

A. Ahr<sup>2</sup>  
U. Holtrich<sup>1</sup>  
T. Karn<sup>1</sup>  
A. Reitter<sup>1</sup>  
A. Rody<sup>1</sup>  
M. Kaufmann<sup>1</sup>  
R. Gätje<sup>1</sup>

# Identifikation von Präeklampsiepatientinnen mittels cDNA-Genexpressionsprofilen an humanen Plazentaprobe und Serum – eine Pilotstudie

## *Identification of Preeclampsia by cDNA-gene Expression Profiling in Human Placentas and Serum – A Pilot Study*

### Zusammenfassung

**Fragestellung:** Die Präeklampsie ist die Hauptursache der maternalen Mortalität und ihre Ätiologie ist bisher unbekannt. Die Analyse von veränderten Genexpressionsmustern in Plazenten und mütterlichem Blut im Vergleich zum Kollektiv gesunder Schwangerer kann zu neuen Denkansätzen bezüglich der Entstehung und Pathogenese der Präeklampsie beitragen und gegebenenfalls eine Identifizierung der Risikopatientinnen vor Beginn der charakteristischen Symptomatik ermöglichen. **Material und Methoden:** Untersucht wurde die Expression von 19200 humanen Genen mittels DNA-Chiptechnologie in 7 plazentalen Gewebe- und Blutproben (3 Patientinnen mit Präeklampsie sowie 4 gesunde Schwangere). **Ergebnisse:** Es wurden bei den Präeklampsieproben 200 differenzielle Gene identifiziert, die einen Expressionsunterschied (Über- oder Unterexpression) zu Genen von normalen Plazenten oder Blutproben aufwiesen. Durch dieses Panel an „informativen“ Genen konnten die Präeklampsieproben mittels hierarchischem Clustering eindeutig von Proben gesunder Schwangerer abgetrennt werden. **Schlussfolgerung:** Zusammenfassend ermöglicht die Methode der DNA-Chiptechnologie die Identifikation von Präeklampsiepatientinnen anhand ihrer Genexpressionsmuster sowohl im Plazentagewebe als auch anhand von peripheren Blutproben. Die Analyse der bei Präeklampsiepatientinnen veränderten Genexpressionen kann zu neuen Ansätzen bezüglich Pathogenese und Therapie dieser Erkrankung beitragen.

### Schlüsselwörter

Präeklampsie · Genexpressionsprofile · Array · Identifikation

### Abstract

**Objective:** Preeclampsia is associated with significant maternal and fetal morbidity and mortality. The etiology remains unclear. For the accurate diagnosis and the prevention of preeclampsia it seems to be important to find a diagnostic tool that identifies risk patients before symptoms occur. With a new approach, the cDNA-Array analysis, human placentas and blood from preeclamptic and healthy pregnant women were examined for differentially expressed genes to find typical genes expression profiles. **Material and Methods:** In this pilot study, cDNA array analysis with a 19200 gene array of placenta and blood samples from three preeclamptic patients have been performed to classify this samples based on expression patterns. **Results:** Comparing normal placenta and blood from healthy delivered women (n = 4), a subset of 200 genes repeatedly found to be differentially expressed in preeclampsia. The placenta and blood samples from preeclampsia were accurately grouped by their individual gene expression patterns. **Conclusions:** These results suggest that the use of cDNA array is a tool to identify gene expression patterns in preeclampsia. With this set of differentially expressed genes in conjunction with sample clustering algorithms the identification of preeclampsia in placenta or blood samples is possible.

### Key words

Preeclampsia · gene expression profiling · array · identification · cluster analysis

### Institutsangaben

<sup>1</sup> Universitäts-Frauenklinik Frankfurt, Frankfurt

<sup>2</sup> Gynäkologische Praxis am Ziegelturn, Gelnhausen

### Korrespondenzadresse

Priv. Doz. Dr. med. André Ahr · Gynäkologische Praxis am Ziegelturn · Am Ziegelturn 4 · 63571 Gelnhausen · Tel.: 06051/4434 · Fax: 06051/5266 · E-mail: Ahr@em.uni-frankfurt.de

### Bibliografie

Zentralbl Gynakol 2006; 128: 138–142 © J. A. Barth Verlag in Georg Thieme Verlag KG

DOI 10.1055/s-2006-933377

ISSN 0044-4197

## Einführung

Die Präeklampsie ist verbunden mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität für Mutter und Kind. Nach Beendigung der Schwangerschaft verschwinden die Symptome vollständig. Die Inzidenz der Präeklampsie wird in der Literatur für Primipara mit 3–5% und für Multipara mit 0,5% angegeben. Die Diagnose der Präeklampsie erfolgt klinisch durch eine Hypertonie und eine signifikante Proteinurie ( $\geq 0,3$  g/24 h). Daneben können weitere Symptome, wie z. B. Kopfschmerzen, Oberbauchschmerzen, Sehstörungen, auf eine Präeklampsie hinweisen. Nach der ACOG erfolgt die Einteilung der Präeklampsie in eine leichte – (Blutdruck systolisch  $\geq 140$  mm HG, diastolisch  $\geq 90$  mm HG und Proteinurie  $\geq 0,3$  g/24 h) und schwere Form, die im Extremfall zum Multiorganversagen führen kann (Blutdruckwerte über denen der leichten Form, bzw. laborchemische und klinische Veränderungen, [1]).

Die eigentliche Ursache der Präeklampsie ist bisher ungeklärt. Sicher ist, dass zur Entstehung einer Präeklampsie zwei Voraussetzungen erfüllt sein müssen: 1. Die Anlage einer Plazenta („placental trigger“) und 2. die nachfolgende Reaktion des mütterlichen Organismus mit den klinischen Symptomen der Präeklampsie („maternal response“). Pathophysiologisch kommt es zu einer Störung des uteroplazentaren Kreislaufs mit Schädigung der Spiralarterien in der Plazenta, Thrombosen und nachfolgend zu Plazentarinfarkten, welche dann klinisch zur fetalen Wachstumsretardierung führt. Im mütterlichen Kreislauf kann es bei entsprechender Disposition oder immunologischer Störung zu einem generalisierten Endothelschaden kommen, mit folgender Vasokonstriktion ( $\rightarrow$  Hypertonie), Endotheliose ( $\rightarrow$  Proteinurie), Kapillarleck ( $\rightarrow$  Ödemen) und einer generalisierten Mikroangiopathie ( $\rightarrow$  Organversagen) [18].

Es sind zahlreiche Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie bekannt: z. B. positive Familien- und Eigenanamnese, Mehrlingsschwangerschaft, Antiphospholipidsyndrom, präexistenter Hypertonus, chronische Nierenerkrankung, genetische Thrombophilien [18]. Für die Entstehung einer Präeklampsie scheint eine genetische Disposition zu bestehen, so dass in der Vergangenheit mittels molekularbiologischer Methoden versucht wurde diese Faktoren zu identifizieren [9]. Ob-

wohl einige Autoren ein so genanntes „Präeklampsie-Gen“ auf einzelnen Chromosomen gefunden zu haben meinen, scheint die Pathophysiologie der Präeklampsie doch eher eine komplexe, aus zahlreichen Genveränderungen bedingte Erkrankung zu sein. Mittels neuer molekularbiologischer Methoden ist es nun möglich, tausende Gene gleichzeitig zu untersuchen. Durch diese neue Methode, die DNA-Chip-Technologie, werden Genexpressionsprofile erstellt um Erkrankungen anhand ihrer biologischen Eigenschaften genauer zu charakterisieren und Gruppen von Patienten zu identifizieren, die spezifischer Behandlungsformen bedürfen. So konnten wir z. B. kürzlich mit Hilfe dieser Methodik Kollektive von Hochrisikopatientinnen beim Mammakarzinom im Vergleich zu etablierten Prognosefaktoren identifizieren [4].

In der vorliegenden Arbeit soll Plazentagewebe und peripheres maternales Blut von gesunden und Präeklampsie-Schwangeren mittel cDNA-Array-Technologie verglichen werden. Nach der Identifikation von „informativen Genen“ wird untersucht, ob anhand von charakteristischen Genexpressionsprofilen eine sichere Unterscheidung dieser beiden Kollektive möglich ist.

## Material und Methoden

Alle Patientinnen wurden 2002 an der Universitäts-Frauenklinik Frankfurt behandelt und entbunden (Tab. 1). Die Diagnose der Präeklampsie wurde anhand der ACOG-Beurteilung vorgenommen [1]. Alle 3 Präeklampsiepatientinnen litten an einer schweren Form der Präeklampsie. Die 4 Kontrollpatientinnen wiesen insgesamt einen unauffälligen Schwangerschafts- und Geburtsverlauf auf. Von jeder Patientin wurde peripheres venöses Blut (20 ml) präpartal entnommen und natives Plazentagewebe direkt postpartal bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Entgegen den bisherigen Untersuchungen von Genexpressionsanalysen beim Mammakarzinom werden bei vergleichenden Studien der Präeklampsieveranlagung keine aufgereinigten Zellpopulationen benötigt [3]. Sind durch Bindegewebsbeimengungen verursachte Genexpressionsmuster beim Mammakarzinom (= epithelialer Tumor) als störend zu werten, so sind bei Untersuchungen der Ätiologie der Präeklampsie alle Expressionsreaktionen sowohl von ekto- und endodermalen und mesodermalen Zellen wertvoll.

Tab. 1 Patientencharakteristika: Präeklampsie n = 3 (\*), Kontrolle n = 4

Parität	Alter	SSW	Geburtsgewicht	SS-Verlauf	Notch	IUGR	phNA	APGAR
IGOP*	36*	36*	2 290*	PE*	+	+	7,24*	7/8/10*
IGOP*	32*	32*	1 430*	PE*	+	+	7,34*	7/8/9*
IGOP*	32*	32*	1 275*	PE*	-	+	7,34*	8/9/9*
IIGIP	34	39	3 820	Sektio a. W.	-	-	7,3	9/10/10
IIGOP	32	39	3 420	spontan	-	-	7,23	9/10/10
IIGOP	26	38	3 340	spontan	-	-	7,36	10/10/10
IIGIP	39	39	3 850	BEL, Sektio	-	-	7,28	10/10/10

Abkürzungen: G: Gravidität, P: Parität, SSW: Schwangerschaftswoche, SS-Verlauf: Schwangerschaftsverlauf, Notch: Notching der Aae. uterinae bds. in der 22.–24. SSW, IUGR: Fetale Retardierung <5% Wachstumsperzentile, phNA: arterieller Nabelschnur-pH, APGAR: APGAR-Score, PE: Präeklampsie, Sektio a. W.: Sectio caesarea auf Wunsch, BEL: Beckenendlage

## RNA-Isolation und cDNA-Array-Hybridisierung

Die Gesamt-RNA der untersuchten Plazenta- und Blutproben, sowie dem Referenzgewebe wurde durch die Guanidinium-Isothiocyanat-Methode [3] in Kombination mit Affinitäts-Reinigungsschritten RNeasy, Qiagen, Hilden) isoliert. Bei den verwendeten Arrays handelt es sich um Hu19k2-Mikroarrays von University Health Network (Ontario Cancer Institute, Ontario, Canada). Die Mikroarrays sind mit 19200 doppelt bestückten cDNA's besetzt. Die mehrstufige Methodik der cDNA-Array-Hybridisierung ist unter [www.zfg/kgu.de](http://www.zfg/kgu.de) im Internet eingestellt.

## Gruppenanalyse und Validierung

Für die Gruppenanalyse wurden die Expressionsdaten log-transformiert und für jede Probe zehnmal median-zentriert. Mit Hilfe des Programms CLUSTER [6] wurden die Proben aufgrund dieser Daten mittels Pearson-Korrelation (Average Linkage Clustering) gruppiert. Die berechneten relativen Abstände (1-Korrelationskoeffizient) werden grafisch durch das TREEVIEW-Programm [6] dargestellt. Die Methode der „Class Prediction“ wurde, wie von Golub et al. [8] vorgeschlagen, zur Validierung der Klassenunterscheidungen eingesetzt. Kurzgefasst wird ein PS-Wert („prediction strength“) für die Zuordnung einer Probe zu einer spezifischen Klasse berechnet durch  $PS = (V_{win} - V_{lose}) / (V_{win} + V_{lose})$ , wobei es sich bei V um den Absolutbetrag der Summen aller Wertungen („votes“) für die Klassen (hier willkürlich mit „win“ und „lose“ bezeichnet) handelt. Eine gewichtete Wertung für eine der Klassen wird für jedes Gen durch  $V_i = P_i \times (x_i - (\mu_1 + \mu_2) / 2)$  kalkuliert. Hierbei wird die Korrelationsmaßinheit P für ein Gen g und eine Klasse c definiert durch  $P(g,c) = (\mu_1 + \mu_2) / (\sigma_1 + \sigma_2)$ , wobei  $\mu$  bzw.  $\sigma$  den Mittelwert bzw. die Standardabweichung der beiden Klassen darstellen. Zur Kreuzvalidierung wurden jeweils eine Probe aus einer Klasse entfernt, der P(g,c)-Wert für jedes Gen aufgrund der restlichen Proben der entsprechenden Klasse kalkuliert und anschließend der PS-Wert für die zuvor entfernte Probe berechnet. Dieser Vorgang wird für alle Proben der entsprechenden Klasse wiederholt, um ein Maß für die Streuung der PS-Werte zu erhalten. Zur Abschätzung der statistischen Signifikanz der Klassenabtrennung wurden in 500 Iterationen randomisierte Klassen gebildet, jeweils Kreuzvalidierungen aller Klassenmitglieder durchgeführt und die medianen PS-Werte für jede Iteration bestimmt.

Von jeder Patientin liegt eine schriftliche Einverständniserklärung vor. Die Studie wurde der lokalen Ethikkommission vorgestellt.

## Ergebnisse

Der Schwerpunkt der vorliegenden Pilotstudie wurde auf die molekularbiologische Klassifizierung von Präeklampsiepatientinnen anhand von Profilen differenziell exprimierter Gene gelegt. Ein solcher experimenteller Aufbau der Arbeit setzt sich aus zwei Teilschritten zusammen. 1. Identifikation von „informativen Genen“ durch Massenanalysen von bekannten bzw. noch unbekanntem Genen mittels Array-Analysen (hier mit 19200 Genen). 2. Molekularbiologische Klassifizierung der Proben anhand ihres Expressionsmusters durch hierarchische Gruppenbildung mittels Pearson-Korrelation.

Ad 1.: Wie in den Arbeiten zu Genexpressionsprofilen beim Mammakarzinom gezeigt wurde [2, 4], werden für die Klassifizierung Marker oder „informative Gene“ gesucht, welche einen deutlichen Genexpressionsunterschied (cut-off >5fach) und häufige Veränderungen im Vergleich zu Kontrollproben aufweisen (Präeklampsie vs. Normalschwangerschaft). In der vorliegenden Studie wurden Plazenta und periphere Blutproben von 3 Präeklampsie- und 4 Normal-Schwangeren mittels eines 19200 Gen-cDNA-Chips untersucht. Es konnte ein Panel von 200 differenziell exprimierten Genen identifiziert werden. In Tab. 2 werden beispielhaft die am stärksten über- und unterexprimierten Gene dargestellt. Zum Teil handelt es sich um bereits bekannte und z.T. um noch unbekannte Gene. Bei der Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Studie spielt der Bekanntheitsgrad der einzelnen Gene allerdings keine Rolle. Dies wird erst sekundär bei der Untersuchung der Ätiologie der Präeklampsie und evtl. therapeutischen Ansätzen von Bedeutung.

Ad 2.: In Abb. 1 sind die unterschiedlichen Genexpressionsmuster dargestellt. Die Daten werden in einer Matrix dargestellt: jede Spalte repräsentiert ein Gen und jede Zeile eine Gewebeprobe (Abb. 1 a) bzw. Blutprobe (Abb. 1 b). Der Vergleich Probe/Gen wird dargestellt als Ratio der Abweichung der transkriptionellen Diversität jedes Gens zu der medianen Abweichung der transkriptionellen Abweichung aller Gewebeproben und wird durch das entsprechende Farbfeld der Matrix repräsentiert. Die grünen Quadrate entsprechen transkriptionellen Leveln unterhalb des Median, schwarze Quadrate entsprechen dem transkriptionellen Level gleich dem Median und rote Quadrate zeigen einen transkriptionellen Level oberhalb des Medians an. Die Farbintensität reflektiert die Höhe der Ratio relativ zu dem Median für jeden Vergleich Probe/Gen. Jede Probe besitzt ein individuelles Genexpressionsmuster. Im letzten Schritt dieser Pilotstudie erfolgt nun der Vergleich der einzelnen Proben miteinander und je ähnlicher sich die Genexpressionsmuster gleichen, desto näher erfolgt die Verbindung in der Stammbaumanalyse (Synonym:

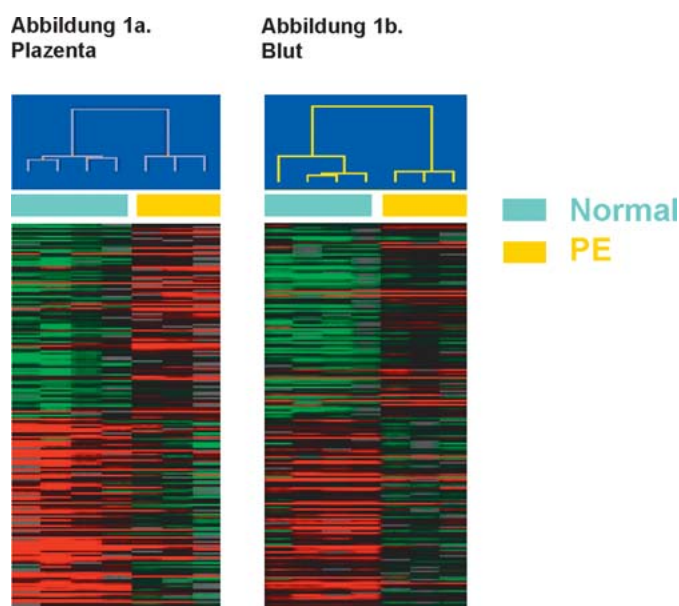


Abb. 1 Klassenbildung von Präeklampsiepatientinnen aufgrund von Genexpressionsprofilen. Variation der Genexpression von 200 differenziell exprimierten Genen bei 3 Präeklampsie-Plazenta- (a) und Blutproben (b); Kontrollkollektiv: n = 4 (+ 1 männliche Blutprobe).

Dendrogramm). In Abb. 1 sind oberhalb der Genexpressionsmuster die Dendrogramme der Plazenta- und Blutproben des Ziel- und Kontrollkollektivs dargestellt. Obwohl es sich um sehr kleine Kollektive handelt, konnten die Präeklampsieproben zuverlässig von den Kontrollproben anhand der Genexpressionsmuster getrennt werden.

## Diskussion

Die Diagnose der Präeklampsie wird anhand von unsicheren klinischen Diagnosen (z.B. Hypertonie und peripheren Ödemen) und international ungenauen Definitionen gestellt. Auch ist es derzeit nicht sicher möglich bei nicht-schwangeren bzw. Frauen in der Frühschwangerschaft ein Präeklampsie-Risikopotenzial darzustellen. Neben den bekannten Risikofaktoren in der Eigen- oder Familienanamnese wurden in den letzten Jahren auch zahlreiche molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Viele dieser Arbeiten beruhen allerdings auf dem Nachweis eines einzelnen Gens oder der Kombination von wenigen Genen. So konnten beispielsweise Page et al. [12] bei Schwangeren mit Hypertonie und Präeklampsie einen starken Anstieg des Proteins NKB (neuropeptide neurokinin B) im synzytiotrophoblastären Anteil der Plazenta nachweisen. Dieses Protein konnte ebenfalls im Plasma in erhöhter Konzentration dieser Patientinnen nachgewiesen werden, so dass die Autoren empfahlen, dieses Protein als Indikator bei Frauen in der Frühschwangerschaft bestimmen zu lassen. Andere Gruppen fokussierten sich auf den Nachweis eines einzelnen rezessiven Gens [7] oder eines einzelnen dominanten Gens mit inkompletter Penetranz [11]. Insgesamt konnten sich diese Hypothesen aber nicht durchsetzen oder wurden widerlegt. Mittlerweile hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass die Entstehung der Präeklampsie ein multifaktorielles Geschehen und genetisches Potenzial voraussetzt [15]. Aufseiten des genetischen Potenzials scheint der mütterliche Genotyp eine wesentlich stärkere Rolle zu spielen als der fetale Genotyp [15]. Durch neue molekularbiologische Untersuchungen ist es möglich Genmassenanalysen durchzuführen und den mütterlichen Genotyp auf frequente Genveränderungen zu untersuchen. Auf diese Weise konnten bei zahlreichen onkologischen Erkrankungen, wie z. B. dem Mammakarzinom oder bei Lymphomen Risikokollektive identifiziert werden [4, 5, 17].

In der vorliegenden Pilotstudie wurden Plazentaprobe von 3 Präeklampsiepatientinnen auf differenziell exprimierte Gene untersucht. Methodisch wurde ein cDNA-Chip eingesetzt, welcher 19200 humane Gene untersucht. 200 Gene zeigten eine frequente Über- oder Unterexpression (Tab. 2). Gene welche eine  $\geq 20\%$ ige Über- oder  $\leq 20\%$ ige Unterexpression im Vergleich zu Plazentaprobe von 4 gesunden, unauffälligen Schwangerschaften aufwiesen wurden als differenzielle oder „informativ“ Gene identifiziert. Mit diesem Panel aus 200 „informativen“ Genen erfolgte anschließend die Gruppierung der Proben. Wie in Abb. 1a ersichtlich, bildeten sich anhand des charakteristischen Genexpressionsprofils zwei Gruppen im Dendrogramm. Nach Entbindung der Proben zeigte sich, dass jeweils die Präeklampsie-, als auch die Kontrollproben richtig gruppiert wurden. Auch wenn es sich um eine Pilotstudie mit kleinen Kollektiven handelt, zeigt sich doch, dass mit einem Panel von „informativen“ Genen zuverlässig Präeklampsie-Genexpressionsprofile identifiziert

Tab. 2 Auflistung der 20 stärksten über- oder unterexprimierten Gene aus dem cDNA-Array-Vergleich der Plazentaprobe (Präeklampsie n = 3 vs. Kontrolle n = 4); 1,00 = semiquantitative Genexpression des entsprechenden Gens der Plazentaprobe bei unauffälliger Schwangerschaft

Überexpression		Unterexpression	
x-fache Abweichung	GenBank #	x-fache Abweichung	GenBank #
4,53	AA046598 IGFBP1	0,20	AA043301 COL4A1
1,59	AA156696 BTG1	0,31	AA151430 unbekannt
1,39	W23776 CGI-25 prot.	0,35	AA136883 HNRPE1
1,38	N41921 unbekannt	0,38	N/A1 unbekannt
1,30	N25099 HLA-DPA1	0,39	W72273 COX7C
1,29	H90824 SEC23A	0,49	R78823 TGASE-H
1,28	W90375 LOC51606	0,51	H03112 SAT
1,26	N40099 INHBA	0,53	H18883 unbekannt
1,26	AA054080 GOS24	0,54	AA136060 unbekannt
1,26	AA011656 RPL27A	0,56	R32571 unbekannt
1,25	AA135735 hypo. prot.	0,60	R76797 USP21
1,25	W95051 unbekannt	0,61	W51940 CLDN1
1,25	AA152292 hypo. prot.	0,62	N330086 GJB2
1,23	N20541 CDH1	0,66	H12714 GATA3
1,23	N69477 COX5B	0,69	H53489 PRP
1,22	AA194047 PRKMK7	0,69	R77022 unbekannt
1,21	AA033685 unbekannt	0,70	R91278 TK1
1,19	AA115092 KIAA1453	0,70	H577 unbekannt
1,18	T98046 PFDN4	0,73	R78997 unbekannt

ziert werden können. Da es sich um Plazentaprobe handelt, d. h. die Patientinnen bereits entbunden waren, stellte sich die Frage, ob man anhand dieser Genexpressionsprofile auch an einfacher erreichbarem Material, wie zum Beispiel peripherem Blut, eine sichere Unterscheidung dieser beiden Kollektive möglich ist. Abb. 1b zeigt die Genexpressionprofile der untersuchten Blutproben beider Kollektive und auch hier ist eine eindeutige Gruppenbildung anhand der differenziellen Genexpressionsmuster möglich. Im Dendrogramm zeigte sich auch bei den Blutproben eine sichere Unterscheidung zwischen Präeklampsie- und Kontrollkollektiv. In weiteren Untersuchungen müssen diese Ergebnisse aber an größeren Kollektiven validiert werden. Insbesondere auch im Hinblick auf eventuelle Genexpressionsmusterunterschiede bedingt durch unterschiedliche Gestationsalter bei Entbindung. In der vorliegenden Studie lag das mittlere Schwangerschaftsalter bei Entbindung in dem Präeklampsiekollektiv bei 33 + 0 SSW, bzw. im Kontrollkollektiv bei 38 + 2 SSW (Tab. 1). Auch ist zu überprüfen, ob es möglich ist, anhand der Genexpressionsmuster Präeklampsie-Risikokollektive in der Frühschwangerschaft, oder sogar noch vor einer Schwangerschaft zu identifizieren. Pang und Xing [14] konnten in ihren Pilotstudien mit Array-Analysen von 3 Präeklampsie- im Vergleich zu 3 gesunden Schwangeren ebenfalls zahlreiche differenziell überexprimierte Gene im Plasma nachweisen. Die Autorengruppe beschränkte sich aber auf den alleinigen Nachweis von überexprimierten Genen. Wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, finden sich im Vergleich Präeklampsie zu Normalschwangerschaft auch Genexpressionsverluste. Diese scheinen in der Pathophysiologie auch eine wichtige Rolle zu spielen.

Wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, spielt in der vorliegenden Pilotstudie zur Gruppierung von Kollektiven die Kenntnis der differenziell exprimierten Gene keine primäre Rolle. Es geht

bei der Massengenanalyse um die Detektion eines zuverlässigen Genexpressionsmusters, um Proben zu trennen. Erst in sekundären Untersuchungen wird dann die Bedeutung der einzelnen Gene und Abklärung über mögliche pathophysiologische Zusammenhänge oder therapeutische Ansätze wichtig. Zur Validierung der Detektion von „informativen“ Genen sollte allerdings ein Vergleich der Array-Ergebnisse mit einer zweiten unabhängigen Methode, hier Real-Time-RT-PCR und auch den Publikationen anderer Arbeitsgruppen erfolgen. In vorherigen Studien konnten wir die semiquantitativen Ergebnisse der cDNA-Arrays in der nachfolgenden RT-PCR-Analyse an einem Set von „informativen“ Genen bestätigen [3]. In Tab. 2 sind beispielhaft die am stärksten differenziell exprimierten „informativen“ Gene dargestellt. Einige dieser Gene konnten auch in anderen Studien nachgewiesen werden. Ebenso wie in der vorliegenden Studie konnte von Ingec et al. [10] IGFBP-1 in erhöhter Konzentration im Plasma von Präeklampsiepatientinnen nachgewiesen werden. Pang und Xing [14] konnten in einer nachfolgenden DNA-Mikroarray-Studie (siehe auch [13]) ebenso wie in der vorliegenden Studie eine Über- und Unterexpression von zytokin-assoziierten Genen bei präeklampsischen Schwangeren identifizieren. Aber zahlreiche der gefundenen differenziell exprimierten Gene sind zzt. noch unbekannt. In der Studie von Tsoi et al. [16] wurden bei der Untersuchung von Präeklampsie-Plazenten mit einem 4131-Gen-cDNA-Chip, 319 differenziell exprimierte Gene gefunden. Dies entspricht einem Anteil von ca. 8%. In der vorliegenden Studie lag der Anteil von differenziell exprimierten Genen bei einem cut-off von  $\geq$  oder  $\leq$  20%-igen Genexpressionsdifferenz bei 2%. Es zeigte sich bereits in den Array-Analysen zum Mammakarzinom, das es sinnvoller war, den cut-off höher zu definieren, um mögliche methodische Fehlmessungen und Fehlinterpretationen bei den „informativen“ Genen zu vermeiden [3]. Andererseits besteht aber auch die Gefahr bei zu hoch festgelegtem Grenzwert Informationen zu verlieren.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Pilotstudie durch eine Genmassenanalyse (cDNA-Array mit 19 200 Genen), ein Set von differenziell exprimierten Genen bei Präeklampsiepatientinnen detektiert werden. Anhand dieses Genexpressionsmusters konnten sowohl Plazenta-, als auch Blutproben von Präeklampsiepatientinnen sicher von Kontrollproben getrennt werden. Es scheint möglich, dass Risikokollektive vor oder zum Beginn einer Schwangerschaft identifiziert werden können. Die Ergebnisse müssen aber zunächst an einem größeren Kollektiv auf Validität kontrolliert werden.

## Literatur

- ACOG Committee on Practice Bulletins – Obstetrics: ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; 99: 159 – 167
- Ahr A, Holtrich U, Solbach C, Scharl A, Strebhardt K, Karn T, Kaufmann M. Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. *J Pathol* 2001; 195: 312 – 320
- Ahr A, Holtrich U, Solbach C, Scharl A, Strebhardt K, Karn T, Kaufmann M. Molekularbiologische Klassifikation von Hochrisiko-Patientinnen beim primären Mammakarzinom durch Genexpressionsanalysen. *Geburtsh Frauenheilk* 2001; 61: 954 – 963
- Ahr A, Karn T, Solbach C, Seiter T, Strebhardt K, Holtrich U, Kaufmann M. Identification of high risk breast-cancer patients by gene expression profiling. *Lancet* 2002; 359: 131 – 132
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson Jr J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503 – 511
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14863 – 14868
- Fitzpatrick E, Goring HH, Liu H, Borg A, Forrest S, Cooper DW, Brennecke SP, Moses EK. Fine mapping and SNP analysis of positional candidates at the preeclampsia susceptibility locus (PREG1) on chromosome 2. *Hum Biol* 2004; 76: 849 – 862
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. 1999; 286: 531 – 537
- Heikkilä A, Tuomisto T, Hakkinen SK, Keski-Nisula L, Heinonen S, Ylä-Herttuala S. Tumor suppressor and growth regulatory genes are overexpressed in severe early-onset preeclampsia – an array study on case-specific human preeclamptic placental tissue. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84: 679 – 689
- Ingec M, Gursoy HG, Yildiz L, Kumtepe Y, Kadanali S. Serum levels of insulin, IGF-1, and IGFBP-1 in pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; 84: 214 – 219
- Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrimsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 105: 94 – 113
- Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, Manyonda IT, Lowry PJ. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* 2000; 405: 797 – 800
- Pang ZJ, Xing FQ. Comparative profiling of metabolism-related gene expression in pre-eclamptic and normal pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2004; 269: 91 – 95
- Pang ZJ, Xing FQ. Comparative study on the expression of cytokine-receptor genes in normal and preeclamptic human placentas using DNA microarrays. *J Perinat Med* 2003; 31: 153 – 162
- Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001; 357: 53 – 56
- Tsoi SC, Cale JM, Bird IM, Kay HH. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human placenta: up-regulation of the transcript encoding muscle subunit of glycogen phosphorylase in preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest* 2003; 10: 496 – 502
- Tsumagari K, Chijiwa K, Nagai H, Makita M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Miki Y. Postoperative prognosis of node-negative breast cancers predicted by gene-expression profiling on a cDNA microarray of 25,344 genes. *Breast Cancer* 2005; 12: 166 – 177
- Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet* 2000; 356: 1260 – 1265