesamtkollektiv mit jeweiliger Medikamentenanamnese.

Medikamentenanamnese	Anzahl der Frauen im Gesamtkollektiv (% vom Gesamtkollektiv)	Anzahl der gesunden Frauen (% vom Gesamtkollektiv)	Anzahl der erkrankten Frauen (% vom Gesamtkollektiv)
Folsäure	127 (71,8 %)	71 (40,1 %)	56 (31,6 %)
Magnesium	45 (25,4 %)	22 (12,4 %)	23 (13 %)
Eisen	37 (20,9 %)	19 (10,7 %)	18 (10,2 %)
L-Thyroxin	25 (14,1 %)	11 (6,2 %)	14 (7,9 %)
Vitamine	53 (29,9 %)	29 (16,4 %)	24 (13,6 %)
Kalzium	13 (7,3 %)	5 (2,8 %)	8 (4,5 %)
Jod	27 (15,3 %)	11 (6,2 %)	16 (9 %)

**Tabelle 13:** Übersicht über die eingenommenen Medikamente von den gesunden und erkrankten Frauen sowie deren Anteil am Gesamtkollektiv.

## Ergebnisse

Medikamente, die von weniger als 10 Frauen während der Schwangerschaft eingenommen wurden, sind nicht mit in die Berechnung eingegangen. Zu diesen Medikamenten zählen folgende: Metoprolol, Progesteron, Acetylsalicylsäure, Heparin und Prednisolon.

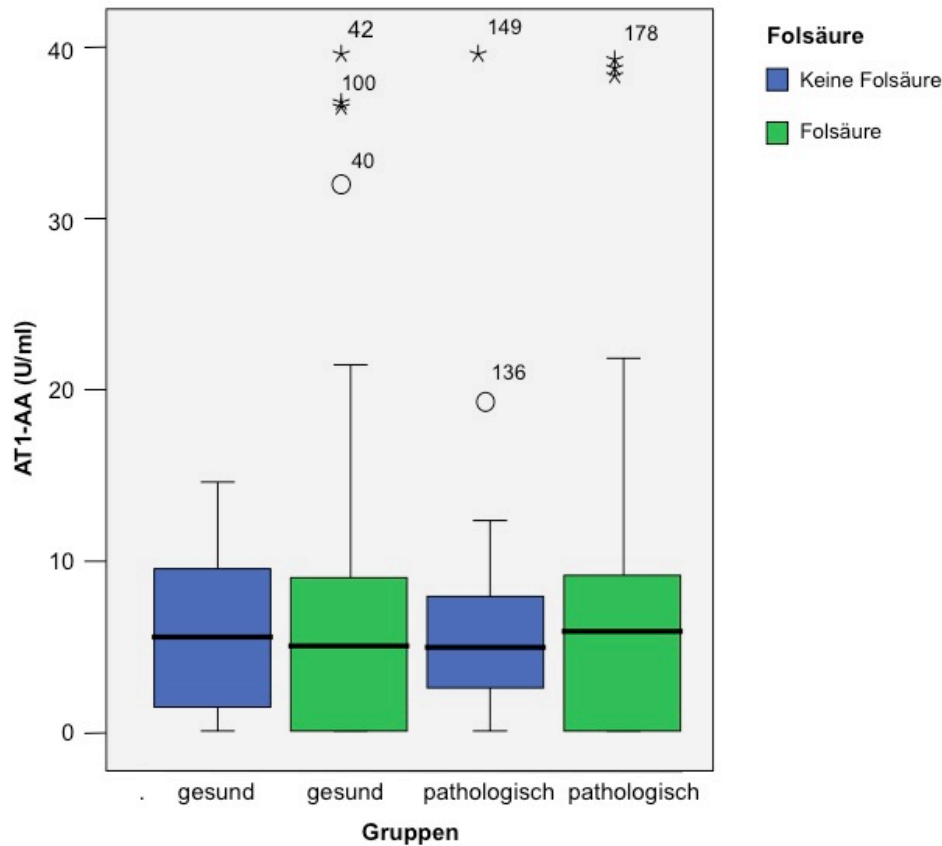
Medikamentenanamnese	Anzahl der Frauen im Gesamtkollektiv	Anzahl der gesunden Frauen	Anzahl der erkrankten Frauen
Metoprolol	1	0	1
Progesteron	5	3	2
Acetylsalicylsäure	2	1	1
Heparin	5	3	2
Prednisolon	1	0	1

**Tabelle 14:** Übersicht über die eingenommenen Medikamente von den Frauen im gesunden und erkrankten Kollektiv sowie deren Anteil am Gesamtkollektiv.

### 4.1.9.1 AT1-AA in Abhängigkeit von Folsäure

Von den insgesamt 177 untersuchten Frauen nahmen im ersten Trimester der Schwangerschaft 127 Frauen (71,8 % vom Gesamtkollektiv) Folsäure ein. Die Substitution von Folsäure wurde in zahlreichen Studien untersucht. Eine im Jahr 2011 von Frau Williams und ihren Mitarbeitern veröffentlichte Studie belegt eine erhöhte Trophoblasteninvasion unter Folsäureeinnahme in der Schwangerschaft sowie einen Einfluss auf die Angiogenese (Williams *et al.*, 2011). Interessanterweise wird wie bereits zu Beginn dieser Arbeit beschrieben, eine gestörte Trophoblasteninvasion als mögliche Ursache für die Entwicklung einer Präeklampsie diskutiert. Vor diesem Hintergrund wurde innerhalb der klinischen Studie versucht, einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Folsäure und gemessener Werte für den AT1-AA herauszuarbeiten. Die Untersuchung des Gesamtkollektivs konnte allerdings keinen möglichen Zusammenhang zwischen gemessenen Werten für den AT1-AA und Folsäuresubstitution aufzeigen (Vergleich der Schwangeren mit Folsäuresubstitution vs. aller Schwangeren ohne Folsäuresubstitution:  $p=0,899$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse



**Abbildung 14:** Überblick der gemessenen Werte für den AT1-AA im gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Kollektiv in Abhängigkeit von der Folsäureeinnahme.

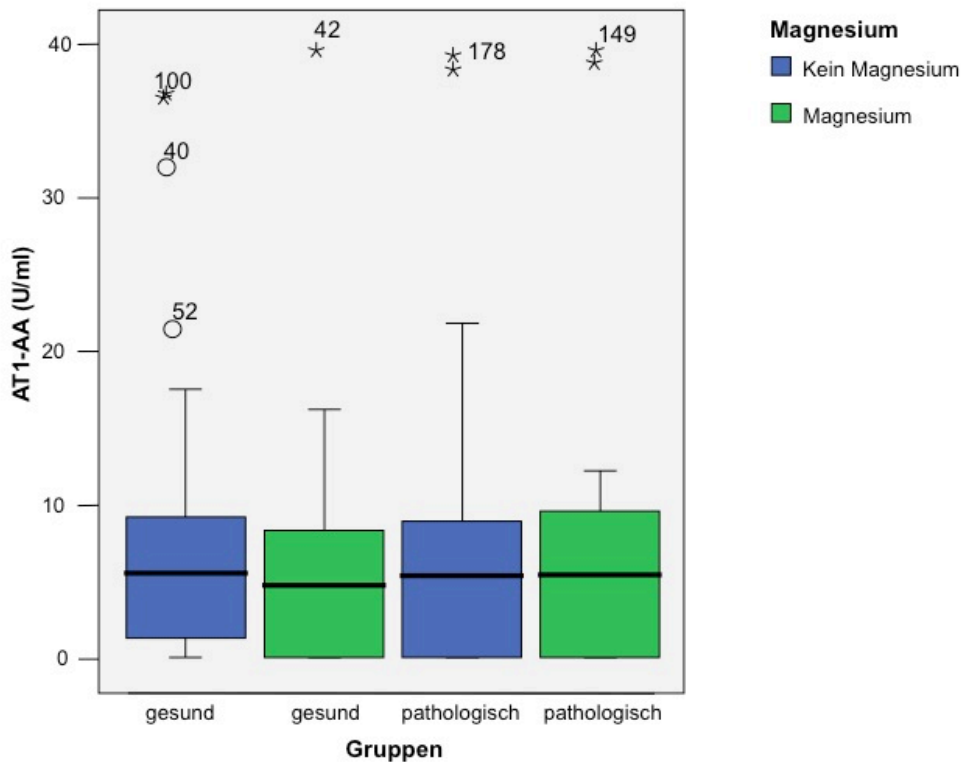
Der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Folsäuresubstitution mit den Gesunden, die Folsäure einnahmen, konnte ebenfalls keinen Zusammenhang aufzeigen (Abb. 14 linke Seite, alle Gesunden mit Folsäuresubstitution vs. erkranktes Kollektiv ohne Folsäuresubstitution:  $p=0,631$ , Mann-Whitney-Test). Gleiches wird deutlich bei der Untersuchung der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft (Abb. 14 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Folsäuresubstitution vs. erkranktes Kollektiv ohne Folsäuresubstitution:  $p=0,522$ , Mann-Whitney-Test).

### 4.1.9.2 AT1-AA in Abhängigkeit von Magnesium

Von den insgesamt 177 untersuchten Frauen nahmen 45 (25,4 % vom Gesamtkollektiv) Magnesium ein. Davon entwickelten im Verlauf der Schwangerschaft 20 Frauen eine schwangerschaftsassozierte Pathologie. Die Untersuchung des Gesamtkollektivs auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und der Einnahme von Magnesium während der Schwangerschaft ergab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang (Vergleich der Schwangeren mit Magnesiumsubstitution vs. aller Schwangeren ohne Magnesiumsubstitution:

## Ergebnisse

$p=0,633$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Magnesiumsubstitution mit den Gesunden, die Magnesium einnahmen, konnte ebenfalls keinen Zusammenhang aufzeigen (Abb. 15 linke Seite, alle Gesunden mit Magnesiumsubstitution vs. alle Gesunden ohne Magnesiumsubstitution:  $p=0,358$ , Mann-Whitney-Test).



**Abbildung 15:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in dem gesunden (95 Frauen) und erkrankten Kollektiv (82 Frauen) in Abhängigkeit von der Magnesiumeinnahme.

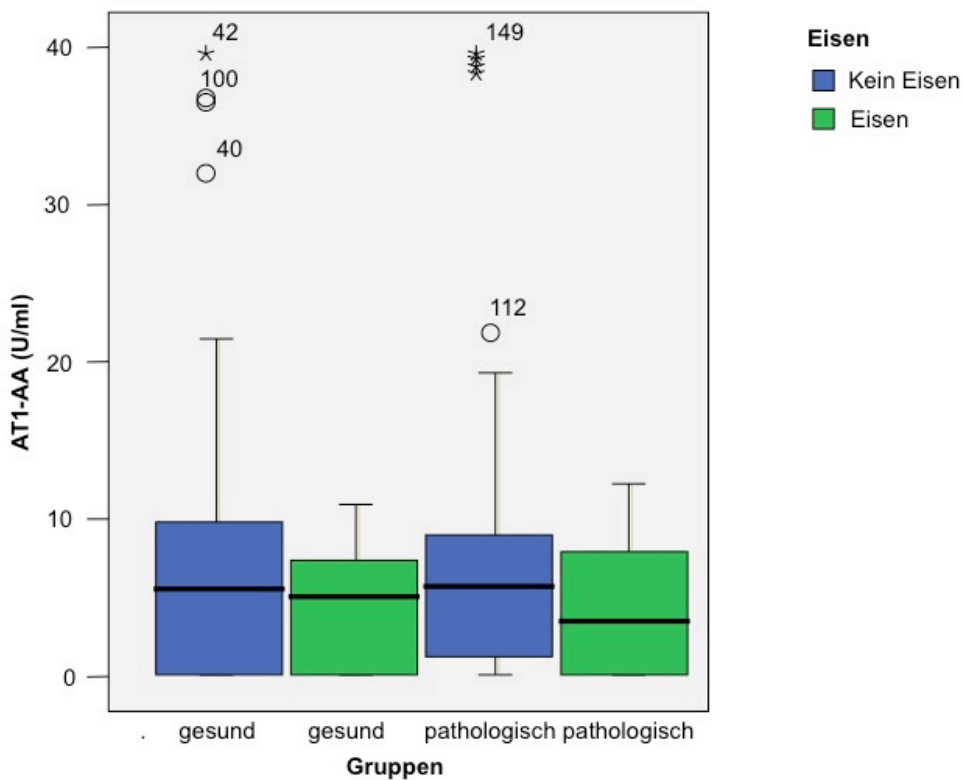
Auch der Vergleich der AT1-AA-Werte bei Schwangeren, die im weiteren Verlauf eine schwangerschaftsassozierte Erkrankung entwickelten und Magnesium substituierten im Vergleich zu Werten von dem erkrankten Kollektiv ohne Magnesiumeinnahme, zeigte keinen Anstieg oder Abfall der gemessenen Werte für den AT1-AA (Abb. 15 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Magnesiumsubstitution vs. erkranktes Kollektiv ohne Magnesiumsubstitution:  $p=0,670$ , Mann-Whitney-Test).

### 4.1.9.3 AT1-AA in Abhängigkeit von Eisen

Von 177 schwangeren Frauen nahmen insgesamt 37 Eisenpräparate zu sich. Die Untersuchung des Gesamtkollektivs auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den

## Ergebnisse

AT1-AA und der Einnahme von Eisen während der Schwangerschaft ergab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang (Vergleich der Schwangeren mit Eisensubstitution vs. aller Schwangeren ohne Eisensubstitution:  $p=0,201$ ; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Eiseneinnahme mit den Gesunden die Eisen einnahmen, konnte ebenfalls keinen Zusammenhang aufzeigen (Abb. 16 linke Seite, alle Gesunden mit Eisensubstitution vs. alle Gesunden ohne Eisensubstitution:  $p=0,275$ , Mann-Whitney-Test). Gleiches wird deutlich bei der Untersuchung des erkrankten Kollektivs (Abb. 16 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Eisensubstitution vs. erkranktes Kollektiv ohne Eisensubstitution:  $p=0,251$ , Mann-Whitney-Test).



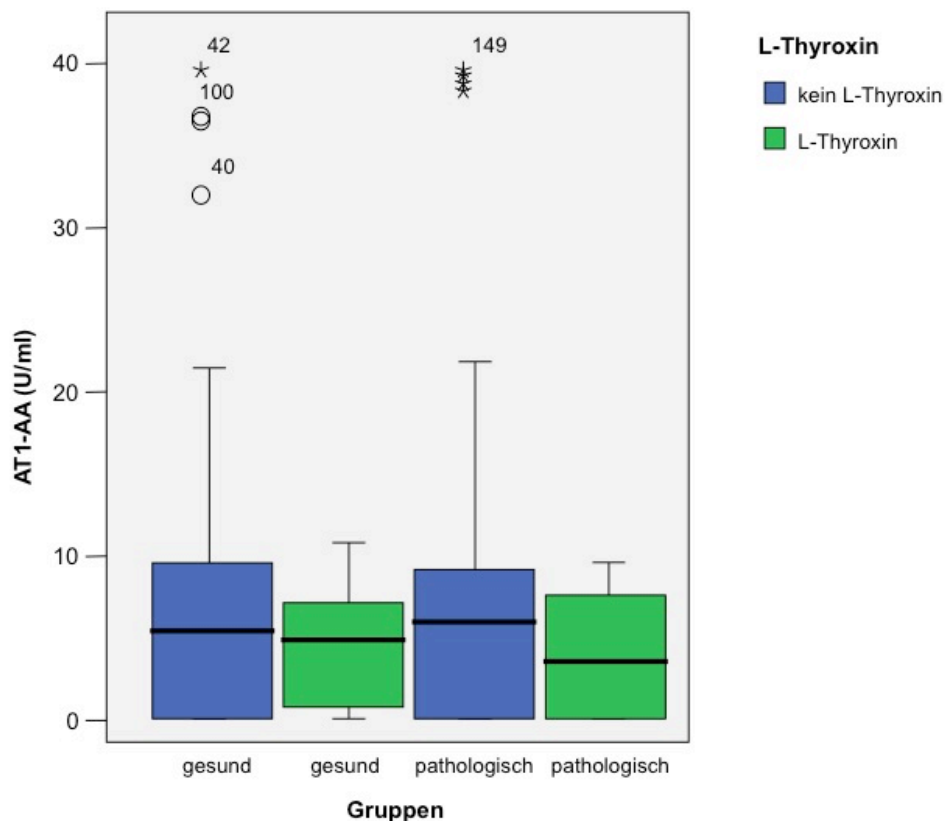
**Abbildung 16:** Überblick über gemessene Werte für den AT1-AA in dem gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Kollektiv in Abhängigkeit von der Eiseneinnahme.

### 4.1.9.4 AT1-AA in Abhängigkeit von L-Thyroxin

Von 177 untersuchten Frauen nahmen 25 im ersten Trimester der Schwangerschaft L-Thyroxin ein. Die Untersuchung des Gesamtkollektivs auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und der Einnahme von L-Thyroxin während der Schwangerschaft ergab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang (Vergleich der Schwangeren mit L-

## Ergebnisse

Thyroxin vs. aller Schwangeren ohne L-Thyroxin:  $p= 0,331$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich gesunder Schwangerer ohne L-Thyroxinsubstitution mit den Gesunden, die L-Thyroxin einnahmen, konnte ebenfalls keinen Zusammenhang aufzeigen (Abb. 17 linke Seite, alle Gesunden mit L-Thyroxin vs. alle Gesunden ohne L-Thyroxin:  $p= 502$ , Mann-Whitney-Test). Gleiches gilt für das erkrankte Kollektiv (Abb. 17 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit L-Thyroxinsubstitution vs. erkranktes Kollektiv ohne L-Thyroxinsubstitution:  $p= 0,533$ , Mann-Whitney-Test).



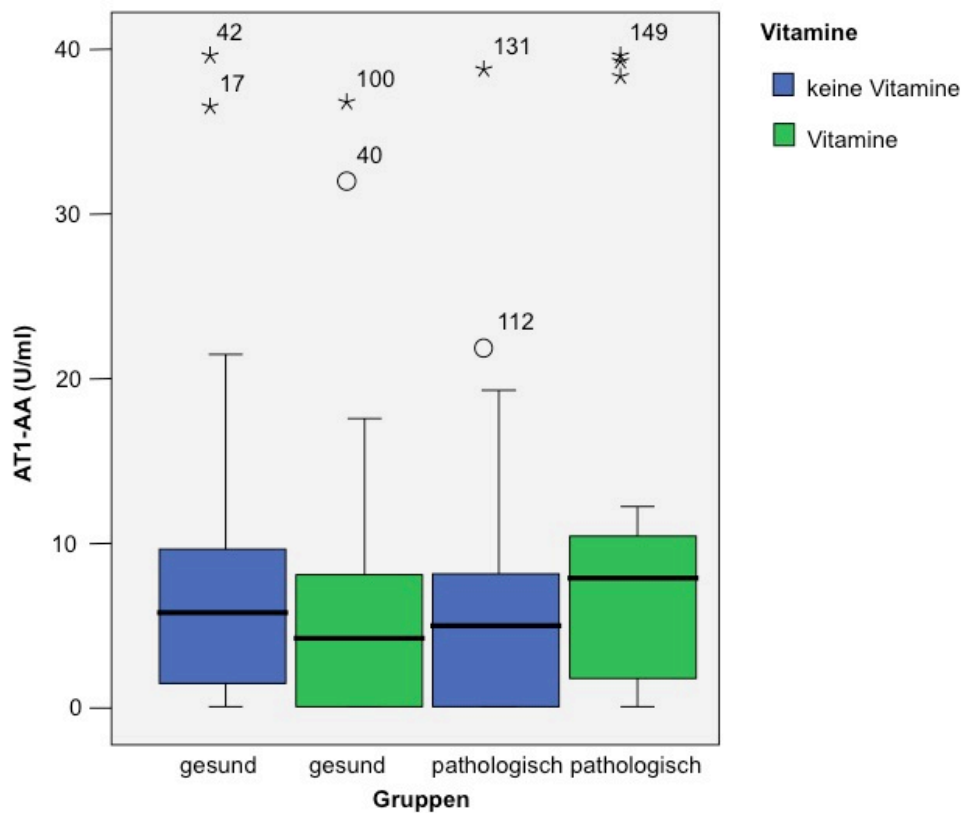
**Abbildung 17:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in dem gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Kollektiv in Abhängigkeit von der L-Thyroxineinnahme.

### 4.1.9.5 AT1-AA in Abhängigkeit von Vitaminen

Die Substitution von Vitaminen während der Schwangerschaft wurde in zahlreichen Studien hinsichtlich geeigneter Mittel zur Prävention hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen untersucht. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2011 überprüfte insbesondere die Vitamine C und E, dabei zeigte sich, dass sich diese nicht als Präventionsmaßnahme zur Vermeidung einer PE eignen (Conde-Agudelo *et al.*, 2011). Innerhalb der klinischen Studie wurde nicht zwischen

## Ergebnisse

den verschiedenen Vitamintypen unterschieden, sondern allgemein von Vitaminen gesprochen.

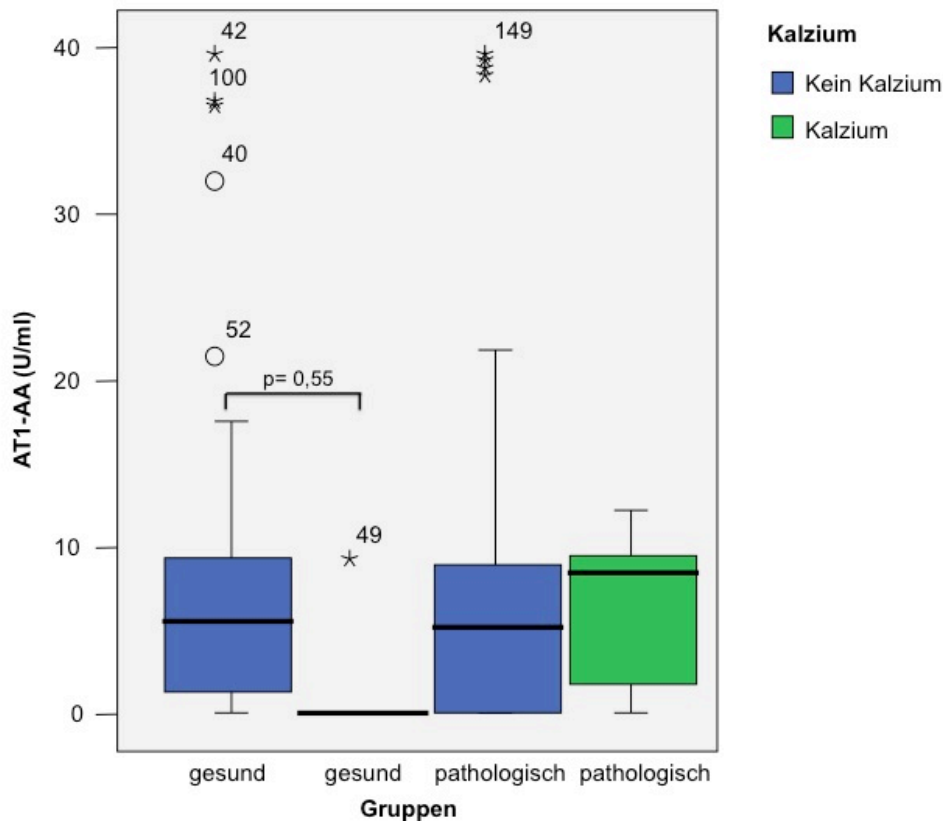


**Abbildung 18:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in der gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Gruppe in Abhängigkeit von der Vitamineinnahme.

Deshalb sind die folgenden Untersuchungsergebnisse wenig differenziert. Die Untersuchung des Gesamtkollektivs auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und der Einnahme von Vitaminpräparaten während der Schwangerschaft ergab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang (Vergleich der Schwangeren mit Vitaminsubstitution vs. aller Schwangeren ohne Vitaminsubstitution:  $p=0,881$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Vitaminsubstitution mit den Gesunden die Vitamine einnahmen, konnte ebenfalls keinen Zusammenhang aufzeigen (Abb. 18 linke Seite, alle Gesunden mit Vitaminsubstitution vs. alle Gesunden ohne Vitaminsubstitution:  $p=0,148$ , Mann-Whitney-Test). Gleiches gilt für die erkrankte Gruppe (Abb. 18 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Vitaminsubstitution vs. erkranktes Kollektiv ohne Vitaminsubstitution:  $p=0,140$ , Mann-Whitney-Test).

#### 4.1.9.6 AT1-AA in Abhängigkeit von Kalzium

In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2011 stellte sich die Substitution von Kalzium während der Schwangerschaft als ein gut geeignetes Mittel zur Prävention von Gestationshypertonus und Präeklampsie heraus (Imdad *et al.*, 2011).



**Abbildung 19:** Überblick über die gemessenen Werte für den AT1-AA in der gesunden (95 Frauen) und erkrankten (82 Frauen) Gruppe in Abhängigkeit von der Kalziemeinnahme.

Die Untersuchung des Gesamtkollektivs auf einen möglichen Zusammenhang gemessener Werte für den AT1-AA und der Einnahme von Kalzium während der Schwangerschaft ergab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang (Vergleich der Schwangeren mit Kalziumsubstitution vs. aller Schwangeren ohne Kalziumsubstitution:  $p= 0,675$ , Mann-Whitney-Test; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich gesunder Schwangerer mit und ohne Kalziumsubstitution zeigt, dass die Werte des AT1-AA bei den gesunden Schwangeren unter Kalziumsubstitution tendenziell niedriger sind als die gemessenen Werte bei gesunden Frauen ohne Kalziumsubstitution (Abb. 19 linke Seite, alle Gesunden mit Kalziumsubstitution vs. alle Gesunden ohne Kalziumsubstitution:  $p= 0,055$ , Mann-Whitney-Test). Im Gegensatz dazu zeigt der Vergleich der AT1-AA-Werte von Schwangeren, die im weiteren Verlauf eine schwangerschaftsassozierte Erkrankung entwickelten, keine Abhängigkeit von der Kalziumsubstitution (Abb. 19 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Kalziumsubstitution vs. erkranktes Kollektiv ohne Kalzi-

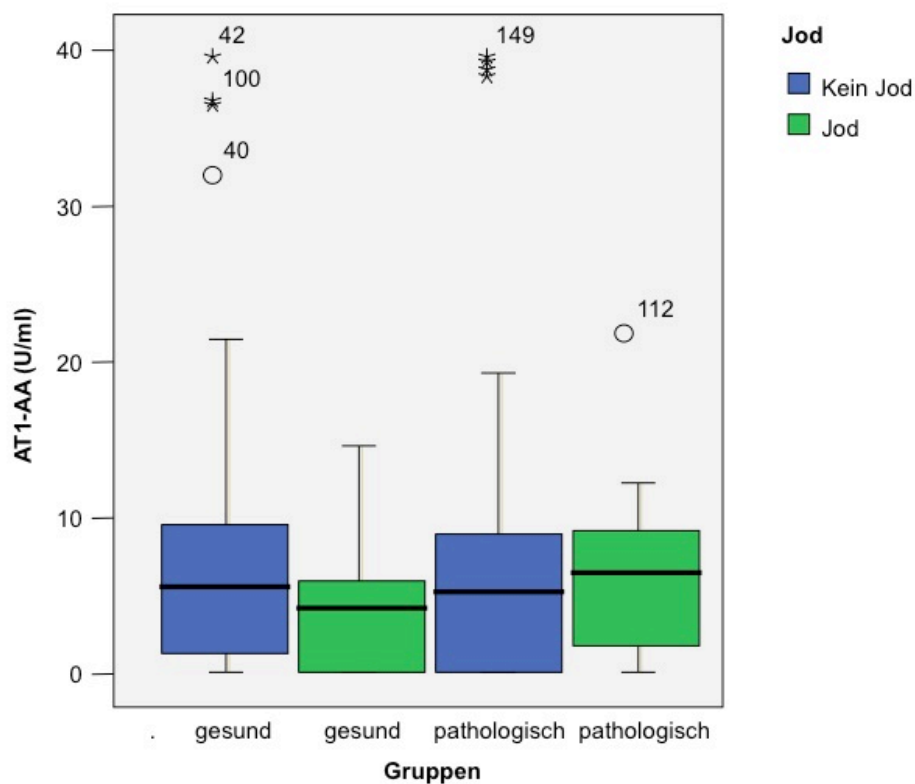


## Ergebnisse

umsubstitution:  $p=0,285$ , Mann-Whitney-Test). Darüber hinaus lässt die Abb. 19 auf den ersten Blick vermuten, dass Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft unter Kalziumsubstitution höhere Werte für den gemessenen AT1-AA aufweisen als die gesunden Schwangeren unter Kalziumsubstitution. Doch die statistische Berechnung belegt dies nicht (erkranktes Kollektiv mit Kalziumsubstitution vs. gesundes Kollektiv mit Kalziumsubstitution:  $p=0,268$ , Mann-Whitney-Test).

### 4.1.9.7 AT1-AA in Abhängigkeit von Jod

Die Literaturrecherche machte deutlich, dass es bis dato keine Studie gibt, die sich explizit mit der Fragestellung auseinandersetzt, inwiefern eine Jodsubstitution während des ersten Trimesters der Schwangerschaft Einfluss auf die Bildung des AT1-AA haben könnte. Außerdem gibt es bisweilen auch keine Hinweise darauf, dass eine PE unter der Einnahme von Jod häufiger oder weniger häufig auftritt. In der klinischen Studie nahmen von insgesamt 177 Frauen 27 Frauen Jod während der Schwangerschaft ein (15,3 % vom Gesamtkollektiv).



**Abbildung 20:** Zusammenfassung gemessener Werte für den AT1-AA in dem gesunden (95 Frauen) und erkrankten (73 Frauen) Kollektiv in Abhängigkeit von der Jodeinnahme.

Zuerst wurde das Gesamtkollektiv auf einen potentiellen Zusammenhang gemessener Werte

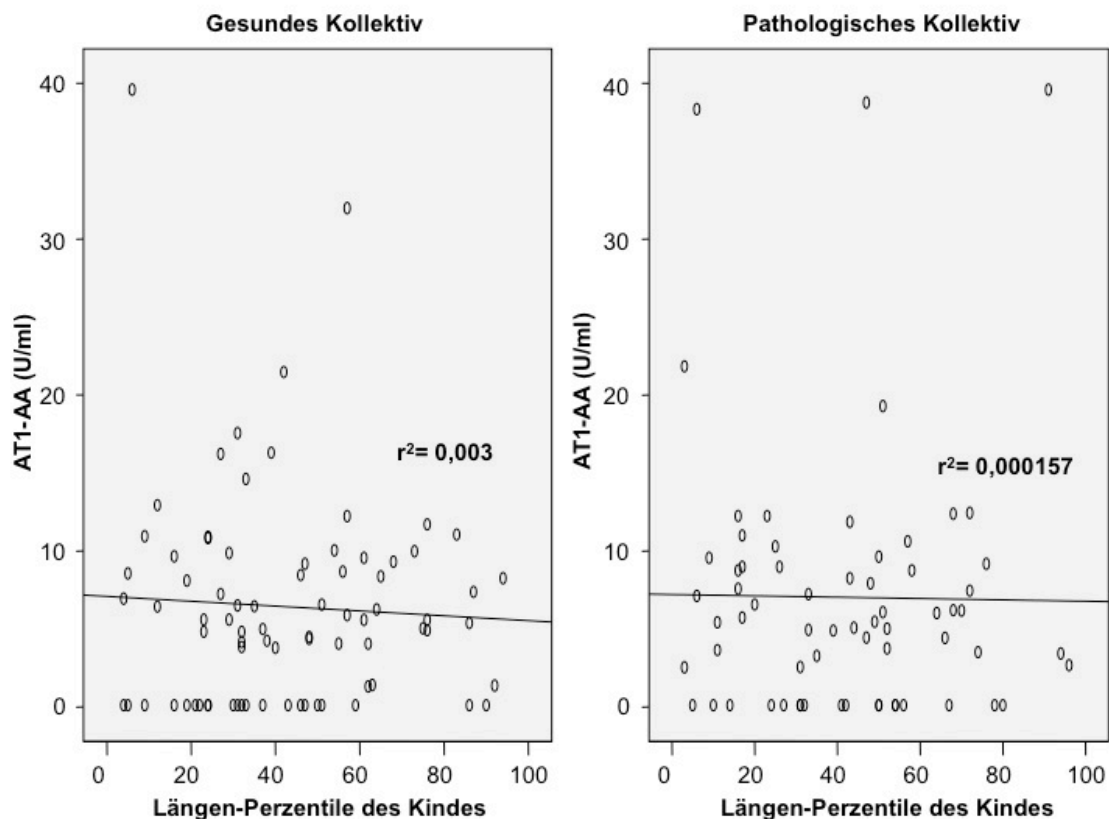
## Ergebnisse

für den AT1-AA und der Einnahme von Jod während der Schwangerschaft untersucht. Die Ergebnisse belegen, dass es keinen Zusammenhang gibt (Vergleich der Schwangeren mit Jodsubstitution vs. aller Schwangeren ohne Jodsubstitution:  $p=0,691$ ; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich von gesunden Schwangeren ohne Jodsubstitution mit den Gesunden die Jod einnahmen, konnte ebenfalls keinen Zusammenhang aufzeigen (Abb. 20 linke Seite, alle Gesunden mit Jodsubstitution vs. alle Gesunden ohne Jodsubstitution:  $p=0,166$ , Mann-Whitney-Test). Gleiches gilt für das erkrankte Kollektiv (Abb. 20 rechte Seite, erkranktes Kollektiv mit Jodsubstitution vs. erkranktes Kollektiv ohne Jodsubstitution:  $p=0,477$ , Mann-Whitney-Test)

### 4.1.10 AT1-AA in Abhängigkeit von den biometrischen Daten zur Geburt

#### 4.1.10.1 AT1-AA in Abhängigkeit von der Längen-Perzentile des Kindes

Die intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) ist mit PE assoziiert (Johnson *et al.*, 1993; Kaufmann *et al.*, 2003). Dementsprechend wurde im Rahmen der klinischen Studie der AT1-AA in Abhängigkeit von der Längen-Perzentile des Kindes untersucht.



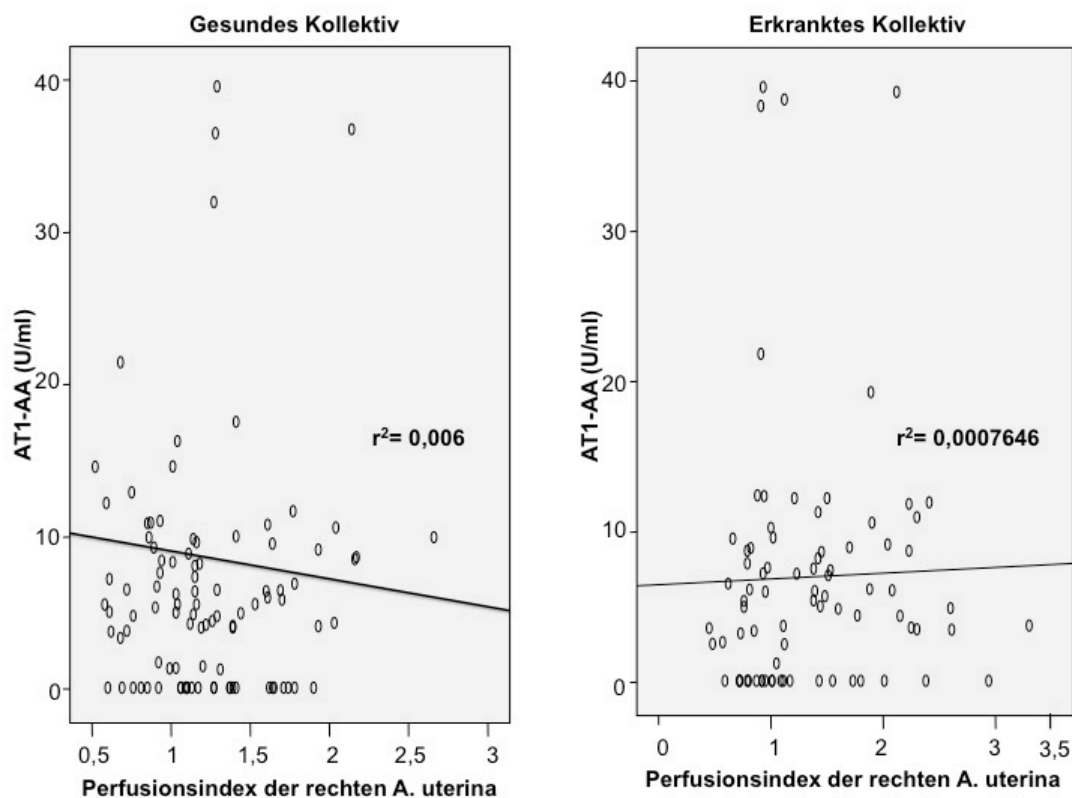
**Abbildung 21:** Korrelationsanalyse der gemessene Werte für den AT1-AA für das gesunde (linke Abb.) und erkrankte Kollektiv (rechte Abb.) in Abhängigkeit von der Längen-Perzentile des Kindes.

Dabei zeigte die Korrelationsanalyse des Gesamtkollektivs keinen Zusammenhang zwischen der Längen-Perzentile des Kindes und den gemessenen Werten für den Autoimmunantikörper (Gesamtkollektiv  $p=0,521$ , Daten nicht gezeigt). Die Daten der gesunden Schwangeren korrelieren ebenfalls nicht mit den gemessenen Werten des AT1-AA und der Längen-Perzentile (Abb. 21 linke Seite, gesundes Kollektiv  $p=0,636$ ). Auch die Korrelationsanalyse der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft zeigt keinen Zusammenhang zwischen der Längen-Perzentile und den gemessenen Werten für den AT1-AA (Abb. 21 rechte Seite, erkranktes Kollektiv  $p=0,665$ ).

#### 4.1.11 AT1-AA in Abhängigkeit von den Doppleruntersuchungen

##### 4.1.11.1 AT1-AA in Abhängigkeit des Perfusions-Index der rechten A. uterina

Im Jahr 2005 führten Walther *et al.* eine Studie durch, die den Zusammenhang zwischen einer Perfusionsstörung der A. uterina und der daraus resultierenden Bildung des AT1-AA klinisch verifizierten. Dabei wies keine der Frauen mit normaler Perfusion der A. uterina in der 20. Schwangerschaftswoche (SSW), dem Zeitpunkt, zu dem die Klinik einer PE manifest werden würde, AT1-AA auf.



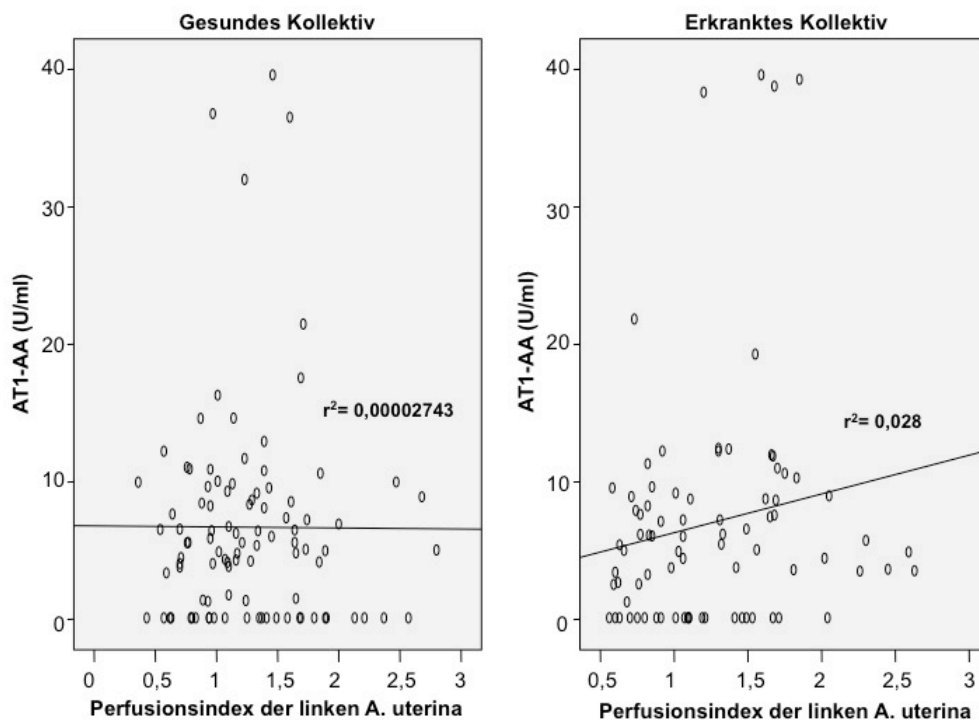
**Abbildung 22:** Korrelationsanalyse der gemessene Werte für den AT1-AA für das gesunde linke Abb.) und erkrankte Kollektiv (rechte Abb.) in Abhängigkeit vom Perfusionsindex der rechten A. uterina.

## Ergebnisse

Die AT1-AA waren bereits vor der klinischen Manifestation der PE im zweiten Trimester der Schwangerschaft bei 80 % der Frauen mit Perfusionsstörung der A. uterina nachweisbar, die im weiteren Verlauf der Schwangerschaft eine PE entwickelten (Walther *et al.*, 2005). Innerhalb der klinischen Studie wurde zuerst das Gesamtkollektiv auf einen Zusammenhang zwischen dem Perfusionsindex (PI) der rechten A. uterina und den gemessenen Werten für den Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor untersucht. Dabei konnte die Korrelationsanalyse keinen entsprechenden Hinweis liefern (Gesamtkollektiv  $p=0,36$ , Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung des gesunden Kollektivs korreliert ebenfalls nicht mit den gemessenen Werten des AT1-AA und dem PI der rechten A. uterina (Abb. 22 linke Seite, gesundes Kollektiv  $p=0,972$ ,  $r^2=0,006$ ). Gleiches wird deutlich bei der Untersuchung des erkrankten Kollektivs (Abb. 22 rechte Seite, erkranktes Kollektiv  $p=0,183$ ,  $r^2=0,0007646$ ).

### 4.1.11.2 AT1-AA in Abhängigkeit des Perfusionsindex der linken A. uterina

Wie bereits unter 4.1.11.1 erwähnte, zeigte eine Studie von Walther *et al.* im Jahr 2005, dass eine verminderte Durchblutung der A. uterina mit dem Auftreten von AT1-AA assoziiert ist (Walther *et al.*, 2005). Dementsprechend wurde auch der Perfusionsindex der linken A. uterina auf einen Zusammenhang mit gemessenen Werten für den AT1-AA untersucht.



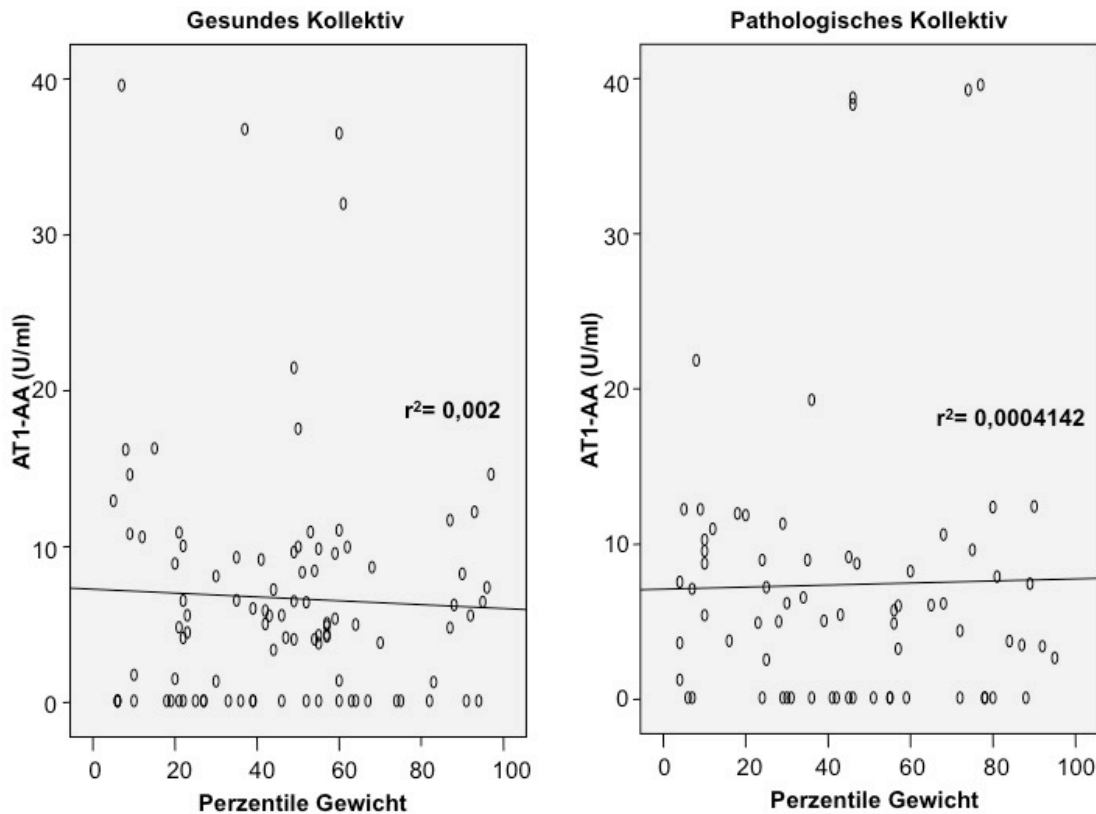
**Abbildung 23:** Korrelationsanalyse der gemessenen Werte für den AT1-AA für das gesunde (linke Abb.) und erkrankte Kollektiv (rechte Abb.) in Abhängigkeit vom Perfusionsindex der linken A. uterina.

## Ergebnisse

Die Korrelationsanalyse des Gesamtkollektivs zeigt keinen Zusammenhang zwischen dem Perfusionsindex (PI) der linken A. uterina und den gemessenen Werten für den Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor (Gesamtkollektiv  $p=0,424$ , Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung der gesunden Schwangeren korreliert ebenfalls nicht mit den gemessenen Werten des AT1-AA und dem PI der linken A. uterina (Abb. 23 linke Seite, gesundes Kollektiv  $p=0,456$ ,  $r^2=0,00002743$ ). Auch die Korrelationsanalyse der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft zeigt keinen Zusammenhang zwischen diesen, dem PI der linken A. uterina und den gemessenen Werten für den AT1-AA (Abb. 23 rechte Seite, erkranktes Kollektiv  $p=0,708$ ,  $r^2=0,028$ ).

### 4.1.12 AT1-AA in Abhängigkeit von der Perzentile des Gewichtes des Kindes

Die Korrelationsanalyse des Gesamtkollektivs zeigt keinen Zusammenhang zwischen der Gewichts-Perzentile des Kindes und den gemessenen Werten für den Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor (Gesamtkollektiv  $p=0,866$ , Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 24:** Korrelationsanalyse der gemessenen Werte für den AT1-AA für das gesunde (linke Abb.) und erkrankte Kollektiv (rechte Abb.) in Abhängigkeit von der Gewichts-Perzentile.

Die Untersuchung der gesunden Schwangeren korreliert ebenfalls nicht mit den gemessenen Werten des AT1-AA und der Gewichts-Perzentile (Abb. 24 linke Seite, gesundes Kollektiv  $p=0,699$ ,  $r^2=0,002$ ). Auch die Korrelationsanalyse der Frauen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft zeigt keinen Zusammenhang zwischen diesen, der Gewichts-Perzentile und den gemessenen Werten für den AT1-AA (Abb. 24 rechte Seite, erkranktes Kollektiv  $p=0,852$ ,  $r^2=0,0004142$ ).

### **4.1.13 Einzelbetrachtung hoher AT1-AA-Werte**

In dem Gesamtkollektiv von 177 Frauen wurden bei 10 Frauen AT1-AA-Werte  $\geq 20$  U/ml gemessen. Von diesen 10 Frauen hatten 5 Frauen einen gesunden und 5 einen pathologischen Ausgang der Schwangerschaft. Von den 5 Frauen, die eine Pathologie entwickelten, hatte eine Frau einen Gestationshypertonus, eine weitere eine Präeklampsie und drei Frauen einen Gestationsdiabetes.

In der Gruppe mit 33 Gestationsdiabetikerinnen wurden die gemessenen Werte für den AT1-AA mit  $\geq 20$  U/ml und  $\leq 20$  U/ml verglichen. Dabei fiel auf, dass der prozentuale Anteil der Einnahme von Vitaminen signifikant unterschiedlich ( $p=0,007$ ) war. Das heißt, dass 3 von 3 Frauen mit AT1-AA  $\geq 20$  U/ml Vitamine einnahmen, während bei den restlichen 30 Gestationsdiabetikerinnen mit Werten für den AT1-AA  $\leq 20$  U/ml, nur 7 von 30 Frauen Vitamine zu sich nahmen (Bemerkung: Mit  $N=3$  in der AT1-AA  $\geq 20$ -Gruppe lässt sich schwer ein signifikanter Zusammenhang ermitteln und sollte daher in weiteren Studien untersucht werden. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die 3 Frauen mit gemessenen Werten für den AT1-AA  $\geq 20$ , erhöhte PIGF-Werte aufwiesen, diese waren allerdings statistisch nicht signifikant ( $p=0,087$ ).

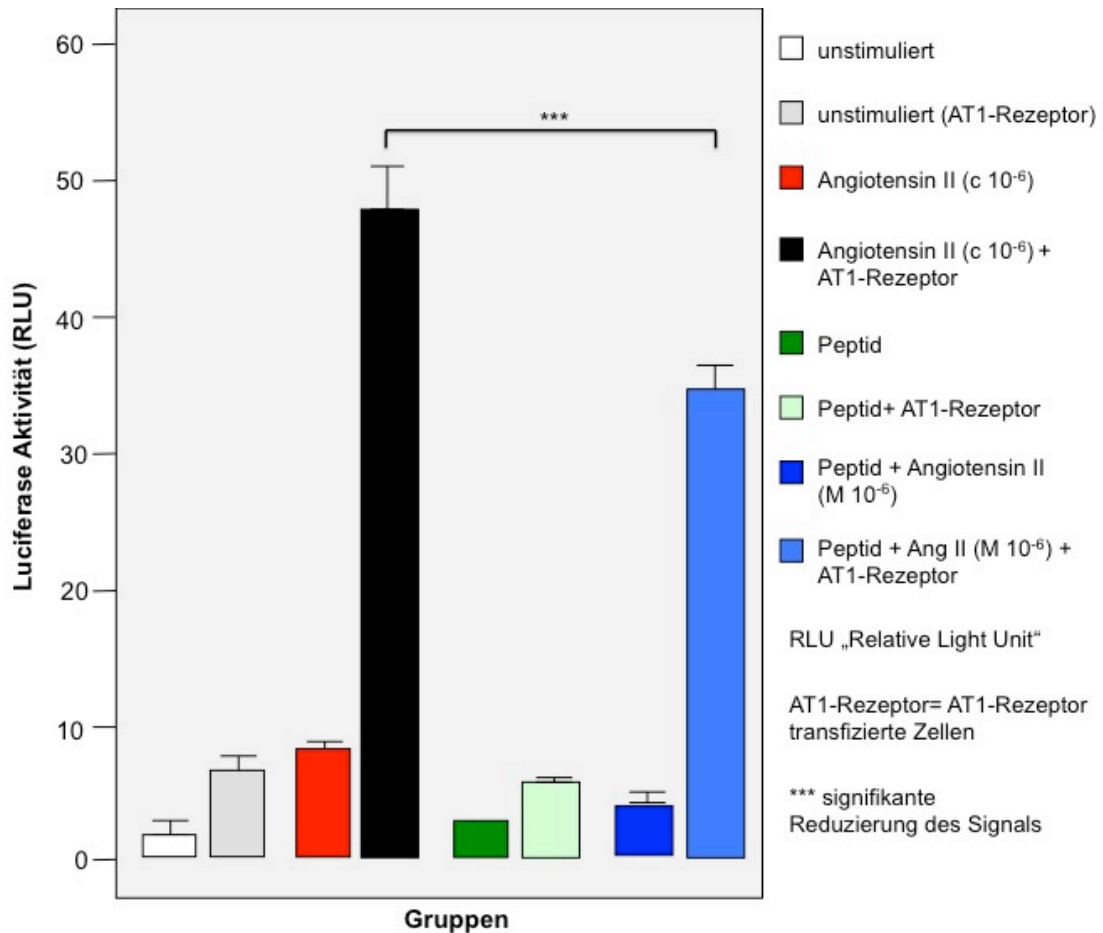
Des Weiteren zeigte die Untersuchung der 95 Frauen mit einem gesunden Ausgang der Schwangerschaft, dass bei 5 Frauen erhöhte Werte für den AT1-AA mit  $> 20$  U/ml gemessen wurden und diese 5 Frauen signifikant erniedrigte Werte für die Gravidität und Parität aufwiesen im Vergleich zu den restlichen 96 Frauen (Gravidität:  $p=0,026$ ; Parität:  $p=0,014$ ).

## **4.2 Experimente zum Verständnis der Wirkungsweise des AT1-AA**

Die Tatsache, dass bereits vor Beginn der Manifestation klinischer Symptome der AT1-AA nachweisbar ist, macht die Entwicklung eines Screeningverfahrens attraktiv, welches den AT1-AA nachweisen und so PE prädictieren könnte. Allerdings ist bis heute kein ELISA

## Ergebnisse

(„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) entwickelt worden, der einen einfachen und spezifischen Nachweis des Autoimmunantikörpers ermöglicht.



**Abbildung 25:** Stimulation von HEK-Zellen, die mit dem Plasmid pcDNA3.1 (Kontrolle) oder pcDNA3.1 AT1 transfiziert wurden, mit Ang II, dem Peptid AFHYESQ-OH oder beiden in Kombination.

Vor diesem Hintergrund sollte der experimentelle Teil dieser Arbeit untersuchen, ob die von Wallukat und seiner Arbeitsgruppe im Jahr 1999 mit Hilfe eines Peptides untersuchte Bindungsdomäne für den AT1-AA an der 2. extrazellulären Schleife des AT1-Rezeptors zu positiven Ergebnissen geführt hat, weil das sieben Aminosäure-lange Peptid mit Homologie zum AT1 in der Schleife des Rezeptors bereits selbst die Konzentration des AT1-Rezeptors in den Zellen reduzierte und damit die stimulierenden Effekte des AT1-AA verhinderte und nicht, wie in der Arbeit geschlussfolgert, das Peptid mit dem AT1-AA interagiert und so zum Ausbleiben des Signals (Erhöhung der Kontraktionszahl) geführt hat (Wallukat *et al.*, 1999).

Dementsprechend wurden HEK-Zellen mit einem AT1-kodierenden Plasmid transfiziert und die Effekte des Peptids mit der Sequenz AFHYESQ-OH (entspricht der von Wallukat und Kollegen identifizierten Sequenz der 2. extrazellulären Schleife des AT1-Rezeptors, an die der AT1-AA binden soll) auf die Effizienz von Ang II untersucht, durch Interaktion mit dem AT1-Rezeptors den Transkriptionsfaktor „Serum Response Factor“ zu stimulieren. HEK-

## Ergebnisse

Zellen, die nur mit dem Leervektor pcDNA3.1 transfiziert wurden, dienten als Kontrolle. Weder in Kontrollvektor-transfizierten HEK-Zellen alleine noch in AT1-Rezeptor-transfizierten Zellen konnte das Peptid einen Effekt auslösen, während Ang II in AT1-transfizierten, nicht aber in Kontrollzellen zu einer hochsignifikanten Erhöhung des Signals führte (Abb. 25). Der Vergleich der Messwerte für Ang II in AT1-transfizierten Zellen mit 43,75 RLU (nach Abzug des unstimulierten Basalwertes) mit dem Messwert von 29,38 RLU (nach Abzug des unstimulierten Basalwertes) für Ang II in AT1-transfizierten Zellen bei paralleler Zugabe des Heptapeptids zeigt eine signifikante Reduzierung von 32,9 %, nicht aber eine vollständige Blockierung des Ang II-Signals durch das Heptapeptid (Abb. 25).



## 5 Diskussion

Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft sind eine der Hauptursachen für den mütterlichen Tod in entwickelten Ländern. Neben thrombembolischen Komplikationen ist die Präeklampsie die häufigste Ursache für die maternale Mortalität (Zhang *et al.*, 2003; Robillard *et al.*, 2007). Vor diesem Hintergrund wurden weltweit viele Studien zum Verständnis des pathophysiologischen Geschehens mit dem Ziel der Früherkennung des Syndroms Präeklampsie durchgeführt. Auch wenn bis heute die Ätiologie der PE nicht eindeutig geklärt werden konnte, gibt es zahlreiche Hinweise für ein komplexes multifaktorielles Geschehen. Dabei scheint die gestörte Implantation des Trophoblasten mit nachfolgender Fehlentwicklung des plazentaren arteriellen Gefäßsystems eine Schlüsselrolle zu spielen. Des Weiteren werden in der Literatur die Beteiligung blutdruckregulierender endothelialer Substanzen innerhalb des pathophysiologischen Geschehens der PE diskutiert (Stepan *et al.*, 2008) sowie ein dysreguliertes Renin-Angiotensin-System als mögliche Ursache für die Entwicklung einer PE in Betracht gezogen (Shah, 2005; Herse *et al.*, 2007). Seit seiner Erstbeschreibung durch Wallukat und Kollegen steht der AT1-AA im Fokus der Forschung zum Renin-Angiotensin-System (Wallukat *et al.*, 1999). Zahlreiche durchgeführte Studien konnten den AT1-AA und seine Bindung mit nachfolgender Aktivierung des AT1-Rezeptors belegen. Der AT1-AA aktiviert AT1-Rezeptoren auf unterschiedlichsten Zellen und bewirkt somit verschiedene, für die PE charakteristische pathophysiologische Reaktionen (Dechend *et al.*, 2000; Dechend *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008a). Diese gehen u.a. auf die Freisetzung zahlreicher Faktoren, wie z.B. sFlt-1 zurück. Durch die Gabe von sFlt-1 konnte in schwangeren Ratten das klinische Bild einer PE mit arteriellem Hypertonus und einer Proteinurie hervorgebracht werden (Maynard *et al.*, 2003). 2008 führten Zhou *et al.* die erste Studie durch, die die pathogenetische Natur des AT1-AA in der Präeklampsie innerhalb eines Tiermodells nachweist (Zhou *et al.*, 2008b). Im Hinblick auf diese Erkenntnisse sollte innerhalb der klinischen Studie sowohl die Assoziation zwischen hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen und dem AT1-AA untersucht werden als auch die klinisch relevanten Kriterien für die Diagnosestellung der PE überprüft und im kritischen Kontext beurteilt werden.

## 5.1 Variierende Inzidenz der Präeklampsie

Die Inzidenz von Präeklampsie schwankt weltweit zwischen 2 – 8 % (Stegers *et al.*, 2010). Die variierenden Zahlen scheinen in verschiedenen Ursachen begründet. Zum einen gibt es unterschiedliche Diagnosekriterien für das Syndrom PE und zum anderen ist die Anzahl von präeklampsischen Frauen abhängig von der untersuchten Bevölkerungsgruppe. Es gibt z.B. Hinweise, dass die PE in der schwarzen Bevölkerung gehäuft auftritt (Eskenazi *et al.*, 1991). Darüber hinaus wird in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der PE und dem Klima in verschiedenen Teilen der Erde diskutiert. Einige Studien postulieren, dass die PE in den Wintermonaten gehäuft vorkomme (Magnu und Eskild, 2001; Wellington und Mulla, 2012), während andere der Ansicht sind, die PE trete verstärkt in der Sommerzeit auf (Tan und Salmon, 1988).

Genau Zahlen für die Inzidenz der PE in Deutschland gibt es nicht. Eine Veröffentlichung von Schneider und seinen Kollegen präsentiert die Untersuchung von Geburten in Deutschland im Jahr 2006. Dabei errechneten sie die Inzidenz der PE mit 2,31 % (Schneider *et al.*, 2012). Das Ergebnis unserer klinischen Studie mit nur 0,99 % fällt deutlich geringer aus. Von den 2109 Frauen entwickelten 21 Frauen eine PE (0,99 %) und 13 ein HELLP-Syndrom (0,61 %). Ursächlich für die variierenden Zahlen ist möglicherweise die großzügige, nicht definitionsgemäße Diagnosestellung der PE oder des HELLP-Syndroms im klinischen Alltag. Die Überprüfung der Pathologien unserer klinischen Studie in den Kliniken bestätigt diese These. Dabei wurden alle Pathologien (Gestationsdiabetes und -hypertonus, essentieller arterieller Hypertonus, PE und HELLP-Syndrom) anhand von Anamnese, Laboruntersuchungen, Blutdruckmessungen, Schwangerschafts- und Geburtsverlauf (einschließlich Indikationsstellung für Sectios, Spinal- und Periduralanästhesien), Medikamenteneinnahme vor, während und nach der Schwangerschaft sowie unter der Geburt untersucht. Zudem wurden neben den Krankenblättern die sowohl den ärztlichen Verlauf dokumentierten als auch Aufschluss über pflegerische Hinweise auf Übelkeit, Druckgefühl im rechten Oberbauch, Kopfschmerzen, Schwindel, Krampfanfälle etc. gaben, überprüft. Letztlich konnten wir auf die Art und Weise drei falsch gestellte Diagnosen herausfiltern und korrigieren. Bei einer der drei Patientinnen wurde ein vermeintliches HELLP-Syndrom diagnostiziert, jedoch ohne entsprechend auffällige Laborparameter. Die Transaminasen waren zu keinem Zeitpunkt der Schwangerschaft erhöht, zudem gab es keine Hämolysezeichen im Labor und die Thrombozyten waren nicht vermindert oder fielen im Laufe der Schwangerschaft ab. Die Recherche konnte ausschließlich einen in der Schwangerschaft (eine Woche *präpartum*) neu aufgetretenen arteriellen Hypertonus und eine Proteinurie bestätigen. Dabei zeigten mehrmalige Blutdruckkontrollen, u.a. das Protokoll

einer 24h-Blutdruckmessung systolische Blutdruckwerte  $\geq 156$  mmHg und diastolische Messwerte  $\geq 90$  mmHg. Der 24h-Sammelurin wies  $> 3$  g Proteine/l auf. Die Diagnose HELLP-Syndrom wurde korrigiert und durch die Diagnose PE ersetzt.

Zwei weitere Frauen erhielten fälschlicherweise die Diagnosen PE ohne den entsprechenden Nachweis einer Proteinurie von  $> 3$ g Protein im 24h-Sammelurin. Bei beiden Frauen wurde ausschließlich ein erhöhter arterieller Blutdruck festgestellt, der allerdings bei beiden bereits Wochen vor dem Klinikaufenthalt zur Entbindung von der jeweils behandelnden Gynäkologin diagnostiziert, allerdings als nicht behandlungsbedürftig eingestuft wurde. Sichergestellt wurde, dass beide Frauen vor der Schwangerschaft keine Blutdruckprobleme hatten. Aus den Krankenhaus-Entlassungsbriefen ging hervor, dass beide Frauen mit einem unauffälligen Blutdruck entlassen werden konnten. In der Zusammenschau dieser evaluierten Befunde wurde deutlich, dass die Diagnose PE nicht richtig gestellt wurde. Aus diesem Grund wurde in beiden Fällen die Diagnose PE in dieser Studie geändert und mit der Abschlussdiagnose Gestationshypertonus kodiert. Doch die Annahme, dass die Diagnose PE oftmals großzügig und nicht definitionsgemäß gestellt werden würde, ist keine hinreichende Erklärung für die deutlich variierenden Zahlen, denn eine Korrektur von 3 Fällen (s.o.) innerhalb der klinischen Studie fällt unter Berücksichtigung der errechneten Prozentzahlen nicht so sehr ins Gewicht. Es verbleibt eine Diskrepanz zwischen der innerhalb der klinischen Studie berechneten Inzidenz der PE mit 0,99 % und der von Schneider für Deutschland angegebenen Inzidenz mit 2,31 % (Schneider *et al.*, 2012). Aus diesem Grund scheint es sinnvoll, auch das untersuchte Patientenkollektiv genauer zu betrachten. Groß angelegte Studien werden oftmals an Universitäts-Kliniken durchgeführt, die sicherlich zu einem nicht geringen Teil Hochrisikoschwangerschaften betreuen, während das Patientenkollektiv der klinischen Studie aus einer Praxis für Ultraschalluntersuchungen im Rahmen des First-Trimester-Screenings rekrutiert wurde (4.1.1). Deshalb besteht das Patientenkontingent dieser Praxis nicht nur aus verschiedenen sozialen Schichten, sondern auch aus einem nicht nach klinischen Gesichtspunkten selektierten Patientengut. Neben Risikoschwangerschaften wurden auch Nicht-Risikoschwangerschaften in dieser Praxis untersucht. Vor diesem Hintergrund wäre es denkbar, dass die Ergebnisse unserer klinischen Studie repräsentativer sind und am ehesten der Inzidenz der PE in Deutschland entsprechen. Außerdem müssen im Zuge dieser neuen Erkenntnisse auch die seit vielen Jahren in der Literatur weltweit variierenden Angaben zur Inzidenz von Präeklampsie zwischen 2 – 8 % (Stegers *et al.*, 2010) kritisch hinterfragt werden.

## 5.2 Mögliche pathophysiologische Rolle des AT1-AA in der Pathogenese der Präeklampsie

Die pathophysiologische Rolle des AT1-AA innerhalb der Pathogenese der PE ist bis dato nicht eindeutig geklärt. Der Zeitpunkt, zu dem der AT1-AA in der Schwangerschaft nachgewiesen werden kann, aber auch die Assoziation zwischen dem Auftreten des AT1-AA und hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen sollte innerhalb dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersucht werden. Der Versuch, den AT1-AA bereits im 1. Trimester der Schwangerschaft nachzuweisen, ist innerhalb der klinischen Studie mittels des EIA der Firma CellTrend nicht gelungen. Dies könnte möglicherweise darin begründet sein, dass die Bildung des AT1-AA eher als Resultat einer Perfusionsstörung und Trophoblastischämie zu werten ist und deshalb nicht im ersten Trimester mit dem EIA der Firma CellTrend, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft nachweisbar wäre. Diese These wird unterstützt durch Walther *et al.*, die den AT1-AA bei Schwangeren mit Perfusionsstörungen der *A. uterina* im 2. Trimester nachweisen konnten. Interessanterweise galt dies auch für normotensive Schwangere mit einer IUGR (*intra-uterine growth restriction*, intrauterine Wachstumsrestriktion) und Schwangere ohne klinische Zeichen von mütterlichen oder fetalen Komplikationen (Walther *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass eine Doppleruntersuchung sowohl das Messen der Perfusionsstörung als auch die Einschätzung über die Qualität der Trophoblasteninvasion ermöglicht, ist bedeutend, weil die Beeinträchtigung der Plazentaentwicklung und Trophoblasteninvasion mit PE assoziiert ist (Chien *et al.*, 2000). Die Invasion des Trophoblasten ist bei Schwangeren mit Perfusionsstörung beeinträchtigt, da der Uterus bei diesen Schwangeren nicht die optimalen Voraussetzungen für die Implantation aufweist. Der Uterus scheint dabei den hohen physiologischen Widerstand zu haben, den er normalerweise bei Nicht-Schwangerschaft hat. Diese Pathologie wird als Charakteristikum für die PE und IUGR verwendet. Dennoch entwickelt nur ein Drittel der Patienten mit einer Perfusionsstörung eine schwangerschaftsassozierte Erkrankung. Die anderen zwei Drittel zeigen, abgesehen von der Perfusionsstörung, einen normalen Schwangerschaftsverlauf (Stepan *et al.*, 2004; Walther *et al.*, 2005). In einer tierexperimentellen Untersuchung konnte durch das Abklemmen der *A. uterina* eine Durchblutungsstörung imitiert werden, die zur Bildung des AT1-AA führte (Verloren *et al.*, 2006). Dieses Resultat zeigt einmal mehr, dass die Bildung des AT1-AA eher auf eine Perfusionsstörung und nicht grundsätzlich auf die PE zurückzuführen ist. Um den Zusammenhang zwischen Perfusionsstörung der *A. uterina* und der daraus resultierenden Bildung des AT1-AA klinisch zu verifizieren, führten Walther *et al.* 2005 eine Studie durch, die den AT1-AA bei Schwangeren

im 2. Trimester mit Perfusionsstörung nachweisen konnte. Keine der Frauen mit normaler Perfusion der *A. uterina* in der 20. Schwangerschaftswoche (SSW), dem Zeitpunkt, zu dem die Klinik einer PE manifest werden würde, wies AT1-AA auf. Im Gegensatz dazu konnte bei 80 % der Frauen mit Perfusionsstörung der *A. uterina* im zweiten Trimester der Schwangerschaft der AT1-AA nachgewiesen werden, die im weiteren Verlauf eine PE entwickelten und bei 60 % der Frauen, die später eine IUGR zeigten. Interessanterweise ergab die Untersuchung von Walther *et al.* aber auch, dass bei 62 % der Frauen mit Perfusionsstörung, aber normalem Schwangerschafts- und Geburtsverlauf, ebenfalls der AT1-AA gefunden werden konnte (Walther *et al.*, 2005). Die Untersuchung des AT1-AA innerhalb der aktuellen klinischen Studie zeigt zwar, dass der AT1-AA mittels EIA der Firma CellTrend nicht im ersten Trimester nachweisbar ist, schließt aber den Nachweis im zweiten Trimester mit dem verwendeten EIA nicht aus und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Dabei sollte aber auch in Betracht gezogen werden, dass der EIA sich gegebenenfalls gar nicht dazu eignet, den AT1-AA im Rahmen der PE oder als Folge einer Perfusionsstörung der *A. uterina* nachzuweisen.

### **5.3 Assoziation der gemessenen AT1-AA-Werte im ersten Trimester der Schwangerschaft mit klinischen und biochemischen Parametern**

Die Literaturrecherche machte deutlich, dass es keine Studien zum AT1-AA im ersten Trimester der Schwangerschaft gibt. Es ist bis dato unklar, ob der AT1-AA überhaupt in diesem frühen Stadium der Schwangerschaft gebildet wird und entsprechend nachgewiesen werden kann. Im Zuge dessen war es Ziel dieser Arbeit, in einem großen Patientinnenkollektiv von 2187 Frauen zu untersuchen, ob bei Schwangeren, die im Verlauf eine PE oder andere schwangerschaftsassoziierte Erkrankung entwickelten, bereits im 1. Trimester der Schwangerschaft höhere AT1-AA-Werte nachgewiesen werden können. Zudem sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen gemessenen Werten für den AT1-AA und klinischen sowie biochemischen Parametern herausgearbeitet werden.

### **5.3.1 AT1-AA-Werte im Zusammenhang mit rheumatologischen Erkrankungen**

Innerhalb der klinischen Studie gaben 10 Frauen an, unter einer der folgenden rheumatischen Erkrankungen zu leiden: Rheuma, Rheumatoide Arthritis, Polyarthritits und reaktive Arthritis. Der vom Hersteller CellTrend angegebene cutoff von 20 U/ml wurde bei diesen Frauen nicht erreicht. Bliebe der cutoff unberücksichtigt, müssten sich bei der Auswertung der gemessenen Werte für den AT1-AA dennoch signifikante Zusammenhänge herausstellen. Es fiel auf, dass Schwangere, die im weiteren Verlauf keine schwangerschaftsassozierte Erkrankung entwickelten und eine positive Anamnese für eine rheumatische Erkrankung haben, im Vergleich zu Werten von den Frauen ohne Rheuma im gesunden Kollektiv einen signifikanten Anstieg der gemessenen Werte für den AT1-AA (alle Gesunden mit einer rheumatischen Erkrankung vs. alle Gesunden ohne rheumatische Erkrankung (Abb. 8) aufzeigen. Dieser signifikante Anstieg blieb bei den Rheumatikerinnen, die eine PE entwickelten, jedoch aus. Dementsprechend zeigte die Gegenüberstellung der Rheumatikerinnen mit pathologischen Ausgang der Schwangerschaft signifikant niedrigere Werte des AT1-AA im Vergleich zu Rheumatikerinnen, die keine Pathologie entwickelten (Abb. 8). Diese Ergebnisse bestätigen einmal mehr die von Walther und Kollegen aufgestellte Hypothese, Tatsache, dass es sich beim AT1-AA nicht um einen spezifischen Marker für die PE handelt (Walther *et al.*, 2005), sondern er vielmehr im Rahmen diverser anderer Erkrankungen, wie zum Beispiel der systemischen Sklerodermie (Riemekasten *et al.*, 2011) oder auch im Rahmen von Nierentransplantatabstoßungen (Dragun *et al.*, 2005) eine Rolle spielt und deshalb möglicherweise auch bei Frauen nachweisbar ist, die keine schwangerschaftsassozierte Pathologie entwickeln. Da allerdings die Werte der gesunden Schwangeren mit rheumatischen Erkrankungen immer noch unter dem Cut-off liegen, wäre es denkbar, dass der Assay in diesem Konzentrationsbereich auf einen anderen Stimulus reagiert und diesen misst, der in dieser Frau spezifisch erhöht ist.

### **5.3.2 Effekte der Kalziumsubstitution auf die AT1-AA-Werte**

Die Rolle der Kalziumsubstitution als Präventionsmaßnahme für hypertensive Schwangerschaftserkrankungen wurde in den letzten Jahren in zahlreichen Studien diskutiert. Das Review von Hofmeyr *et al.* im Jahr 2010 beschreibt die Auswertung durchgeführter Studien in entwickelten als auch in nichtentwickelten Ländern und zeigte, dass eine Kalziumsubstitution während der Schwangerschaft das Auftreten von Gestationshypertonus, PE und Frühgeburtlichkeit senken kann (Hofmeyr *et al.*, 2010). Ähnliches bestätigten ein Jahr später Imdad und

Kollegen (Imdad *et al.*, 2011). Allerdings schlossen sie nur die Studien ein, die in entwickelten Ländern durchgeführt wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die Kalziumsubstitution während der Schwangerschaft das Risiko, einen Gestationshypertonus zu entwickeln, um 45 % und das Risiko, eine PE zu entwickeln, um 59 % reduziert (Imdad *et al.*, 2011). Studien über einen potentiellen Einfluss von Kalziumsubstitution auf den AT1-AA wurden bislang nicht veröffentlicht. Innerhalb der klinischen Studie nahmen von den 177 untersuchten Frauen, 13 während des ersten Trimesters der Schwangerschaft Kalzium ein. Dabei konnte der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Kalziumsubstitution mit den Gesunden, die Kalzium einnahmen, zeigen, dass die Werte des AT1-AA bei den gesunden Schwangeren unter Kalziumsubstitution tendenziell niedriger sind als die gemessenen Werte bei gesunden Frauen ohne Kalziumsubstitution (gesundes Kollektiv mit Kalziumsubstitution vs. gesundes Kollektiv ohne Kalziumsubstitution:  $p=0,055$ , Abb. 19). Doch erreichen die gemessenen Werte für den AT1-AA nicht den vom Hersteller angegebenen cutoff von 20 U/ml und sind deshalb nur unter Berücksichtigung dieser Tatsache zu beurteilen. Dennoch ist anhand der gemessenen Werte für den AT1-AA ersichtlich, dass diese unter Kalziumsubstitution tendenziell geringer sind als bei den gesunden Schwangeren, die kein Kalzium einnahmen. Die Ergebnisse lassen mutmaßen, dass die Ergänzung von Kalzium im ersten Trimester der Schwangerschaft möglicherweise Einfluss auf die Bildung des AT1-AA haben kann. Dies lässt sich allerdings nur mittels größerer Patientenzahlen untersuchen, um statistisch valide Aussagen zu erhalten.

### **5.3.3 Essentieller arterieller Hypertonus im Zusammenhang mit gemessenen AT1-AA-Werten**

Bereits im Jahr 2003 beschrieb Sibai mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie (Sibai, 2003), die zwei Jahre später durch Duckitt komplementiert wurden (Duckitt, 2005). Zu diesen zählt u.a. ein essentieller arterieller Hypertonus (aHT). Einen Zusammenhang zwischen der essentiellen arteriellen Hypertonie und dem Nachweis von AT1-AA zeigten Fu und seine Kollegen, denn sie konnten den AT1-AA bei nicht-schwangeren Hypertonikerinnen nachweisen (Fu *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie bestätigen diese Resultate nicht. Innerhalb der klinischen Studie wurden Schwangere mit einem vorbestehenden aHT zu dem erkrankten Kollektiv gezählt. Insgesamt hatten von den 82 Frauen mit pathologischem Ausgang der Schwangerschaft 13 Frauen einen vorbestehenden essentiellen arteriellen Hypertonus. Bei dem Vergleich der AT1-AA-Werte von Schwangeren, die einen essentiellen arteriellen Hypertonus haben, fielen keine signifikant höheren AT1-AA-Werte auf im Vergleich zu dem übrigen Kollektiv mit schwan-

gerschaftsassozierten Erkrankungen, aber ohne essentiellen arteriellen Hypertonus (erkranktes Kollektiv mit essentiellm aHT vs. erkranktes Kollektiv ohne essentiellen aHT:  $p=0,586$ , Abb. 12). Diese Ergebnisse können keine Assoziation zwischen vorbestehenden hypertensiven Erkrankungen und dem AT1-AA belegen. Geht man davon aus, dass ein Endothelschaden, verursacht durch einen vorbestehenden aHT, zur Bildung des AT1-AA führen würde, wäre es denkbar, dass die im Blutkreislauf zirkulierenden AT1-AA die Entwicklung einer PE im Schwangerschaftsverlauf begünstigen könnten. Allerdings konnte auch dies nicht anhand der klinischen Studie bestätigt werden, da die Anzahl der Frauen mit PE und bereits vor der Schwangerschaft diagnostiziertem aHT mit  $N=3$  zu gering ausfallen, um eine Tendenz erkennen zu lassen.

### 5.3.4 Einzelbetrachtung AT1-AA-Werte $\geq 20$ U/ml

Der vom Hersteller angegebene cutoff  $\geq 20$  U/ml wurde in einzelnen Fällen erreicht und genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass von den 177 untersuchten Frauen bei 10 Frauen AT1-AA-Werte  $\geq 20$  U/ml gemessen wurden. Von diesen 10 Frauen hatten 5 Frauen einen gesunden Ausgang der Schwangerschaft und 5 entwickelten eine schwangerschaftsassozierte Pathologie. Interessanterweise zeichneten sich die Frauen mit einem gesunden Ausgang der Schwangerschaft, aber erhöhten Werten für den AT1-AA über 20 U/ml, durch signifikant erniedrigte Graviditäts- und Paritätswerte im Vergleich zu den restlichen 94 Frauen mit gesundem Ausgang der Schwangerschaft aus (Gravidität  $p=0,026$ ; Parität  $p=0,014$ ). Somit scheint es einen Zusammenhang zwischen dem AT1-AA und der Anzahl der Schwangerschaften und Geburten zu geben. Interessanterweise entwickelten diese Frauen jedoch trotz der erhöhten AT1-AA-Werte keine schwangerschaftsassozierte Pathologie. Dieses Erkenntnis bestätigt die Ergebnisse der von Fu und seinen Mitarbeitern im Jahr 2000 durchgeführte Studie. Nicht alle Frauen mit nachgewiesenem AT1-AA müssen zwangsläufig eine PE entwickeln (Fu *et al.*, 2000). Dennoch gelten die erste Schwangerschaft und erste Geburt als Risikofaktoren für die Entwicklung einer PE (Sibai, 2003; Duckitt und Harrington, 2005).

Die Untersuchung der Gruppe mit der Abschlussdiagnose Gestationsdiabetes, bestehend aus insgesamt 33 Frauen, konnte ebenfalls interessante Hinweise aufzeigen. Hierbei zeigte der Vergleich der AT1-AA-Werte  $\geq 20$  U/ml und  $\leq 20$  U/ml, dass der prozentuale Anteil der Einnahme von Vitaminen signifikant unterschiedlich ist ( $p=0,007$ ). Das heißt 3 von 3 Frauen in der AT1-AA  $\geq 20$  U/ml-Gruppe nahmen Vitamine ein, während in der AT1-AA  $\leq 20$  U/ml-Gruppe nur 7 von 30 Frauen Vitamine substituierten. Allerdings lässt sich mit einem  $N=3$  in der AT1-AA  $\geq 20$ -Gruppe schwer ein signifikanter Zusammenhang ermitteln und sollte daher



in weiteren Studien untersucht werden. Außerdem wurden die schwangeren Frauen nach der Einnahme von Vitaminen im Allgemeinen befragt und zwischen den verschiedenen Vitaminen nicht differenziert, ausgenommen Folsäure (4.1.9.1), weshalb auch kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Substitution von Vitaminen und der AT-AA im Rahmen der klinischen Studie ermittelt werden konnte. Die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Einnahme von Folsäure und der AT1-AA ergab keinen interessanten Hinweis. Dennoch wird der Befund von anderen Gruppen gestützt, die zeigen konnten, dass die Einnahme diverser Vitamine das Risiko eine PE zu entwickeln, reduziert (Hovdenak und Haram, 2012).

### **5.4 Assoziation zwischen Präeklampsie und weiterer Faktoren**

Innerhalb der klinischen Studie galt es nicht nur, den AT1-AA auf potentielle Assoziationen mit schwangerschaftsassozierten hypertensiven Erkrankungen hin zu untersuchen, sondern auch weitere mögliche Zusammenhänge zwischen der PE und anderen Faktoren herauszuarbeiten.

#### **5.4.1 Der Zusammenhang zwischen Rauchen und Präeklampsie**

Neben den zahlreichen Risikofaktoren zur Entwicklung einer PE gibt es auch protektive Faktoren, wie z.B. das Rauchen von Zigaretten. Das Rauchen von Zigaretten in der Schwangerschaft reduziert paradoxerweise das Risiko, eine PE zu entwickeln um 30 – 50 % (Zhang *et al.*, 1999; Conde-Agudelo und Belizan, 2000). Geht man davon aus, dass das Rauchen von Zigaretten das Endothel schädigt und es im Rahmen dessen zu einer endothelialen Dysfunktion kommen würde, müssten Schwangere mit Nikotinabusus eher ein erhöhtes Risiko für eine Präeklampsie aufweisen. Die Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten klinischen Studie zeigt aber, dass alle Schwangeren, die eine PE entwickelten, Nichtraucherinnen waren. Keine dieser Frauen rauchte Zigaretten vor oder während der Schwangerschaft. Dennoch sollte das Rauchen von Zigaretten nicht als adäquate präventive Maßnahme zur Vermeidung einer PE verstanden werden, da die negativen Auswirkungen des Tabakkonsums auf den Organismus überwiegen, insbesondere in der Schwangerschaft (Roelands *et al.*, 2009).

Ein Zusammenhang zwischen dem Rauchen während der Schwangerschaft und gemessener Werte für den AT1-AA wurde in der Literatur bis dato nicht beschrieben und konnte auch innerhalb der klinischen Studie nicht aufgezeigt werden (4.1.7).

### **5.4.2 Der Zusammenhang zwischen dem Gewicht der Mutter und PE**

Wie bereits in mehreren Studien gezeigt werden konnte, gilt ein erhöhtes Gewicht der Mutter als Risikofaktor für die Entwicklung der PE. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie konnte diese Annahme erneut bestätigen (Myatt *et al.*, 2012). Der BMI der schwangeren Frauen ist mittlerweile in die klinische Studie aufgenommen worden, aber zu einem Zeitpunkt, zu dem die Auswertung der Daten innerhalb dieser Dissertation bereits abgeschlossen war und deshalb an dieser Stelle nicht diskutiert werden kann.

### **5.4.3 Der Zusammenhang zwischen dem Alter der Mutter und PE**

Das Alter der Mutter, ein vielfach diskutierter Risikofaktor für die Entwicklung einer PE, wurde ebenfalls innerhalb der klinischen Studie untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Frauen mit einem essentiellen arteriellen Hypertonus oder Frauen, die im Verlauf der Schwangerschaft eine Präeklampsie entwickelten, mit durchschnittlich 37 Jahren deutlich älter waren als die Frauen in anderen Kollektiven. Diese Ergebnisse bestätigen partiell die bereits von Sibai und Duckitt identifizierten Risikofaktoren für die Entwicklung einer PE, der aHT und das Alter der Mutter > 40 Jahre (Sibai, 2003; Duckitt und Harrington, 2005). Das durchschnittliche Alter der Frauen die eine PE entwickelten liegt allerdings mit 37 Jahren unterhalb der 40 Jahre. Weshalb Frauen in diesem Alter ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer PE haben, ist nicht geklärt und lässt sich vermutlich auch nicht auf nur eine Ursache zurückführen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass das Gefäßsystem der vergleichsweise älteren Schwangeren häufiger durch einen potentiell vorbestehenden Endothelschaden gekennzeichnet ist.

## **5.5 Experimenteller Ansatz**

Dass all die Jahre die Etablierung eines antikörperbasierten Assays fehlschlug, obwohl Wallukat *et al.* das Epitop, das durch den AT1-AA erkannt wird, bereits 1999 beschrieben haben (Wallukat *et al.*, 1999), lässt vermuten, dass das 7-Aminosäurepeptid die Effekte des AT1-AA nicht durch Neutralisierung des Antikörpers ausschaltet. Ein hypothetischer Erklärungsansatz könnte sein, dass das Peptid nicht den AT1-AA neutralisiert, sondern das 7-Aminosäure-lange Peptid an den AT1-Rezeptor bindet und zu dessen Internalisierung führt, so dass der AT1-AA nur deshalb nicht mehr die Kontraktilität der neonatalen Kardiomyozy-

ten stimulieren kann, da durch die Internalisierung die AT1-Rezeptoren von der Zelloberfläche entfernt werden und so nicht mehr vom AT1-AA stimuliert werden können. Die Ergebnisse des Experiments innerhalb dieser Arbeit zeigen, dass Ang II in AT1-tranfizierten zu einer hochsignifikanten Erhöhung des Signals führte (Abb. 25), das aber bei paralleler Zugabe des Heptapeptids signifikant reduziert (um etwa 32,9 %), nicht aber vollständig blockiert wurde. Auch wenn damit die experimentellen Daten einen mechanistischen Hinweis geben könnten, erklären sie nicht die vollständige Blockade der erhöhten Kontraktionsfrequenz der Kardiomyozyten in den Wallukat-Experimenten, nach Zugabe des Peptids zur IgG-Fraktion aus dem Blut präeklampsischer Frauen. In weiteren Experimenten sollte dementsprechend z.B. mit einem Fluoreszenz-markierten AT1-Rezeptorkonstrukt überprüft werden, ob die Interaktion zwischen Peptid und Rezeptor in Zellen, die dieses Konstrukt überexprimieren, zu einer deutlichen Reduktion des Fluoreszenzsignals führt, als die im funktionalen Test gemessenen 32,9 % oder ob die gemessene Reduktion in Wirklichkeit nicht auf einer Verringerung der Rezeptordichte in der Membran basiert, sondern auf einer Konformationsänderung des Rezeptors durch Interaktion mit dem Heptapeptid und damit zu einer schlechteren Signalweiterleitung nach Stimulation mit Ang II.

### **5.6 Evaluierung des kommerziellen Assays als Prädiktor hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen**

Das verwendete enzymatische Immunadsorptionsverfahren (EIA) zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörper gegen den AT1-Rezeptor der Firma CellTrend GmbH wird grundsätzlich in der Transplantationsmedizin, der Rheumatologie und Neurologie eingesetzt und ist seit 2007 kommerziell verfügbar. Dragun *et al.* veröffentlichten im Jahr 2005 eine Studie, die den direkten Zusammenhang zwischen nachgewiesenem AT1-AA und dem Verlust von Nierentransplantaten durch eine akute, therapierefraktäre, vaskuläre Abstoßung aufzeigte. Dabei vermutete die Arbeitsgruppe eine Beteiligung des AT1-AA an der Pathogenese von vaskulären Schäden. Die Bindung des Antikörpers an den AT1-Rezeptor bewirkt vermutlich eine Signalkaskade, welche letztlich die Wirkung des Ang II als inflammatorisches Zytokin imitiert und somit an der Entstehung vaskulärer Erkrankungen beteiligt ist (Dragun *et al.*, 2005). Darüber hinaus zeigten Dragun und ihre Mitarbeiter/-innen in Kooperation mit Reinsmoen und Kollegen aus Los Angeles in einer weiteren Studie, dass es eine hohe Assoziation gibt zwischen dem AT1-AA und der Antikörper vermittelten Abstoßung nach Nierentransplantati-

on bei Patienten, die keine HLA- und MICA-Antikörper aufwiesen (Reinsmoen *et al.*, 2010). Auch in der Rheumaforschung hat sich der AT1-AA für Patienten mit systemischer Sklerodermie als Biomarker für die Risiko-Stratifizierung und die Prognose des Krankheitsverlaufes als geeignet erwiesen (Riemekasten *et al.*, 2011). Neben diesen Studien sind zahlreiche weitere veröffentlicht worden, die beweisen, dass der AT1-AA nicht nur bei Patientinnen mit PE nachweisbar ist, sondern auch eine tragende Rolle in verschiedenen anderen Erkrankungsbildern zu spielen scheint. Die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung des AT1-AA bei der PE mit Hilfe des EIA von CellTrend sollte innerhalb dieser Arbeit untersucht werden. Die Ergebnisse dieser gemessenen Werte wurden im Zusammenhang mit der klinischen Studie ausgewertet. Die Auswertung der gemessenen Werte für den AT1-AA mittels EIA der Firma CellTrend zeigt, dass die meisten Werte unterhalb des cutoff von 20 U/ml liegen. Nach Angaben des Herstellers ist der Nachweis des AT1-AA allerdings nur bei einem Wert  $\geq 20$  U/ml gesichert. Demzufolge hat der Test keinen prädiktiven Wert für hypertensive Schwangerschaftserkrankungen, um Schwangere als Risikopatientinnen zu screenen.

Die Ergebnisse der gemessenen Werte für den AT1-AA mittels des kommerziell verfügbaren Assay von CellTrend sind nicht mit denen des Bioassays von Wallukat im Jahr 1999 (Wallukat *et al.*, 1999) vergleichbar. Um die Korrelation der biologischen Aktivität in Wallukats Versuch mit der gemessenen Quantität durch den CellTrend-Assay zu berechnen, bedarf es weiterer Untersuchungen. Möglicherweise messen die beiden unterschiedlichen Methoden zwei unterschiedliche Aktivitäten. Oder aber die gemessene Aktivität in Wallukats Versuch korreliert mit der gemessenen Quantität des EIA der Firma CellTrend. An dieser Stelle sei erneut darauf hingewiesen, dass keine Studien existieren, die den AT1-AA bereits im ersten Trimester der Schwangerschaft nachweisen konnten. Möglicherweise ist der AT1-AA zu diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft noch nicht gebildet und deshalb nicht mit dem Assay der Firma CellTrend nachweisbar.

### **5.7 Mögliche Triggerfaktoren für die Entstehung des AT1-AA**

Die Ursachenklärung für die Entstehung des AT1-AA ist ein entscheidender Ansatz für die Entwicklung potentiell präventiver Maßnahmen. Dabei werden spezifische „Triggerfaktoren“ für die Bildung von AT1-AA diskutiert. Bei genauerer Betrachtung kristallisieren sich zwei favorisierte Theorien heraus. Die eine basiert auf dem Vorhandensein eines molekularen Mimikris (Oldstone, 1998), die andere geht von einem Endothelschaden aus (Vecchi *et al.*, 2000). Die erste Theorie bezieht sich auf die bereits oben erwähnte Sieben-Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Schleife des AT1-Rezeptors (Wallukat *et al.*,

1999). Dieser hat eine Übereinstimmung von sechs Aminosäuren mit den Kapsidproteinen des humanen Parvovirus B19, VP1 und VP2 (Stepan *et al.*, 2007). Es handelt sich dabei um einen Einzelstrang-DNA-Virus, welcher u.a. mit *Hydrops fetalis*, fetaler Anämie und *Erythema infectiosum* assoziiert ist (Brown und Young, 1997).

Neuere Erkenntnisse betreffen das gemeinsame Auftreten von Parvovirus B19 im Myokard und einer Kardiomyopathie oder endothelialen Dysfunktion (Vallbracht *et al.*, 2004; Tschöpe *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Ergebnisse diskutierten Walther und Stepan die Hypothese, dass eine vorangegangene Parvovirus B19-Infektion und der damit verbundene Kontakt mit den Kapsidantigenen (VP1, VP2) zu der Entwicklung von agonistisch am AT1-Rezeptor wirkenden Antikörpern führt, basierend auf molekularem Mimikry und letztlich in dem klinischen Bild einer PE endet (Walther und Stepan, 2007). Doch die Ergebnisse zeigten, dass der Anteil von AT1-AA-positiven Schwangeren in der Gruppe mit Parvovirus B19-IgG-negativen Patientinnen höher ist als in der Gruppe mit einem positiven Nachweis für Parvovirus B19-positiven Patientinnen (Stepan *et al.*, 2007). Diese Erkenntnisse führen somit zu der Annahme, dass eine vorangegangene Parvovirus B19-Infektion möglicherweise vor der Entwicklung einer PE schützen könnte und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Innerhalb der aktuellen klinischen Studie wurde bis dato noch keine Untersuchung begonnen, die eine potentielle Assoziation zwischen Parvovirus B19-positiven Schwangeren und der Entwicklung einer PE überprüft.

### **5.8 Aussichten präventiver Maßnahmen**

In Bezug auf die Möglichkeit der Detektion des AT1-AA im Serum präeklampsischer Frauen als mögliches Screeningverfahren mittels zellbasierenden EIA der Firma CellTrend wäre eine weitere Untersuchung innerhalb einer groß angelegten Studie sinnvoll. Berücksichtigt man dabei die Erkenntnisse der klinischen Studie innerhalb dieser Arbeit, die den AT1-AA im ersten Trimester der Schwangerschaft mittels des kommerziell verfügbaren Assays nicht nachweisen konnte, sollten Seren schwangerer Frauen im zweiten Trimester untersucht werden. Möglicherweise ist der AT1-AA tatsächlich nicht im ersten Trimester nachweisbar, weil dieser erst zu einem späteren Zeitpunkt gebildet wird. Dennoch sei auf die Tatsache hingewiesen, dass nicht alle Frauen, bei denen der AT1-AA nachgewiesen werden konnte, im weiteren Verlauf der Schwangerschaft eine PE entwickeln müssen (Walther *et al.*, 2005). Zahlreiche Studien zeigten, dass nicht nur die Verwendung von Nachweismethoden biochemischer Marker alleine, sondern deren Kombination mit mütterlicher Anamnese und Doppleruntersuchun-

gen der *A. uterina* zur Früherkennung einer PE sinnvoll sein könnten (Onwudiwe *et al.*, 2008; Poon *et al.*, 2010).

Dennoch ist nicht geklärt, welche Konsequenzen bzw. Behandlungsstrategien aus einer möglichen sicheren Diagnosestellung einer PE folgen würden. Die Überlegung, einen AT1-Rezeptorblocker zu verwenden, liegt nahe, doch sind diese wegen ihrer gefürchteten teratogenen Wirkung während der Schwangerschaft kontraindiziert. Eine weitere Möglichkeit wäre die Anwendung eines Immunadsorptionsverfahrens zur Eliminierung der AT1-AA. Allerdings ist diese Methode neben der Invasivität auch kostenaufwendig und deshalb die Etablierung dieses Verfahrens im Rahmen der PE fragwürdig und ihr Kosten-Nutzen-Verhältnis klärungsbedürftig. Derzeit wird zum Schutz der Mutter bei ausgeprägter Symptomatik einer PE die sofortige Beendigung der Schwangerschaft durch umgehende Einleitung der Geburt des Kindes als einzig kurativer Ansatz praktiziert und führt nicht selten zu einer Reihe von möglichen Komplikationen für das Frühgeborene.

Die Therapiemöglichkeiten scheinen derzeit begrenzt und die Suche nach Alternativen notwendig. Die Verwendung des Peptids mit der Aminosäuresequenz AFHYESQ-OH (entspricht der Sequenz der 2. extrazellulären Schleife des AT1-Rezeptors) als potentiell Mittel zur Vermeidung der durch die Bindung des AT1-AA an seinen AT1-Rezeptor entstehenden Signalkaskade kann leider nicht überprüft werden. Denn dieser Ansatz führt durch die Internalisierung des AT1-Rezeptors auch zum Verlust bzw. zur Schwächung der für die Nierenentwicklung des Feten essentiellen Stimulation durch Ang II mit entsprechenden fatalen Folgen für das Neugeborene.

## **Zusammenfassung der Arbeit**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

### **Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung des Autoimmunantikörpers gegen den AT1-Rezeptor im ersten Trimester der Schwangerschaft zur Prädiktion der Präeklampsie**

**Andrea Logar**

Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Leipzig

**betreut von Prof. Dr. Thomas Walther**

Oktober 2014

Die Präeklampsie (PE), eine schwangerschaftsspezifische Erkrankung, ist durch das erstmalige Auftreten von arterieller Hypertonie und Proteinurie nach der 20. Schwangerschaftswoche charakterisiert. Laut Literatur tritt sie in 2 - 8 % aller Schwangerschaften auf und ist unverändert eine der häufigsten Ursachen für mütterliche und kindliche Morbidität und Mortalität (Duley, 2003; Sibai, 2003; Schneider *et al.*, 2012). Im Zuge dessen wurden weltweit zahlreiche Studien zum Verständnis des pathophysiologischen Geschehens mit dem Ziel der Früherkennung des Syndroms Präeklampsie durchgeführt. Dabei scheint die gestörte Implantation des Trophoblasten mit nachfolgender Fehlentwicklung des plazentaren arteriellen Gefäßsystems eine Schlüsselrolle zu spielen. Neben einer Beteiligung blutdruckregulierender endothelialer Substanzen (Stepan *et al.*, 2008) wird ein dysreguliertes Renin-Angiotensin-System als mögliche Ursache für die Entwicklung einer PE in Betracht gezogen (Shah, 2005; Herse *et al.*, 2007). Seit seiner Erstbeschreibung durch Wallukat und Kollegen steht der Autoimmunantikörper gegen den AT1-Rezeptor (AT1-AA) im Fokus der Forschung zur Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems in der Pathophysiologie der PE (Wallukat *et al.*, 1999). Der AT1-AA aktiviert AT1-Rezeptoren auf unterschiedlichsten Zellen und bewirkt somit verschiedene, für die PE charakteristische pathophysiologische Reaktionen (Dechend *et al.*, 2000; Dechend

*et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008a). Im Hinblick auf diese Erkenntnisse war es das Ziel der klinisch-experimentellen Studie, in die 2187 Frauen eingeschlossen wurden, im ersten Trimester der Schwangerschaft mittels anamnestischer Informationen zur Mutter und Familie, inklusive Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen während der Schwangerschaft, anhand des Schwangerschaftsverlaufes, biometrischer Daten des Kindes und Bestimmung von biochemischen Markern, mit besonderem Fokus auf den AT1-AA, in Serumproben der Schwangeren mögliche Zusammenhänge aufzudecken, die eine Diagnosestellung PE bereits vor Auftreten der klinischen Symptomatik ermöglichen. Dabei bestätigte ein Teil der Resultate bekannte Risikofaktoren zur Entwicklung einer Präeklampsie. So wurde z. B. auch das Alter der Mutter, ein vielfach diskutierter Risikofaktor für die Entwicklung einer PE, in der klinischen Studie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl Frauen mit einem essentiellen arteriellen Hypertonus als auch Frauen, die im Verlauf der Schwangerschaft eine Präeklampsie entwickelten, mit durchschnittlich 37 Jahren deutlich älter waren als Frauen ohne Schwangerschaftskomplikationen und Kollektive mit anderen Schwangerschaftserkrankungen. Neben zahlreichen Risikofaktoren zur Entwicklung einer PE gibt es auch protektive Faktoren, wie z. B. das Rauchen von Zigaretten, das in der Schwangerschaft das Risiko, eine PE zu entwickeln, um 30 – 50 % reduziert (Zhang *et al.*, 1999; Conde-Agudelo und Belizan, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit erbrachte Auswertung der Studiendaten konnte diese Ergebnisse sehr gut untermauern, da alle Schwangeren, die eine PE entwickelten, Nichtraucherinnen waren. Des Weiteren zeigte die Auswertung der klinischen Studie, dass von den insgesamt 2109 Frauen nur 21 eine PE entwickelten. Daraus ergibt sich eine Diskrepanz zwischen der innerhalb der klinischen Studie berechneten Inzidenz der PE von 0,99 % und der von Schneider für Deutschland angegebenen Inzidenz mit 2,31 % (Schneider *et al.*, 2012). Der deutliche Unterschied in der Inzidenz scheint zum einen ein weitreichendes Problem der adäquaten Diagnosestellung zu sein und zum anderen mit dem untersuchten Patientenkollektiv bezüglich bestimmter Risikogruppen- und Faktoren zusammenzuhängen und wird innerhalb der vorliegenden Arbeit ausführlich diskutiert.

Im Mittelpunkt der Auswertung der klinischen Studie stand der AT1-AA, der anhand eines kommerziell verfügbaren EIA (enzymatisches Immunadsorptionsverfahren) der Firma Cell-Trend in Serumproben von 181 Schwangeren im ersten Trimester quantitativ bestimmt wurde. 95 dieser 181 Frauen waren gesund und dienten als Vergleichs- bzw. Kontrollgruppe. Die weiteren 86 Frauen entwickelten eine schwangerschaftsassozierte Pathologie und wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit als erkranktes Kollektiv bezeichnet. Die Ergebnisse der gemessenen Werte wurden im Zusammenhang mit der klinischen Studie ausgewertet. Bei-



## Zusammenfassung der Arbeit

spielhaft fiel auf, dass Schwangere, die im weiteren Verlauf keine schwangerschaftsassozierte Erkrankung entwickelten und eine positive Anamnese für eine rheumatische Erkrankung haben im Vergleich zu Werten von den Frauen ohne Rheuma im gesunden Kollektiv einen signifikanten Anstieg der gemessenen Werte für den AT1-AA aufzeigen. Dieser signifikante Anstieg blieb bei den Rheumatikerinnen, die eine PE entwickelten, jedoch aus. Dementsprechend zeigte die Gegenüberstellung der Rheumatikerinnen mit einem pathologischen Ausgang der Schwangerschaft signifikant niedrigere Werte des AT1-AA im Vergleich zu Rheumatikerinnen, die keine Pathologie entwickelten. Diese Ergebnisse bestätigen einmal mehr die von Walther und Kollegen aufgestellte Hypothese, dass es sich beim AT1-AA nicht um einen spezifischen Marker für die PE handelt (Walther *et al.*, 2005), sondern vielmehr im Rahmen diverser anderer Erkrankungen, wie zum Beispiel der systemischen Sklerodermie (Riemekasten *et al.*, 2011) oder auch im Rahmen von Nierentransplantatabstoßungen (Dragun *et al.*, 2005) eine Rolle spielt und deshalb möglicherweise auch bei Frauen nachweisbar ist, die keine schwangerschaftsassozierte Pathologie entwickeln.

Als zweites Beispiel sei hier die Kalziumsubstitution genannt, die als probates Mittel zur Prävention für hypertensive Schwangerschaftserkrankungen in zahlreichen Studien in den letzten Jahren diskutiert wurde. Das Review von Hofmeyr *et al.* im Jahr 2010 beschreibt die Auswertung durchgeführter Studien in entwickelten als auch in nichtentwickelten Ländern und zeigte, dass eine Kalziumsubstitution während der Schwangerschaft das Auftreten von Gestationshypertonus, PE und Frühgeburtlichkeit senken kann (Hofmeyr *et al.*, 2010). Studien über einen potentiellen Einfluss von Kalziumsubstitution auf den AT1-AA wurden bislang nicht veröffentlicht. Innerhalb der klinischen Studie nahmen von den 181 untersuchten Frauen 13 während des ersten Trimesters der Schwangerschaft Kalzium ein. Dabei konnte der Vergleich gesunder Schwangerer ohne Kalziumsubstitution mit den Gesunden, die Kalzium einnahmen, zeigen, dass die Werte des AT1-AA bei den gesunden Schwangeren unter Kalziumsubstitution tendenziell niedriger sind als die gemessenen Werte bei gesunden Frauen ohne Kalziumsubstitution. Dieses Resultat gibt Grund zur Annahme, dass die Ergänzung von Kalzium im ersten Trimester der Schwangerschaft möglicherweise Einfluss auf die Bildung des AT1-AA haben kann. Doch um diesbezüglich statistisch verifizierbare Aussagen zu erhalten, sollte eine größere Anzahl von schwangeren Frauen untersucht werden.

Neben der Quantifizierung des AT1-AA und der Einbindung der Messergebnisse in die Daten der klinischen Studie und deren gemeinsamer Datenanalyse enthält die vorgelegte Arbeit auch einen experimentellen Abschnitt. Die Rationale für die Versuche basiert auf der Tatsache, dass, obwohl Wallukat *et al.* das Epitop, das durch den AT1-AA erkannt wird, bereits 1999

## Zusammenfassung der Arbeit

beschrieben haben (Wallukat *et al.*, 1999), die Etablierung eines antikörperbasierten Assays fehlschlug. Dies lässt vermuten, dass die von Wallukat und seiner Arbeitsgruppe mit Hilfe eines Peptides untersuchte Bindungsdomäne für den AT1-AA an der 2. extrazellulären Schleife des AT1-Rezeptors zu positiven Ergebnissen geführt hat, weil das sieben Aminosäure-lange Peptid mit Homologie zum AT1-Rezeptor in der Schleife selbst die Konzentration des AT1-Rezeptors in den Zellen reduzierte und damit die Effekte des AT1-AA verhinderte und nicht, wie in der Arbeit von 1999 geschlussfolgert, das Peptid mit dem AT1-AA interagiert und so zum Ausbleiben des Signals (Erhöhung der Kontraktilität) geführt hat. Vor diesem Hintergrund wurden innerhalb der experimentellen Arbeit HEK-Zellen mit einem AT1-kodierenden Plasmid transfiziert und die Effekte des Peptids mit der Sequenz AFHYESQ-OH (entspricht der von Wallukat und Kollegen identifizierten Sequenz der 2. extrazellulären Schleife des AT1-Rezeptors, an den der AT1-AA binden soll) auf die Effizienz von Ang II untersucht, den Transkriptionsfaktor „Serum Response Factor“ zu stimulieren. Dabei zeigte sich, wie erwartet, dass Ang II in AT1-transfizierten Zellen zu einer hochsignifikanten Erhöhung des Signals führte. Die parallele Zugabe des Heptapeptids reduzierte den Ang II-medierten Anstieg signifikant um 32,9 %, konnte das Signal aber nicht vollständig blockieren.

Die Auswertung der gemessenen Werte für den AT1-AA mittels EIA der Firma CellTrend zeigt, dass fast alle Werte unterhalb der angegebenen Grenze für einen positiven Wert von 20 U/ml liegen. Da dementsprechend laut Hersteller der Nachweis des AT1-AA nur bei einem Wert  $\geq 20$  U/ml gesichert ist, hätte der Test keinen prädiktiven Wert für hypertensive Schwangerschaftserkrankungen, um Risikoschwangerschaften im ersten Trimester zu screenen. Entsprechend konnte im Rahmen dieser Arbeit keine mögliche Assoziation zwischen gemessenen Werten für den AT1-AA und den Erkrankungen PE und HELLP-Syndrom festgestellt werden. Dies könnte möglicherweise darin begründet sein, dass die Bildung des AT1-AA das Resultat einer Perfusionsstörung und Trophoblastenischämie darstellt und der AT1-AA daher noch nicht im ersten Trimester, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft nachweisbar ist. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass bis dato keine Studien existieren, die den AT1-AA bereits im ersten Trimester der Schwangerschaft nachweisen konnten. Allerdings kann die Arbeit auch nicht ausschließen, dass der Assay der Firma CellTrend prinzipiell nicht geeignet ist, um den AT1-AA zu quantifizieren und dass dies zu dem fehlenden AT1-AA-Nachweis im Blut von Schwangeren, die später eine PE entwickeln, geführt hat. Hier konnte die Arbeit zwar die Grundlagen für Interpretationen legen, es bedarf aber weiterer klinischer und experimenteller Arbeiten mit dem hier verwendeten Assay und anderen Nachweismethoden, um abschließende Schlussfolgerungen zu erlauben.

## Literaturverzeichnis

2000. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 183, S1-S22.
- ABDALLA, S., ABDEL-BASET, A., LOTHER, H., EL MASSIERY, A. & QUITTERER, U.** 2005. Mesangial AT1/B2 receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension. *J Mol Neurosci*, 26, 185-92.
- AKSORNPUSITAPHONG, A. & PHUPONG, V.** 2012. Risk factors of early and late onset pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*.
- ANTON, L., MERRILL, D. C., NEVES, L. A., STOVALL, K., GALLAGHER, P. E., DIZ, D. I., MOOREFIELD, C., GRUVER, C., FERRARIO, C. M. & BROSNIHAN, K. B.** 2008. Activation of local chorionic villi angiotensin II levels but not angiotensin (1-7) in preeclampsia. *Hypertension*, 51, 1066-72.
- ARIZA, A. C., BOBADILLA, N. A. & HALHALI, A.** 2007. [Endothelin 1 and angiotensin II in preeclampsia]. *Rev Invest Clin*, 59, 48-56.
- ASSALI, N. S. & WESTERSTEN, A.** 1961. Regional flow-pressure relationship in response to angiotensin in the intact dog and sheep. *Circ Res*, 9, 189-93.
- BOBST, S. M., DAY, M. C., GILSTRAP, L. C., 3RD, XIA, Y. & KELLEMS, R. E.** 2005. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion. *Am J Hypertens*, 18, 330-6.
- BROWN, C. E., GANT, N. F., COX, K., SPITZ, B., ROSENFELD, C. R. & MAGNESS, R. R.** 1990. Low-dose aspirin. II. Relationship of angiotensin II pressor responses, circulating eicosanoids, and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol*, 163, 1853-61.
- BROWN, K. E. & YOUNG, N. S.** 1997. Parvovirus B19 in human disease. *Annu Rev Med*, 48, 59-67.
- BROWN, M. A., GALLERY, E. D., ROSS, M. R. & ESBER, R. P.** 1988. Sodium excretion in normal and hypertensive pregnancy: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol*, 159, 297-307.
- BROWN, M. A., WANG, J. & WHITWORTH, J. A.** 1997. The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens*, 19, 713-26.
- BUMPUS, F. M., CATT, K. J., CHIU, A. T., DEGASPARO, M., GOODFRIEND, T., HUSAIN, A., PEACH, M. J., TAYLOR, D. G., JR. & TIMMERMANS, P. B.** 1991. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*, 17, 720-1.

- BURTON**, G. J., HEMPSTOCK, J. & JAUNIAUX, E. 2003. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online*, 6, 84-96.
- CANIGGIA**, I., GRISARU-GRAVNOSKY, S., KULISZEWSKY, M., POST, M. & LYE, S. J. 1999. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest*, 103, 1641-50.
- CHEIFETZ**, S., BELLON, T., CALES, C., VERA, S., BERNABEU, C., MASSAGUE, J. & LETARTE, M. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 267, 19027-30.
- CHESLEY**, L. C., ANNITTO, J. E. & COSGROVE, R. A. 1968. The familial factor in toxemia of pregnancy. *Obstet Gynecol*, 32, 303-11.
- CHIEN**, P. F., ARNOTT, N., GORDON, A., OWEN, P. & KHAN, K. S. 2000. How useful is uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of pre-eclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An overview. *BJOG*, 107, 196-208.
- COLBERN**, G. T., CHIANG, M. H. & MAIN, E. K. 1994. Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 170, 1244-50.
- CONDE-AGUDELO**, A. & BELIZAN, J. M. 2000. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *BJOG*, 107, 75-83.
- CONDE-AGUDELO**, A., ROMERO, R., KUSANOVIC, J. P. & HASSAN, S. S. 2011. Supplementation with vitamins C and E during pregnancy for the prevention of preeclampsia and other adverse maternal and perinatal outcomes: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*, 204, 503 e1-12.
- DECHEND**, R., HOMUTH, V., WALLUKAT, G., KREUZER, J., PARK, J. K., THEUER, J., JUEPNER, A., GULBA, D. C., MACKMAN, N., HALLER, H. & LUFT, F. C. 2000. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation*, 101, 2382-7.
- DECHEND**, R., MULLER, D. N., WALLUKAT, G., HOMUTH, V., KRAUSE, M., DUDENHAUSEN, J. & LUFT, F. C. 2004. AT1 receptor agonistic antibodies, hypertension, and preeclampsia. *Semin Nephrol*, 24, 571-9.
- DECHEND**, R., VIEDT, C., MULLER, D. N., UGELE, B., BRANDES, R. P., WALLUKAT, G., PARK, J. K., JANKE, J., BARTA, P., THEUER, J., FIEBELER, A., HOMUTH, V., DIETZ, R., HALLER, H., KREUZER, J. & LUFT, F. C. 2003. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation*, 107, 1632-9.
- DEKKER**, G. A. & SIBAI, B. M. 1998. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol*, 179, 1359-75.

- DEKKER, G. A. & SIBAI, B. M.** 1999. The immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol*, 23, 24-33.
- DORFFEL, Y., WALLUKAT, G., BOCHNIG, N., HOMUTH, V., HERBERG, M., DORFFEL, W., PRUSS, A., CHAOUI, R. & SCHOLZE, J.** 2003. Agonistic AT(1) receptor autoantibodies and monocyte stimulation in hypertensive patients. *Am J Hypertens*, 16, 827-33.
- DRAGUN, D., MULLER, D. N., BRASEN, J. H., FRITSCHKE, L., NIEMINEN-KELHA, M., DECHEND, R., KINTSCHER, U., RUDOLPH, B., HOEBEKE, J., ECKERT, D., MAZAK, I., PLEHM, R., SCHONEMANN, C., UNGER, T., BUDDE, K., NEUMAYER, H. H., LUFT, F. C. & WALLUKAT, G.** 2005. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*, 352, 558-69.
- DUCKITT, K. & HARRINGTON, D.** 2005. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*, 330, 565.
- DULEY, L.** 2003. Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy. *Br Med Bull*, 67, 161-76.
- DURIG, P., FERRIER, C. & SCHNEIDER, H.** 1999. [Hypertensive disorders in pregnancy]. *Ther Umsch*, 56, 561-71.
- ESKENAZI, B., FENSTER, L. & SIDNEY, S.** 1991. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *JAMA*, 266, 237-41.
- ESKILD, A., NILSEN, T. I., JEANSSON, S., JENUM, P. A. & VATTEN, L. J.** 2008. Serum levels of immunoglobulin E and the subsequent risk of pre-eclampsia: a population-based study. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87, 373-6.
- FAY, W. P.** 2004. Plasminogen activator inhibitor 1, fibrin, and the vascular response to injury. *Trends Cardiovasc Med*, 14, 196-202.
- FU, M. L., HERLITZ, H., SCHULZE, W., WALLUKAT, G., MICKE, P., EFTEKHARI, P., SJOGREN, K. G., HJALMARSON, A., MULLER-ESTERL, W. & HOEBEKE, J.** 2000. Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. *J Hypertens*, 18, 945-53.
- GANT, N. F., WORLEY, R. J., EVERETT, R. B. & MACDONALD, P. C.** 1980. Control of vascular responsiveness during human pregnancy. *Kidney Int*, 18, 253-8.
- GENBACEV, O., ZHOU, Y., LUDLOW, J. W. & FISHER, S. J.** 1997. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*, 277, 1669-72.
- GIGUERE, Y., CHARLAND, M., BUJOLD, E., BERNARD, N., GRENIER, S., ROUSSEAU, F., LAFOND, J., LEGARE, F. & FOREST, J. C.** 2010. Combining biochemical and ultrasonographic markers in predicting preeclampsia: a systematic review. *Clin Chem*, 56, 361-75.
- GOUGOS, A., ST JACQUES, S., GREAVES, A., O'CONNELL, P. J., D'APICE, A. J., BUHRING, H. J., BERNABEU, C., VAN MOURIK, J. A. & LETARTE, M.** 1992.

## Literaturverzeichnis

- Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol*, 4, 83-92.
- GREER**, I. A., LYALL, F., PERERA, T., BOSWELL, F. & MACARA, L. M. 1994. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet Gynecol*, 84, 937-40.
- GUTTERIDGE**, J. M. & HALLIWELL, B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*, 899, 136-47.
- HAGEMANN**, A., NIELSEN, A. H. & POULSEN, K. 1994. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol*, 102, 252-61.
- HANDA**, R. K. 1999. Angiotensin-(1-7) can interact with the rat proximal tubule AT(4) receptor system. *Am J Physiol*, 277, F75-83.
- HANDA**, R. K. 2000. Metabolism alters the selectivity of angiotensin-(1-7) receptor ligands for angiotensin receptors. *J Am Soc Nephrol*, 11, 1377-86.
- HAUKKAMAA**, L., SALMINEN, M., LAIVUORI, H., LEINONEN, H., HIILESMAA, V. & KAAJA, R. 2004. Risk for subsequent coronary artery disease after preeclampsia. *Am J Cardiol*, 93, 805-8.
- HERSE**, F., DECHEND, R., HARSEM, N. K., WALLUKAT, G., JANKE, J., QADRI, F., HERING, L., MULLER, D. N., LUFT, F. C. & STAFF, A. C. 2007. Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia. *Hypertension*, 49, 604-11.
- HODARI**, A. A., SMEBY, R. & BUMPUS, F. M. 1967. A renin-like substance in the human placenta. *Obstet Gynecol*, 29, 313-7.
- HOFMEYR**, G. J., LAWRIE, T. A., ATALLAH, A. N. & DULEY, L. 2010. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001059.
- HOJO**, M., SUTHANTHIRAN, M., HELSETH, G. & AUGUST, P. 1999. Lymphocyte intracellular free calcium concentration is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 180, 1209-14.
- HOVDENAK**, N. & HARAM, K. 2012. Influence of mineral and vitamin supplements on pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 164, 127-32.
- HSUEH**, W. A., LUETSCHER, J. A., CARLSON, E. J., GRISLIS, G., FRAZE, E. & MCHARGUE, A. 1982. Changes in active and inactive renin throughout pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 54, 1010-6.
- HUBEL**, C. A. 1999. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222, 222-35.

- HUNYADY, L., GABORIK, Z., SHAH, B. H., JAGADEESH, G., CLARK, A. J. & CATT, K. J.** 2004. Structural determinants of agonist-induced signaling and regulation of the angiotensin AT1 receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 217, 89-100.
- HUNYADY, L. & TURU, G.** 2004. The role of the AT1 angiotensin receptor in cardiac hypertrophy: angiotensin II receptor or stretch sensor? *Trends Endocrinol Metab*, 15, 405-8.
- IMDAD, A., JABEEN, A. & BHUTTA, Z. A.** 2011. Role of calcium supplementation during pregnancy in reducing risk of developing gestational hypertensive disorders: a meta-analysis of studies from developing countries. *BMC Public Health*, 11 Suppl 3, S18.
- JIANG, B., KAMAT, A. & MENDELSON, C. R.** 2000. Hypoxia prevents induction of aromatase expression in human trophoblast cells in culture: potential inhibitory role of the hypoxia-inducible transcription factor Mash-2 (mammalian achaete-scute homologous protein-2). *Mol Endocrinol*, 14, 1661-73.
- JOHNSON, A., TOWNSHEND, P., YUDKIN, P., BULL, D. & WILKINSON, A. R.** 1993. Functional abilities at age 4 years of children born before 29 weeks of gestation. *BMJ*, 306, 1715-8.
- KARUMANCHI, S. A. & BDOLAH, Y.** 2004. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the "chicken-and-egg" question. *Endocrinology*, 145, 4835-7.
- KAUFMANN, P., BLACK, S. & HUPPERTZ, B.** 2003. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*, 69, 1-7.
- KENDALL, R. L. & THOMAS, K. A.** 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10705-9.
- KOELMAN, C. A., COUMANS, A. B., NIJMAN, H. W., DOXIADIS, II, DEKKER, G. A. & CLAAS, F. H.** 2000. Correlation between oral sex and a low incidence of preeclampsia: a role for soluble HLA in seminal fluid? *J Reprod Immunol*, 46, 155-66.
- LACHMEIJER, A. M., DEKKER, G. A., PALS, G., AARNOUDSE, J. G., TEN KATE, L. P. & ARNGRIMSSON, R.** 2002. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 105, 94-113.
- LEVINE, R. J. & KARUMANCHI, S. A.** 2005. Circulating angiogenic factors in preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol*, 48, 372-86.
- LEVINE, R. J., LAM, C., QIAN, C., YU, K. F., MAYNARD, S. E., SACHS, B. P., SIBAI, B. M., EPSTEIN, F. H., ROMERO, R., THADHANI, R., KARUMANCHI, S. A. & GROUP, C. S.** 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 355, 992-1005.
- LI, C., ANSARI, R., YU, Z. & SHAH, D.** 2000. Definitive molecular evidence of renin-angiotensin system in human uterine decidual cells. *Hypertension*, 36, 159-64.

- LI, Y., SONG, Y. H., MOHLER, J. & DELAFONTAINE, P.** 2006. ANG II induces apoptosis of human vascular smooth muscle via extrinsic pathway involving inhibition of Akt phosphorylation and increased FasL expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H2116-23.
- LIM, K. H., ZHOU, Y., JANATPOUR, M., MCMASTER, M., BASS, K., CHUN, S. H. & FISHER, S. J.** 1997. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol*, 151, 1809-18.
- LORENTZEN, B. & HENRIKSEN, T.** 1998. Plasma lipids and vascular dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*, 16, 33-9.
- LUFT, F. C.** 2000. The preeclampsia enigma and the renin-angiotensin system. *J Mol Med (Berl)*, 78, 63-5.
- MAGNU, P. & ESKILD, A.** 2001. Seasonal variation in the occurrence of pre-eclampsia. *BJOG*, 108, 1116-9.
- MARIC, C., ZHENG, W. & WALTHER, T.** 2006. Interactions between angiotensin II and atrial natriuretic peptide in renomedullary interstitial cells: the role of neutral endopeptidase. *Nephron Physiol*, 103, p149-56.
- MAYNARD, S. E., MIN, J. Y., MERCHAN, J., LIM, K. H., LI, J., MONDAL, S., LIBERMANN, T. A., MORGAN, J. P., SELLKE, F. W., STILLMAN, I. E., EPSTEIN, F. H., SUKHATME, V. P. & KARUMANCHI, S. A.** 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 111, 649-58.
- MCKEEMAN, G. C., ARDILL, J. E., CALDWELL, C. M., HUNTER, A. J. & MCCLURE, N.** 2004. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *Am J Obstet Gynecol*, 191, 1240-6.
- MERRILL, D. C., KAROLY, M., CHEN, K., FERRARIO, C. M. & BROSNIHAN, K. B.** 2002. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine*, 18, 239-45.
- MIHRSHAHI, S., BELOUSOVA, E., MARKS, G. B., PEAT, J. K. & CHILDHOOD ASTHMA PREVENTION, T.** 2003. Pregnancy and birth outcomes in families with asthma. *J Asthma*, 40, 181-7.
- MORGAN, T., CRAVEN, C. & WARD, K.** 1998. Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertension*, 32, 683-7.
- MYATT, L., CLIFTON, R. G., ROBERTS, J. M., SPONG, C. Y., HAUTH, J. C., VARNER, M. W., THORP, J. M., JR., MERCER, B. M., PEACEMAN, A. M., RAMIN, S. M., CARPENTER, M. W., IAMS, J. D., SCISCIONE, A., HARPER, M., TOLOSA, J. E., SAADE, G., SOROKIN, Y., ANDERSON, G. D., EUNICE KENNEDY SHRIVER NATIONAL INSTITUTE OF CHILD, H. & HUMAN DEVELOPMENT MATERNAL-FETAL MEDICINE UNITS, N.** 2012. First-trimester prediction of preeclampsia in nulliparous women at low risk. *Obstet Gynecol*, 119, 1234-42.



- NAGAMATSU, T., FUJII, T., KUSUMI, M., ZOU, L., YAMASHITA, T., OSUGA, Y., MOMOEDA, M., KOZUMA, S. & TAKETANI, Y.** 2004. Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology*, 145, 4838-45.
- NESS, R. B. & HUBEL, C. A.** 2005. Risk for coronary artery disease and morbid preeclampsia: a commentary. *Ann Epidemiol*, 15, 726-33.
- OLDSTONE, M. B.** 1998. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J*, 12, 1255-65.
- ONWUDIWE, N., YU, C. K., POON, L. C., SPILIOPOULOS, I. & NICOLAIDES, K. H.** 2008. Prediction of pre-eclampsia by a combination of maternal history, uterine artery Doppler and mean arterial pressure. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 32, 877-83.
- PACKHAM, D. K., MATHEWS, D. C., FAIRLEY, K. F., WHITWORTH, J. A. & KINCAID-SMITH, P. S.** 1988. Morphometric analysis of pre-eclampsia in women biopsied in pregnancy and post-partum. *Kidney Int*, 34, 704-11.
- PETRUCCO, O. M., THOMSON, N. M., LAWRENCE, J. R. & WELDON, M. W.** 1974. Immunofluorescent studies in renal biopsies in pre-eclampsia. *Br Med J*, 1, 473-6.
- POISNER, A. M.** 1998. The human placental renin-angiotensin system. *Front Neuroendocrinol*, 19, 232-52.
- POON, L. C., KAMETAS, N. A., CHELEMEN, T., LEAL, A. & NICOLAIDES, K. H.** 2010. Maternal risk factors for hypertensive disorders in pregnancy: a multivariate approach. *J Hum Hypertens*, 24, 104-10.
- PRIDJIAN, G. & PUSCHETT, J. B.** 2002. Preeclampsia. Part 2: experimental and genetic considerations. *Obstet Gynecol Surv*, 57, 619-40.
- QUITTERER, U., LOTHER, H. & ABDALLA, S.** 2004. AT1 receptor heterodimers and angiotensin II responsiveness in preeclampsia. *Semin Nephrol*, 24, 115-9.
- REDMAN, C. W. & SARGENT, I. L.** 2009. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*, 30 Suppl A, S38-42.
- REINSMOEN, N. L., LAI, C. H., HEIDECHE, H., HAAS, M., CAO, K., ONG, G., NAIM, M., WANG, Q., MIROCHA, J., KAHWAJI, J., VO, A. A., JORDAN, S. C. & DRAGUN, D.** 2010. Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients. *Transplantation*, 90, 1473-7.
- RIEMEKASTEN, G., PHILIPPE, A., NATHER, M., SLOWINSKI, T., MULLER, D. N., HEIDECHE, H., MATUCCI-CERINIC, M., CZIRJAK, L., LUKITSCH, I., BECKER, M., KILL, A., VAN LAAR, J. M., CATAR, R., LUFT, F. C., BURMESTER, G. R., HEGNER, B. & DRAGUN, D.** 2011. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 70, 530-6.

- ROBILLARD**, P. Y., **DEKKER**, G., **CHAOUAT**, G. & **HULSEY**, T. C. 2007. Etiology of preeclampsia: maternal vascular predisposition and couple disease--mutual exclusion or complementarity? *J Reprod Immunol*, 76, 1-7.
- RODIE**, V. A., **FREEMAN**, D. J., **SATTAR**, N. & **GREER**, I. A. 2004. Pre-eclampsia and cardiovascular disease: metabolic syndrome of pregnancy? *Atherosclerosis*, 175, 189-202.
- ROELANDS**, J., **JAMISON**, M. G., **LYERLY**, A. D. & **JAMES**, A. H. 2009. Consequences of smoking during pregnancy on maternal health. *J Womens Health (Larchmt)*, 18, 867-72.
- ROS**, H. S., **CNATTINGIUS**, S. & **LIPWORTH**, L. 1998. Comparison of risk factors for preeclampsia and gestational hypertension in a population-based cohort study. *Am J Epidemiol*, 147, 1062-70.
- SANCHEZ-RAMOS**, L., **BRIONES**, D. K., **KAUNITZ**, A. M., **DELVALLE**, G. O., **GAUDIER**, F. L. & **WALKER**, C. D. 1994. Prevention of pregnancy-induced hypertension by calcium supplementation in angiotensin II-sensitive patients. *Obstet Gynecol*, 84, 349-53.
- SCHIFFRIN**, E. L. & **TOUYZ**, R. M. 2003. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol*, 42, 911-3.
- SCHNEIDER**, S., **FREERKSEN**, N., **ROHRIG**, S., **HOEFT**, B. & **MAUL**, H. 2012. Gestational diabetes and preeclampsia--similar risk factor profiles? *Early Hum Dev*, 88, 179-84.
- SHAH**, D. M. 2005. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288, F614-25.
- SHAH**, D. M., **BANU**, J. M., **CHIRGWIN**, J. M. & **TEKMAL**, R. R. 2000. Reproductive tissue renin gene expression in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 19, 341-51.
- SHAW**, K. J., **DO**, Y. S., **KJOS**, S., **ANDERSON**, P. W., **SHINAGAWA**, T., **DUBEAU**, L. & **HSUEH**, W. A. 1989. Human decidua is a major source of renin. *J Clin Invest*, 83, 2085-92.
- SHIBUYA**, M. 2001. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*, 26, 25-35.
- SHORTER**, S. C., **STARKEY**, P. M., **FERRY**, B. L., **CLOVER**, L. M., **SARGENT**, I. L. & **REDMAN**, C. W. 1993. Antigenic heterogeneity of human cytotrophoblast and evidence for the transient expression of MHC class I antigens distinct from HLA-G. *Placenta*, 14, 571-82.
- SIBAI**, B., **DEKKER**, G. & **KUPFERMINC**, M. 2005. Pre-eclampsia. *Lancet*, 365, 785-99.
- SIBAI**, B. M. 2001. Antihypertensive drugs during pregnancy. *Semin Perinatol*, 25, 159-64.

- SIBAI**, B. M. 2003. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 102, 181-92.
- SIBAI**, B. M. 2004. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol*, 103, 981-91.
- SIBAI**, B. M., EL-NAZER, A. & GONZALEZ-RUIZ, A. 1986. Severe preeclampsia-eclampsia in young primigravid women: subsequent pregnancy outcome and remote prognosis. *Am J Obstet Gynecol*, 155, 1011-6.
- STEEGERS**, E. A., VON DADELSZEN, P., DUVEKOT, J. J. & PIJNENBORG, R. 2010. Pre-eclampsia. *Lancet*, 376, 631-44.
- STEPAN**, H., GEIPEL, A., SCHWARZ, F., KRAMER, T., WESSEL, N. & FABER, R. 2008. Circulatory soluble endoglin and its predictive value for preeclampsia in second-trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion. *Am J Obstet Gynecol*, 198, 175 e1-6.
- STEPAN**, H., HEIHOFF-KLOSE, A. & FABER, R. 2004. Reduced antioxidant capacity in second-trimester pregnancies with pathological uterine perfusion. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 23, 579-83.
- STEPAN**, H., WALLUKAT, G., SCHULTHEISS, H. P., FABER, R. & WALTHER, T. 2007. Is parvovirus B19 the cause for autoimmunity against the angiotensin II type receptor? *J Reprod Immunol*, 73, 130-4.
- TAKIMOTO**, E., ISHIDA, J., SUGIYAMA, F., HORIGUCHI, H., MURAKAMI, K. & FUKAMIZU, A. 1996. Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science*, 274, 995-8.
- TAN**, G. W. & SALMON, Y. M. 1988. Meteorological factors and pre-eclampsia. *Singapore Med J*, 29, 133-7.
- THWAY**, T. M., SHLYKOV, S. G., DAY, M. C., SANBORN, B. M., GILSTRAP, L. C., 3RD, XIA, Y. & KELLEMS, R. E. 2004. Antibodies from preeclamptic patients stimulate increased intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization through angiotensin receptor activation. *Circulation*, 110, 1612-9.
- TJOA**, M. L., LEVINE, R. J. & KARUMANCHI, S. A. 2007. Angiogenic factors and preeclampsia. *Front Biosci*, 12, 2395-402.
- TRUPIN**, L. S., SIMON, L. P. & ESKENAZI, B. 1996. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology*, 7, 240-4.
- TSCHOPE**, C., BOCK, C. T., KASNER, M., NOUTSIAS, M., WESTERMANN, D., SCHWIMMBECK, P. L., PAUSCHINGER, M., POLLER, W. C., KUHL, U., KANDOLF, R. & SCHULTHEISS, H. P. 2005. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation*, 111, 879-86.

- UNGER, T.** 1999. Significance of angiotensin type 1 receptor blockade: why are angiotensin II receptor blockers different? *Am J Cardiol*, 84, 9S-15S.
- VALDES, G., GERMAIN, A. M., CORTHORN, J., BERRIOS, C., FORADORI, A. C., FERRARIO, C. M. & BROSNIHAN, K. B.** 2001. Urinary vasodilator and vasoconstrictor angiotensins during menstrual cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrine*, 16, 117-22.
- VALLBRACHT, K. B., SCHWIMMBECK, P. L., KUHL, U., SEEBERG, B. & SCHULTHEISS, H. P.** 2004. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation of systemic arteries is impaired in patients with myocardial virus persistence. *Circulation*, 110, 2938-45.
- VAN TUYL, M., LIU, J., WANG, J., KULISZEWSKI, M., TIBBOEL, D. & POST, M.** 2005. Role of oxygen and vascular development in epithelial branching morphogenesis of the developing mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288, L167-78.
- VANWIJK, M. J., KUBLICKIENE, K., BOER, K. & VANBAVEL, E.** 2000. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res*, 47, 38-48.
- VECCHI, M. L., RADICE, A., RENDA, F., MULE, G. & SINICO, R. A.** 2000. Anti-laminin auto antibodies in ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*, 15, 1600-3.
- VERLOHREN, S., GALINDO, A., SCHLEMBACH, D., ZEISLER, H., HERRAIZ, I., MOERTL, M. G., PAPE, J., DUDENHAUSEN, J. W., DENK, B. & STEPAN, H.** 2010. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 202, 161 e1-161 e11.
- WALKER, J. J.** 2000. Pre-eclampsia. *Lancet*, 356, 1260-5.
- WALLUKAT, G., HOMUTH, V., FISCHER, T., LINDSCHAU, C., HORSTKAMP, B., JUPNER, A., BAUR, E., NISSEN, E., VETTER, K., NEICHEL, D., DUDENHAUSEN, J. W., HALLER, H. & LUFT, F. C.** 1999. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest*, 103, 945-52.
- WALTHER, T. & STEPAN, H.** 2007. Agonist autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor in renal and hypertensive disorders. *Curr Hypertens Rep*, 9, 128-32.
- WALTHER, T., WALLUKAT, G., JANK, A., BARTEL, S., SCHULTHEISS, H. P., FABER, R. & STEPAN, H.** 2005. Angiotensin II type 1 receptor agonistic antibodies reflect fundamental alterations in the uteroplacental vasculature. *Hypertension*, 46, 1275-9.
- WELLINGTON, K. & MULLA, Z. D.** 2012. Seasonal trend in the occurrence of preeclampsia and eclampsia in Texas. *Am J Hypertens*, 25, 115-9.
- WILLIAMS, P. J. & BROUGHTON PIPKIN, F.** 2011. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25, 405-17.

- WILLIAMS, P. J., BULMER, J. N., INNES, B. A. & BROUGHTON PIPKIN, F.** 2011. Possible roles for folic acid in the regulation of trophoblast invasion and placental development in normal early human pregnancy. *Biol Reprod*, 84, 1148-53.
- XIA, Y., WEN, H., BOBST, S., DAY, M. C. & KELLEMS, R. E.** 2003. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig*, 10, 82-93.
- XIA, Y., WEN, H. Y. & KELLEMS, R. E.** 2002. Angiotensin II inhibits human trophoblast invasion through AT1 receptor activation. *J Biol Chem*, 277, 24601-8.
- YIE, S. M., LI, L. H., LI, Y. M. & LIBRACH, C.** 2004. HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 191, 525-9.
- YOUSSEF, A., RIGHETTI, F., MORANO, D., RIZZO, N. & FARINA, A.** 2011. Uterine artery Doppler and biochemical markers (PAPP-A, PIGF, sFlt-1, P-selectin, NGAL) at 11 + 0 to 13 + 6 weeks in the prediction of late (> 34 weeks) pre-eclampsia. *Prenat Diagn*, 31, 1141-6.
- ZHANG, J., KLEBANOFF, M. A., LEVINE, R. J., PURI, M. & MOYER, P.** 1999. The puzzling association between smoking and hypertension during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 181, 1407-13.
- ZHANG, J., MEIKLE, S. & TRUMBLE, A.** 2003. Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States. *Hypertens Pregnancy*, 22, 203-12.
- ZHOU, C. C., AHMAD, S., MI, T., ABBASI, S., XIA, L., DAY, M. C., RAMIN, S. M., AHMED, A., KELLEMS, R. E. & XIA, Y.** 2008a. Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertension*, 51, 1010-9.
- ZHOU, C. C., IRANI, R. A., ZHANG, Y., BLACKWELL, S. C., MI, T., WEN, J., SHELAT, H., GENG, Y. J., RAMIN, S. M., KELLEMS, R. E. & XIA, Y.** 2010. Angiotensin receptor agonistic autoantibody-mediated tumor necrosis factor- $\alpha$  induction contributes to increased soluble endoglin production in preeclampsia. *Circulation*, 121, 436-44.
- ZHOU, C. C., ZHANG, Y., IRANI, R. A., ZHANG, H., MI, T., POPEK, E. J., HICKS, M. J., RAMIN, S. M., KELLEMS, R. E. & XIA, Y.** 2008b. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med*, 14, 855-62.
- ZHOU, Y., DAMSKY, C. H. & FISHER, S. J.** 1997a. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*, 99, 2152-64.
- ZHOU, Y., FISHER, S. J., JANATPOUR, M., GENBACEV, O., DEJANA, E., WHEELLOCK, M. & DAMSKY, C. H.** 1997b. Human cytotrophoblasts adopt a

## Literaturverzeichnis

vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*, 99, 2139-51.

**ZHOU**, Y., **MCMASTER**, M., **WOO**, K., **JANATPOUR**, M., **PERRY**, J., **KARPANEN**, T., **ALITALO**, K., **DAMSKY**, C. & **FISHER**, S. J. 2002. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol*, 160, 1405-23.

## Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift

## **Curriculum vitae**

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





## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Walther für die entscheidende Themenstellung sowie die Betreuung und Unterstützung. Sein Engagement und seine Diskussionsbereitschaft trugen zur Fertigstellung der Arbeit bei. Außerdem danke ich ihm herzlich für das zeitaufwendige und kritische Korrekturlesen, das mir stets weitergeholfen hat.

Weiterhin danke ich PD Dr. Niels Wessel für die Durchführung der statistischen Berechnungen und für entscheidende Hinweise zur Datenauswertung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. Rolf Becker und seinem medizinischen und technischen Team für die großartige Hilfe bei der Durchführung der klinischen Studie bedanken.