

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr.med. Klaus Friese

Der Einfluß von Genveränderungen gerinnungsaktiver Faktoren und ihrer
Kombinationen auf das Risiko von Spontanaborten bei Patientinnen mit
rezidivierenden Spontanaborten unklarer Genese

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elke Atzenbeck
aus
Krumbach

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Tina Buchholz

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Rudolf Gruber

PD Dr. med. Karsten Spiekermann

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Dr. med. habil. Peter Lohse

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2006

1. Einleitung	4
1.1. Fehlgeburt (Abort)	4
1.1.1. Definition und Häufigkeit	4
1.1.2. Ätiologische Faktoren	4
1.2. Rezidivierende Fehlgeburten	6
1.2.1. Definition und Häufigkeit	6
1.2.2. Ätiologische Faktoren	6
1.2.2.1. Uterine Ursachen	7
1.2.2.2. Endokrinologische Ursachen	7
1.2.2.3. Autoantikörpersyndrome – Anti-Phospholipid-Syndrom	8
1.2.2.4. Immunologische Ursachen	9
1.2.2.5. Infektiöse Ursachen	10
1.2.2.6. Genetische Ursachen	10
1.2.2.7. Psychische Ursachen	10
1.2.2.8. Gerinnungsphysiologische Ursachen	11
1.2.3. Rationale Diagnostik	12
1.3. Hämostase in der Schwangerschaft	12
1.3.1. Veränderungen in der Hämostase	12
1.3.2. Grundlagen von Thrombose und Embolie in der Schwangerschaft	14
1.4. Einzelne Gerinnungsfaktoren	16
1.4.1. Faktor V	16
1.4.2. Faktor II	16
1.4.3. Faktor XIII	17
1.4.4. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1	17
1.4.5. "Angiotensin-Converting"-Enzym	18
1.4.6. Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor	19
1.4.7. Endotheliale Stickoxidsynthase	21
1.5. Fragestellungen dieser Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Untersuchte Studienkollektive	23
2.1.1. Patientinnenkollektiv	23
2.1.2. Kontrollkollektiv	23

2.1.3. Aufklärung	23
2.2. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden	24
2.2.1. Labortechniken	24
2.2.1.1. Isolierung genomischer DNA	24
2.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR)	24
2.2.1.3. Verwendete Oligonukleotid-Primer	26
2.2.1.4. Präzipitation der DNA mit Äthanol	27
2.2.1.5. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse	28
2.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.2. Verwendete Geräte und Substanzen	32
2.2.2.1. Geräte	32
2.2.2.2. Chemikalien	33
2.3. Statistische Auswertung	34
3. Ergebnisse	35
3.1. Allgemeine Schwangerschaftsdaten	35
3.1.1. Demographische Daten	35
3.1.2. Abortdaten	37
3.2. Verteilung der einzelnen Genotypen	38
3.2.1. Faktor XIII-Genotypen	38
3.2.2. Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Genotypen	39
3.2.3. Endotheliale Stickoxid-Synthase (NOS3)-Genotypen	40
3.2.4. Faktor V-, Faktor II-, PAI-1- und ACE-Genotypen	41
3.2.4.1. Faktor V-Genotypen	41
3.2.4.2. Faktor II-Genotypen	42
3.2.4.3. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-Genotypen	43
3.2.4.4. "Angiotensin-Converting"-Enzym-Genotypen	44
3.3. Kombinationsverteilungen	45
3.3.1. AT1R in Kombination mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D	46
3.3.2. NOS3 in Kombination mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D	47
4. Diskussion	50
4.1. Prokoagulatorische Faktoren	52
4.1.1. Faktor V	53

4.1.2. Prothrombin (Faktor II)	54
4.1.3. Faktor XIII	55
4.2. Fibrinolytische Faktoren	57
4.2.1. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)	58
4.2.2. "Angiotensin-Converting"-Enzym (ACE)	59
4.3. Vasokonstriktorische Genmutationen	60
4.3.1. Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT1R)	61
4.3.2. Endotheliale Stickoxid-Synthase (eNOS)	62
4.4. Kombination mehrerer Genpolymorphismen	63
4.4.1. Die Kombination des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus mit dem ACE-I/D-Polymorphismus	63
4.4.2. AT1R in Kombination mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D	64
4.4.3. NOS3 in Kombination mit PAI1-4G/4G und ACE-D/D	65
5. Zusammenfassung	69
6. Anhang	73
7. Literaturverzeichnis	78
8. Danksagung	91
9. Lebenslauf	92

1. Einleitung

1.1. Fehlgeburt (Abort)

1.1.1. Definition und Häufigkeit

Beim Abort handelt es sich um eine vorzeitige Beendigung der Gravidität mit oder ohne Ausstoßung der toten Frucht mit einem Geburtsgewicht unter 500 g.

Man unterteilt das Abortgeschehen in Frühabort (bis zur 12. SSW) und Spätabort (13. – 24. SSW). Frühaborte kommen häufiger vor als Spätaborte. Da sich durch Fortschritte der Neonatologie die Untergrenze der Lebensfähigkeit des Fetus verschoben hat, wird ab der 24. SSW nicht mehr von einem Abort, sondern von einer Tot- bzw. Frühgeburt gesprochen. In den ersten Schwangerschaftswochen verläuft der Abort nicht selten subklinisch, d.h. die Patientin nimmt an, es handele sich um eine verspätete, eventuell leicht verstärkte Regelblutung.

Abhängig vom Stadium bzw. der Verlaufsform unterscheidet man:

Abortus imminens (drohender Abort), Abortus incipiens (beginnender Abort), Abortus incompletus (unvollständiger Abort), Abortus completus (vollständiger Abort), "missed abortion" (verhaltener Abort), Abortus febrilis (fiebriger Abort; schwerste Verlaufsform = septischer Abort), Abortus habitualis (habituelle Abort).

Man geht davon aus, dass nur 30 % der befruchteten Eizellen in einer normalen Schwangerschaft ausgetragen werden. Über 30 % sollen bis zur Implantationsphase zugrunde gehen. In prospektiven Studien gingen 30-60 % der biochemisch durch ein erhöhtes HCG nachgewiesenen Schwangerschaften verloren. 10-20 % der klinisch bekannten Schwangerschaften enden im Abort; 20-25 % der Schwangeren haben Blutungen im I. Trimenon, von denen die Hälfte abortiert (Feige et al. 2001).

1.1.2. Ätiologische Faktoren

Der Abort ist ein multifaktorielles Geschehen. Man unterscheidet mütterliche, fetale, immunologische, andrologische und andere Gründe.

Unter den fetalen Ursachen sind die chromosomalen Störungen hervorzuheben. Sie verursachen 50-70 % aller Spontanaborte. Dies erklärt auch das mit zunehmendem Alter der Schwangeren steigende Abortrisiko, da ein höheres Alter mit einer höheren Rate an Chromosomenaberrationen vergesellschaftet ist. Die Aborthäufigkeit ist bei den über 35jährigen doppelt so hoch wie in der Gruppe der 20-29jährigen.

Bei den mütterlichen Faktoren unterscheidet man anatomische Veränderungen an den Genitalorganen (Uterus, Zervix), hormonale Störungen (z.B. Gelbkörperinsuffizienz) und andere Ursachen wie chronische, schwere Infektionskrankheiten, mechanische oder psychische Traumen, exogene Intoxikationen und Antigen-Antikörperreaktionen.

Ursachen für Spontanaborte:

Genitale Ursachen

Missbildungen (uterine Doppelbildung, intrauterine Synechien), Uterustumoren (Myome), Zervixinsuffizienz (mit Zustand nach Dysplasie, bei Infektionen, nach Trauma, Bindegewebsschwäche), endokrine Störungen (Endometriumsinsuffizienz, Follikelreifungsstörungen), Infektionen (Zervizitis, Endometritis), Hypermotilität (psychovegetative Störung, Fieber).

Extragenitale Ursachen

Endokrine Störungen (Diabetes, Hyperthyreose), virale und bakterielle Infektionen (fieberbedingte Hypermotilität des Uterus, infektiöse bzw. toxische Fruchtschädigung), Anämie, Trauma, konsumierende Erkrankungen.

Andere Ursachen

Frühaborten liegen zum Großteil chromosomale Veränderungen (strukturelle oder numerische Aberrationen) oder Störungen des Trophoblasten (z. B. Blasenmole) bzw. der Nidation zu Grunde. In der Spätschwangerschaft treten eher funktionelle (Zervixinsuffizienz) und anatomische (Uterusfehlbildungen) Veränderungen als Abortursache in den Vordergrund (Stauber und Weyerstahl 2001).

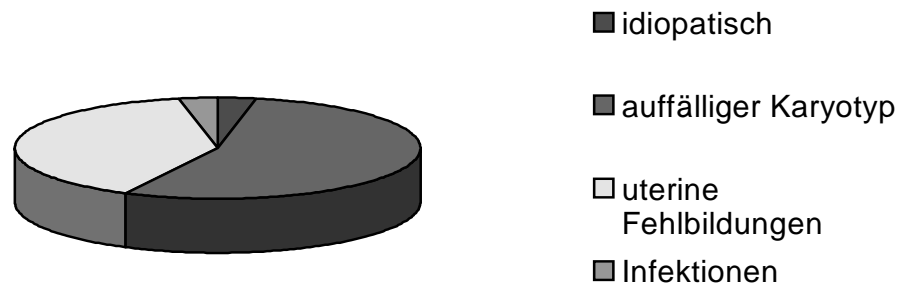


Diagramm 1: Mögliche ätiologische Faktoren von Frühaborten (modifiziert nach Feige et al. 2001)

1.2. Rezidivierende Fehlgeburten

1.2.1. Definition und Häufigkeit

Bei drei oder mehr aufeinander folgenden Aborten vor der 20. Schwangerschaftswoche spricht man von rezidivierenden Fehlgeburten (Definition der WHO).

Ohne vorausgegangene Geburt bezeichnet man die Fehlgeburten als primär habituelle Aborte. Ist die Serie durch eine ausgetragene Schwangerschaft unterbrochen, spricht man von sekundär habitueller Abortneigung. Nach einer Fehlgeburt steigt das Risiko für eine weitere Fehlgeburt zunächst diskret, nach mehreren konsekutiven spontanen Fehlgeburten deutlich an. Das Wiederholungsrisiko liegt nach drei Aborten bereits bei über 50 % (Strowitzki 1996).

1.2.2. Ätiologische Faktoren

Die Ursachen sind häufig multifaktoriell und im Einzelnen nur schwer nachzuweisen. Gelegentlich können auch mehrere sich überlappende Ursachen in Frage kommen. In vielen Fällen aber wird die Ätiologie ungeklärt bleiben.

1.2.2.1. Uterine Ursachen

Angeborene uterine Anomalien gehen ontogenetisch auf eine mehr oder weniger inkomplette Fusion der Müllerschen Gänge zurück. Assoziiert finden sich häufig angeborene Anomalien des harnableitenden Systems.

Es handelt sich in erster Linie um angeborene Hemmungsmisbildungen wie einen Uterus septus oder subseptus. Bei einer Implantation im Bereich des fibrösen Septums kommt es zu trophischen Störungen, die typischerweise zu Spontanaborten am Ende des ersten oder zu Beginn des zweiten Trimenons führen. Die Abortraten liegen zwischen 25 % und 67 %, wobei das Risiko stark von der individuellen Ausprägung der Anomalie abhängt (Strowitzki 1996). Das therapeutische Vorgehen besteht nach Möglichkeit in einer hysteroskopischen Abtragung des Septums. Die Erfolgsquote ist hoch.

Des Weiteren können erworbene Uterusveränderungen wie intrauterine Synechien (Asherman-Syndrom) und Ablation des Endometriums sowie intramurale und submuköse Myome für wiederholte Aborte ursächlich sein. Myome stören je nach Größe und Lokalisation die Durchblutung an Endometrium (Kompression venöser Gefäße mit nachfolgenden venösen Ektasien) und Myometrium. Kleinere subseröse Myome spielen in der Regel keine Rolle, es sei denn, sie liegen am Tubenabgang. Gelegentlich können jedoch subseröse Myome zu Beschwerden in der Gravidität führen. In Abhängigkeit vom Lokalbefund kann die operative Myomenukleation hysteroskopisch, laparoskopisch oder per laparotomiam erfolgen.

1.2.2.2. Endokrinologische Ursachen

Der Einfluss von Schilddrüsenfunktionsstörungen auf wiederholte Fehlgeburten ist noch nicht ganz sicher geklärt. Große Bedeutung hat sicher die Hypothyreose. Begleitend findet sich nicht selten eine Hyperprolaktinämie (durch erhöhte TRH-Sekretion). Erhöhte TSH-Spiegel vermindern die Freisetzung von HCG aus dem Trophoblasten. TBG (Thyroxin-bindendes Globulin) sowie T3 und T4 sind erniedrigt und steigen verspätet an (statt in der 7./8. SSW erst in der 14./15. SSW). Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse wie z.B. die Hashimoto-Thyreoiditis sind

vor allem durch eine pathologische Aktivierung des Immunsystems, die auch zu einer Erhöhung der Abortrate führt, von Bedeutung (siehe Kap. 1.2.2.4).

Die Rolle eines Diabetes mellitus wurde in der Vergangenheit dagegen oft kontrovers diskutiert. Heute gilt, dass ein gut eingestellter Diabetes keine Abortursache darstellt. Eine schlechte Stoffwechsellage mit Beeinträchtigung der endokrinen Funktionen ist hingegen ein Risikofaktor für habituelle Aborte.

Follikelreifungsstörungen sind typisch für das polyfollikuläre Ovar (PFO). Die Art und Ausprägung eines PFO können sehr unterschiedlich sein. Im Fall einer Anovulation oder insuffizienter Ovulationsabläufe resultiert Sterilität. Bei weniger massiven Störungen der Ovulationsregulation kann es jedoch durchaus zur Konzeption kommen, die Abortrate ist aber erhöht. Insbesondere eine LH/FSH-Ratio >2 , also eine Erhöhung der LH-Spiegel, gilt als prognostisch ungünstig. Die Corpus-luteum-Insuffizienz, die man bei RSA in 20-60 % finden soll, ist meist nicht die primäre Ursache für die Aborte, sondern die Folge einer primären Follikelreifungsstörung (Feige et al. 2001).

1.2.2.3. Autoantikörpersyndrome – Anti-Phospholipid-Syndrom

Der Nachweis von irregulären Anti-Phospholipid-Autoantikörpern (z.B. Lupus-Antikoagulanzen, Cardiolipin-AK) zusammen mit zusätzlichen relevanten klinischen Ereignissen wie wiederholtem Abort oder Fruchttod, Thromboembolien, einer autoimmunen Thrombozytopenie oder einer Coombs-positiven hämolytischen Anämie führt zur Bezeichnung Anti-Phospholipid-Syndrom.

Die Anti-Phospholipid-Antikörper nehmen Einfluss auf die Blutgerinnung, indem sie zu einer Hyperkoagulabilität führen. Charakteristisch für das Vorhandensein ist eine verlängerte partielle Thromboplastinzeit (PTT). Scheinbar in Widerspruch zu der verlängerten PTT zeigten die betroffenen Patientinnen klinisch gehäuft arterielle und venöse Thrombosen (Lockshin et al. 1985; Strowitzki 1996).

Durch die ausgeprägten Alterationen u.a. mit der Öffnung von Blutgefäßen der Mikrozirkulation bzw. der Neoangiogenese besteht um den Implantationsort herum

ohnehin eine Situation, in der eine lokale Blutgerinnung leicht ausgelöst werden kann. Durch die durch Anti-Phospholipid-AK verursachte Hyperkoagulabilität wird diese lokale Neigung zur Thrombenbildung gesteigert. Die Folge ist eine unzureichende Throphoblasteninvasion, wodurch es früher oder später zu einem Absterben des Embryos kommen kann.

Bei Patientinnen mit rezidivierenden Aborten lassen sich dementsprechend signifikant häufiger Anti-Phospholipid-Antikörper finden als bei Frauen ohne Fehlgeburten. Aber auch wenn es nicht zum Abort kommt, treten gehäuft andere schwangerschaftsassozierte Störungen auf wie z.B. eine fetale Wachstumsretardierung, die Abruption placentae, früh beginnende Präeklampsien oder auch das HELLP-Syndrom. Auch diese können ihren Ursprung bereits in einer unzureichenden Throphoblasteninvasion und erhöhten Gerinnungsneigung des Blutes haben (Blumfeld und Brenner 1999).

Weitere Antikörper, die eine ähnliche klinische Symptomatik auslösen können, sind antinukleäre Antikörper (ANA), antimitochondriale Antikörper (AMA; sehr selten) und Thyreoglobulin-Antikörper (TAK; typischerweise bei Euthyreose). Von vielen Autoimmunerkrankungen ist bekannt, dass sie ein deutlich erhöhtes Abortrisiko nach sich ziehen, wie z.B. das Sjögren-Syndrom oder der systemische Lupus erythematoses (SLE). Diese Autoantikörper sind als Hinweis auf ein generalisiert aktiviertes Autoimmunsystem mit einer überschießenden AK-Produktion zu werten, die sich möglicherweise auch antithrophoblastisch auswirken.

1.2.2.4. Immunologische Ursachen

Es besteht heute kein Zweifel mehr daran, dass das Immunsystem der Mutter bei Regulation und Reaktion der Implantation des Embryos eine entscheidende Rolle spielt. Für die Implantation muss ein Gleichgewicht bestehen zwischen Faktoren, die hauptsächlich vom Immunsystem aktiviert werden und die das embryonale Wachstum bzw. das Wachstum des Zyto- und Synzytiotrophoblasten fördern, und dem hemmenden Einfluss der dezidualen Reaktion. Abweichungen von dieser Balance führen zu fehlender oder ungenügender Implantation.

1.2.2.5. Infektiöse Ursachen

Während bakterielle und virale Infektionen häufig Ursache sporadischer Schwangerschaftsverluste sind, stellen sie selten die Ursache rezidivierender Spontanaborte dar. Als mögliche Erreger werden in diesem Zusammenhang *Toxoplasma gondii*, Mykoplasmen und Chlamydien diskutiert. Bei chronischen Infektionen kommt es zu einer Kaskade, die über Keimassenzion, Infektion und Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu erhöhter Wehenbereitschaft sowie isthmozervikaler Insuffizienz führt.

1.2.2.6. Genetische Ursachen

Chromosomenanomalien sind in mehr als 50 % aller spontanen Frühaborte als Ursache für die Fehlgeburten anzusehen. Es handelt sich hierbei vielfach um spontan auftretende numerische Chromosomenaberrationen (Trisomien, Monosomie 45 X0, Triploidie oder Tetraploidie).

Bei habitueller Abortneigung ist im Gegensatz dazu ursächlich nach vererbten strukturellen Chromosomenanomalien wie (balancierten) Translokationen und Inversionen zu suchen, die bei nachfolgenden Schwangerschaften (unbalanciert) erneut zu einem Abort führen können. Das Wiederholungsrisiko hängt von der Art der Chromosomenanomalie und auch vom Geschlecht des betroffenen Elternteils ab.

Die Diagnostik erfolgt anhand eines Karyogramms aus einer Lymphozytenkultur aus peripherem, heparinisierendem Venenblut. Eine „Therapie“ im eigentlichen Sinne gibt es nicht. Obligatorisch ist eine professionelle Beratung durch den Humangenetiker.

1.2.2.7. Psychische Ursachen

Bei Frauen mit gehäuft auftretenden Fehlgeburten ist es bei der Beurteilung psychischer Auffälligkeiten oft schwierig, zwischen Kausalität und Folgeerscheinung zu unterscheiden. Untersuchungen zeigen, dass eine Psychotherapie bei Frauen mit rezidivierenden Aborten zu signifikant höheren Therapieerfolgen führt. Eine Studie

der Dres. Stray-Pedersen (1984) konnte eindeutige Therapieerfolge allein durch intensivere ärztliche Betreuung und psychische Führung der betroffenen Elternpaare im Rahmen ihres "tender loving care", wie sie es nannten, nachweisen.

Diese besteht aus folgenden Komponenten:

wöchentliche Einbestellung, optimale psychologische Unterstützung, möglichst viel Ruhe, Vermeidung von Reisen und schwerer Arbeit, wenigstens zwei Wochen lang Bettruhe in der Zeit, in der die früheren Aborte aufgetreten waren, kein Geschlechtsverkehr.

Die Erfolgsrate (86 % ausgetragene Schwangerschaften gegenüber 33 % bei Frauen ohne besondere Zuwendung) gibt den Autoren recht. Die Ergebnisse zeigen, welche große Bedeutung eine engmaschige, empathische Betreuung für RSA-Patientinnen spielen kann.

1.2.2.8. Gerinnungsphysiologische Ursachen

Im Rahmen von Frühaborten werden häufig ausgedehnte Mikrothrombosierungen im intervillösen Raum beschrieben, wobei nicht klar ist, inwieweit diese Veränderungen Ursache oder Effekt eines Schwangerschaftsverlustes sind. Ätiologisch scheinen bei einem Teil der betroffenen Patientinnen Anti-Phospholipid-Antikörper eine Rolle zu spielen. Allerdings finden sich Mikrothrombosierungen oft auch bei Patientinnen ohne Anti-Phospholipid-AK. Man geht davon aus, dass verschiedene andere hämostaseologische Anomalien mit rezidivierenden Spontanaborten (RSA) assoziiert sein können. Es gibt eine Reihe von angeborenen Defekten der Blutgerinnung, die auf der Grundlage von Genveränderungen zu einem erhöhten Abortrisiko und damit nachfolgend zu einer erhöhten Abortneigung führen, so z.B. die APC-Resistenz (Faktor V-Leiden-Mutation) als häufigste Ursache, der Protein-C- oder -S-Mangel oder Defekte im Antithrombinsystem.

1.2.3. Rationale Diagnostik

Erkannte Ursachen müssen zunächst beseitigt werden. Es ist aber nochmals darauf hinzuweisen, dass nicht immer nur eine Ursache in Betracht kommen muss. Außerdem kann trotz intensiver Diagnostik nur in 60 % der Fälle eine mögliche Ursache gefunden werden. Insofern sollte die Diagnostik umfassend sein.

1.3. Hämostase in der Schwangerschaft

1.3.1. Veränderungen in der Hämostase

Gerinnungsbeeinflussende Veränderungen in der Schwangerschaft betreffen die plasmatischen Gerinnungsfaktoren, die Fibrinolyse, die Thrombozytenfunktion, das Gefäßsystem sowie die rheologischen Faktoren.

Vor allem der Anstieg der plasmatischen Gerinnungsfaktoren in Kombination mit einer verminderten fibrinolytischen Aktivität führt zu einer schwangerschaftsspezifischen Hyperkoagulabilität (von Hugo et al. 1984; Stirling et al. 1984). Die absolute Thrombozytenzahl sowie die Thrombozytenüberlebenszeit bleiben dagegen im Verlauf der Schwangerschaft im wesentlichen unbeeinflusst (Fenton et al. 1977).

Da das Plasmavolumen während einer Schwangerschaft stärker ansteigt als das Erythrozytenvolumen, kommt es zur physiologischen Hämodilution. Dem entgegen steht die Synthese an Gerinnungsfaktoren, wobei dem Fibrinogen eine entscheidende Bedeutung zukommt. Somit steigen während der normalen Gravidität sowohl die Erythrozytenaggregation als auch die Plasmaviskosität an. Diese beiden gegensätzlichen Effekte bewirken, dass die Blutviskosität erst ab der 37. SSW zunimmt (Lowe 1992).

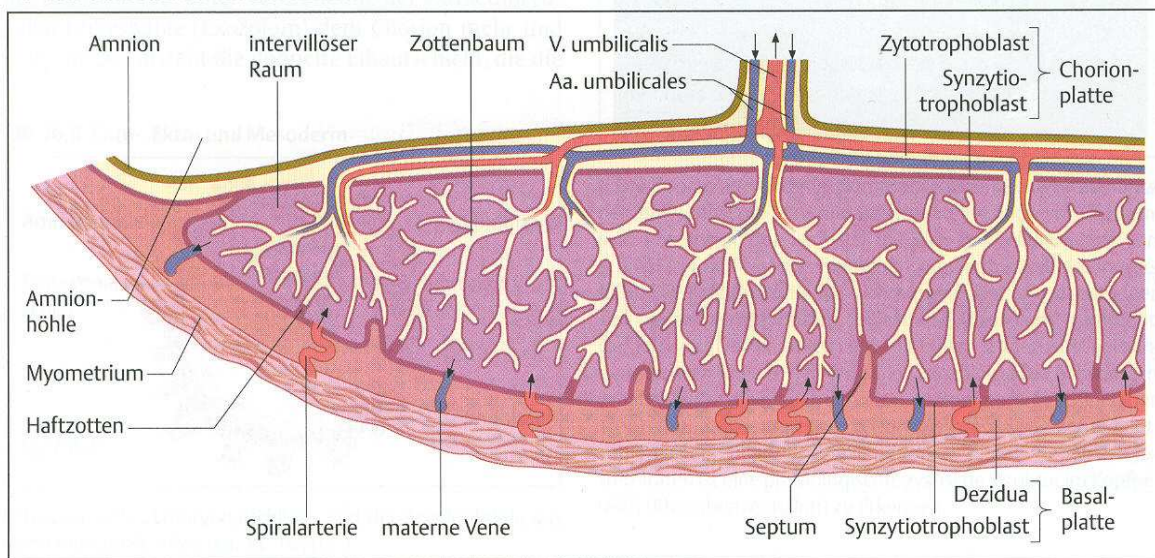


Abbildung 1: Aufbau einer reifen Placenta (Pfleiderer et al. 2000)

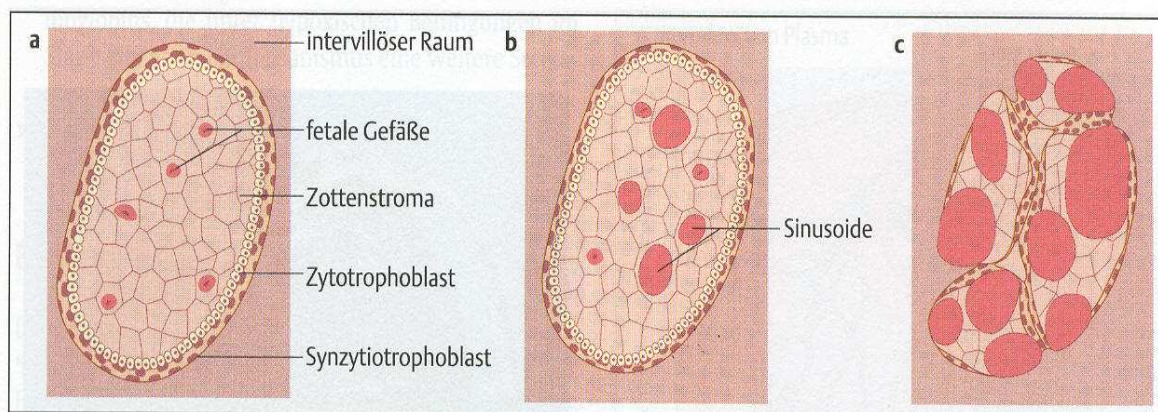


Abbildung 2: Zottenreifung (Pfleiderer et al. 2000)

- a) unreife Zotte mit doppelreihiger Zottenwandung und wenigen, kleinen, nicht wandständigen Gefäßen
- b) mit zunehmender Reifung wird die Zottenwandung dünner und die Vaskularisierung nimmt zu
- c) Reduktion des Zottendurchmessers. Der Zottenüberzug ist nur noch membranartig und zellarm. Die maternofetale Diffusionsstrecke verringert sich. Die Kapillaren sind zu weitlumigen, wandständigen Sinusoiden umgewandelt.

Betrachtet man die Hämorheologie in der uteroplazentaren Zirkulation, so hängt diese im Wesentlichen von zwei Kräften ab. Die Kombination von hohen Schubspannungen und niedrigen Schergeschwindigkeiten im intervillösen Spaltsystem in der Plazenta ist eine exzellente Voraussetzung für den optimalen Gasaustausch. Dieses System ist allerdings äußerst ungünstig bei pathologischen Zuständen wie dem abfallenden Druckgradienten beim Schwangerschaftshochdruck aufgrund von Stenosen der uterinen Gefäße und dem Auftreten pathologischer Fließzustände des Blutes wie ansteigender Viskosität, Hämokonzentration und verminderter Erythrozytenverformbarkeit. Neben der Neigung zur Erythrozytenaggregation können die Erythrozyten dadurch mechanisch geschädigt und auch aktiviert werden (Rath 1991).

1.3.2. Grundlagen von Thrombose und Embolie in der Schwangerschaft

Weltweit den größten Anteil an Morbidität und Mortalität in der Schwangerschaft und Postpartalphase haben venöse Thrombosen und ihre embolischen Komplikationen, insbesondere die Lungenarterienembolie (Kierkegaard 1983, Greer 1999). Das Risiko, in einer normalen Schwangerschaft ein thromboembolisches Ereignis zu erleiden, ist gegenüber nichtgraviden Frauen gleichen Alters bereits um das 5-6 fache erhöht. Die in der Literatur berichteten Angaben zur Häufigkeit einer Thromboembolie liegen bei 1 auf 1000 bis 1 auf 2000 Schwangerschaften (Treffers et al. 1983).

Die Häufigkeit und Bedeutung einer familiären Thromboseneigung, also der hereditären Thrombophilie, für die venöse Thrombogenese in der Schwangerschaft wurde lange Zeit unterschätzt, da nur der Antithrombinmangel als bis dato wichtigster angeborener Risikofaktor einer Thrombophilie nachgewiesen war.

Diese Situation hat sich in den vergangenen Jahren geändert. Die Forschung identifiziert immer weitere, genetisch determinierte Risikofaktoren für eine angeborene Thrombophilie. Hierzu zählen neben Mangelzuständen an Protein C und S (Preston et al. 1996) die G1691A-Mutation des Faktor V-Gens (Faktor V-Leiden) (Bertina et al. 1994), die G20210A-Mutation des Faktor II (Prothrombin)-Gens (Poort

et al. 1996) und der homozygote T/T-Genotyp des Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR)-C677T-Polymorphismus (Frosst et al. 1995).

Etwa die Hälfte aller Patientinnen mit einer venösen Thromboembolie während der Schwangerschaft und Postpartalphase und etwa 15% der Normalbevölkerung sind Träger genetisch determinierter Thrombose-Risikofaktoren (Greer 2000). Die Prävalenz, d.h. die Verbreitung dieser hereditären Prädispositionsfaktoren, ist in der Allgemeinbevölkerung somit relativ hoch. Eine tiefe Venenthrombose ist jedoch in der Regel nicht durch die Präsenz eines Risikofaktors alleine bedingt. Nach der Virchow-Trias (Stase, Gefäßwandveränderung und gestörte Blutzusammensetzung) beruht die Ätiologie venöser thromboembolischer Ereignisse nach aktuellem Verständnis auf dem Zusammenwirken erworbener und genetischer Risikodeterminanten und den daraus resultierenden Risikokonstellationen (Rosendaal 1999).

Mittlerweile geht man davon aus, dass auch die Kombination thrombophiler Polymorphismen/Mutationen zu einem erhöhten Risiko führen kann (Buchholz et al. 2004).

Neueren Untersuchungen zufolge haben genetische Veränderungen ebenfalls einen prothrombotischen Einfluss auf die uteroplazentare Zirkulation. Hierin wird ein kausaler Zusammenhang mit dem Auftreten von vermehrten Aborten, intrauteriner Wachstumsretardierung, intrauterinem Fruchttod/Todgeburt, vorzeitiger Plazentalösung oder Präeklampsie gesehen (Brenner et al. 1997, Kupferminc et al. 1999, Kupferminc et al. 2000, Glueck et al. 2001). Die in Gefäßen und im intervillösen Raum frühabortierter Plazenten gefundenen Mikrothromben lassen eine Assoziation zwischen einer thrombophilen/hypofibrinolytischen Prädisposition und rezidivierenden Frühaborten vermuten (Arias et al. 1998, Glueck et al. 2000).

1.4. Einzelne Gerinnungsfaktoren

1.4.1. Faktor V

Als Ursache einer Thromboseneigung wurde erstmals 1993 von Dahlbäck et al. eine Resistenz gegenüber aktiviertem Protein C beschrieben. In nahezu allen Fällen ist diese Resistenz durch eine G1691A-Punktmutation in Exon 10 des Faktor V-Gens bedingt.

Der Faktor V ist ein 300-Kilodalton-Glykoprotein. Sein Gen besteht aus 25 Exons. Es sind bereits mehrere Mutationen beschrieben, von denen die Faktor V-Leiden-Mutation die bedeutsamste zu sein scheint. Es handelt sich um eine Substitution von Guanin zu Adenin an Position 1691, die zum Austausch der Aminosäure 506, Arginin, durch Glutamin führt. Dadurch wird eine wichtige Protein C-Spaltungsstelle im aktivierten Faktor V so verändert, dass Faktor Va nur verzögert durch aktiviertes Protein C gespalten werden kann. Die prokoagulatorische Wirkung ist dadurch verlängert bzw. verstärkt und die Aufhebung ist verzögert (Bertina et al. 1994, Seligsohn und Lubetsky 2001).

1.4.2. Faktor II

Für das Prothrombin-Gen sind mehrere Polymorphismen beschrieben worden. Die meisten führen zur einer verminderten Prothrombinkonzentration oder einer veränderten Prothrombinfunktion. Die bedeutsamste Faktor II-Mutation ist jedoch ein Austausch der Base Guanin durch Adenin an Position 20210 außerhalb des Proteinkodierenden Bereichs in der 3'-nichttranslatierten Region des Gens. Dieser ist mit erhöhten Prothrombinspiegeln und damit einer verstärkten Prothrombinaktivität assoziiert (Poort et al. 1996, Vicente et al. 1999). Hierdurch wird eine vermehrte Thrombingenerierung gefördert und zugleich die Inaktivierung von Faktor Va durch aktiviertes Protein C beeinträchtigt (Butenas et al. 1999, Smirnov et al. 1999). Dies wiederum stellt ein erhöhtes Risiko für venöse Thrombosen sowie möglicherweise auch für zerebrale Insulte und Myokardinfarkte dar (Martinelli et al. 1998, Gerhardt et al. 2000).

Bei 6 % der Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose und in 20 % der Familien mit einer Häufung von Thrombosen wurde diese Mutation festgestellt (Chrobac und Dulicek 1998). Kombiniert man die Faktor II-Mutation mit anderen genetischen Defekten wie z.B. der Faktor V-Leiden-Mutation, wird das Risiko für Thrombosen potenziert, und diese Patienten sind nachweislich früher und wiederholt betroffen (Adamek et al. 1999).

1.4.3. Faktor XIII

Am Ende der Gerinnungskaskade aktiviert Thrombin den Blutgerinnungsfaktor XIII (FXIII). Das aktivierte Enzym (FXIIIa) überführt lösliches Fibrin in quervernetztes, unlösliches Fibrin. Ein Mangel an FXIII hat eine reduzierte Fibrinstabilität und damit eine verstärkte Blutungsneigung zur Folge. Die Rolle des Faktor XIII bei der Entstehung kardio- und zerebrovaskulärer Erkrankungen wird erst seit kurzem untersucht (Kohler und Schröder 2002).

Das für Faktor XIII kodierende Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert und enthält 15 Exons, die durch 14 Introns getrennt werden (Anwar et al. 1995). Faktor XIII besteht aus zwei Untereinheiten: A mit katalytischer Aktivität und B mit einer Strukturfunktion. Eine häufige G→T-Punktmutation in Exon 2 der Faktor XIII-A-Untereinheit kodiert für den Austausch der Aminosäure Valin an Position 34 durch Leucin. Diese Substitution ist drei Aminosäuren von der Thrombin-aktivierenden Region entfernt und interagiert mit der Fibrinquervernetzung.

1.4.4. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1

PAI-1 ist der wesentliche Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, dem eine wichtige Kontrollfunktion zukommt. Seine Hauptfunktion besteht in der schnellen Inhibition von Gewebeplasminogenaktivator durch irreversible Komplexbildung. PAI-1 zirkuliert im Gefäßsystem und verhindert eine systemische Fibrinolyse und systemische Blutungen. Ein erhöhter PAI-1-Spiegel führt zur Suppression der Fibrinolyse und

damit zu einem erhöhten Risiko für ischämische Insulte, Myokardinfarkte und Thrombosen (Margaglione et al. 1994, Thögersen et al. 1998).

Das PAI-1-Gen ist unter anderem durch einen 4G/5G-Polymorphismus charakterisiert, der 675 Basenpaare 5' vom Start der Transkription liegt. Dieser Polymorphismus beeinflusst die Bindung von Kernproteinen, welche die Transkription und damit die PAI-1-Synthese regulieren. Eine bis zu 25 % verstärkte Aktivität lässt sich vor allem bei Vorliegen des 4G/4G-Genotyps nachweisen (Francis 2002). Somit könnte das 4G-Allel des PAI-1-Gens an der Entstehung der aufgefundenen Fibrindepositionen beteiligt und damit für ein höheres Risiko an rezidivierenden Fehlgeburten mitverantwortlich sein.

4G/4G	PAI-1 ↑	→	Plasminaktivität ↓	→	Thromboserisiko ↑
5G/5G	PAI-1 ↓	→	Plasminaktivität ↑	→	Fibrinolyse ↑

Tabelle 1: Auswirkungen des PAI-1-4G/4G- und -5G/5G-Genotyps auf die Hämostase

1.4.5. "Angiotensin-Converting"-Enzym

Entsprechend dem PAI-1-Gen wird auch die Expression des "Angiotensin-Converting"-Enzyms (ACE) durch Polymorphismen moduliert. Eine Reihe von ihnen ist bereits identifiziert worden (Kimura et al. 1998). So ist beispielsweise die Deletion eines 300-Basenpaar-Fragmentes (D-Allel) im Intron 16 des ACE-Gens mit einer verstärkten Transkription des ACE-Gens und damit in der Folge der Kaskade mit einer verstärkten PAI-1-Aktivität assoziiert (Kim et al. 1997, Odawara et al. 1997, Fatini et al. 2000a und 2000b).

ACE tritt sowohl als membrangebundenes Enzym an der Oberfläche von Gefäßendothelzellen als auch frei im Plasma zirkulierend auf. Synthetisiert wird es von Zellen des Gefäßendothels (Cambien et al. 1988). Es wurde gezeigt, dass 50 % der interindividuellen Schwankungen des ACE-Plasmaspiegels mit dem I/D-

Polymorphismus in Intron 16 des ACE-Gens assoziiert sind. Insbesondere für den D/D-Genotyp konnten signifikant erhöhte PAI-1-Spiegel im Plasma nachgewiesen werden. Daher muss man davon ausgehen, dass der ACE-I/D-Polymorphismus ebenfalls die Fibrindeposition und die Thrombose durch eine reduzierte Fibrinolyse begünstigt (Kim et al. 1997).

Es wurden bereits mehrere Studien durchgeführt, die sich mit dem Einfluss dieses Polymorphismus auf das arterielle bzw. venöse Gefäßsystem befassen:

So ist der ACE-D/D-Genotyp ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten von koronaren Herzerkrankungen (Kimura et al. 1998, Fatini et al. 2000a), venösen Thrombosen (Fatini et al. 2003), chronischer Vasokonstriktion und arteriellem Hypertonus (Gonzalez et al. 2000) sowie der Alzheimer-Erkrankung (Paillard et al. 1999). Petrovic et al. konnten ein zweifach erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt in der Patientengruppe nachweisen (Petrovic et al. 2001).

ACE D/D	PAI-1 ↑	→	Plasminaktivität ↓	→	Thromboserisiko ↑
ACE I/I	PAI-1 ↓	→	Plasminaktivität ↑	→	Fibrinolyse ↑

Tabelle 2: Auswirkungen des ACE-D/D- und -I/I-Genotyps auf die Hämostase

1.4.6. Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor

Auf zellulärer Ebene interagiert Angiotensin II mit hoher Affinität mit Oberflächen-Rezeptoren (Thomas 1999). Es gibt zwei Haupttypen, den Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT1R) und den Angiotensin II-Typ 2-Rezeptor (AT2R). Beide haben eine unterschiedlich starke Affinität zu ihrem Liganden und unterschiedliche Wirkungen auf zellulärer Ebene (Chiu et al. 1989, Murphy et al. 1991). Der Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor vermittelt dabei alle Effekte von Angiotensin II. Angiotensin II ist stark vasopressorisch wirksam und stimuliert die Freisetzung von Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Die Aktivierung des AT1R-Rezeptors durch

Angiotensin II führt zu einer G-Protein-vermittelten Signaltransduktion. Diese läuft über so genannte "Second messenger", die Phospholipasen, Calcium und Proteinkinase C beinhalten (Griendling et al. 1996, Kim et al. 2000).

Die AT1-Rezeptoren sind in vielen Geweben nachweisbar, so vor allem in Gefäßen, Myokard, Niere, Nebenniere, Leber, Gehirn und Lunge.

Das AT1R-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 3 lokalisiert, mehr als 55 kb groß, und besteht aus 5 Exons und 4 Introns. Bonnardeaux et al. konnten fünf verschiedene Polymorphismen identifizieren. Von diesen zeigte in einer Fall-Kontroll-Studie allerdings nur einer ein signifikant erhöhtes Risiko für einen arteriellen Hypertonus. Der A→C-Austausch an Position 1166 in der 3'-nichttranslatierten Region wurde für blutdrucksteigernde Effekte verantwortlich gemacht (Bonnardeaux et al. 1994, Kainulainen et al. 1999). Umgekehrt hat die A-Variante einen niedrigeren Blutdruck zur Folge.

Zusätzlich zum arteriellen Hypertonus wurde nach anderen klinischen Endpunkten wie koronaren Herzerkrankungen oder Niereninsuffizienz gesucht. Die Beweise für eine Assoziation zwischen dem AT1R-C/C-Genotyp und kardiovaskulären Erkrankungen (einschließlich Myokardinfarkt) sind sehr kontrovers. Dagegen konnte eine Interaktion mit dem ACE-I/D-Polymorphismus im Sinne einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für einen Myokardinfarkt mehrfach gezeigt werden (Tiret et al. 1994, Alvarez et al. 1998).

Amant et al. kamen bei ihren Untersuchungen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass ein Zusammenhang zwischen dem A1166C-Polymorphismus und der hämodynamischen Funktion besteht. Sie konnten eine stärkere Vasokonstriktion bei Individuen mit homozygotem C-Allel zeigen. Daraus wurde auf eine erhöhte Reaktivität der glatten Muskelzellen bei CC-homozygoten Individuen geschlossen (Amant et al. 1997). Diese scheint über eine verstärkte Angiotensin II-Aktivität vermittelt zu werden (Miller et al. 1999).

1.4.7. Endotheliale Stickoxidsynthase

Stickstoffmonoxid (NO) ist eines der vielseitigsten Moleküle und spielt in fast jedem biologischen System eine Rolle. Es agiert als Trigger, Mediator oder Effektor in vielen biologischen Reaktionen und Signaltransduktionen. Der Effekt von Stickstoffmonoxid beruht entweder direkt auf einer Reaktion zwischen NO und einem spezifischen Molekül oder indirekt auf der Oxidation.

Physiologische Funktionen von NO beinhalten die Relaxation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Vasodilatation. Es inhibiert außerdem die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Thrombo- und Monozytenadhäsion, also Vorgänge, die bei der initialen Phase der Atherosklerose eine Rolle spielen (Quyyumi et al. 1995, Rudic und Sessa. 1999). Die Reduktion der basalen Stickstoff-Freisetzung prädisponiert zu einem arteriellen Hypertonus, Myokardinfarkt, Thrombose, Vasospasmus und Atherosklerose (Candipan et al. 1996, Orange et al. 2000). Eine Überproduktion kann ebenfalls Schäden an Zellen und Geweben verursachen.

Die Produktion übernimmt ein Enzym namens Stickoxid-Synthase (NOS). NO wird bei der Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin durch die NOS freigesetzt. Die endotheliale NOS (eNOS) findet sich in erster Linie im Endothel und in geringen Mengen auch in Thrombozyten (Christopherson und Bredt 1997). Das für eNOS kodierende NOS3-Gen besitzt 26 Exons, die über eine Länge von 21 kb verteilt sind (Marsden et al. 1993). Für einen 4/5-Polymorphismus, d.h. 4 oder 5 Wiederholungen einer 27-bp-Sequenz in Intron 4 des NOS3-Gens, konnte ein Zusammenhang mit niedrigeren Plasmaspiegeln der NO-Metabolite gezeigt werden (Tsukada et al. 1998).

Bereits im Juni 2000 gab es mehr als 40 Studien, die von einer Assoziation zwischen diesem NOS3-Polymorphismus und Gefäßerkrankungen berichteten. Untersucht wurden arterieller Bluthochdruck, koronare Herzerkrankung und Myokardinfarkt, Koronararterienspasmus, Erkrankungen der hirnersorgenden Gefäße, verschiedene Formen von Nierenerkrankungen und tiefe Beinvenenthrombosen als klinische Endpunkte (Wang und Wang 2000).

1.5. Fragestellungen dieser Arbeit

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich thrombophile Mutationen/Polymorphismen im Faktor XIII-, AT1R- und NOS3-Gen untersucht, von denen bekannt ist, dass sie für thromboembolische Ereignisse im arteriellen oder venösen System prädisponieren. Die grundlegende Frage war, ob diese Veränderungen, die für Beinvenenthrombosen, Myokardinfarkte oder zerebrale Insulte mitverantwortlich sind, auch im Rahmen von rezidivierenden Spontanaborten gehäuft auftreten.

1. Wie häufig sind die analysierten Mutationen/Polymorphismen in unserem Patientenkollektiv mit wiederholten Fehlgeburten im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv?
2. Welchen Einfluss haben Kombinationen dieser Faktoren auf die Häufigkeit von RSA?

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchte Studienkollektive

2.1.1. Patientinnenkollektiv

Seit vielen Jahren gibt es an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Großhadern des Klinikums der Universität München in der Kinderwunsch-Ambulanz eine spezielle Sprechstunde für Frauen mit rezidivierenden Aborten (RSA-Sprechstunde). Die Patientinnen werden mit ihren jeweiligen Partnern in dieser RSA-Sprechstunde auf mögliche Ursachen bezüglich der Fehlgeburten untersucht. Für meine Untersuchungen wurden Paare ausgewählt, bei denen keine Ursache für die Fehlgeburten gefunden wurde. Bei 179 Patientinnen, die zwei oder mehr Aborte vor der 25. SSW erlitten hatten, war dies der Fall.

2.1.2. Kontrollkollektiv

126 Mütter, die spontan schwanger geworden waren, stellten das Kontrollkollektiv dar. Alle wurden von mindestens einem gesunden Baby nach problemloser Schwangerschaft entbunden und hatten keinen Abort in der Anamnese.

2.1.3. Aufklärung

Alle Frauen des Patientinnen- und Kontrollkollektivs wurden mündlich über die Untersuchungen aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung. Die Studie wurde nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki und ihren Novellierungen von Tokio, Hongkong und Somerset West durchgeführt.

2.2. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

2.2.1. Labortechniken

2.2.1.1. Isolierung genomischer DNA

Die genomische DNA der Leukozyten wurde direkt aus EDTA-Vollblut unter Verwendung des "QIAamp DNA Blood Mini Kits" isoliert. Dazu wurden 200 µl Blut für zehn Minuten bei 70°C mit 25 µl QIAGEN-Protease und 200 µl Lysepuffer „AL“ inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 100 %igem Alkohol wurde das gesamte Volumen auf eine Zentrifugensäule pipettiert und eine Minute zentrifugiert. Von einer in der Säule befindlichen Silikatmembran wurde die DNA adsorbiert und konnte nach sequentiellem Waschen mit den zwei Waschpuffern „AW1“ und „AW2“ mit 200 µl Puffer „AE“ oder destilliertem Wasser eluiert werden. Anschließend wurde die DNA bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR)

Die PCR erlaubt die exponentielle Vervielfältigung definierter doppelsträngiger Nukleinsäuresequenzen, die durch zwei Oligonukleotid-Startermoleküle („Primer“) flankiert werden. Die entstehenden Amplifikationsprodukte können anschließend analysiert werden.

Die Kettenreaktion besteht in der Regel aus 35-40 sich wiederholenden Zyklen, die aus jeweils drei Teilschritten zusammengesetzt sind und in einem Thermocycler mit Deckelheizung (MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-225) durchgeführt wurden. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang bei 94-95°C in die beiden Einzelstränge aufgetrennt (Hitzedenaturierung). Im zweiten Schritt, bei etwa 55-65°C, binden die beiden Primer an die ihnen komplementären Zielsequenzen auf den beiden DNA-Einzelsträngen (Annealing). Diese kurzen, doppelsträngigen Bereiche dienen im dritten Teil, der Extension, als Startblöcke für eine hitzestabile, aus dem hitzeliebenden Organismus *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase. Diese synthetisiert bei 72°C unter Einbau von Desoxyribonukleotidtriphosphaten mit einer

Geschwindigkeit von 1000-2000 Nukleotiden pro Minute den zur Vorlage komplementären DNA-Strang.

Durch wiederholte Denaturierung werden die neu entstandenen DNA-Doppelstränge immer wieder voneinander getrennt und dienen als Vorlage für die Synthese weiterer komplementärer Stränge. Theoretisch verdoppelt jeder neue Zyklus also die Menge an DNA-Produkten, so dass man nach n Zyklen 2^n doppelsträngige Moleküle synthetisiert hat. Die tatsächliche Ausbeute beträgt allerdings nur etwa 80 % dessen, da die Reaktion nach der exponentiellen Vermehrung in eine Plateau-Phase übergeht.

Ein typischer 50 μ l-PCR-Reaktionsansatz in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß enthält 5 μ l 10x-Reaktionspuffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris HCl pH 9,0), 5 μ l einer Mischung aus allen vier Desoxynukleotiden mit einer Endkonzentration von jeweils 125 μ M (Pharmacia), 400 nM des "sense"- und des "antisense"-Primers, ca. 100-200 ng DNA, 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und Aqua bidest ad 50 μ l. Die Denaturierungszeit betrug initial drei Minuten, in den folgenden Zyklen 20-30 Sekunden, die Primer-Anlagerung dauerte 30-60 Sekunden und die Extension ebenfalls 30-60 Sekunden.

Gen	Denaturierung	Anealing	Extension	Zyklen
AT1R	95°C 30 Sekunden	63°C 30 Sekunden	72°C 30 Sekunden	40
Faktor XIII	95°C 30 Sekunden	63°C 30 Sekunden	72°C 30 Sekunden	40
NOS3	95°C 30 Sekunden	63°C 30 Sekunden	72°C 30 Sekunden	40

PAI-1	95°C 30 Sekunden	72°C 60 Sekunden	72°C 60 Sekunden	35
ACE	95°C 20 Sekunden	56°C 30 Sekunden	72°C 30 Sekunden	40
Faktor V	95°C 30 Sekunden	60°C 30 Sekunden	72°C 30 Sekunden	40
Faktor II	95°C 30 Sekunden	60°C 30 Sekunden	72°C 30 Sekunden	40

Tabelle 3: Verwendete PCR-Bedingungen

2.2.1.3. Verwendete Oligonukleotid-Primer

Die Primer sind etwa 20 bis 30 Basen lange, chemisch synthetisierte Abschnitte einzelsträngiger DNA. Sie flankieren den interessierenden Genom-Abschnitt und erlauben dessen schnelle und spezifische Vermehrung, indem sie mit der komplementären Sequenz auf der DNA-Matrize hybridisieren und damit als kurze doppelsträngige Abschnitte der Taq-Polymerase als Startpunkt dienen. Die Oligonukleotide stammten von der Firma Interaktiva (jetzt Thermo Electron Corporation, Ulm). Die gefriergetrocknet gelieferten Primer werden mit 1xTE-Puffer aufgelöst, um eine Stocklösung mit einer Konzentration von 200 pmol/μl herzustellen. Diese wird dann entsprechen mit Aqua bidest auf 20 μM verdünnt.

Name	Orientierung	
AR-1	5'→3'	AGAACATTCCTCTGCAGCACTTCACTACCAAATGATC
AR-2	5'→3'	GCTAGGGAGATTGCATTTCTGTCAG
F13-1	5'→3'	AAGATGACCTGCCACAGTGGAGCTTCAGCGC
F13-2	5'→3'	TGGGTCTTCGGTGCTTTCAC
NOS-1	5'→3'	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTG
NOS-2	5'→3'	TCCTGCTACTGACAGCACCG
PAI-1-1	5'→3'	AGCCCTCAGGGGCACAGAGAGAGTCTGGCCACGT
PAI-1-2	5'→3'	TCTAGGTTTTGTCTGTCTAGGACTTGGGGCCA
ACE-1	5'→3'	CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT
ACE-2	5'→3'	GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT
APC-1	5'→3'	GGAACAACACCATGATCAGAGCA
APC-2	5'→3'	TAGCCAGGAGACCTAACATGTTC
PT-2M	5'→3'	CAGAGAGCTGCCCATGAATAGCACTGGGAGCATTGA AGC
PT-3	5'→3'	GGCTGTGACCGGGATGGGAAATATGGC

Tabelle 4: Sequenzen der Primer, die für den jeweiligen Mutations- bzw. Polymorphismus-Nachweis verwendet wurden

2.2.1.4. Präzipitation der DNA mit Äthanol

Nukleinsäuren können mit Alkoholen in der Gegenwart von Salzen gefällt werden. Da die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren im wässrigen Milieu negativ geladen sind,

können sie positiv geladene Salzionen binden. Durch die Zugabe von absolutem Äthanol kommt es zum Wasserentzug und damit zur Präzipitation der DNA.

Zur Fällung wird die wässrige DNA-Lösung mit 4 M NaCl auf eine Endkonzentration von 200 mM eingestellt. Durch Hinzufügen des 2,5 fachen Volumens 100 %igen Äthanol werden die Nukleinsäuren entweder 5 Minuten in flüssigem Stickstoff, 20-30 Minuten bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt. Nach dreißigminütiger Zentrifugation bei 14.000 UpM und 4°C wird der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac) oder bei Raumtemperatur ausreichend getrocknet. Resuspendiert wird die DNA anschließend z. B. mit 10 μl eines Restriktionsenzymgemisches (siehe unten).

2.2.1.5. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse

Diese Methode dient dem Nachweis bzw. Ausschluss bekannter Mutationen oder Polymorphismen, da aufgrund von Nukleotidaustauschen Schnittstellen für bakterielle Restriktionsenzyme verloren gehen oder neu entstehen können.

Restriktionsendonukleasen sind DNA-abbauende Enzyme, die auf dem Doppelstrang eine spezifische Sequenz von in der Regel vier bis sechs Nukleotiden erkennen und an einer definierten Stelle die DNA schneiden. Sie hydrolysieren dabei die Phosphodiester-Bindung des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA, so dass ein Ende mit einer 5'-Phosphat-Gruppe und ein Ende mit einer 3'-OH-Gruppe an der Desoxyribose entsteht.

Restriktionsendonukleasen werden von Bakterien synthetisiert und dienen ihnen als natürliche Schutzmechanismen gegen eindringende Fremd-DNA, die durch Bakteriophagen oder zufällig durch Transformation aufgenommen wird. Diese artfremde DNA besitzt Erkennungssequenzen für die bakteriellen Restriktionsenzyme und wird dementsprechend abgebaut. Eigene DNA wird dagegen nicht gespalten, weil die entsprechenden Sequenzen durch Methylierung modifiziert sind. Da die eingedrungene Fremd-DNA wesentlich langsamer methyliert wird, als sie durch Restriktionsendonukleasen abgebaut wird, kann sich die Bakterienzelle effektiv gegen die artfremde DNA schützen.

Die in vitro-Reaktionsbedingungen (pH, Salzgehalt des Puffers, Temperatur, Zusätze wie Rinderserumalbumin (BSA)) sind vom Hersteller für jedes Enzym definiert. Zur Auswertung wird der Verdau auf ein Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetragen.

Gen	Primer	Restriktions- endonuklease	Verdau- Bedingungen
AT1R	AR-1 und AR-2	Bcl I	50°C NEB 3-Puffer
Faktor XIII	F13-1 und F13-2	Hae II	37°C NEB 4-Puffer + BSA
PAI-1	PAI-1-1 und PAI-1-2	Bsl I	55°C NEB 3-Puffer
Faktor V	APC-1 und APC-2	Mnl I	37°C NEB 2-Puffer + BSA
Faktor II	PT-3 und PT-2M	Hind III	37°C NEB 2-Puffer

Tabelle 5: Bedingungen für die durchgeführten RFLP-Analysen

Das NOS3- und das ACE-PCR-Produkt zeigten bereits ohne Verdau anhand der Größe bei der elektrophoretischen Auftrennung, ob eine Deletion bzw. Insertion vorliegt.

2.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese in Agarose-Gelen ist eine Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten. Die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld von der Anode zur Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Fragmentlänge, der angelegten Spannung, der Konzentration und der Schichtdicke des Agarosegels und der Zusammensetzung des Laufpuffers ab.

Die mit 1x-Marathon-Puffer (135 mM Tris, 45 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) versetzte Agarose wird in einer Mikrowelle geschmolzen und in einen Gelträger gegossen. Die Agarosekonzentration (1,5–2 %) wird dabei der Größe der aufzutrennenden Fragmente angepasst. Nach dem Aushärten und Überschichten des Gels mit Laufpuffer werden die in einem Ficoll-Ladepuffer (15 % Ficoll, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) aufgenommenen DNA-Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Das Ficoll verhindert das Aufschwimmen der Proben beim Laden, während Bromphenolblau und Xylencyanol als Farbstoffmarker anzeigen, wo sich die Proben im Gel befinden. Um die Größe der Produkte zu bestimmen, trägt man zusätzlich einen Größenmarker (z. B. die 1kb-DNA-Leiter) auf, der aus unterschiedlich großen DNA-Fragmenten mit definierter Länge besteht.

Die Elektrophorese wird je nach Gelgröße bei einer Stromstärke von 40-100 mA durchgeführt. Nach der Auftrennung wird das Gel für ein paar Minuten mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Farbstoff lagert sich dabei in den DNA-Doppelstrang ein. Zum Entfernen überschüssigen Farbstoffs wird die elektrophoretische Auftrennung noch etwa fünf Minuten fortgesetzt. Dann wird das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt, um die DNA bei langwelliger UV-Bestrahlung ($\lambda = 302 \text{ nm}$) sichtbar zu machen und das Gel zu Dokumentationszwecken zu photographieren.

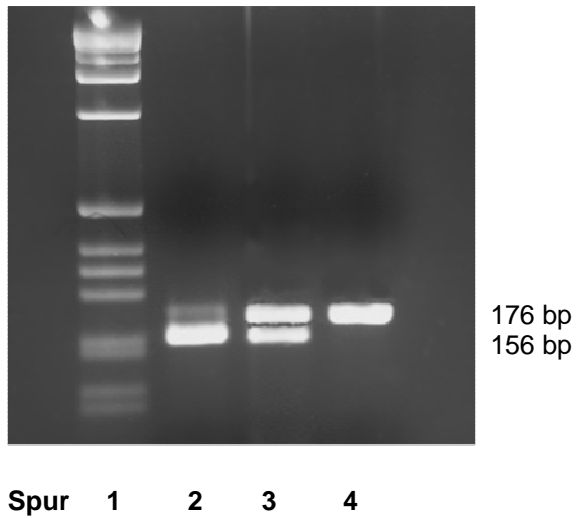


Abb. 3:
**Gelelektrophorese zum Nachweis
des AT1R-Polymorphismus**

Spur 1: 1kb-DNA-Leiter
Spur 2: homozygoter A/A-Genotyp
Spur 3: heterozygoter A/C-Genotyp
Spur 4: homozygoter C/C-Genotyp

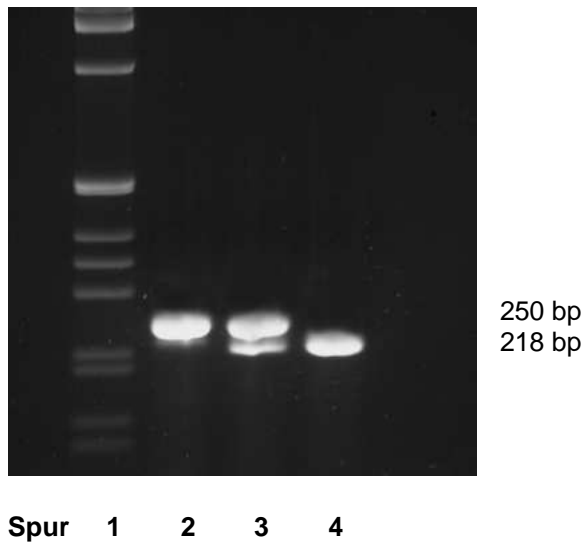


Abb. 4:
**Gelelektrophorese zum Nachweis
des Faktor XIII-Polymorphismus**

Spur 1: 1kb-DNA-Leiter
Spur 2: homozygoter T/T-Genotyp
Spur 3: heterozygoter G/T-Genotyp
Spur 4: homozygoter G/G-Genotyp

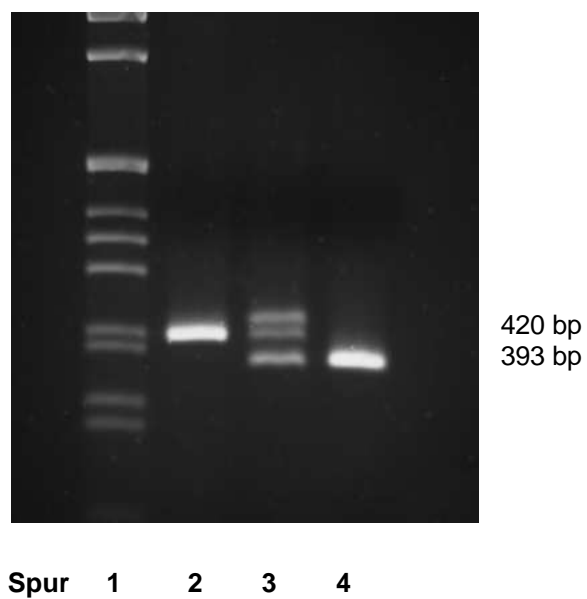


Abb. 5:
**Gelelektrophorese zum Nachweis
des NOS3-Polymorphismus**

Spur 1: 1kb-DNA-Leiter
Spur 2: homozygoter B/B-Genotyp
Spur 3: heterozygoter A/B-Genotyp
Spur 4: homozygoter A/A-Genotyp

2.2.2. Verwendete Geräte und Substanzen

2.2.2.1. Geräte

Kategorie	Typ	Hersteller
Elektrophoresekammern	Horizon 58 und	Gibco BRL Life Technologies,
	Horizon 11-14	Eggenstein
Heizblock	Multi-Blok Heater,	Lab-Line Instruments Inc.,
	Lab-Line	USA
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	MJ Research	Biozym
	Peltier Thermal Cycler	Hess. Oldendorf
	PTC-225	
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
	TDTMX Centrifuge	Abbott Diagnostics
		Division, Illinois, USA
Vakuumzentrifuge	Speed Vac Concentrator	Bachofer, Reutlingen

Tabelle 6: Verwendete Geräte

2.2.2.2. Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Borsäure	Merck, Darmstadt
Äthanol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Desoxyribonukleotide	Pharmacia Biotech, Freiburg
DNA molecular weight marker (1kb ladder)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ficoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Na ₂ -EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
LMP-Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease	QIAGEN, Hilden
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Substanzen

2.3. Statistische Auswertung

Sämtliche Daten wurden prospektiv erhoben und in einer Access-Datenbank (Microsoft Inc., Redmond, USA) zusammengeführt.

Die Ergebnisse der RSA-Patientengruppe und der Kontrollgruppe wurden mit dem „Student-t-Test“, dem „Chi-Quadrat-Test“ nach Pearson und dem „Exakten Fisher-Test“ statistisch ausgewertet. Das relative Risiko (RR) und dessen Konfidenzintervall von 95 % wurden berechnet. Zur demographischen Datenerhebung wurde außerdem der „Mann Whitney-U-Test“ herangezogen.

Die Berechnung erfolgte mit dem Statistik-Paket für „Social Sciences“ (SPSS für Windows 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Für das Signifikanzniveau wurden 5 % (p-Wert 0,05) für signifikante Unterschiede und 1 % (p-Wert 0,01) für hochsignifikante Unterschiede gewählt.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Schwangerschaftsdaten

3.1.1. Demographische Daten

Vergleicht man das Alter der Schwangeren, die Anzahl der Schwangerschaften sowie die Anzahl der Aborte und der Geburten, so besteht zwischen der Patientengruppe und dem Kontrollkollektiv jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

Die Gruppe der RSA-Patientinnen war mit durchschnittlich 36 Jahren um 2 Jahre älter als die Gruppe der Frauen ohne Aborte. Mit 4 versus 1 war auch die Anzahl der Gesamtschwangerschaften deutlich erhöht. Betrachtet man den Median, so traten Fehlgeburten beim RSA-Kollektiv dreimal auf, während das bei den Kontroll-Patientinnen definitionsgemäß kein Mal der Fall war. Durchschnittlich wurde die RSA-Gruppe kein Mal und die Kontrollgruppe einmal von einem gesunden Kind entbunden. Erwähnt sei hierbei, daß es in beiden Kollektiven Frauen mit vier erfolgreichen Geburten gab.

	RSA	Kontrollen	p-Wert
n	179	126	
Alter	36 (22-50)	34 (20-51)	< 0,001
Schwangerschaften	4 (2-12)	1 (1-4)	< 0,001
Aborte	3 (2-11)	0 (0-0)	< 0,001
Geburten	0 (0-4)	1 (1-4)	< 0,001

Tabelle 8: Demographische Daten

Die folgende Tabelle macht deutlich, wie viele Geburten in den verschiedenen Kollektiven vorkamen. Durchschnittlich findet man in der RSA-Gruppe keine und bei den Kontrollen eine Geburt.

	RSA	Kontrollen
Geburten gesamt	105	193
Keine Geburt	56,4 % (101)	0 % (0)
Eine Geburt	33,0 % (59)	56,3 % (71)
Zwei Geburten	7,8 % (14)	34,9 % (44)
Drei Geburten	1,1 % (2)	7,9 % (10)
Vier Geburten	1,7 % (3)	0,8 % (1)

Tabelle 9: Anzahl der Geburten

Grundsätzlich kann zwischen primären und sekundären Abgängen unterschieden werden, also zwischen Patientinnen ohne vorangehende Geburt und solchen, die mindestens von einem gesunden Kind entbunden worden waren, bevor die Aborte stattfanden. Primäre RSA lagen bei 117 Patientinnen (65,4 %) vor. Bei 62 Patientinnen (34,6 %) handelte es sich dagegen um sekundär rezidivierende Aborte.

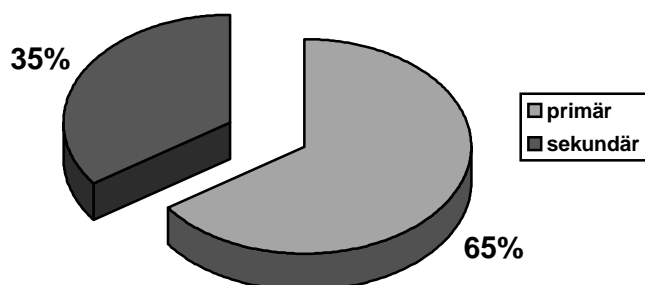


Diagramm 2: Abortart

3.1.2. Abortdaten

Im folgenden werden die nicht erfolgreichen Schwangerschaften näher klassifiziert. Insgesamt fanden bei unseren 179 RSA-Patientinnen 569 Aborte statt. Die Anzahl der Aborte, die eine Frau erlitten hatte, war definitionsgemäß größer oder gleich zwei. Die Anzahl schwankte in unserem Patientenkollektiv zwischen zwei und elf.

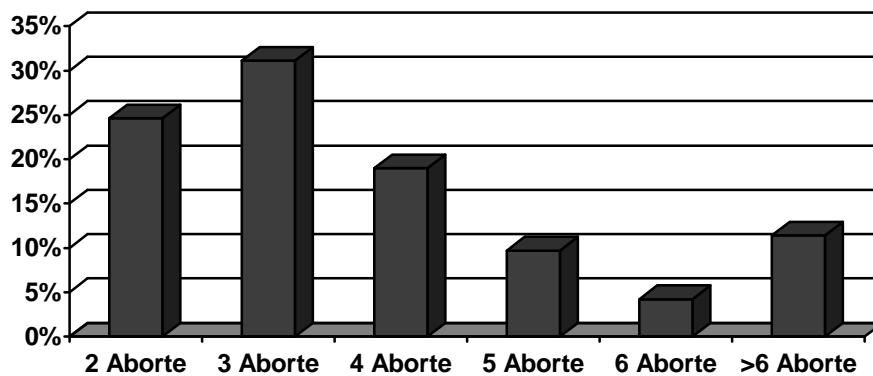


Diagramm 3: Anzahl der Aborte

Die Aborte wurden nach dem Zeitpunkt des Schwangerschaftsendes in Fehlgeburten vor (1. Trimester) bzw. nach (2. Trimester) der 12. Schwangerschaftswoche unterteilt. In unserem Kollektiv überwogen eindeutig die Aborte im ersten Schwangerschaftsdrittel. Es waren 136 (76 %) Patientinnen, die ihr Kind im ersten Trimenon verloren hatten, und 43 (24 %) Patientinnen mit einem Verlust im zweiten Trimenon.

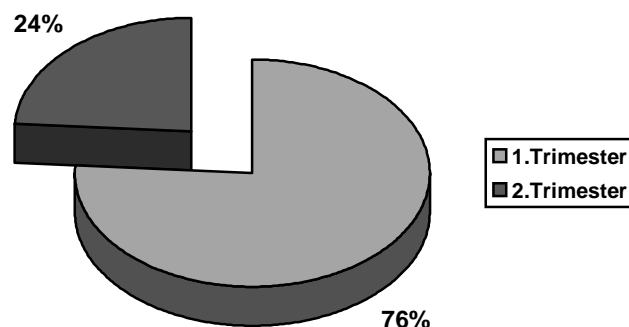


Diagramm 4: Abortzeitpunkt

3.2. Verteilung der einzelnen Genotypen

Es werden in der Folge die Häufigkeiten für die einzelnen Genotypen im RSA- und im Kontrollkollektiv dargestellt.

3.2.1. Faktor XIII-Genotypen

Bei den statistischen Analysen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung nachweisen. Die Ergebnisse waren nahezu identisch.

Faktor XIII	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
G/G	57,5 % (103)	59,5 % (75)	0,81
G/T	37,4 % (67)	34,9 % (44)	0,72
T/T	5,0 % (9)	5,6 % (7)	1,0
Allelhäufigkeit G	76,3 % (273)	77,0 % (194)	0,85
Allelhäufigkeit T	23,7 % (85)	23,0 % (58)	0,85

Tabelle 10: Häufigkeiten der Genotypen des Faktor XIII-G/T(V34L)-Polymorphismus

Beim Wildtyp G/G des Faktor XIII besteht zwischen beiden Gruppen nur ein geringer Unterschied von 57,5 % (RSA) vs. 59,5 % (Kontrollen). Ähnlich sieht es bei dem heterozygoten Genotyp G/T mit 37,4 % vs. 34,9 % aus. Noch geringer wird der Unterschied, wenn man die homozygote Ausprägung betrachtet. Hier besitzen Frauen mit wiederholten Fehlgeburten den T/T-Genotyp in 5,0 % der Fälle gegenüber 5,6 % der Frauen ohne Fehlgeburten.

Die Allelfrequenzen betragen für das G-Allel 76,3 % in der RSA-Gruppe vs. 77,0 % bei den Kontrollen. Beim T-Allel sind es 23,7 % auf Seiten der RSA-Patientinnen und 23,0 % bei den Kontrollen.

3.2.2. Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Genotypen

Bei den RSA-Patientinnen wiesen 52,0 % den A/A-Genotyp auf. Fast identisch ist die Verteilung bei den gesunden Müttern. Hier tritt diese Ausprägung mit 52,4 % auf. Korrespondierend weichen die Häufigkeiten des heterozygoten A/C-Genotyps und des homozygoten C/C-Genotyps zwischen Patientinnen und Kontrollen nur gering voneinander ab (A/C 42,5 % vs. 40,5 %; C/C 5,6 % vs. 7,1 %). Anzumerken ist noch, dass das C-Allel deutlich seltener auftritt als das A-Allel (C-Allel: 26,8 vs. 27,4 %; A-Allel: 73,2 % vs. 72,6 %).

AT1R	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
A/A	52,0 % (93)	52,4 % (66)	1,0
A/C	42,5 % (76)	40,5 % (51)	0,81
C/C	5,6 % (10)	7,1 % (9)	0,63
Allelfrequenz A	73,2 % (262)	72,6 % (183)	0,93
Allelfrequenz C	26,8 % (96)	27,4 % (69)	0,93

Tabelle 11: Häufigkeiten der Genotypen des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-A1166C-Polymorphismus

3.2.3. Endotheliale Stickoxid-Synthase (NOS3)-Genotypen

Wie schon bei den vorangehenden Auswertungen konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung bei Frauen mit und ohne rezidivierende Fehlgeburten gefunden werden. Die Ausprägung NOS3-5/5 findet sich bei 68,7 % der RSA-Patientinnen vs. 65,1 % der Kontrollpatientinnen. Für die heterozygote Variante sieht die Verteilung wie folgt aus: RSA 29,1 % vs. Kontrollen 31,0 %. Die homozygote Ausprägung 4/4 fand sich in 2,2 % vs. 4,0 % der Fälle.

Bestätigt werden konnte, dass das 4-Allel wesentlich seltener als das 5-Allel auftritt, so bei den RSA-Patientinnen mit einer Häufigkeit von 83,2 % für das 5-Allel und von 16,8 % für das 4-Allel. Bei den gesunden Müttern war die Verteilung nahezu gleich, nämlich 80,6 % für das 5-Allel und 19,4 % für das 4-Allel. Ebenso wenig ergaben sich Unterschiede bei den homo- und heterozygoten Genotypen.

NOS3	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
5/5	68,7 % (123)	65,1 % (82)	0,54
4/5	29,1 % (52)	31,0 % (39)	0,80
4/4	2,2 % (4)	4,0 % (5)	0,50
Allelfrequenz 5	83,2 % (298)	80,6 % (203)	0,39
Allelfrequenz 4	16,8 % (60)	19,4 % (49)	0,39

Tabelle 12: Häufigkeiten der Genotypen des 4/5-Polymorphismus im Gen der endothelialen Stickoxid-Synthase

3.2.4. Faktor V-, Faktor II-, PAI-1- und ACE-Genotypen

Mutationen in den für Faktor V (FV) und Faktor II (FII) kodierenden Genen werden seit längerem auf ihren Zusammenhang mit rezidivierenden Spontanaborten hin untersucht. Es gibt einige Veröffentlichungen, die der Faktor V-Leiden-Mutation ein erhöhtes Risiko für wiederholte Fehlgeburten zuschreiben (Ridker et al. 1998, Meinardi et al. 1999). Untersuchungen von Brenner et al. (1997), Gris et al. (1997) und Kutteh et al. (1999) haben auch den Faktor II-G20210A-Genotyp als Risikofaktor für Fehlgeburten des 2. und 3. Trimenons identifiziert.

Auch am Klinikum Großhadern widmet sich eine Forschergruppe dem Zusammenhang von habituellen Aborten und thrombophilen Mutationen. Es gibt bereits eine Veröffentlichung dieses Teams, die sich mit den Auswirkungen von Faktor V- und Faktor II-Mutationen auf den Schwangerschaftsverlauf befasst (Pihusch et al. 2001). Außerdem wurden der PAI-1-4G/5G- und der ACE-D/I-Polymorphismus als Risikofaktoren für RSA identifiziert (Buchholz et al. 2003).

Die Zielsetzung meiner Arbeit war es daher auch, die bereits beschriebenen Polymorphismen im F XIII-, AT1R- und NOS3-Gen mit diesen Mutationen und Polymorphismen anhand größerer Fallzahlen zu korrelieren.

3.2.4.1. Faktor V-Genotypen

Die Häufigkeit der heterozygoten FVL-Mutation unterschied sich nur minimal in beiden Gruppen. Der normale Genotyp konnte bei 93,3 % der Patientinnen und bei 91,2 % der unkomplizierten Schwangerschaften nachgewiesen werden. Ein FVL in heterozygoter Form fand sich bei den RSA-Patientinnen in 6,7 % der Fälle und im Kontrollkollektiv in 8,8 % der Fälle. Der homozygot mutierte A/A-Genotyp trat in keiner der beiden Gruppen auf.

Die Verteilung der Allelfrequenzen für RSA bzw. Kontrollen war für das G-Allel 96,7 % vs. 95,6 % und für das A-Allel 3,4 % vs. 4,4 %.

Bei jeweils einer Patientin aus dem RSA- sowie dem Kontrollkollektiv war keine DNA mehr für die Analyse vorhanden.

Faktor V	RSA	Kontrollen	p
n	178	125	
1691 G/G	93,3 % (166)	91,2 % (114)	0,52
1691 A/G	6,7 % (12)	8,8 % (11)	0,52
1691 A/A	0 % (0)	0 % (0)	
Allelfrequenz 1691 G	96,7 % (344)	95,6 % (239)	0,52
Allelfrequenz 1691 A	3,4 % (12)	4,4 % (11)	0,52

Tabelle 13: Häufigkeit der Faktor V-Mutation

3.2.4.2. Faktor II-Genotypen

Alle Frauen im Kontrollkollektiv (100 %) trugen die Normalvariante G/G an Position 20210 des Prothrombin-Gens. Im Gegensatz dazu tritt diese mit 94,9 % bei den Frauen mit wiederholten Fehlgeburten deutlich seltener auf. Die Faktor II-Mutation ließ sich dementsprechend in heterozygoter Form bei 5,1 % der RSA-Patientinnen und bei keiner Patientin der Kontrollgruppe nachweisen. Der homozygote A/A-Genotyp war dagegen in keiner der beiden Gruppen nachweisbar.

Betrachtet man die G-Allelfrequenz, so finden sich im erkrankten Kollektiv 97,5 % Trägerinnen im Vergleich zu 100 % bei den Gesunden. Die Allelfrequenz für das 20210A-Allel betrug bei den RSA-Patientinnen 2,5 % vs. 0 % in der Kontrollgruppe.

II Faktor	RSA	Kontrollen	p
n	178	125	
G/G	94,9 % (169)	100 % (125)	0,08
G/A	5,1 % (9)	0 % (0)	0,08
A/A	0 % (0)	0 % (0)	
Allelfrequenz 20210 G	97,5 % (347)	100 % (250)	0,01
Allelfrequenz 20210 A	2,5 % (9)	0 % (0)	0,01

Tabelle 14: Häufigkeit der Faktor II-Mutation

3.2.4.3. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-Genotypen

Die Frequenz der PAI-1-Genotypen war im Patienten- und Kontrollkollektiv annähernd gleich, so dass sich kein signifikanter Unterschied erkennen ließ. Der homozygote 5G/5G-Genotyp wurde bei 19,6 % der RSA-Gruppe vs. 22,2 % der Kontrollen gefunden. Der heterozygote Status 4G/5G konnte bei 41,3 % der Patientinnen und bei 46,0 % der Vergleichspersonen registriert werden. Damit ist die homozygote Variante 4G/4G in der RSA-Gruppe mit 39,1 % vs. 31,7 % in der Kontrollgruppe leicht erhöht.

Die Ergebnisse korrelieren mit einer erhöhten 4G-Allelfrequenz bei den RSA- gegenüber den Kontroll-Patientinnen (59,8 % vs. 54,8 %). Das 5G-Allel findet sich dagegen in 40,2 % vs. 45,2 % der Fälle.

PAI-1	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
5G/5G	19,6 % (35)	22,2 % (28)	0,57
4G/5G	41,3 % (74)	46,0 % (58)	0,48
4G/4G	39,1 % (70)	31,7 % (40)	0,23
Allelfrequenz 5G	40,2 % (144)	45,2 % (114)	0,24
Allelfrequenz 4G	59,8 % (214)	54,8 % (138)	0,24

Tabelle 15: Häufigkeiten der Genotypen des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-4G/5G-Polymorphismus

3.2.4.4. "Angiotensin-Converting"-Enzym-Genotypen

Betrachtet man die Häufigkeit des ACE-I/I-Genotyps, so trat dieser im RSA- und Kontrollkollektiv nahezu gleich häufig auf (22,3 % vs. 20,6 %). Die heterozygote Form D/I war dagegen bei den RSA-Patientinnen wesentlich seltener als im Kontrollkollektiv (45,3 % vs. 55,6 %). Dementsprechend war der ACE-D/D-Genotyp bei den Abortpatientinnen mit 32,4 % vs. 23,8 % deutlich häufiger.

Die Ergebnisse korrelierten mit einer gering erhöhten D-Allelfrequenz in der RSA-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (55,0 % vs. 51,6 %). Die Häufigkeit des I-Allels betrug 45,0 % vs. 48,4 %.

ACE	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
I/I	22,3 % (40)	20,6 % (26)	0,78
D/I	45,3 % (81)	55,6 % (70)	0,08
D/D	32,4 % (58)	23,8 % (30)	0,12
Allelfrequenz I	45,0 % (161)	48,4 % (122)	0,41
Allelfrequenz D	55,0 % (197)	51,6 % (130)	0,41

Tabelle 16: Häufigkeiten der Genotypen des "Angiotensin-Converting"-Enzym-D/I-Polymorphismus

3.3. Kombinationsverteilungen

Die untersuchten Mutationen und Polymorphismen haben zwar mit Ausnahme der Faktor II-Mutation und des ACE-D/I-Polymorphismus für sich allein genommen keinen Effekt auf den Verlauf der Schwangerschaft. Sie könnten aber in Kombination miteinander das Risiko rezidivierender Spontanaborte erhöhen oder eventuell protektiv wirken. Da die einzelnen Polymorphismen/Mutationen unterschiedliche Angriffspunkte im Gerinnungssystem haben, aber zu einer gemeinsamen Einflussgröße auf die hämostaseologische Balance werden können, habe ich deshalb auch das Auftreten von Kombinationen einzelner Mutationen und Polymorphismen untersucht.

Es konnte von mir bestätigt werden, dass der ACE-D/D-Genotyp für sich allein genommen, wie oben erwähnt, häufiger bei den RSA-Patientinnen (32,4 %) als bei Kontrollen (23,8 %) ($p=0,12$) zu finden ist. Treffen die thrombophilen Genotypen ACE-D/D und PAI-1-4G/4G in einer Person zusammen, so führt dies zu einem signifikant erhöhten Abortrisiko (13,6 % vs. 4,7 %) ($p=0,007$; Buchholz et al. 2003).

3.3.1. AT1R in Kombination mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D

Die Kombination der Varianten AT1R-A/A und PAI-1-4G/4G war signifikant häufiger bei RSA-Patientinnen als bei Kontrollen zu finden (20,7 % vs. 11,9 %) ($p=0,03$).

AT1R + PAI-1-4G/4G	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
A/A	20,7 % (37)	11,9 % (15)	0,03
A/C	15,6 % (28)	16,7 % (21)	0,47
C/C	2,8 % (5)	3,2 % (4)	0,55

Tabelle 17: Häufigkeiten der Genotypen des AT1R-A1166C-Polymorphismus in Kombination mit PAI-1-4G/4G

Die Kombination des AT1R-A1166C-Polymorphismus mit ACE-D/D zeigte dagegen keine Unterschiede, die auf einen Zusammenhang mit rezidivierenden Spontanaborten schließen lassen könnten.

AT1R + ACE-D/D	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
A/A	16,2 % (29)	10,3 % (13)	0,10
A/C	13,4 % (24)	10,3 % (13)	0,26
C/C	2,8 % (5)	3,2 % (4)	0,55

Tabelle 18: Häufigkeiten der Genotypen des AT1R-A1166C-Polymorphismus in Kombination mit ACE-D/D

Die Kombination des AA-Genotyps des AT1R-A1166C-Polymorphismus mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D war dagegen eine hochsignifikante Risikokonstellation (6,1 % vs. 0,0 %) ($p=0,002$). Auffallend ist insbesondere, dass diese Kombination genetischer Varianten bei keiner der Kontrollpatientinnen zu finden war.

AT1R + PAI-1-4G/4G + ACE-D/D	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
A/A	6,1 % (11)	0 % (0)	0,002
A/C	6,7 % (12)	3,2 % (14)	0,14
C/C	1,7 % (3)	1,6 % (2)	0,66

Tabelle 19: Häufigkeiten der Genotypen des AT1R-A1166C-Polymorphismus in Kombination mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D

3.3.2. NOS3 in Kombination mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D

Nachdem die Genotypen PAI-1-4G/4G und ACE-D/D gemeinsam eine Einflussgröße auf die Fibrinolyse bilden, hat mich insbesondere die Kombination mit dem NOS3-Polymorphismus interessiert. Ein Unterschied in der Häufigkeit zwischen RSA- und Kontrollkollektiv war für das Zusammentreffen der hypofibrinolytischen Variante PAI-1-4G/4G mit dem Genotyp NOS3-5/5 (27,4 % vs. 19,0 %) nachweisbar ($p=0,06$).

NOS3 + PAI-1-4G/4G	RSA	Kontrollen	p
N	179	126	
5/5	27,4 % (49)	19,0 % (24)	0,06
4/5	11,7 % (27)	11,1 % (14)	0,51
4/4	0 % (0)	1,6 % (2)	0,17

Tabelle 20: Häufigkeiten der Genotypen des NOS3-4/5-Polymorphismus in Kombination mit PAI-1-4G/4G

Auch die Kombination NOS3-5/5 und ACE-D/D trat bei RSA-Patientinnen signifikant häufiger auf (RSA-Patientinnen 25,1 % vs. Kontrollen 15,9 %)($p=0,03$).

NOS3 + ACE-D/D	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
5/5	25,1 % (45)	15,9 % (20)	0,03
4/5	7,3 % (13)	7,1 % (9)	0,58
4/4	0 % (0)	0,8 % (1)	0,41

Tabelle 21: Häufigkeiten der Genotypen des NOS3-4/5-Polymorphismus in Kombination mit ACE-D/D

Desgleichen stellte die Variante NOS3-5/5 in Kombination mit ACE-D/D und PAI-1-4G/4G ein hochsignifikantes Risiko für Spontanaborte dar (10,6 % vs. 2,4 %, $p=0,04$).

NOS3 + PAI-1- 4G/4G + ACE-D/D	RSA	Kontrollen	p
n	179	126	
5/5	10,6 % (19)	2,4 % (3)	0,004
4/5	3,9 % (7)	2,4 % (3)	0,35
4/4	0 % (0)	0 % (0)	

Tabelle 22: Häufigkeiten der Genotypen des NOS3-4/5-Polymorphismus in Kombination mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genotypen im Gerinnungssystem wirksamer Faktoren bei Frauen mit idiopathischen rezidivierenden Spontanaborten untersucht. Dazu wurden deren Häufigkeiten in einer Gruppe von Frauen mit Aborten ungeklärter Ursache und in einer Gruppe von Müttern ohne Fehlgeburten bestimmt. Einerseits wurde untersucht, ob bekannte Polymorphismen im Faktor XIII-, NOS3- und AT1R-Gen, die mit Beinvenenthrombosen, Myokardinfarkten, arteriellem Hypertonus oder zerebralen Insulten assoziiert sind, auch für rezidivierende Spontanaborte verantwortlich sein können. Andererseits wurden bereits bekannte, für RSA verantwortliche Genveränderungen im Faktor V-, Faktor II-, PAI-1- und ACE-Gen anhand einer größeren Fallzahl von Patientinnen überprüft und mit den neu zu untersuchenden Polymorphismen korreliert. Diese Genveränderungen wurden bei den RSA-Patientinnen und Kontrollen mittels molekulargenetischer Methoden analysiert, und die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen wurden mit Hilfe der Statistik miteinander verglichen.

Seit einiger Zeit werden Polymorphismen und Mutationen in Genen, die für Gerinnungsfaktoren sowie Faktoren der Fibrinolysekaskade kodieren, untersucht, die Ursache einer angeborenen Neigung zu thrombotischen Komplikationen und Gerinnungsstörungen sein könnten. Eine Publikation von Lane und Grant (2000) gibt eine umfassende Übersicht über die Auswirkungen einiger angeborener thromboembolischer Defekte auf das venös-arterielle System.

Bereits eine Schwangerschaft an sich stellt ein signifikantes Thromboserisiko dar. Dies resultiert aus der Kombination von reduzierter Blutfliessgeschwindigkeit bei venöser Dilatation und einer zellulären und plasmatischen Hyperkoagulabilität. Häufige schwangerschaftsassozierte Probleme wie Präeklampsie, Abruption placenta, fetale Retardierung und Totgeburt werden in Verbindung mit intervillösen und spiralarteriellen Thrombosen sowie inadäquater plazentarer Perfusion beschrieben (Kupferminc et al. 2000). Für diese pathologischen Veränderungen in der Schwangerschaft sind maternale angeborene oder erworbene thrombophile Faktoren prädisponierend, die ein erhebliches Risiko für den Feten bedeuten (Yamada et al. 2000, Mousa und Alfirevic 2001).

Die meisten dieser genetischen Veränderungen verursachen eine verstärkte Gerinnbarkeit, nur wenige vermindern die Blutviskosität. Eine gestörte Perfusion der Plazenta ist gekennzeichnet durch eine eingeschränkte Ausbreitung der PlazentagefäÙe zumeist mit Endothelschädigung. Dadurch verstärkt sich die lokale Mikrokoagulation, und Thrombosen in den Spiralarterien können die Folge sein (Kupferminc 2000, Salafia 1995). Die daraus resultierende fetale Minderperfusion und Hypoxie kann ursächlich für ein Absterben des Feten mitverantwortlich gemacht werden (Yamada 2000).

In diesem Zusammenhang spielen prothrombotisch und vasokonstriktorisch wirkende Polymorphismen möglicherweise eine wesentliche Rolle:

Aktivierter Faktor XIII ist für die Etablierung eines stabilen Fibrinpolymers zuständig. Eine häufige G→T-Punktmutation in Exon 2 kodiert für den Austausch der Aminosäure Valin durch Leucin an Aminosäureposition 34. Sowohl ein erhöhtes Risiko für Thrombosen (Val/Val), als auch eine verstärkte Blutungsneigung (Leu/Leu) wurden als Auswirkungen beschrieben.

Der Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor ist in vielen Geweben vorhanden und vermittelt die Angiotensin II-Effekte. Angiotensin II ist stark vasopressorisch wirksam und stimuliert die Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Ein A1166C-Polymorphismus im AT1R-Gen konnte mit einem blutdrucksteigernden Effekt assoziiert werden (Bonnardeaux et al. 1994, Kainulainen et al. 1999).

Das Enzym endotheliale Stickoxid-Synthase übernimmt die Regulation der Produktion von Stickstoffmonoxid, welches für die Relaxation von glatte Muskelzellen und eine Vasodilatation verantwortlich ist. Der untersuchte 4/5-Polymorphismus im NOS3-Gen soll über eine Vasokonstriktion zu Hypertonus und kardiovaskulären Erkrankungen führen (Hibi et al. 1998, Wattanapitayakul et al. 2001).

Die vorliegende Arbeit untersuchte einen möglichen Zusammenhang dieser Genveränderungen im Gerinnungssystem mit dem Auftreten rezidivierender Spontanaborte. Zudem wurde der Einfluß synergistisch wirkender Polymorphismen auf das RSA-Risiko analysiert.

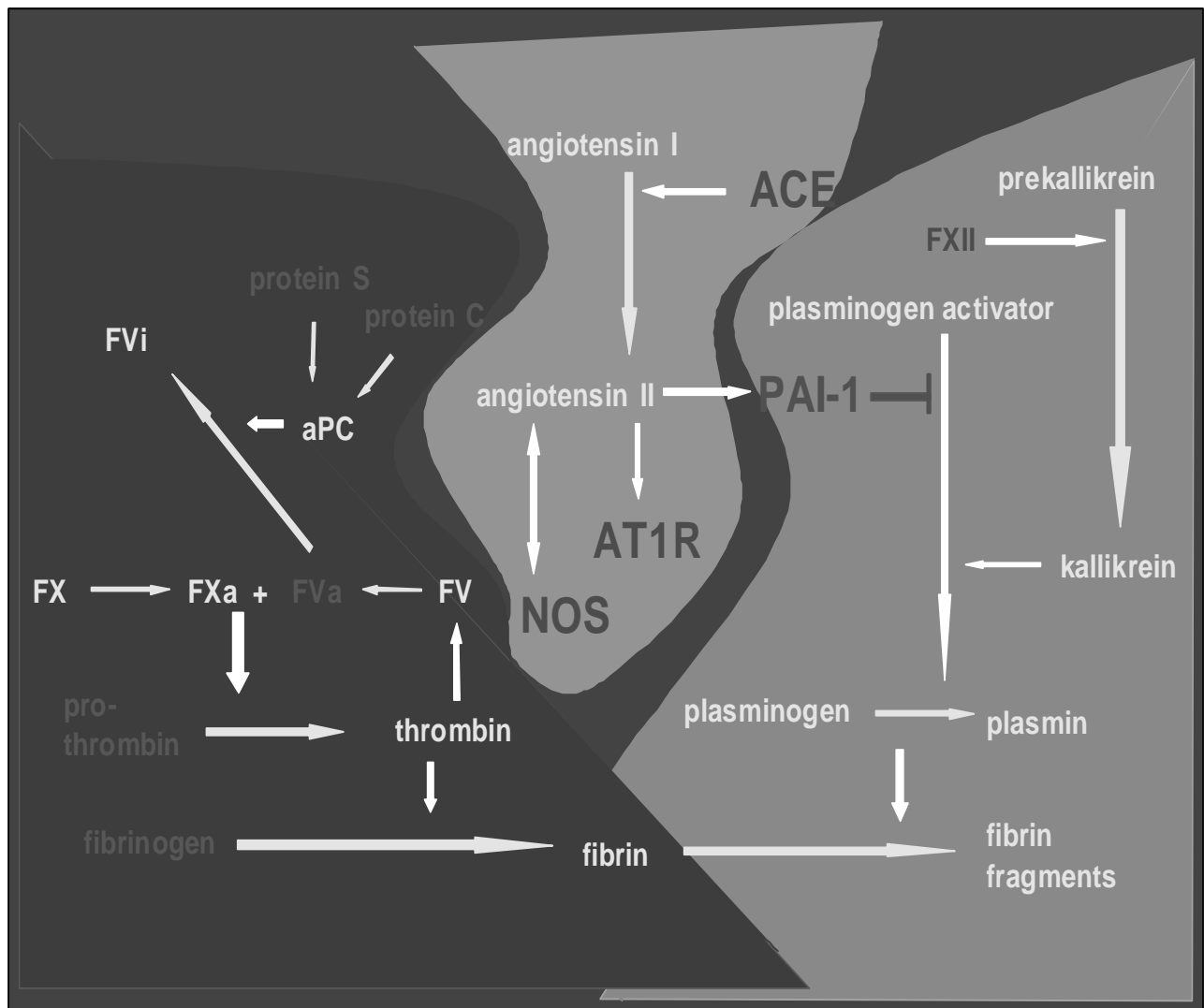


Abbildung 6: Gesamtschema Hämostase

4.1. Prokoagulatorische Faktoren

Unter physiologischen Bedingungen befindet sich die Hämostase in einem fein austarierten Gleichgewicht von fördernden und hemmenden Reaktionspartnern. Defekte der beteiligten Komponenten, ein Mangel oder Überschuss sowie Fehlregulationen durch Aktivierung oder Inhibierung der Regulationssysteme können zu einer Dysbalance führen. Dies hat entweder eine reduzierte Blutstillung (Hämorrhagie) oder eine abnorme Gerinnungsfähigkeit mit Thrombusbildung (Thrombophilie) zur Folge (Beckmann et al. 2002).

Die Thrombophilie wird als ein Zustand definiert, bei dem das Auftreten thromboembolischer Erkrankungen begünstigt bzw. erhöht ist. Diese Definition kann rein klinisch, ohne Kenntnis der Ursache erfolgen, oder für solche Zustände verwendet werden, bei denen eine definierte erworbene oder angeborene Abnormalität im Hämostase- oder Fibrinolyse-System vorliegt, die als isolierter oder kombinierter Defekt Hauptursache einer Thromboseneigung ist. Die zu einer Thrombose führenden molekularen Pathomechanismen resultieren direkt oder indirekt aus einem Überschuss an Thrombin. Thrombin ist das zentrale Enzym der Hämostase, das nach Aktivierung aus Prothrombin gebildet wird. Die meisten hereditären Thrombophilien können deshalb entweder als gestörte Neutralisation von Thrombin (z. B. Vorliegen eines Antithrombinmangels) verstanden werden oder als gesteigerte Thrombingenerierung (z. B. infolge einer Faktor V-Leiden- oder einer Prothrombin-G20210A-Mutation).

4.1.1. Faktor V

Schon vielfach untersucht und seit längerem bekannt sind Mutationen im Faktor V, welche für Thrombosen im venösen Gefäßsystem prädisponieren. Insbesondere die Faktor V-Leiden-Mutation wird mit dem Auftreten einer Plazentainsuffizienz im höheren Schwangerschaftsalter in Verbindung gebracht (Brenner et al. 1997, Pauer et al. 2000).

Rezidivierende Aborte können das Ergebnis einer Hyperkoagulabilität in der uteroplazentaren Strombahn sein. Die Prävalenz einer Mutation im Faktor V-Gen ist bei diesen Frauen um das 2,2 fache erhöht (Ridker et al. 1998). In einer großen Studie von Preston et al. konnte 1996 ein signifikanter Zusammenhang zwischen Patientinnen mit einer erhöhten Abortrate und der Faktor V-Leiden-Mutation gezeigt werden. Dieses bezieht sich allerdings auf das Risiko für späte Fehlgeburten und Totgeburten. Eindeutig geklärt war bisher nicht, ob diese Mutation auch für frühe Fehlgeburten ein erhöhtes Risiko darstellt.

Vergleicht man unser eigenes Patientenkollektiv, das aus Frauen mit rezidivierenden Spontanaborten unklarer Ursache besteht, mit den Frauen ohne Aborte, läßt sich nur

ein minimaler Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen feststellen. Die Frequenz des 1691A-Allels ist mit 3,4 % bei den RSA-Patientinnen sogar niedriger als in der Kontrollgruppe. In keiner der beiden Gruppen gab es Frauen mit einem homozygoten A/A-Genotyp. Aus meinen Ergebnissen muss man den Schluß ziehen, dass die Faktor V-Leiden-Mutation wahrscheinlich kein Risikofaktor für frühe habituelle Aborte ist.

Damit können die Ergebnisse von Buchholz et al. (2004) und Pihusch et al. (2001) bestätigt werden. In einer Studie, die 102 Patientinnen mit zwei oder mehr ungeklärten Aborten vorwiegend des ersten Trimenons umfaßte, wurde ebenfalls keine erhöhte Prävalenz der Faktor V-Leiden-Mutation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (7,9 % vs. 8,6 %) gefunden.

Die Schlußfolgerung ist, dass die FVL-Mutation keine Rolle in der Genese früher Fehlgeburten zu spielen scheint. Dieser Sachverhalt läßt sich möglicherweise durch Kompensationsmechanismen der möglichen Plazentabeeinträchtigung wie ein begünstigendes Embryo-Plazenta-Größen- und -Durchblutungsverhältniss erklären (Buchholz et al. 2004).

4.1.2. Prothrombin (Faktor II)

Die G20210A-Mutation im Faktor II-Gen ist mit einer erhöhten Prothrombinaktivität assoziiert (Poort et al. 1996). Eine vermehrte Thrombingenerierung ist die Folge. Gleichzeitig wird die Inaktivierung von Faktor Va beeinträchtigt, was wiederum ein erhöhtes Risiko für Thrombosen darstellt (Butenas et al. 1999, Smirnov et al. 1999).

Die Rolle, die die Faktor II-Mutation in der Schwangerschaft spielt, ist noch nicht vollständig geklärt. Das relative Risiko für einen Schwangerschaftsverlust einer Mutter mit heterozygoter G20210A-Mutation ist insgesamt 2,4-fach höher (Brenner et al. 1999). Auch das Risiko für eine ausgeprägte Präeklampsie ist bei diesen Patientinnen doppelt so oft gegeben (Kupferminc et al. 1999 und 2000).

Es gibt Untersuchungen, die diesen Genotyp für Aborte vorwiegend im ersten Trimenon verantwortlich machen (Pihusch et al. 2001, Finan et al. 2002) und einige,

die einen Zusammenhang mit Fehlgeburten im zweiten und dritten Trimenon gefunden haben (Brenner et al. 1997, Kutteh et al. 1999). Es wird deshalb spekuliert, dass weitere Mechanismen wie Zelladhäsion, Muskelzellproliferation oder verstärkte Vaskulogenese ebenso eine Rolle spielen (Pihusch et al. 2001).

Bei den für meine Arbeit betrachteten 125 Kontrollpatientinnen konnte ich nur den homozygot normalen Genotyp G/G finden. Keine der gesunden Mütter besaß ein A-Allel und somit den heterozygote G/A- bzw. den homozygoten A/A-Genotyp. Im Gegensatz dazu besaßen 9 RSA-Patientinnen die Faktor II-G20210A-Mutation in heterozygoter Form. Sie tritt damit deutlich häufiger bei den abortierenden Patientinnen auf. Wie schon bei der FVL-Mutation gab es in keinem der beiden Kollektive Patientinnen mit dem homozygot veränderten Genotyp. Insgesamt läßt sich eine deutliche Assoziation mit wiederholten Schwangerschaftsverlusten erkennen, die allerdings nicht ganz so deutlich ausgeprägt ist wie in vorhergehenden Untersuchungen. Die von Buchholz et. al. erhobenen Daten zeigen ein signifikantes Risiko für einen Schwangerschaftsabbruch vor der 12. SSW. Bei 75 Patientinnen mit zwei aufeinanderfolgenden spontanen Aborten fand man in 6,7 % das A-Allel im Vergleich zu nur 0,8 % bei den Kontrollen.

4.1.3. Faktor XIII

In einer Studie von Catto et al. (1999) zeigte der Val₃₄→Leu-Polymorphismus eine Korrelation mit Thromboseereignissen bei 221 untersuchten Patienten. Patienten mit Thrombosen hatten eine erhöhte Prävalenz für den Val/Leu (G/T)-Phäno-/Genotyp. In dieser Untersuchung wurde auch nachgewiesen, dass homozygote Träger des T-Allels eine signifikant höhere Enzymaktivität besitzen als Träger des normalen Genotyps G/G.

Eine ausführliche Untersuchung von Anwar et al. (1999) bestätigte, daß die Leu₃₄-Variante zu einer erhöhten spezifischen Aktivität des FXIII führt. Es wurden insgesamt fünf Polymorphismen im FXIII untersucht. Die Autoren konnten jedoch auch zeigen, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen der FXIII-Plasmakonzentration und der Enzymaktivität gibt.

Es gibt mehrere Studien, die einen protektiven Effekt des FXIII-Val₃₄→Leu-Polymorphismus in Bezug auf Herzinfarkt (Kohler et al. 1998, Franco et al. 2000) und ischämischen Insult (Elbaz et al. 2000) zeigen. Vermutet wird auch ein Schutz vor tiefer Beinvenenthrombose und Lungenembolie. Als mögliche Mechanismen werden die vorzeitige Elimination des mutierten Faktor XIIIa aus der Zirkulation sowie veränderte Strukturen der durch den mutierten FXIIIa vernetzten Gerinnsel diskutiert (Franco et al. 1999, Lane and Grant 2000, Kohler und Schröder 2002).

Gemmati et al. (2001) konnten in einer Studie diesen Effekt ebenfalls nachweisen. Darüberhinaus fanden sie ein erhöhtes Auftreten von intrazerebralen Hämorrhagien bei Vorhandensein des Val₃₄→Leu-Polymorphismus. Das T-Allel fand sich häufiger bei Patienten mit intrazerebralen Hämorrhagien als bei gesunden Kontrollen (33,8 % vs. 23,1 %, p=0,009) und weniger oft bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und ischämischem Insult als im Vergleichskollektiv (18,1 % vs. 23,1 %, p=0,010 bzw. 17,3 % vs. 24,2 %, p=0,011). Möglicherweise führt eine funktionelle Einschränkung zu ähnlichen Hämorrhagien wie bei komplettem FXIII-Mangel.

Dem entgegen steht eine Studie von Balogh et al. (2000), die 273 Patienten mit venösen Thrombosen einschloß. Es wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Stabilität und die Plasmakonzentration bei verschiedenen Val₃₄/Leu-Genotypen identisch ist. Die mittlere spezifische Aktivität des FXIII im Plasma war bei allen Varianten die gleiche.

Die Etablierung eines stabilen Fibrinpolymers im Rahmen der plazentaren Basalplatte sowie die ungehinderte Perfusion des intervillösen Raumes stellen elementare Voraussetzungen der intakten Frühschwangerschaftsentwicklung dar. FXIII ist maßgeblich an der Fibrinvernetzung beteiligt. Da sowohl ein erhöhtes Risiko für Thrombosen (G/G) als auch eine verstärkte Blutungsneigung (T/T) beschriebene Auswirkungen des Val₃₄→Leu-Polymorphismus sind, habe ich in meiner Arbeit untersucht, ob der Polymorphismus auch als Risikofaktor für Mikrovaskularisationsstörungen in der plazentaren Strombahn anzusehen ist. Betrachtet man die Verteilung der Genotypen, findet sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und dem Gesamtkollektiv der RSA-Patientinnen. Beim normalen G/G-Genotyp beträgt die Differenz beider Gruppen

lediglich 2 % (57,5 % vs. 59,5 %, $p=0,81$). Auch für die heterozygoten G/T- und die homozygoten T/T-Trägerinnen sind die Ergebnisse sehr ähnlich (G/T: 37,4 % vs. 34,9 %, $p=0,72$) (T/T: 5,0 % vs. 5,6 %, $p=1,0$). Betrachtet man die Allelhäufigkeiten, stellt man fest, dass sie bei Patientinnen und Kontrollen nahezu identisch sind. Das G-Allel kam in der RSA-Gruppe mit 76,3 % vs. 77,0 % bei den Kontrollen vor. Das T-Allel war mit 23,7 % vs. 23,0 % wesentlich seltener. Es gibt also keinen Unterschied bezüglich des Auftretens des Faktor XIII-Val₃₄→Leu-Polymorphismus bei Frauen mit und ohne Aborte. Die infolge dieses Polymorphismus möglicherweise unterschiedlichen Aktivitäten des FXIII spielen also für die plazentare Implantation oder Perfusion keine Rolle.

4.2. Fibrinolytische Faktoren

Die Fibrinolyse steht normalerweise im Gleichgewicht mit der plasmatischen Gerinnung. Es gibt vielfältige wechselseitige Beeinflussungsmöglichkeiten. Die zentrale Reaktion des Fibrinolysesystems ist der proteolytische Abbau von Fibrin durch Plasmin zu Fibrinspaltprodukten. Der Gewebe-Plasminogen-Aktivator wird im Gefäßendothel vor allem des venösen Gefäßsystems synthetisiert, gespeichert und auf adäquaten Reiz freigesetzt. Physiologischerweise ist die Konzentration von tPA-Antigen im Plasma niedrig, wobei mehr als 95 % durch Bindung an den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) funktionell inaktiviert sind (Rath und Heilmann 1999).

Eine unzureichende Fibrinolyse scheint deshalb eine Rolle bei der Entstehung von arteriellen und venösen Thrombosen zu spielen. Bei Patienten mit einer tiefen Beinvenenthrombose, die eine eingeschränkte fibrinolytische Kapazität aufweisen, findet man hauptsächlich eine erhöhte Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1)-Konzentration. PAI-1 hat die Aufgabe, eine systemische Fibrinolyse zu verhindern und lokale Gerinnselauflösungen ohne systemische Blutungskomplikationen zuzulassen. Daher ist PAI-1 der wichtigste Regulationsfaktor in der Fibrinolyse. Äußere Einflüsse zeigen ebenso wie genetische Faktoren Auswirkungen auf die PAI-1-Synthese. Glukokortikoide, Zytokine, Lipopolysaccharide und Insulin beeinflussen die PAI-1-Synthese bereits auf der Ebene der Transkription. Eine physiologisch

regulierende Funktion auf die PAI-1-Konzentration hat das "Angiotensin-Converting"-Enzym.

4.2.1. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)

Die Hypofibrinolyse scheint ein unabhängiger Risikofaktor für Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, intrauterine Wachstumsretardierung, Plazentalösung oder Totgeburt zu sein, die am ehesten durch Mikrothrombosierung und nachfolgende Plazentainsuffizienz ausgelöst werden (Glueck et al. 2000). Eine Studie von Yamada et al. (2000) fand in diesem Zusammenhang eine signifikant höhere Prävalenz des 4G-Allels des 4G/5G-Deletions-/Insertions-Polymorphismus in der Promotor-Region des PAI-1-Gens bei diesen Patientinnen. PAI-1 als hauptsächlicher Inhibitor der Fibrinolyse in der plasminabhängigen Proteolyse verursacht aber möglicherweise habituelle Aborte durch Fibrinablagerungen in der frühen plazentaren Zirkulation oder durch Limitierung der Trophoblastentwicklung oder durch beides (Gris et al. 1993 und 1997).

Betrachtet man unsere eigenen Daten, tritt der 4G/4G-Polymorphismus, wie schon erwartet, tendenziell häufiger bei den RSA-Patientinnen (39,1 %) als bei den Kontrollen (31,7 %) auf ($p=0,23$). Die 4G-Allelfrequenz ist mit 59,8 % in der RSA-Gruppe höher. Anscheinend führt der 4G/4G-Genotyp also auch bei unseren RSA-Patientinnen zu verstärkter PAI-1-Aktivität. Daraus resultiert eine erhöhte Thromboseneigung, was die Gefahr der plazentaren Minderperfusion und einer Störung der uteroplazentaren Einheit zur Folge hat. Die Unterschiede sind jedoch nicht besonders deutlich ausgeprägt und lassen nur einen moderaten Einfluß auf das Abortgeschehen vermuten.

In unserer Analyse zeigt die Verteilung des 5G/5G-Genotyps eine nahezu gleiche Verteilung in beiden Kollektiven. Mit 19,6 % bei den Frauen mit mehreren Fehlgeburten und 22,2 % bei den Frauen ohne Aborte trat dieser Genotyp insgesamt seltener auf als die beiden anderen Genotypen.

Die Daten früherer Untersuchungen (Rogenhofer) konnten somit bestätigt werden. Trotz erhöhter Fallzahlen ist die grundlegende Tendenz gleichgeblieben. Die

Ergebnisse dieser Studie ergaben ebenfalls ein tendenziell ($p=0,08$) häufigeres Vorkommen des 4G/4G-Polymorphismus bei RSA-Patientinnen als bei Kontrollen (42,2 % vs. 32,2 %). Der 4G/5G-Genotyp war entsprechend mit 35,3 % bei den Patientinnen seltener als mit 45,7 % bei den Vergleichspersonen.

Der PAI-1-4G/5G-Genotyp findet sich also öfter beim gesunden Vergleichskollektiv. Die gegensätzlichen Effekte des thrombophilen 4G-Allels einerseits und des zur Hyperfibrinolyse führenden 5G-Allels andererseits scheinen sich in dieser Genotyp-Konstellation gegenseitig aufzuheben. Es wäre also möglich, dass der 4G/5G-Genotyp sich neutral verhält, die Hämostase nicht beeinflusst und deshalb bei nicht betroffenen Frauen häufiger vorkommt.

4.2.2. "Angiotensin-Converting"-Enzym (ACE)

In mehreren Studien wurde ein Deletions-/Insertions-Polymorphismus in Intron 16 des ACE-Gens als Risikofaktor für thromboembolische Ereignisse sowohl im arteriellen wie im venösen Gefäßsystem beschrieben (Kimura et al. 1998, Paillard et al. 1999, Fatini et al. 2000 und 2003, Gonzalez et al. 2000).

Es scheint ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen diesem ACE-Polymorphismus und dem Schwangerschaftsverlust im ersten Trimenon zu bestehen. Es ist bekannt, dass auch die Eihäute wichtige Produktionsstellen für ACE darstellen. Fatini et al. (2000) haben in einer Arbeit mit 59 Patientinnen, die Fehlgeburten in den ersten 12 Wochen hatten, zwei Polymorphismen untersucht, den D/I-Polymorphismus im ACE-Gen und den A1166C-Polymorphismus im AT1R-Gen. Der ACE-D/D-Genotyp war neben dem AT1R-C/C-Genotyp der am häufigsten bei Patientinnen mit Aborten vorliegende Genotyp, der als möglicher prädisponierender Faktor sowohl unabhängig als auch additiv wirkte (Fatini et al. 2000). Ebenfalls ein Zusammenhang wurde für die ACE-D/D-Variante in Kombination mit anderen Polymorphismen aus dem Renin-Angiotensin-System bei der Präeklampsie beschrieben (Bouba et al. 2003).

Auch in diesem Falle sahen wir die These, dass der ACE-Polymorphismus eine Rolle im Abortgeschehen spielt, bestätigt. Wie schon in anderen Studien publiziert, gab es

auch in unserer Gruppe von RSA-Patientinnen eine annähernd signifikante Häufung ($p=0,12$) des homozygoten ACE-D/D-Genotyps (RSA-Patientinnen 32,4 % vs. 23,8 %). Dies legt die Vermutung nahe, dass dieser Genotyp möglicherweise eine Ursache für Schwangerschaftsverluste sein könnte.

Meine Untersuchungen bezüglich des ACE-Polymorphismus haben in der Gruppe der ungeklärten Aborte dementsprechend auch einen ebenfalls annähernd signifikanten Zusammenhang ($p=0,08$) mit dem ACE-I/D-Genotyp ergeben. Dieser trat bei den Patientinnen mit 45,3 % vs. 55,6 % weniger häufig auf. Hier liegt die Vermutung nahe, es könnte sich bei dem heterozygoten Genotyp um das Vorliegen sich gegenseitig antagonisierender Allele handeln, die die Hämostase im Gleichgewicht halten. Dabei würde das I-Allel über eine gesteigerte Plasminaktivität zu einer Hyperfibrinolyse führen, dem das thrombophile D-Allel entgegensteht.

Auch diese Ergebnisse haben frühere Untersuchungen bestätigt (Rogenhofer). Der homozygote D/D-Genotyp trat bei Frauen mit Aborten häufiger auf als bei den gesunden Müttern (31,7 % vs. 23,6 %, $p=0,11$). Eine umgekehrte Verteilung zeigte die D/I-Heterozygotie mit 46,5 % bei RSA-Patientinnen und 55,9 % im Kontrollkollektiv ($p=0,101$).

4.3. Vasokonstriktorische Genmutationen

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist verbunden mit der Pathogenese des essentiellen Hypertonus, kardiovaskulärer Erkrankungen und einer fortschreitenden Niereninsuffizienz. Angiotensin II, als letzter Regulator der Aktivität, ist beides, starker Vasokonstriktor und potenter Mediator der Zellproliferation, die zur Synthese und Ansammlung von extrazellulärem Matrixprotein führt. Diese Effekte tragen zu fibrotischen Veränderungen in verschiedenen Organsystemen bei.

4.3.1. Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT1R)

Der A1166C-Polymorphismus des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gens steht im Verdacht, Einfluß auf die hämodynamische Funktion zu nehmen. Eine erhöhte Reaktivität der glatten Muskelzellen bei C/C-homozygoten Individuen führt zu einer stärkeren Vasokonstriktion (Amant et al. 1997). Es liegt also nahe, diesen Polymorphismus im Renin-Angiotensin-System auch in Bezug auf ein vorzeitiges Schwangerschaftsende zu untersuchen. Bei Aborten im ersten Trimenon finden Fatini et al. (2000) einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Genotypen ACE-D/D und AT1R-C/C. Als Ursache werden eine pathologische Plazentadurchblutung und Störungen im Gleichgewicht der Hämostase vermutet. Die statistische Auswertung meiner Daten kann diese Beobachtung nicht bestätigen (siehe Kap. 4.4.2.).

Dieser Polymorphismus kann ebenfalls nicht für die ungeklärten Aborte in unserem Patientinnenkollektiv verantwortlich gemacht werden. Bei 179 RSA-Patientinnen und 126 Kontrollpatientinnen ist die Häufigkeit der einzelnen Genotypen nahezu identisch verteilt. Das A-Allel findet sich bei 73,2 % der Frauen mit Aborten und mit einer nahezu gleichen Häufigkeit von 72,6 % bei den Frauen ohne Aborte. Gleiches gilt für das C-Allel des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptors, das mit einer Häufigkeit von 26,8 % vs. 27,4 % vorkommt.

Homozygotie für das C-Allel findet sich mit 5,6 % bei RSA-Patientinnen bzw. 7,1 % beim Kontrollkollektiv insgesamt gesehen relativ selten. Dies legt den Schluß nahe, dass es sich im Lauf der Evolution nicht um einen Vorteil gehandelt hat, Träger dieses Genotyps zu sein.

In früheren Studien wurde die C/C-Homozygotie für einen blutdrucksteigernden Effekt und umgekehrt Homozygotie für die A-Variante für einen blutdrucksenkenden Effekt verantwortlich gemacht (Bonnardeaux et al. 1994, Kainulainen et al. 1999). Dies würde eine Vasodilation bedeuten. Vorstellbar ist außerdem, dass es durch die Erweiterung der Gefäße zu einer Blutstase kommen kann. Es scheint, dass ein ungenügend aufgebauter vaskulärer Tonus einen negativen Einfluß auf den Blutdruck hat. Dieser ist aber für die Versorgung des Feten mit ausreichend Sauerstoff unabdingbar.

Für sich allein genommen, hat der AT1R-A1166C-Polymorphismus also keinen Effekt auf das Schwangerschaftsgeschehen. Betrachtet man aber eine Kombination des AT1R-A1166C-Polymorphismus mit anderen Polymorphismen, läßt sich ein Einfluß auf den Verlauf der Schwangerschaft erkennen. Die Kombinationsverteilungen der einzelnen Polymorphismen werden an späterer Stelle diskutiert (siehe Kap. 4.4.).

4.3.2. Endotheliale Stickoxid-Synthase (eNOS)

Der in dieser Arbeit untersuchte NOS3-4/5-Polymorphismus ist bereits dafür bekannt, dass er die Expression des Genproduktes beeinflusst. Vermutet wird, dass es so zu einer Vasokonstriktion kommt, und er dadurch zu Hypertonus und kardiovaskulären Erkrankungen prädisponiert (Hibi et al. 1998, Wattanapitayakul et al. 2001).

Endotheliale NOS ist in terminal villösen Gefäßen und im Syncytiotrophoblasten von schwangeren Frauen nachweisbar (Rossmanith et al. 1999). Tempfer et al. (2001 und 2004) konnten bei Patientinnen mit rezidivierenden Spontanaborten ein 1,6fach erhöhtes Risiko für einen Abgang nachweisen, falls sie heterozygote Trägerinnen des NOS3-4/5-Polymorphismus waren. Es wurde vermutet, daß der Polymorphismus und die daraus resultierenden niedrigen Stickstoffspiegel zu einer Beeinträchtigung der Placentaperfusion führen (Tempfer 2001, Tempfer 2004).

Die Untersuchung unserer Patientinnen mit zwei oder mehr Aborten konnte die Ergebnisse der Studie von Tempfer et al. (2001) nicht bestätigen. Bezüglich des NOS3-4/5-Polymorphismus konnte ich keinen Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Genotypen feststellen. Der normale Genotyp 5/5 war mit 68,7 % bei den Patientinnen mit Fehlgeburten und mit 65,1 % bei Frauen ohne Aborte zahlenmäßig am häufigsten. Der homozygote Genotyp 4/4 kam dagegen in beiden Kollektiven sehr selten vor. Bei den RSA-Patientinnen waren nur 2,2 % Träger, in der Kontrollgruppe 4,0 %. Auch die Allelfrequenzen waren in beiden Gruppen annähernd gleich (5-Allel: 83,2 % vs. 80,6 %; 4-Allel: 16,8 % vs. 19,4 %).

Eine von Sigusch et al. publizierte Studie (2000) hat 630 Patienten mit koronarer Herzkrankheit auf einen Zusammenhang mit dem NOS3-Polymorphismus

untersucht. Die Autoren kommen zu dem Schluß, dass weder das seltene NOS3-4- Allel noch der NOS3-4/4-Genotyp einen unabhängigen Risikofaktor für diese Erkrankung darstellen. Die statistischen Ergebnisse bezüglich der Verteilung der einzelnen Genotypen sind mit unseren Ergebnissen annähernd vergleichbar.

Es könnte also sein, dass der vasokonstriktorisch wirkende 4/5-Polymorphismus des NOS3-Gens zwar den mütterlichen Blutfluß und Blutdruck beeinflusst, aber auf die Entwicklung einer frühen Schwangerschaft keinen Einfluß hat. Wie wir mittlerweile wissen, ist die plazentare Perfusion weitestgehend unabhängig vom mütterlichen System (Jaffe 2001). Während der Frühschwangerschaft scheint das Eindringen des Trophoblasten in die Spiralarterien einen ausreichenden Plazentarfluß sicherzustellen, der von mütterlichen Organen unabhängig ist. Dies könnte erklären, warum Polymorphismen, die zu Vasospasmus und Minderdurchblutung z.B. in Myokard und Niere führen, der Perfusion am Anfang der Schwangerschaft nicht schaden. Nach der Invasion des Trophoblasten scheinen die Spiralarterien für einen Vasospasmus, der aus einem Mangel an Stickstoffmonoxid entsteht, nicht mehr anfällig zu sein.

4.4. Kombination mehrerer Genpolymorphismen

4.4.1. Die Kombination des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus mit dem ACE-I/D-Polymorphismus

Die beiden Polymorphismen greifen zwar an unterschiedlichen Punkten in der Fibrinolyse an, beeinflussen aber letztendlich beide synergistisch die Plasminaktivität. Liegt beim ACE-Polymorphismus das D-Allel vor, führt dieses zu einem erhöhten ACE-Plasmaspiegel. Dieser führt indirekt über Angiotensin II zu einer verstärkten PAI-1-Aktivität (Margaglione et al. 1997, Ferrer-Antunes 1998). Es gibt Studien, die den ACE-Polymorphismus als Regulator der PAI-1-Plasmakonzentration bezeichnen (Matsubara et al. 2000). Daraus resultiert eine reduzierte Plasminaktivität, die wiederum zu einem erhöhten Thromboserisiko führt. Gleiches gilt für den 4G/4G-Genotyp des PAI-1-Polymorphismus (Kimura et al. 1998).

Unsere Analysen bestätigen den synergistischen Effekt dieser beiden Varianten. Die thrombophile Wirkung des 4G/4G-Genotyps in Kombination mit dem D/D-Genotyp führte in unserem Patientenkollektiv im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu einem signifikant erhöhten Abortrisiko (13,6 % vs. 4,7 %, $p=0,007$). Diese Kombination wurde bereits untersucht und mit weniger Patientinnen publiziert (Buchholz et al. 2003). Die hochsignifikanten Ergebnisse dieser Studie konnte ich allerdings in meinem erweiterten Kollektiv nicht bestätigen. Im Kollektiv der 101 Patientinnen mit wiederkehrenden Aborten und 127 gesunden Müttern war bei 17,8 % der Patientinnen die Kombination ACE-D/D plus PAI-1-4G/4G gefunden worden ($p=0,001$).

Polymorphismen, die die fibrinolytische Aktivität beeinflussen, scheinen mit einem erhöhten Risiko für rezidivierende Spontanaborte vergesellschaftet zu sein. Der ACE- und der PAI-1-Polymorphismus sollten deshalb ins Programm der Untersuchungen bei ungeklärten Aborten mit aufgenommen werden. Unsere Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass die Feinabstimmung der Fibrinolyse für die erfolgreiche Etablierung einer Schwangerschaft essentiell ist.

Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass andere Polymorphismen, die das Renin-Angiotensin-System mit beeinflussen, wie zum Beispiel der Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT1R)-A1166C-Polymorphismus und der NOS3-4/5-Polymorphismus, zusammen mit den hypofibrinolytisch wirkenden Genotypen PAI-1-4G/4G und ACE-D/D eine synergistische Wirkung in Bezug auf wiederholte Schwangerschaftsverluste haben.

4.4.2. AT1R in Kombination mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D

Bei der Untersuchung dieser Kombinationsverteilungen habe ich interessante Unterschiede zwischen der Gruppe der Frauen mit und der ohne Fehlgeburten gefunden.

Die Gruppe der Patientinnen mit habituellen Aborten zeigte eine signifikante Häufung des Zusammentreffens der Genotypen AT1R-A/A und PAI-1-4G/4G ($p=0,03$). In einer Studie von Fatini et al. (2000b) wurden die Polymorphismen im AT1R- und

ACE-Gen als mögliche Risikofaktoren für einen Schwangerschaftsverlust untersucht. Sie beobachteten einen synergistischen Effekt für das Auftreten von Fehlgeburten, wenn die Genotypen AT1R-C/C und ACE-D/D zusammentrafen. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse meiner Arbeit, die nicht für die Kombination ACE-D/D und AT1R-C/C, sondern für die Kombination ACE-D/D und AT1R-A/A ein erhöhtes Risiko eines Schwangerschaftsverlustes zeigten. Verglichen mit der Untersuchung von Fatini et al. wies unsere Kontrollgruppe ähnliche Häufigkeiten in Bezug auf den AT1R-Polymorphismus auf. Das Auftreten des homozygoten ACE-D/D-/AT1R-C/C-Genotyps wurde allerdings etwas häufiger beobachtet (Fatini et al 2000b). Die in dieser Studie ebenfalls beschriebene signifikant erhöhte C-Allel-Häufigkeit konnte in unserem Patientinnenkollektiv nicht bestätigt werden. Es ist außerdem darauf hinzuweisen, dass in dieser Studie nur Aborte im 1. Trimester, mehr als drei aufeinander folgende Fehlgeburten und mit 59 Patientinnen eine relativ kleine Gruppe untersucht wurden. Die Mehrheit unserer Patientinnen erlitten die Aborte ebenfalls im 1. Trimenon und hatten durchschnittlich mehr als drei aufeinanderfolgende Schwangerschaftsverluste.

Hochsignifikant war das Ergebnis in unseren Kollektiven für die Kombination AT1R-A/A + PAI-1-4G/4G + ACE-D/D ($p=0,002$). Die zuletzt genannte Kombination war nur bei wenigen RSA-Patientinnen ($n=11$) zu finden und bei keiner Frau aus der Kontrollgruppe. Das legt den Schluß nahe, dass es sich hier um eine Mikrovaskularisationsstörung handelt, die bei der Fortpflanzung Probleme bereitet. Deshalb müssen diese Genotypen als wichtige Risikokombination für das Auftreten von Fehlgeburten betrachtet werden. Da die Polymorphismen einzeln ein vergleichsweise mildes bzw. gar kein Thromboserisiko verursachen, ist der genaue pathophysiologische Zusammenhang noch unklar.

4.4.3. NOS3 in Kombination mit PAI1-4G/4G und ACE-D/D

Das Zusammenwirken des NOS3-4/5-Polymorphismus mit den Genotypen PAI-1-4G/4G und ACE-D/D wurde bisher noch nicht untersucht. Ich habe bei meiner Literaturrecherche jedenfalls keine Veröffentlichungen gefunden, die diese Kombination zum Thema hatten, weder in Bezug auf das Herz-Kreislauf-System

noch in Bezug auf mögliche Schwangerschaftskomplikationen. Er erschien aber deshalb interessant, weil Stickstoffmonoxid auf den Gefäßtonus wirkt und somit mögliche Effekte auf den Schwangerschaftsverlauf durch das Zusammenwirken von Vasokonstriktion und Hypofibrinolyse hat.

Die Kombination NOS3-5/5, welche die höchsten Plasmaspiegel an NO produziert und zu nachfolgender Vasodilatation führt, mit den Genotypen PAI-1-4G/4G und ACE-D/D scheint einen entscheidenden Nachteil für die Frauen mit habituellen Aborten zu haben. Bei 19 RSA-Patientinnen (10,6 %) und nur drei der Normalgebärenden (2,4 %) trafen diese Genotypen zusammen, was zu einer hohen statistischen Signifikanz ($p=0,004$) führt. Zwei Thesen sind möglich, die diese Beobachtung erklären könnten. Einerseits kann Stickstoffmonoxid einen direkten Gefäßschaden verursachen. Andererseits kann auch eine Venostase die Folge sein, die bei Hypofibrinolyse in einer Thrombose der Kapillargefäße resultiert. So wie eine verminderte NO-Freisetzung zu schwangerschaftsinduzierter Hypertension führt, wäre eine vermehrte Freisetzung von Stickstoffmonoxid als Ursache einer Hypotension mit folgender Minderdurchblutung denkbar.

Nicht ganz so ausgeprägt ist dieser Effekt für die jeweils einzelnen Kombinationen. NOS3-5/5 in Kombination mit PAI-1-4G/4G ist nur annähernd signifikant häufiger bei RSA-Patientinnen ($p=0,06$), während ACE-D/D und NOS3-5/5 in Kombination eindeutig signifikant öfter zu finden ist ($p=0,03$).

Weiter fällt auf, dass der Genotyp NOS3-4/4 bei den RSA-Patientinnen gar nicht und im Kontrollkollektiv extrem selten ($n=1$) auftritt. Die Kombination NOS3-4/4 mit PAI-1-4G/4G und ACE-D/D findet sich bei keiner der untersuchten Frauen. Für das NOS3-4-Allel ist eine starke Reduktion des Stickstoffmonoxids nachgewiesen worden (Tsukada et al. 1998). Tritt der homozygote Genotyp auf, könnte das letal enden bzw. einen eindeutigen Selektionsnachteil bedeuten.

Insgesamt scheinen die kombinatorischen Effekte in der Frühschwangerschaft durchaus eine Rolle zu spielen. Weitere Studien mit höheren Fallzahlen sind jedoch nötig, um diese Aussagen zu bestätigen.

Faktor	Genort	Allel Ver- änderung	Effekt	Hämostaseologischer Effekt	Risiko	Effekt in der Schwangerschaft
Prokoagulatorische Faktoren						
F V	1q23	FV G1691A	veränderte Proteinstruktur führt zur APC-Resistenz	verlängerte prokoagulatorische Wirkung des Faktor Va	Thrombose	Risiko einer intrauterinen Wachstumsretardierung oder Totgeburt; fragliches Risiko für Fehlgeburten oder Präeklampsie
Prothrombin F II	11q11- q12	G21210A	Hyperprothrombinämie	verstärkte Thrombin- Aktivität	Thrombose	Risiko für frühe und späte Fehlgeburten und Präeklampsie
F XIII Untereinheit A	6p25-24	Val34Leu	beeinträchtigte Proteinfunktion	reduzierte Fibrinstabilität	beeinträchtigt Gerinnungsverhalten (einschließlich verstärkte Blutung und Thrombose)	Risiko für Fehlgeburten fraglich erhöhtes Risiko für Plazentalösung

Antikoagulatorische Faktoren						
PAI-1	7q21-22	4G/5G	Mangel	verstärkte Fibrinolyse	verstärkte Blutung	Risiko für Totgeburt und Präeklampsie
			verstärkte Expression	reduzierte Fibrinolyse	Thrombose	fragliche Hinweise für frühe Fehlgeburten
ACE	17q23	D/I	verstärkte Expression	reduzierte Fibrinolyse	Thrombose	Risiko für Fehlgeburten
Vasokonstriktorische Faktoren						
AT1R	3q21-q25	A1166C	verstärkte Expression	Gefäßspasmus	Thrombose	fragliche Hinweise für frühe Fehlgeburten
eNOS	7q36	4/5	Reduktion der basalen NO-Freisetzung	Gefäßspasmus	Thrombose	fragliche Hinweise für frühe Fehlgeburten

Tabelle 23: Zusammenfassung der genetischen Faktoren, welche die Hämostase und die Fibrinolyse beeinflussen (modifiziert nach Buchholz und Thaler 2003)

5. Zusammenfassung

Eine Fehlgeburt ist ein recht häufiges Ereignis. Man schätzt, dass 11-15 % aller Schwangerschaften vorzeitig enden. Von habituellen Aborten als abklärungsbedürftiger Erkrankung spricht man nach mehreren Fehlgeburten in ununterbrochener Reihenfolge. Allerdings steigt die Wahrscheinlichkeit eines weiteren Aborts auch schon nach ein oder zwei Aborten deutlich an. Die möglichen Ursachen wurden in der Einleitung eingehend erläutert.

Im Rahmen einer hereditären Thrombophilie haben prokoagulatorische Veränderungen einen prothrombotischen Einfluß auf die uteroplazentare Zirkulation. Das Auftreten von Mikrothromben im intervillösen Raum und Blutungskomplikationen im Rahmen von Frühaborten ließen den Zusammenhang mit Störungen der Gerinnung oder Fibrinolyse vermuten. Eine gestörte Perfusion der Plazenta mit darausfolgender Minderperfusion und Hypoxie könnte deshalb möglicherweise auch für die Entstehung rezidivierender Spontanaborte verantwortlich sein (Eldor 2001). Maternale angeborene oder erworbene thrombophile Faktoren sind prädisponierend für Probleme in der Schwangerschaft und könnten deshalb ein erhebliches Risiko für den Feten bedeuten (Mousa und Alfirevic 2001). Die Ätiologie thromboembolischer Ereignisse beruht nach aktuellem Verständnis auf dem multifaktoriellen Zusammenwirken erworbener und angeborener Risikodeterminanten und daraus resultierender Risikokonstellationen (Rosendaal 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden thrombophile Genmutationen bei Patientinnen untersucht, bei denen bislang keine Ursache für die rezidivierenden Aborte festgestellt werden konnte. Ausgewählt wurden Polymorphismen, die bis jetzt nur für Thrombosen, Hypertonus, zerebrale Insulte und ähnliches verantwortlich gemacht worden waren. Die Kombinationen der einzelnen Polymorphismen wurden ebenfalls analysiert. Unser Bestreben war es herauszufinden, ob Polymorphismen, die für thromboembolische Ereignisse im Gefäßsystem verantwortlich sind, auch die Ursache für wiederkehrende Aborte sein können. Dazu wurden 179 RSA-Patientinnen und 126 Mütter ohne Aborte untersucht und die Genotyp-Häufigkeiten der jeweiligen Polymorphismen in den zwei Kollektiven miteinander verglichen.

Die Rolle des Faktor XIII-Val₃₄→Leu-Polymorphismus bei der Entstehung kardio- und zerebrovaskulärer Erkrankungen wird noch nicht besonders lange untersucht. Beschriebene Auswirkungen sind sowohl ein erhöhtes Risiko für Thrombosen (G/G bzw. Val/Val) (Catto et al. 1999) als auch eine verstärkte Blutungsneigung (T/T bzw. Leu/Leu) (Gemmati et al. 2001). Eine ausführliche Studie von Anwar et al. (1999) konnte diese Beobachtungen nicht bestätigen. In dieser Untersuchung ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Plasmakonzentration oder Enzymaktivität erkennen. Erklärt wurde dies mit den ausgeprägten lokalen Schwankungen bei der Thrombusentstehung und Thrombusentfernung. Betrachtet man die statistische Auswertung unserer ermittelten Genotyp-Häufigkeiten, so läßt sich ebenfalls kein Unterschied zwischen der Gruppe der RSA-Patientinnen und dem Kontrollkollektiv erkennen. Dies läßt den Schluß zu, dass die möglicherweise unterschiedlichen Aktivitäten des Faktor XIII auf Grund des Val₃₄→Leu-Polymorphismus keine fatalen Auswirkungen auf die Implantation oder Mikrozirkulation in der Frühschwangerschaft zu haben scheinen.

Im Renin-Angiotensin-System habe ich den A1166C-Polymorphismus des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptors untersucht, da von den fünf Polymorphismen des AT1R-Gens nur dieser mit einem Hypertonus assoziiert war (Bonnadeaux et al. 1994, Kainulainen et al. 1999). Bei Individuen mit homozygotem C-Allel konnte eine stärkere Vasokonstriktion und damit ein Zusammenhang mit der hämodynamischen Funktion nachgewiesen werden. Daraus folgend wurde auf eine erhöhte Reaktivität der glatten Muskelzellen bei C/C-Homozygoten geschlossen (Amant et al. 1997). In den von uns untersuchten Kollektiven waren die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen jedoch nahezu identisch. Ein Einfluß des AT1R-Polymorphismus auf die Gravidität ist deshalb möglicherweise lediglich in Interaktion mit anderen Gen-Polymorphismen relevant (siehe unten). Für sich allein genommen läßt er jedenfalls keinen Einfluß auf die Schwangerschaftsentwicklung erkennen. Dies stimmt mit dem Konzept einer unabhängigen Regulation der Vasokonstriktion beim Embryo überein.

Stickstoffmonoxid spielt ebenfalls eine zentrale Rolle in vielen biologischen Systemen. Die Regulation übernimmt die endotheliale Stickoxid-Synthase (eNOS). Vielfach beschrieben ist ein Zusammenhang zwischen dem NOS3-4/5-Polymorphismus und Gefäßerkrankungen. Mehrere Studien schlossen Krankheiten

wie arteriellen Bluthochdruck, koronare Herzerkrankung und Myokardinfarkt, Koronararterienspasmus, Erkrankungen der hirnersorgenden Gefäße, verschiedene Formen von Nierenerkrankungen und tiefe Beinvenenthrombosen als klinische Endpunkte ein (Wang und Wang 2000). eNOS ist in terminal villösen Gefäßen und im Syncytiotrophoblasten von schwangeren Frauen nachweisbar (Rossmanith et al. 1999). Tempfer et al. (2001) stellten die These auf, dass bei heterozygoten Trägerinnen des NOS3-Polymorphismus ein niedrigerer Stickstoffspiegel nachweisbar ist und deshalb die Plazentaperfusion vermindert sein könnte. In unserer Studie traten der heterozygote Trägerstatus wie auch die beiden homozygoten Genotypen bei Frauen mit und ohne Aborte gleich häufig auf. Dieser Polymorphismus stellt für sich alleine also ebenfalls keinen relevanten Risikofaktor für wiederholte Schwangerschaftsverluste dar.

Im Gegensatz dazu konnte ich in meiner Arbeit zeigen, dass die Kombination bestimmter Genotypen mit einem deutlich erhöhten Risiko von Spontanaborten assoziiert ist.

Die Fibrinolyse wird hauptsächlich von PAI-1 reguliert, welches wiederum von ACE stimuliert wird. Hypofibrinolyse aufgrund von erhöhten PAI-1-Spiegeln führt zur Thrombose von Kapillargefäßen und zur Hemmung der plazentaren Perfusion (Glück et al. 2001). Aufgrund dieser Tatsachen hat uns das Zusammenwirken der hypofibrinolytischen Genotypen PAI-1-4G/4G und ACE-D/D mit Polymorphismen des AT1R- und NOS3-Gens in Bezug auf wiederholte Schwangerschaftsverluste interessiert.

Betrachtet man die Kombination von AT1R-A/A und PAI-1-4G/4G, läßt sich ein synergistischer Effekt erkennen. Das A-Allel als eigentliche Normalvariante scheint von Nachteil für die Entwicklung einer Schwangerschaft zu sein, wenn sie in Kombination mit erhöhten PAI-1-Spiegeln auftritt. Der von Fatini et al. für Aborte im ersten Trimester verantwortlich gemachte Zusammenhang zwischen den Genotypen AT1R-C/C und ACE-D/D konnte durch unsere statistische Analyse dagegen nicht bestätigt werden (Fatini et al. 2000). Die Kombination AT1R-A/A plus PAI-1-4G/4G plus ACE-D/D trat bei den RSA-Patientinnen ebenfalls hochsignifikant häufiger auf ($p=0,002$), war aber insgesamt nur bei wenigen RSA-Patientinnen und bei keiner

Frau aus der Kontrollgruppe zu finden. Das legt den Schluß nahe, dass es sich hier um eine Mikrovaskularisationsstörung handelt, die bei der Fortpflanzung Probleme bereitet. Deshalb muss diese Veränderung als Risikokombination für das Auftreten von Fehlgeburten betrachtet werden. Da die Mutationen einzeln ein vergleichsweise mildes bzw. gar kein Thromboserisiko verursachen, ist der genaue pathophysiologische Zusammenhang noch unklar.

Stickstoffmonoxid wirkt ebenfalls auf den Gefäßtonus. Kombiniert man den Genotyp 5/5 des NOS3-Polymorphismus, welcher mit den höchsten Plasmaspiegeln an Stickstoffmonoxid assoziiert ist, die in der Folge zu einer Vasodilatation führen, mit den Genotypen PAI-1-4G/4G und ACE-D/D, scheint dies einen entscheidenden Nachteil für die Frauen mit habituellen Aborten zu haben. Zwei Gründe sind denkbar, die diese Beobachtung erklären könnten. Einerseits kann Stickstoffmonoxid einen direkten Gefäßschaden verursachen. Andererseits kann NO zu einer Venostase führen, die die bei der Patientin vorliegende prothrombotisch-hypofibrinolytische Konstellation zusätzlich verstärkt. Auch die Kombination PAI-1-4G/4G bzw. ACE-D/D mit NOS3-5/5 ist ein RSA-Risikofaktor, aber ein nicht annähernd so signifikanter.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die kombinatorischen Effekte unterschiedlicher Gen-Polymorphismen in der Frühschwangerschaft durchaus eine Rolle zu spielen scheinen. Allerdings müssen die Ergebnisse an größeren Kollektiven überprüft und die pathophysiologisch wirksamen Mechanismen noch genauer untersucht werden.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACL	Anti-Cardiolipin
ACE	"Angiotensin-Converting"-Enzym
AK	Antikörper
AMA	antimitochondriale Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
APS	Antiphospholipid-Syndrom
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT III	Antithrombin III
AT1R	Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
D	Deletion
d.h.	das heißt
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
NOS3	endotheliale Stickoxid-Synthase
F II	Gerinnungsfaktor II
F V	Gerinnungsfaktor V
F Va	aktivierter Gerinnungsfaktor Va
F VII	Gerinnungsfaktor VII
F VIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VIIa
F VIII	Gerinnungsfaktor VIII
F VIIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VIIIa
F X	Gerinnungsfaktor X
F Xa	aktivierter Gerinnungsfaktor Xa
F XII	Gerinnungsfaktor XII
F XIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor XIIa
F XIII	Gerinnungsfaktor XIII
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
FVL	Faktor V-Leiden (Mutation im Gerinnungsfaktor V)
g	Gramm
G	Guanin
HCG	"human chorionic gonadotropine"
HCl	Salzsäure
I	Insertion
IgG	Immunglobuline vom Typ G
IgM	Immunglobuline vom Typ M
IU	internationale Units
IUFT	intrauteriner Fruchttod

Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kd	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
Leu	Leucin
LH	lutinisierendes Hormon
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	molar
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	"messenger" (Boten)-RNA
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickoxidsynthase
p	Signifikanzniveau

PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PC	Protein C
PCR	"polymerase chain reaction"
PFO	polyfollikuläres Ovar
pmol	Pikomol
PS	Protein S
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RR	relatives Risiko
RSA	rezidivierende Spontanaborte
sec.	Sekunden
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SPSS	Statistik-Paket für "Social Sciences"
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAK	Thyreoglobulin-Antikörper
Taq	Thermus aquaticus
TBG	Thyroxin-bindendes Hormon
Temp.	Temperatur
t-PA	"tissue-type plasminogen activator"
TRH	"Thyreotropin-releasing"-Hormon
TSH	Thyreoid-stimulierendes Hormon
UV	Ultraviolett

Val	Valin
vs.	versus
WHO	"World Health Organisation"
z.B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

- **Adamek L, Jankowski M, Sanak M, Grzanka P, Nizankowska E, Szczeklik A 1999.** Coincidence of 20210A prothrombin variant and factor V Leiden predisposing to venous thromboembolism. *Pol Arch Med Wewn* 102:1095-1099
- **Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, Coto E 1998.** Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease. *Cardiovasc Res* 40:375-379
- **Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Escudero X, Lablanche JM, Amouyel P, Bertrand ME 1997.** The angiotensin II typ 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 29:486-490
- **Anwar R, Gallivan L, Edmonds SD, Markham AF 1999.** Genotype/phenotype correlation for coagulation factor XIII: specific normal polymorphisms are associated with high or low factor XIII specific activity. *Blood* 93:897-905
- **Anwar R, Stewart AD, Miloszewski KJ, Losowsky MS 1995.** Molecular basis of inherited factor XIII deficiency: identification of multiple mutations provides insights into protein function. *Brit J Haematol* 91:728-735
- **Arias F, Romero R, Joist H, Kraus FT 1998.** Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta. *J Matern Fetal Med* 7:277-286
- **Balogh I, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, Haramura G, Pfliegler G, Mikkola H, Muszbek L 2000.** Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 96:2479-2486
- **Beckmann MW, Dall P, Fasching PA, Krüssel JS, Niederacher D, Tutschek B 2002.** *Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde.* Steinkopf Darmstadt

-
- **Bertina RM, Koeleman PC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Felden PA, Reitsma PH 1994.** Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369:64-66
 - **Blumfeld Z, Brenner B 1999.** Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril* 72: 765-774
 - **Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Chambien F, Corvol P, Soubrier F 1994.** Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 24:63-69
 - **Bouba I, Makrydimas G, Kalaitzidis R, Lolis DE, Siamopoulos KC, Georgioupuolos I 2003.** Interaction between the polymorphisms of the renin-angiotensin system in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110:8-11
 - **Brenner B, Mandel H, Lanir N, Younis J, Rotbart H, Ohel G, Blumfeld Z 1997.** Activated protein C resistance can be associated with recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 97:551-554
 - **Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumfeld Z, Lanir N 1999.** Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* 82:6-9
 - **Buchholz T, Lohse P, Kosian E, Thaler CJ 2004.** Vasoconstrictively acting AT1R A1166C and NOS3 4/5 polymorphisms in recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 51:323-328
 - **Buchholz T, Lohse P, Rogenhofer N, Kosian E, Pihusch R, Thaler CJ 2003.** Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 18:2473-2477
 - **Buchholz T, Thaler CJ 2003.** Inherited thrombophilia: Impact on human reproduction. *Am J Reprod Immunol* 50:20-32
 - **Butenas S, van't Veer C, Mann KG 1999.** "Normal" thrombin generation. *Blood* 94:2169-2178

-
- **Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovo R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C 1988.** Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. *Am J Hum Genet* 43:774-780
 - **Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP 1996.** Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:44-50
 - **Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ 1999.** Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 93:906-908
 - **Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans P 1989.** Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165:196-203
 - **Christopherson KS, Bredt DS 1997.** Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *J Clin Invest* 100:2424-2429
 - **Chrobak L, Dulicek P 1998.** Thrombophilic states. *Vnitr Lek* 44:481-486
 - **Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ 1993.** Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1004-1008
 - **Dufner GS, Marbet GA 2002.** Der Faktor XIII des Menschen: eine Übersicht. *Haemost* 22:1-7
 - **Duncan JA, Scholey JW, Miller JA 2001.** Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in humans: physiology of the genotypes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001 10:111-116
 - **Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chedru F, Cambien F, Amarenco P 2000.** The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood* 95:586-591

-
- **Eldor A 2001.** Thrombophilia, thrombosis and pregnancy. *Thromb Haemost* 86:104-111
 - **Fatini C, Abbate R, Pepe G, Battaglini B, Gensini F, Ruggiano G, Gensini GF, Guazzelli R 2000a.** Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile. The role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor and angiotensinogen gene polymorphisms. *Eur Heart J* 2000 21:633-638
 - **Fatini C, Gensini F, Battaglini B, Prisco D, Cellai AP, Fedi S, Marcucci R, Brunelli T, Mello G, Paretto E, Pepe G, Abbate R 2000b.** Angiotensin-converting enzyme DD genotype, angiotensin typ 1 receptor CC genotype, and hyperhomocysteinemia increase first-trimester fetal-loss susceptibility. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000 11:657-662
 - **Fatini C, Gensini F, Sticchi E, Battaglini B, Prisco D, Fedi S, Brunelli T, Marcucci R, Conti AA, Gensini GF, Abbate R 2003.** ACE DD genotype: an independent predisposition factor to venous thromboembolism. *Eur J Clin Invest* 33:642-647
 - **Feige A, Rempen A, Würfel W, Jawny J, Caffier H 2001.** *Frauenheilkunde*. Urban&Fischer
 - **Fenton V, Saunders K, Cavill I 1977.** The platelet count in pregnancy. *J Clin Path* 30:20-26
 - **Ferrer-Antunes C 1998.** Polymorphisms of coagulation factor genes – a review. *Clin Chem Lab Med* 36:897-906
 - **Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY 2002.** Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210 gene mutations in a recurrent miscarriage population. *Am J Hematol* 71:300-305
 - **Francis CW 2002.** Factor XIII polymorphism and venous thromboembolism. *Arch Path Lab Med* 126:1391-1393
 - **Francis CW 2002.** Plasminogen activator inhibitor-1 levels and polymorphisms. *Arch Path Lab Med* 126:1401-1404

-
- **Franco RF, Pazin-Filho A, Tavella MH, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA 2000.** Factor XIII Val34Leu and the risk of myocardial infarction. *Haematologica* 85:67-71
 - **Franco RF, Reitsma PH, Lourenco D, Maffei FH, Morelli V, Tavella MH, Araujo AG, Piccinato CE, Zago MA 1999.** Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 81:676-679
 - **Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R 1995.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113
 - **Gemmati D, Serino ML, Ongaro A, Tognazzo S, Moratelli S, Resca R, Moretti M, Scapoli GL 2001.** A common mutation in the gene for coagulation factor XIII-A (Val34Leu): a risk factor for primary intracerebral hemorrhage is protective against atherothrombotic diseases. *Am J Hematol* 67:183-188
 - **Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M, Sandmann W, Zotz RB 2000.** Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med* 342:374-380
 - **Glueck CJ, Kupferminc MJ, Fontaine RN, Wang P, Weksler BB, Eldor A 2001.** Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstet Gynecol* 97:44-48
 - **Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, Wang P, Fontain RN, Moore SK, Sieve-Smith L, Tracy T 2000.** The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications. *Metabolism* 49:845-852
 - **Gonzalez Ordonez AJ, Fernandez Carreira JM, Medina Rodriguez JM, Martin Sanchez L, Alvarez Diaz R, Alvarez Martinez MV, Coto Garcia E 2000.** Risk of venous thromboembolism associated with the insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene. *Blood Coagul Fibrinolysis* 11:485-490

-
- **Greer IA 1999.** Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues. *The Lancet* 353:1258-1265
 - **Greer IA 2000.** The challenge of thrombophilia in maternal-fetal medicine. *N Engl J Med* 342:424-425
 - **Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW 1996.** Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:281-306
 - **Gris JC, Neveu S, Mares P, Biron C, Hedon B, Schved JF 1993.** Plasma fibrinolytic activators and their inhibitors in women suffering from early recurrent abortion of unknown etiology. *J Lab Clin Med* 122:606-615
 - **Gris JC, Ripart-Neveu S, Maugard C, Tailland ML, Brun S, Courtieu C, Biron C, Hoffet M, Hedon B, Mares P 1997.** Respective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) Study. *Thromb Haemost* 77:1096-1103
 - **Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S 1998.** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 32:521-526
 - **Jaffe R 2001.** Development of early uteroplacental circulation. *Early pregnancy* 5:34-35
 - **Kainulainen K, Perola M, Terwilliger J, Kaprio J, Koskenvuo M, Syvanen AC, Vartiainen E, Peltonen L, Kontula K 1999.** Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. *Hypertension* 33:844-849
 - **Kierkegaard A 1983.** Incidence and diagnosis of deep vein thrombosis associated with pregnancy. *Acta Obstetr Gynecol Scand* 62:239-243
 - **Kim Dk, Kim JW, Gwon HC, Ryu JC, Huh JE, Choo JA, Choi Y, Rhee CH, Lee WR 1997.** Polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene is associated with

circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3242-3247

- **Kim S, Iwao H 2000.** Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52:11-34
- **Kimura H, Gejyo F, Suzuki S, Mijazaki R, Arakawa M 1998.** Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 genes in diabetes and macroangiopathy. *Kidney Int* 54:1659-1669
- **Kohler HP, Schröder V 2002.** Die Rolle von Faktor XIII bei kardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen. *Hämostaseologie* 22:53-58
- **Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ 1998.** Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 79:8-13
- **Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB 1999.** Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 340:9-13
- **Kupferminc MJ, Fait G, Many A, Gordon D, Eldor A, Lessing JB 2000.** Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations. *Obstet Gynecol* 96:45-49
- **Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR 1999.** Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 71:1048-1053
- **Lane and Grant 2000.** Genetic polymorphisms and venous thrombosis. *Blood* 95:1518-1532
- **Lockshin MD, Druzin ML, Goei S et al. 1985.** Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 313: 152-156

-
- **Lowe GDO 1992.** Blood rheology in pregnancy – physiology and pathology. In Greer IA, Turpie AGG, Forbes CD. 1992. Haemostasis and Thrombosis, Chapman and Hall, London
 - **Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, Vecchione G, Celentano E, Cappucci G, Grilli M, Simone P, Panico S, Mancini M 1994.** Abnormally high circulation levels of tissue plasminogen activator inhibitor-1 in patients with a history of ischemic stroke. *Arterioscler Thromb* 14:1741-1745
 - **Margaglione M, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Giuliani N, Colaizzo D, Celentano E, Panico S, Di Minno G 1997.** Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antigen plasma levels in subjects attending a metabolic ward: relation to polymorphisms of PAI-1 and angiotensin converting enzyme (ACE) genes. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 17:2082-2087
 - **Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT 1993.** Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268:17478-17488
 - **Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM 1998.** High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 338:1793-1797
 - **Matsubara Y, Hayakawa T, Tsuda T, Takeshita E, Watanabe G, Murata M, Watanabe K, Ikeda Y 2000.** Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with plasma antigen levels of plasminogen activator inhibitor-1 in healthy Japanese population. *Blood Coagul Fibrinolysis* 11:115-120
 - **Meinardi JR, Middeldorp S, de Kam PJ, Koopman MM, van Pampus EC, Hamulyak K, Prins MH, Buller HR, van der Meer J 1999.** Increased risk for fetal loss in carriers of the factor V Leiden mutation. *Ann Intern Med* 130:736-739
 - **Miller JA, Thai K, Scholey JW 1999.** Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts response to losartan and angiotensin II. *Kidney Int* 56:2173-2180

-
- **Mousa HA, Alfircvic Z 2001.** Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Croat Med J* 42:135-145
 - **Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE 1991.** Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351:233-236
 - **National Institutes of Health Consensus Development Conference 1986.** Prevention of venous thrombosis and pulmonary embolism. *JAMA* 256:744-749
 - **Odawara M, Matsunuma A, Yamashita K 1997.** Mistyping frequency of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and an improved method for its avoidance. *Hum Genet* 100:163-166
 - **Orange SJ, Ledingham JM, Lavery R 2000.** Cardiovascular effects of chronic nitric oxide synthase inhibition in genetically hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:488-493
 - **Paillard F, Chansel D, Brand E, Benetos A, Thomas F, Czekalski S, Raymond A, Soubrier F 1999.** Genotype-phenotype relationships for the renin-angiotensin-aldosterone system in a normal population. *Hypertension* 34:423-429
 - **Pauer HU, Neesen J, Schloesser M, Hinney B, Rauskolb R 2000.** Homozygous factor V Leiden mutation in a woman with multiple adverse pregnancy outcomes. *Arch Gynecol Obstet* 264:164-165
 - **Petrovic D, Zorc M, Kanic V, Peterlin B 2001.** Interaction between gene polymorphisms of renin-angiotensin system and metabolic risk factors in premature myocardial infarction. *Angiology* 52:247-252
 - **Pfleiderer A, Breckwoldt M, Martius G 2000.** *Gynäkologie und Geburtshilfe.* Thieme-Verlag
 - **Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Ruebsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, Hiller E, Thaler CJ 2001.** Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* 46:124-131

-
- **Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM 1996.** A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88:3698-3703
 - **Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briet E, Berntorp E, Conard J, Fontcuberta J, Makris M, Mariani G, Noteboom W, Pabinger I, Legnani C, Scharrer I, Schulmann S, van der Meer FJM 1996.** Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 348:913-916
 - **Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO 1995.** Nitric oxid activity in the human coronary circulation: Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 95:1747-1755
 - **Rath W, Heilmann L 1999.** Gerinnungsstörungen in Gynäkologie und Geburtshilfe. Thieme-Verlag
 - **Rath W, Wieding JU, Kuhn W 1991.** Neue Erkenntnisse über hämostaseologische Veränderungen bei Gestose und HELLP-Syndrom für die klinische Praxis. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 51:741-746
 - **Ridker PM, Miletich JP, Buring JE, Ariyo AA, Price DT, Manson JE, Hill JA 1998.** Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *Ann Intern Med* 15:1000-1003
 - **Rosendaal FR 1999.** Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 82:610-619
 - **Rossmannith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, Mc Lean M, Jacobs RA, Grossman AB 1999.** Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod* 5:487-494
 - **Rudic RD, Sessa WC 1999.** Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: Clinical correlates and experimental links. *Am J Hum Genet* 64:673-677

-
- **Salafia CM, Minior VK, Lopez-Zeno JA, Whittington SS, Pezzullo JC, Vintzileos AM 1995.** Relationship between placental histologic features and umbilical cord blood gases in preterm gestations. *Am J Obstet Gynecol* 173:1058-1064
 - **Schirren C, Leidenberger F, Frick-Bruder V, Hirsch GE, Rudolf K, Schütte B 1995.** Unerfüllter Kinderwunsch. Deutscher Ärzteverlag
 - **Seligsohn U, Lubetsky A 2001.** Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 344:1222-1231
 - **Sigusch HH, Surber R, Lehmann MH, Surber S, Weber J, Henke A, Reinhardt D, Hoffmann A, Figulla HR 2000.** Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 60:229-235
 - **Smirnov MD, Safa O, Esmon NL, Esmon CT 1999.** Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. *Blood* 94:3839-3846
 - **Stauber M, Weyerstahl T 2001.** Gynäkologie und Geburtshilfe. Thieme-Verlag
 - **Stirling Y, Woolf L, North WRS, Seghatchian MJ, Meade TW 1984.** Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 52:176-182
 - **Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S 1984.** Etiological factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 148:140-146
 - **Strowitzki T 1996.** Ungewollte Kinderlosigkeit. Fischer
 - **Tempfer C, Unfried G, Zeillinger R, Hefler L, Nagele F, Huber JC 2001.** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 16:1644-1647
 - **Tempfer CB, Jirecek S, Riener EK, Zeisler H, Denschlag D, Hefler L, Husslein PW 2004.** Polymorphisms of thrombophilic and vasoactive genes and severe preeclampsia: a pilot study. *J Soc Gynecol Investig* 11:227-231

-
- **Thögersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G 1998.** High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women. *Circulation* 98:2241-2247
 - **Thomas WG 1999.** Regulation of angiotensin II type 1 (AT1) receptor function. *Regul Pep* 79:9-23
 - **Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Kee F, Ducimetier P 1994.** Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 344:910-913
 - **Treffers PE, Huidekoper BL, Weenink G, Kloosterman G 1983.** Epidemiological observations of thromboembolic disease during pregnancy and in puerperium, in 56.022 women. *Int J Gynaecol Obstet* 21:327-331
 - **Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J 1998.** Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 245:190-193
 - **Vicente V, Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Corral J 1999.** The prothrombin gene variant 20210A in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 84:356-362
 - **von Hugo R, Theiss W, Kuhn W, Graeff H 1984.** Thrombembolische Erkrankungen in der Geburtshilfe. *Gynäkologe* 17:115-123
 - **Wang XL, Wang J 2000.** Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 70:241-245
 - **Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA 2001.** Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 22:361-368

-
- **Yamada N, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Watanabe H, Sohda S, Hamada H, Kubo T, Hamaguchi H 2000.** The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia. *J Hum Genet* 45:138-141
 - **Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Yamada T, Sakuragi N, Fujimoto S 2001.** Recurrent pregnancy loss: etiology of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 27:121-129

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hermann Hepp sehr herzlich, dass ich die vorliegende Arbeit an der Frauenklinik im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. C.J. Thaler danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Tina Buchholz für die stete Förderung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit sowie ihre kontinuierliche, engagierte Betreuung mit wertvollen Hinweisen und Anregungen.

Ebenfalls zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn PD Dr. Peter Lohse und seinen unermüdlichen Mitarbeiterinnen aus dem molekularbiologischen Labor des Institutes für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern. Durch ihre wertvolle Unterstützung und die umfangreichen Hilfestellungen haben sie wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich Frau Nina Rogenhofer für die Überlassung einiger für mich wichtiger Patientendaten.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Mann für ihre stete Unterstützung und ihr Verständnis bedanken.

9. Lebenslauf

Name: Atzenbeck, geb. Kosian

Vorname: Elke

Geburtsdatum: 16.03.1974

Geburtsort: Krumbach/Schwaben

Eltern: Günther Kosian, Studiendirektor
Brigitta Kosian, geb. Zimmermann, Hausfrau

Familienstand: verheiratet mit Dipl.-Ing. Markus Atzenbeck, Konstrukteur

Nationalität: deutsch

Schulbildung

1980 – 1984 Grundschule Weißenhorn

1984 – 1993 Nikolaus-Kopernikus-Gymnasium Weißenhorn

1993 Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung und Berufsausübung

1993 – 1995 Ausbildung zur medizinisch-technischen
Laboratoriumsassistentin am Schulzentrum für nichtärztliche
medizinische Berufe der Universität Ulm

1995 Prüfung und staatliche Anerkennung als MTLA

1995 – 1997 Tätigkeit als MTLA in der Neurochemischen Abteilung der Psychiatrischen Klinik der Universität München

Studium

04/97 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

04/97 – 07/99 wissenschaftliche Untersuchungen in der Neurochemischen Abteilung der Psychiatrischen Klinik der LMU

03/99 Ärztliche Vorprüfung

08/99 Famulatur in der Abteilung Innere Medizin und Tropenmedizin / Missionsärztliche Klinik Würzburg

10/99 Famulatur in der Abteilung Innere Medizin / Krankenhaus München-Bogenhausen

03/00 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02/01 – 03/01 Famulatur in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Großhadern

09/01 – 10/01 Famulatur in der dermatologischen Praxis Dr. Ryckmanns München

09/02 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/02 – 09/03 Praktisches Jahr

1. Tertial: 1. Med. Abteilung / Krankenhaus München-Neuperlach

2. Tertial: Dermatologie und Allergologie / Krankenhaus München-Schwabing

3. Tertial: Allgemein- und Unfallchirurgie / Krankenhaus Dritter
Orden

12/03

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und vorläufige
Approbation als Ärztin

seit 6/04

ÄIP bzw. ab 1.10.04 vollapprobierte Assistenzärztin in der
Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses Agatharied in
Hausham