Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Prof. Dr. med. Kurt Hecher

Aktivität und Expression der plazentaren Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase bei gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Laura Marie Maaß

aus Hamburg

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 22.04.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. K. Hecher

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. R. Böger

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. med. T. Somville

Inhaltsverzeichnis

1 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG 1

2 EINLEITUNG 2

2.1 PRÄEKLAMPSIE 2

2.1.1 Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen 2

2.1.2 Epidemiologie und Komplikationen der Präeklampsie 3

2.1.3 Risikofaktoren und Vorhersagemöglichkeiten der Präeklampsie 4

2.1.4 Therapie der Präeklampsie 5

2.1.5 Pathogenese der Präeklampsie 5

2.2 STICKSTOFFMONOXID 6

2.2.1 Vasodilatation 6

2.2.2 Endotheliale Dysfunktion 7

2.2.3 Synthese von Stickstoffmonoxid 8

2.2.4 Abbau von zyklischem Guanosinmonophosphat und Stickstoffmonoxid 8

2.3 ASYMMETRISCHES DIMETHYLARGININ 9

2.3.1 Hemmung der Synthese von Stickstoffmonoxid durch Asymmetrisches Dimethylarginin 9

2.3.2 Erhöhte Plasmakonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen 10

2.3.3 Synthese von Asymmetrischem Dimethylarginin 11

2.3.4 Abbau von Asymmetrischem Dimethylarginin durch Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen 11

2.3.5 Ursachen einer erhöhten Plasmakonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin 13

2.4 ASYMMETRISCHES DIMETHYLARGININ UND PRÄEKLAMPSIE 13

3 METHODIK 15

3.1 GENEHMIGUNGEN 15

3.2 STUDIENDESIGN 15

3.3 PATIENTINNEN 15

3.3.1 Patientinnenauswahl 15

3.3.2 Diagnosestellung der Präeklampsie 16

3.3.3 Ein- und Ausschlusskriterien 17

3.4 STUDIENABLAUF 18

3.5 LABORPARAMETER 19

3.6 MESSUNG VON DIMETHYLARGININEN UND L-ARGININ IM PLASMA 19

3.6.1 Methode 19

3.6.2 Durchführung 19

3.7 MESSUNG DER EXPRESSION PLAZENTARER GENE 21

3.7.1 Extraktion von Ribonukleinsäure aus dem Plazentagewebe 21

3.7.2 Reverse Transkription der Ribonukleinsäure 22

3.7.3 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion 23

3.8 MESSUNG DER PLAZENTAREN DDAH-AKTIVITÄT 23

3.9 ANGEWANDTE STATISTISCHE VERFAHREN 24

4 ERGEBNISSE 25

4.1 PATIENTINNEN 25

4.1.1 Patientinnencharakteristika 25

4.1.2 Laborauswertung der Frauen mit Präeklampsie 26

4.2 DIMETHYLARGININE UND L-ARGININ IM PLASMA 28
4.2.1 Maternale Plasmakonzentrationen 28
4.2.2 Fetale Plasmakonzentrationen 30
4.2.3 Fetomaternale Konzentrationsgradienten 31
4.3 AKTIVITÄT DER PLAZENTAREN DIMETHYLARGININ-DIMETHYLAMINOHYDROLASE 33
4.4 EXPRESSION PLAZENTARER GENE 34
4.5 KORRELATIONSANALYSEN 36

5 DISKUSSION 37
5.1 HÖHERE DIMETHYLARGININ-PLASMAKONZENTRATIONEN BEI FRAUEN MIT PRÄEKLAMPSIE 37
5.2 VERMINDERTE AKTIVITÄT DER PLAZENTAREN DIMETHYLARGININ-DIMETHYLAMINOHYDROLASE BEI FRAUEN MIT PRÄEKLAMPSIE 39
5.2.1 Direkter Nachweis der verminderten Aktivität und Expression der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase im Plazentagewebe 39
5.2.2 Verminderter fetomaternaler Konzentrationsgradient von Asymmetrischem Dimethylarginin 40
5.3 HOHE KONZENTRATION VON ASYMMETRISCHEM DIMETHYLARGININ IM NABELSCHNURBLUT ALLER FETEN 41
5.4 KLINISCHE RELEVANZ DER ERGEBNISSE 42
5.4.1 Asymmetrisches Dimethylarginin und Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase: Verwendbarkeit als Prädiktoren der Präeklampsie 42
5.4.2 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase als pharmakologisches Ziel in der Therapie der Präeklampsie 43
5.5 LIMITATIONEN DER STUDIE 45
5.5.1 Patientinnenauswahl 45
5.5.2 Probengewinnung 45
5.5.3 Ergebnisauswertung 46
5.6 ZUSAMMENFASSENDE BEWERTUNG 46

6 ZUSAMMENFASSUNG 48

7 LITERATURVERZEICHNIS 49

8 ANHANG 61
8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 61
8.2 TABELLENVERZEICHNIS 66
8.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 67
8.4 MATERIALIEN 68
8.4.1 Substanzen, Lösungen und Kits 68
8.4.2 Verbrauchsmaterialien 69
8.4.3 Geräte 69
8.5 EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG ZUR TEILNAHME AN DER STUDIE 71
8.6 EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG ZUR ENTNAHME VON GEWEBE 72
8.7 EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG ZUR GENETISCHEN UNTERSUCHUNG 73
8.8 DEMOGRAFISCHER FRAGEBOGEN 74

9 DANKSAGUNG 79

10 LEBENSLAUF 80

11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 81

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Präeklampsie ist eine relativ häufige Erkrankung bei schwangeren Frauen und eine Hauptursache maternaler und perinataler Morbidität und Mortalität. Bislang ist wenig über die Pathogenese bekannt.

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase und führt zu einer verminderten Bioverfügbarkeit des vasodilatierenden Stickstoffmonoxids. ADMA spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Endotheldysfunktion und Atherosklerose. Studien belegen, dass Frauen mit Präeklampsie erhöhte Plasma-ADMA-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Schwangeren aufweisen.

ADMA wird hauptsächlich von dem Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) metabolisiert, welches ubiquitär im Gewebe vorkommt und auch in hohem Maß in der Plazenta exprimiert wird. Wir vermuten, dass bei Frauen mit Präeklampsie eine Beeinträchtigung der plazentaren DDAH-Aktivität oder eine verminderte Expression dieses Enzyms eine mögliche Ursache für die erhöhte ADMA-Plasmakonzentration sein könnte. Im Rahmen dieser Studie wollen wir daher untersuchen, ob und inwieweit bei Frauen mit Präeklampsie ein Zusammenhang besteht zwischen der ADMA-Plasmakonzentration und der Aktivität oder Expression der plazentaren DDAH. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen für die vorliegende Arbeit:

- Unterscheidet sich die Höhe der ADMA-Plasmakonzentration bei den von uns untersuchten gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie?
- Bestehen Unterschiede in der Expression und/oder der Aktivität der plazentaren DDAH in diesen beiden Gruppen?
- Korreliert die plazentare DDAH-Aktivität und/oder die plazentare DDAH-Expression mit der Höhe der ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie?

Die Bestätigung unserer Hypothese wäre ein Hinweis darauf, dass bei Präeklampsie möglicherweise ein kausaler Zusammenhang besteht zwischen verminderter Leistung der plazentaren DDAH und erhöhter ADMA-Plasmakonzentration. Dies könnte pathogenetisch bedeutsam sein und einen Angriffspunkt einer zukünftigen Pharmakotherapie darstellen.

2 Einleitung

2.1 Präeklampsie

2.1.1 Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen

In der westlichen Welt werden 5-10% aller Schwangerschaften durch hypertensive Erkrankungen kompliziert (Wagner et al. 2007; Póvoa et al. 2008; Kuklina et al. 2009), sie stehen an erster bis dritter Stelle der mütterlichen Todesursachen weltweit. Folgende Klassifizierung richtet sich nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG 2010):

- Gestationshypertonie: Nach der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) auftretende Blutdruckwerte über 140 mmHg systolisch und/oder 90 mmHg diastolisch bei einer zuvor normotensiven Schwangeren. Eine Proteinurie tritt nicht auf und die Blutdruckwerte normalisieren sich innerhalb von 12 Wochen nach der Geburt.

- Präeklampsie: Nach der 20. SSW auftretende Gestationshypertonie und Proteinurie von mindestens 300 mg in 24 Stunden. Eine Präeklampsie kann auch bei fehlender Proteinurie bestehen, wenn alternativ folgende Kriterien auftreten: Fetale Wachstumsretardierung, Leberbeteiligung in Form ansteigender Aminotransferasen, Nierenfunktionsstörungen, neurologische Probleme oder hämatologische Störungen.

- Schwere Präeklampsie: Diese Diagnose kann bei zusätzlichem Vorliegen mindestens eines der folgenden Kriterien gestellt werden: Blutdruck über 170 mmHg systolisch und/oder 110 mmHg diastolisch, Proteinurie über 5 g in 24 Stunden, Nierenfunktionseinschränkung (Kreatinin > 0,9 g/l oder Oligurie < 500 ml/24 h), Leberbeteiligung (Anstieg der Aminotransferasen oder schwere Oberbauchschmerzen), Lungenödem oder Zyanose, hämatologische Störungen (Thrombozytopenie, Hämolyse), neurologische Symptome (starke Kopfschmerzen, Sehstörungen) oder fetale Wachstumsretardierung.

- Pfropf-Präeklampsie: Liegt vor bei Frauen mit chronischer arterieller Hypertonie, bei denen im Verlauf der Schwangerschaft eine Proteinurie auftritt (vor der 20. SSW oder nach der 20. SSW, dann Gestationsproteinurie). Die Diagnose verlangt zudem eines der folgenden Kriterien nach der 20. SSW: Plötzlicher Anstieg der Proteinurie, plötzlicher

Blutdruckanstieg oder ein klinisches oder laborchemisches Merkmal der schweren Präeklampsie.

- Eklampsie: Bezeichnet das Auftreten von zerebralen Krampfanfällen bei Frauen mit Präeklampsie, die keiner anderen Ursache zugeordnet werden können.

- HELLP-Syndrom: Eine Sonderform der Präeklampsie stellt dieser Symptomkomplex aus *haemolysis* (Hämolyse), *elevated liver enzymes* (erhöhte Aminotransferasen) und *low platelet count* (erniedrigte Thrombozytenzahl) dar. Bei Eklampsie und HELLP-Syndrom können die Symptome einer Präeklampsie auch fehlen.

- Chronische Hypertonie: Präkonzeptionell oder vor der 20. SSW diagnostizierte und postpartal länger als 12 Wochen persistierende arterielle Hypertonie, das heißt Blutdruckwerte über 140 mmHg systolisch und/oder 90 mmHg diastolisch.

Der Begriff Präeklampsie wird in dieser Arbeit übergreifend für Präeklampsie, Pfropf-Präeklampsie und HELLP-Syndrom verwendet.

2.1.2 Epidemiologie und Komplikationen der Präeklampsie

Die Präeklampsie tritt in medizinisch entwickelten Ländern bei 1,8-8% aller schwangeren Frauen auf (Póvoa et al. 2008; Kuklina et al. 2009; Steegers et al. 2010) und ist für jeden dritten Fall schwerer mütterlicher Morbidität sowie eine fünffach gesteigerte perinatale Mortalität verantwortlich (Waterstone et al. 2001, DGGG 2010). Die Rate ernsthafter geburtshilflicher Komplikationen ist im Vergleich zu gesunden Schwangeren um ein Vielfaches erhöht. Insbesondere Frauen mit schwerer Präeklampsie sind prädisponiert für potentiell lebensbedrohliche Ereignisse wie intrazerebrale Blutungen, Leberversagen oder vorzeitige Plazentalösung (National High Blood Pressure Education Program Working Group 2000; Sibai et al. 2005). Die Inzidenz schwerer Verlaufsformen stieg im letzten Jahrzehnt signifikant an (Kuklina et al. 2009).

In Bezug auf 10.000 Geburten von erkrankten Frauen erleiden 185 Patientinnen eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), bei über 100 tritt ein akutes Nierenversagen auf. Weitere Komplikationen sind akutes progressives Lungenversagen bei 97, zerebrovaskuläre Ereignisse im Wochenbett bei 57 und Lungenödeme bei 54 Frauen. Etwa 130 von 10.000

erkrankten Frauen müssen beatmet werden. Die Letalität beträgt 14,4 von 10.000 Betroffenen. Im Vergleich dazu liegen die Raten schwerwiegender Komplikationen bei schwangeren Frauen ohne hypertensive Erkrankungen für die DIC bei 6,7 und für das Lungenversagen bei 2,5 von 10.000. Die Letalität beträgt 0,6 von 10.000 gebärenden Frauen (Kuklina et al. 2009).

2.1.3 Risikofaktoren und Vorhersagemöglichkeiten der Präeklampsie

Duckitt und Harrington (2005) haben in einer Metaanalyse die in der Tabelle 1 dargestellten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie zusammengefasst. Bereits 1986 konnten Fleischer et al. zeigen, dass mit der Dopplersonografie ein erhöhter Gefäßwiderstand der Aa. uterinae durch veränderte Flussmuster darstellbar ist. Insbesondere postsystolische Inzisuren (*Notches*) stellen Indikatoren für schwangerschaftskomplizierende Ereignisse wie die Präeklampsie dar. Da bislang kein laborchemischer Test die Kriterien eines brauchbaren prädiktiven Verfahrens erreicht, bleiben die Dopplersonografie und Anamneseerhebung in der Klinik die Mittel der Wahl, um Frauen mit einem erhöhtem Präeklampsie-Risiko frühzeitig zu identifizieren (Levine und Lindheimer 2009).

Tabelle 1. **Risikofaktoren für das Auftreten einer Präeklampsie**. Modifiziert nach Duckitt und Harrington (2005).

Risikofaktor	**Relatives Risiko**
Antiphospholipidsyndrom	9,7
Präeklampsie in der Vorgeschichte	7,2
Autoimmunerkrankung	6,9
Diabetes mellitus	3,6
Hoher *Body Mass Index* (26,1-29,0 versus <26,1 kg/m²)	3,2
Nulliparität	2,9
Letzte Geburt mehr als zehn Jahre zurückliegend	2,9
Positive Familienanamnese (betroffene Mutter der Patientin)	2,9
Zwillingsschwangerschaft	2,9
Alter über 40 Jahre	2,0

2.1.4 Therapie der Präeklampsie

Patientinnen mit leichter Präeklampsie können ambulant behandelt werden, erst bei anhaltenden Blutdruckwerten über 170 mmHg systolisch und/oder 120 mmHg diastolisch wird eine medikamentöse Blutdrucksenkung notwendig, welche dann stationär erfolgen sollte. Die antihypertensive Therapie dient der Prävention mütterlicher zerebrovaskulärer und kardiovaskulärer Komplikationen, eine Verbesserung der kindlichen Prognose konnte nicht gezeigt werden (DGGG 2010). Die bislang einzige kausale Behandlung der Präeklampsie stellt die Entbindung dar (Levine und Lindheimer 2009).

2.1.5 Pathogenese der Präeklampsie

Die als multifaktoriell angesehene Ätiologie der Präeklampsie ist bislang weitgehend ungeklärt (Redman und Sargent 2005; Schmidt und Kimmig 2007). Allgemein gilt jedoch, dass die Plazenta bei der Entwicklung der Erkrankung eine zentrale Rolle einnimmt und Störungen in deren Entwicklung (Plazentation) der klinischen Manifestation der Erkrankung vorausgehen. Während der ersten Hälfte einer normalen Schwangerschaft verlassen embryonale Trophoblastzellen den fetalen Zottenbaum und invadieren als extravillöser Trophoblast das innere Drittel des Myometriums (interstitielle Invasion). Zeitgleich durchdringen die invasiven Trophoblastzellen die Wand der Spiralarterien (endovaskuläre Invasion). Bei diesem Vorgang werden mütterliches Endothel und Gefäßmedia durch die embryonalen Zellen ersetzt, es resultiert eine ausgeprägte Vasodilatation der nun uteroplazentaren Gefäße mit der Folge der maximalen Durchblutung der Plazenta. Die vasomotorische Kontrolle über diese Gefäße entfällt (Robertson 1976; Klockenbusch 2005).

Bei der Präeklampsie erfolgt die Umwandlung der Spiralarterien in uteroplazentare Arterien durch fehlerhafte endovaskuläre Invasion nur unzureichend (Brosens 1995; Rath 2005; Schmidt und Kimmig 2007). Die Arterien werden von Thrombozyten und Fibrinablagerungen obstruiert, es resultiert eine Ischämie der Plazenta (Reister et al. 2008). Die Ursachen der gestörten Plazentation sind ungeklärt. Vermutet werden eine verminderte invasive Potenz der Trophoblastzellen oder eine überschießende mütterliche Immunantwort auf den Fetus (Schmidt und Kimmig 2007; Reister et al. 2008). Andere Autoren hingegen postulieren, dass im Gegenteil eine zu geringe Interaktion zwischen Mutter und Kind der Invasionsstörung zu Grunde liegt (Hiby et al. 2004).

Infolge der Ischämie der Plazenta entwickelt sich eine generalisierte Endotheldysfunktion des mütterlichen Gefäßsystems. Vasokonstriktion und Verlust der endothelialen Schrankenfunktion in zahlreichen Endorganen mit den klinischen Symptomen der Präeklampsie sind die Folge (Lam et al. 2005; Maynard et al. 2008). Auch die Inkubation gesunder Endothelzellen mit den Seren von Frauen mit Präeklampsie hat eine Endotheldysfunktion zur Folge (Myers et al. 2005). Da die Erkrankung außerdem einzig mit der Geburt der Plazenta beendet werden kann (Levine und Lindheimer 2009), stellten Roberts et al. (1989) die Hypothese auf, dass eine unter Hypoxie von der Plazenta sezernierte Substanz Auslöser der Präeklampsie ist. In den letzten Jahren sind zahlreiche potentielle „Präeklampsiemediatoren“, beispielsweise Asymmetrisches Dimethylarginin, Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren, Gegenstand intensiver Forschung gewesen (Holden et al. 1998; Dechend et al. 2003; Luft 2003; Maynard et al. 2003; Maynard et al. 2008; Kuc et al. 2011).

2.2 Stickstoffmonoxid

2.2.1 Vasodilatation

Furchgott und Zawadzki (1980) konnten zeigen, dass Acetylcholin nur bei intakter Endothelzellschicht eine Vasodilatation auszulösen vermag. Eine von den Endothelzellen produzierte und sezernierte Substanz führte in der benachbarten glatten Gefäßmuskulatur zur Tonusabnahme und wurde *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF) genannt (Furchgott 1983). Zwei verschiedene Forschungsgruppen konnten schließlich die Übereinstimmung von EDRF und Stickstoffmonoxid (NO) nachweisen (Ignarro et al. 1987; Palmer et al. 1987).

Die vasodilatierende Wirkung von NO ist auf die direkte Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase innerhalb der glatten Gefäßmuskelzelle zurückzuführen: Die aktivierte Guanylatzyklase katalysiert die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP; Förstermann et al. 1986). Der intrazelluläre cGMP-Anstieg wiederum aktiviert cGMP-gekoppelte Proteinkinasen, die eine Abnahme der zytosolischen Calciumkonzentration und damit eine Abnahme des muskulären Tonus des Blutgefäßes bewirken (Moncada und Higgs 1993), Abbildung 1.

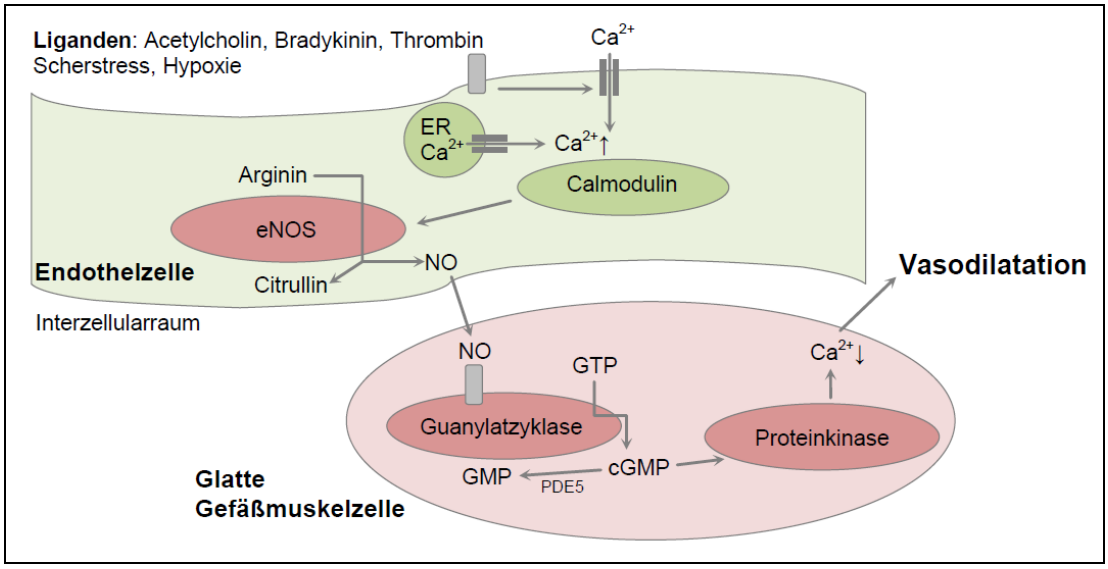

Abb. 1. **Arginin-Stickstoffmonoxid-Kaskade**. Ca^{2+} = Calcium, NO = Stickstoffmonoxid, eNOS = endotheliale NO-Synthase, ER = Endoplasmatisches Retikulum, GTP = Guanosintriphosphat, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, PDE 5 = Phosphodiesterase 5, GMP = Guanosinmonophosphat

2.2.2 Endotheliale Dysfunktion

Stickstoffmonoxid aus Endothelzellen ist von besonderer Wichtigkeit für die lokale Regulation von Blutdruck und Blutfluss (Förstermann et al. 1994). Weitere wichtige Effekte von NO werden ebenfalls durch cGMP als *second messenger* vermittelt: NO ist Hemmstoff der Plättchenadhäsion und Plättchenaggregation (Alheid et al. 1987). Außerdem reduziert es intrazellulären oxidativen Stress, der für die vermehrte Leukozyten-Adhäsivität an der Endotheloberfläche und somit einer Begünstigung von Atherosklerose verantwortlich gemacht wird (Kubes et al. 1991). Weitere Wirkungen sind die Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen (Garg und Hassid 1989; Böger et al. 1998) und die Reduktion der Produktion von Superoxidradikalen (Böger et al. 1995). NO wirkt zudem antiatherosklerotisch durch Verhinderung der Oxidation von *Low Density Lipoproteines* (LDL), die die Plaqueentstehung begünstigt (Leitinger et al. 1995), Abbildung 2.

Eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit führt zu Endotheldysfunktion (Ross 1999). Zahlreiche Risikofaktoren der Atherosklerose sind mit einem verminderten Stickstoffmonoxid-Angebot beziehungsweise einer Endotheldysfunktion assoziiert (Böger et al. 1996a). Bei der Präeklampsie weisen die Patientinnen eine generalisierte Endotheldysfunktion auf (Maynard et al. 2008).

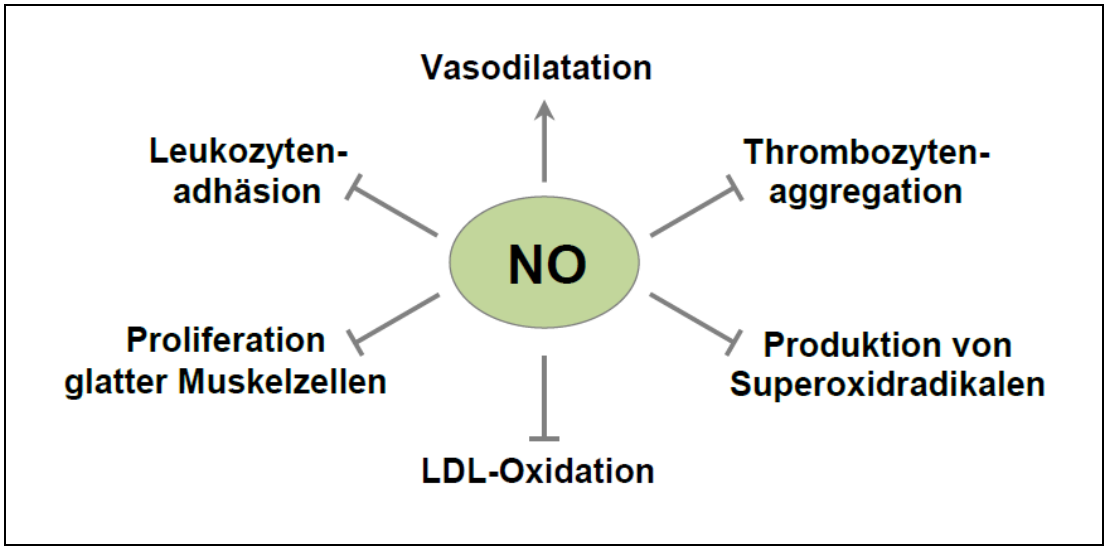

Abb. 2. **Effekte von Stickstoffmonoxid** (NO). Modifiziert nach Böger (2003). LDL = *Low Density Lipoproteines*

2.2.3 Synthese von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid wird aus der Guanidinogruppe der Aminosäure L-Arginin mit L-Citrullin als Nebenprodukt synthetisiert (Palmer et al. 1988). Die Reaktion wird durch das Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert, von der drei verschiedene Isoformen existieren (Pollock et al. 1991): Eine induzierbare NOS (iNOS = NOS II), die unter Einfluss von Zytokinen exprimiert wird (Stuehr et al. 1991), sowie zwei konstitutiv exprimierte NO-Synthasen, die nach dem Ort ihrer Erstbeschreibung als neuronale NOS (nNOS = NOS I; Mayer et al. 1991) und endotheliale NOS (eNOS = NOS III; Pollock et al. 1991) bezeichnet werden. Die eNOS reagiert auf physikalische Reize wie Scherstress oder Hypoxie oder nach Bindung bestimmter Liganden wie Acetylcholin, Bradykinin oder Thrombin. Die Aktivität der konstitutiven NOS wird durch Calcium und Calmodulin reguliert (Moncada et al. 1991), während die iNOS Calcium-unabhängig NO in sehr großen Mengen produziert.

2.2.4 Abbau von zyklischem Guanosinmonophosphat und Stickstoffmonoxid

Der Abbau von cGMP erfolgt einerseits durch Phosphodiesterasen (Rybalkin et al. 2003), andererseits wird es unverändert über die Nieren ausgeschieden (Tolins et al. 1990). Die cGMP-Konzentration des Urins kann auf diese Weise als indirekter Parameter für die systemische NO-Syntheserate herangezogen werden (Tolins et al. 1990; Böger et al. 1994).

Stickstoffmonoxid hat eine sehr kurze Halbwertszeit (Moncada et al. 1991); nach etwa vier Sekunden biologischer Aktivität wird es über Nitrit (NO_2^-) zu Nitrat (NO_3^-) oxidiert und anschließend mit dem Urin ausgeschieden (Ignarro 1990; Wennmalm et al. 1993). Die Nitrat-Urin-Exkretion wird ebenfalls häufig als Parameter für die systemische NO-Aktivität genutzt (Böger et al. 1996b).

2.3 Asymmetrisches Dimethylarginin

2.3.1 Hemmung der Synthese von Stickstoffmonoxid durch Asymmetrisches Dimethylarginin

Argininanaloga konkurrieren mit dem Substrat L-Arginin um die Bindungsstelle an der NO-Synthase und wirken auf diese Weise als kompetitive Inhibitoren der Stickstoffmonoxid-Synthese. Sie kommen natürlicherweise im Körper vor: Zum einen in Form des einfach methylierten N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), zum anderen als die an der Guanidinogruppe substituierten Dimethylarginine Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA; Nakajima et al. 1971; Vallance et al. 1992).

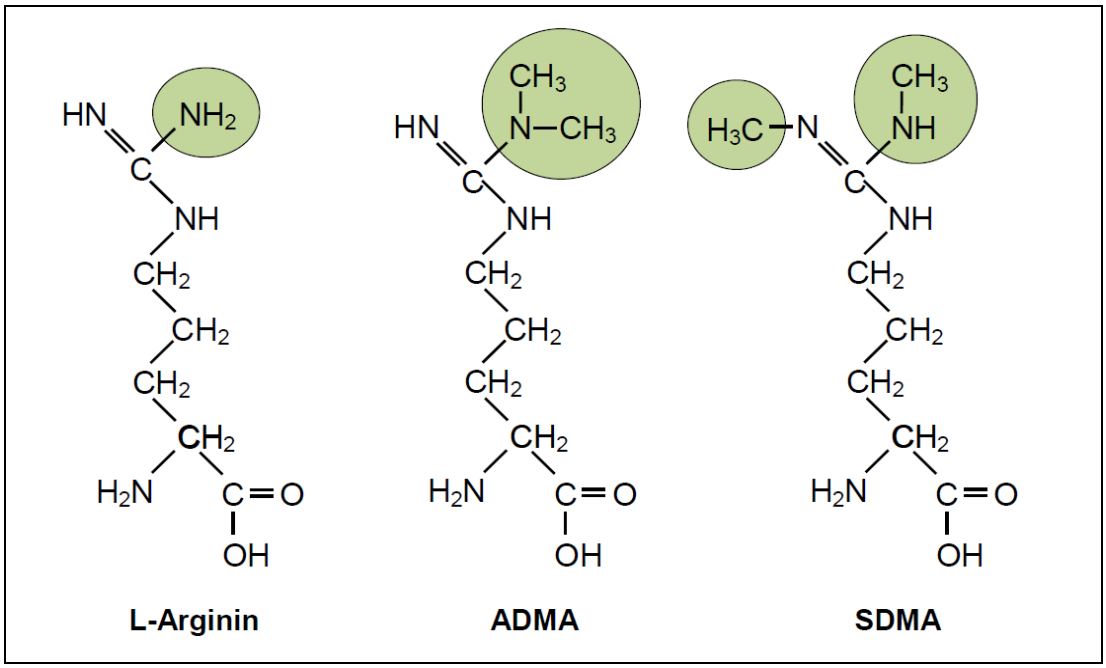

Abb 3. **L-Arginin und Strukturanaloga Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA)**.

Hibbs et al. (1987) konnten die NOS-hemmende Wirkung der Argininanaloga zunächst anhand von L-NMMA nachweisen. In tierexperimentellen Studien löste L-NMMA Hypertonie aus (Aisaka et al. 1989). Vallance et al. (1992) konnten die gleiche Wirkung für ADMA nachweisen. Bei etwa zehnmal höherer Plasma-Konzentration macht ADMA den weitaus größeren Anteil der endogenen NO-Hemmung aus. Für SDMA konnte kein NOS-hemmender Effekt nachgewiesen werden.

2.3.2 Erhöhte Plasmakonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen

Kielstein et al. (2004) haben im Rahmen einer experimentellen Studie die Wirkung einer intravenösen ADMA-Applikation an gesunden Probanden in vivo untersucht. Kurz nach der Infusion von ADMA wurde als Ausdruck einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit eine verminderte Plasmakonzentration von cGMP gemessen. Außerdem war das Herzzeitvolumen niedriger und der systemische Gefäßwiderstand und arterielle Blutdruck höher im Vergleich zu den gemessenen Parametern vor der ADMA-Infusion.

Eine erhöhte ADMA-Plasmakonzentration ist ein unabhängiger Risikomarker für peri- und postoperative Komplikationen. In einer klinischen Studie mit 402 Patienten, die sich einer nicht-kardialen Operation unterziehen lassen mussten, wurde präoperativ die ADMA-Plasmakonzentration bestimmt. In einer 30 tägigen postoperativen Beobachtungsphase war das Risiko postoperativer Komplikationen um 33% erhöht für jeden Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration um 0,1 µmol/l (Maas et al. 2007).

Eine erhöhte ADMA-Plasmakonzentration bewirkt durch eine kompetitive Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit. Dies führt zu einer Endotheldysfunktion und daraus resultierend möglicherweise zu einer Vasokonstriktion, erhöhtem arteriellen Blutdruck und Atherosklerose (Böger et al. 2009; Pope et al. 2009; Leiper und Nandi 2011). Zahlreiche, insbesondere kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit einer erhöhten ADMA-Plasmakonzentration einher, Tabelle 2.

Tabelle 2. **Erkrankungen, die mit einer erhöhten Plasmakonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin einhergehen**. Alle Daten stammen aus klinischen Studien. Modifiziert nach Böger (2004).

Erkrankung	**Faktor der ADMA-Konzentration im Vergleich zur gesunden Kontrolle**
Chronisches Nierenversagen	2-7
Chronische Herzinsuffizienz	2-3
Diabetes mellitus Typ II	2-3
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	2-3
Präeklampsie	2-3
Chronische arterielle Hypertonie	2
Hypercholesterinämie	2
Hyperhomocysteinämie	2
Schlaganfall	2
Koronare Herzkrankheit	2

2.3.3 Synthese von Asymmetrischem Dimethylarginin

ADMA entsteht ubiquitär bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen in nahezu allen Zelltypen (Cantoni 1975). Argininreste werden dabei von bestimmten Enzymen (Protein-N-Arginin-Methyltransferasen = PRMT) mit S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppendonor methyliert (Paik und Kim 1968). Bei anschließender hydrolytischer Spaltung der Proteine werden die methylierten Argininanaloga frei (Cantoni 1975). Es existieren zwei Typen der PRMT: die Typ I PRMTs (PRMT1, 2, 3, 4, 6, 8) katalysieren die Synthese von ADMA, die Typ II PRMTs (PRMT5, 7) führen zur Bildung von SDMA. An der Synthese von L-NMMA können beide Enzyme beteiligt sein (McBride und Silver 2001).

2.3.4 Abbau von Asymmetrischem Dimethylarginin durch Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen

Der Abbau des Asymmetrischen Dimethylarginins erfolgt auf zwei Wegen: ADMA wird zum einen unverändert mit dem Urin ausgeschieden (Vallance et al. 1992), der größere Anteil jedoch wird enzymatisch durch die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase

(DDAH) abgebaut, die in nahezu allen Geweben nachgewiesen werden kann (Ogawa et al. 1989). Die DDAH katalysiert die hydrolytische Spaltung von ADMA und L-NMMA in Dimethylamin und L-Citrullin. SDMA wird nicht durch die DDAH abgebaut.

Das Enzym existiert in zwei Isoformen: DDAH 1 dominiert in Geweben, die die neuronale NO-Synthase (NOS I) exprimieren, außerdem konnte eine hohe Aktivität in Nieren und Leber festgestellt werden. Die DDAH 2 wird vor allem in den Nieren und dem kardiovaskulären System sowie Plazentagewebe exprimiert (Leiper et al. 1999). Eine Hemmung der DDAH erhöht die ADMA-Konzentration in Endothelzellen und mindert auf diese Weise die NO-vermittelte Vasodilatation (MacAllister et al. 1996).

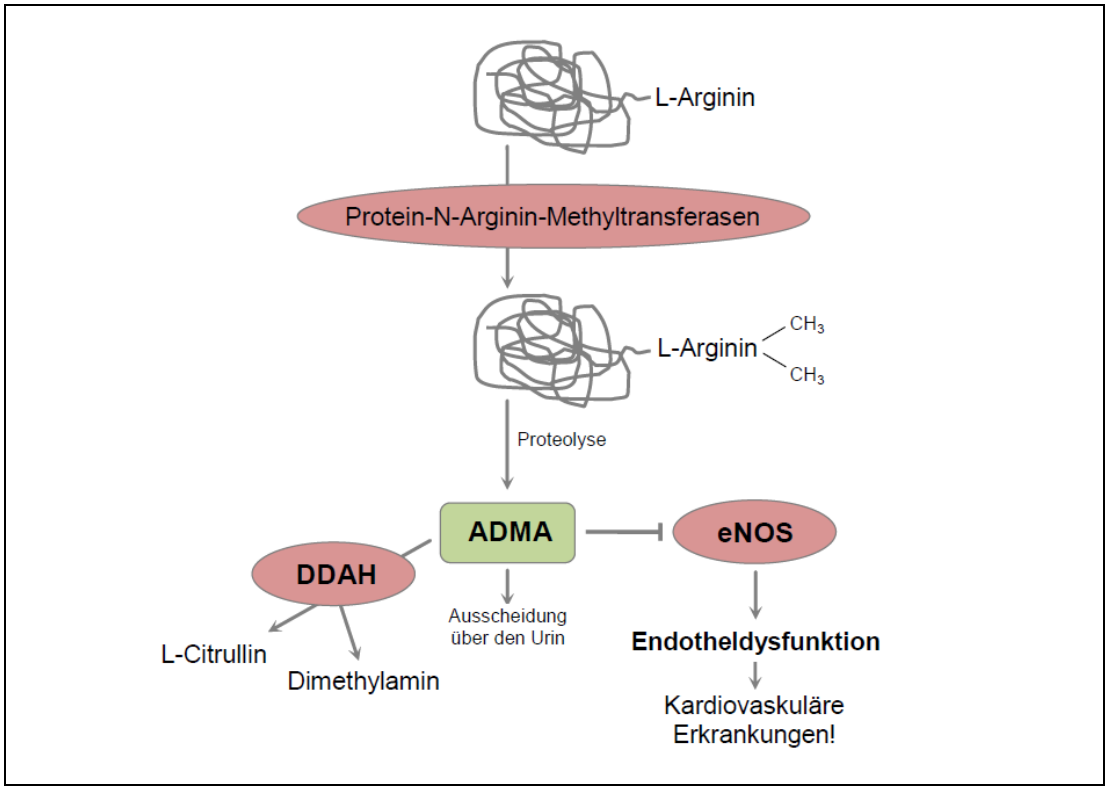

Abb. 4. **Synthese und Abbau von Asymmetrischem Dimethylarginin**. Modifiziert nach Böger (2003). ADMA = Asymmetrisches Dimethylarginin, DDAH = Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

2.3.5 Ursachen einer erhöhten Plasmakonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin

Die Ursachen einer erhöhten ADMA-Plasmakonzentration können in einer gesteigerten Synthese oder einem verminderten Abbau von ADMA liegen. Scherstress am Endothel steigert die PRMT-Expression und somit die Produktion von ADMA (Osanai et al. 2003). Eine verminderte DDAH-Aktivität und/oder DDAH-Expression führt über eine verminderte Metabolisierung zu einer erhöhten ADMA-Plasmakonzentration (Wang et al. 2007; Abhary et al. 2010). Es konnte ein Zusammenhang von eingeschränkter DDAH-Aktivität und/oder DDAH-Expression und zahlreichen Erkrankungen mit verminderter NO-Bioverfügbarkeit nachgewiesen werden (Leiper und Nandi 2011). Außerdem akkumuliert ADMA bei Niereninsuffizienz mit eingeschränkter Urin-Exkretion (Vallance et al. 1992).

2.4 Asymmetrisches Dimethylarginin und Präeklampsie

Der mittlere arterielle Blutdruck einer gesunden Schwangeren ist deutlich niedriger als der einer nichtschwangeren Frau. Er fällt zunächst mit Beginn der Schwangerschaft ab, steigt ab dem zweiten Trimenon wieder an und erreicht zum Zeitpunkt der Geburt etwa den Ausgangswert. Vor allem endotheliale Mechanismen scheinen an der Reduktion des arteriellen Blutdruckes bei gesunden Schwangeren verantwortlich zu sein (Holden et al. 1998). Bei Frauen mit Präeklampsie bleibt die Reduktion des peripheren Widerstandes aus (Seligman et al. 1994; López-Jaramillo et al. 1995), der Blutdruck ist erhöht im Vergleich zu gesunden Schwangeren und nichtschwangeren Frauen (Holden et al. 1998). Es besteht ein Zusammenhang von Endotheldysfunktion mit verminderter NO-Synthese und erhöhtem Blutdruck bei Präeklampsie (Baylis et al. 1998; López-Jaramillo et al. 2008).

Parallel zum Blutdruckverlauf verhält sich die ADMA-Plasmakonzentration bei Schwangeren: Im Verlauf der Schwangerschaft fällt sie zunächst ab und steigt dann kontinuierlich bis zur Geburt hin an. Sie ist dabei zu jedem Zeitpunkt geringer als bei nichtschwangeren Frauen (Holden et al. 1998). ADMA kann als endogener Inhibitor der NO-Synthase die Menge an freiem Stickstoffmonoxid reduzieren und endotheliale Dysfunktion (Vallance et al. 1992; Calver et al. 1993) und Hypertonie (Kielstein et al. 2005) zur Folge haben. In klinischen Studien konnte ein Zusammenhang von Präeklampsie und erhöhter ADMA-Plasmakonzentration gezeigt werden (Tabelle 3).

Tabelle 3. **Plasmakonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin bei gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie**.

Gestationsalter	Kontrollen ADMA [µmol/l]	Präeklampsie ADMA [µmol/l]	Faktor	Quelle
2. Trimenon	0,34	0,45	1,3	(Speer et al. 2008)
3. Trimenon	0,50	1,20	2,4	(Fickling et al. 1993)
3. Trimenon	0,36	0,55	1,5	(Pettersson et al. 1998)
3. Trimenon	0,56	1,17	2,1	(Holden et al. 1998)
Geburt	0,39	0,44	1,1	(Braekke et al. 2009)
Geburt	0,49	0,55	1,1	(Speer et al. 2008)
3 Tage post partum	0,64	0,67	1,0	(Pettersson et al. 1998)

Die Arbeitsgruppe um Savvidou et al. (2003) konnte nachweisen, dass Endotheldysfunktion und eine erhöhte ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen, die später eine Präeklampsie entwickelten, schon vor Manifestation der Erkrankung nachweisbar waren. Da ADMA im Wesentlichen durch die DDAH abgebaut wird, könnte eine mögliche Ursache für die erhöhte ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie eine Beeinträchtigung der plazentaren DDAH-Aktivität oder eine verminderte Expression dieses Enzyms sein.

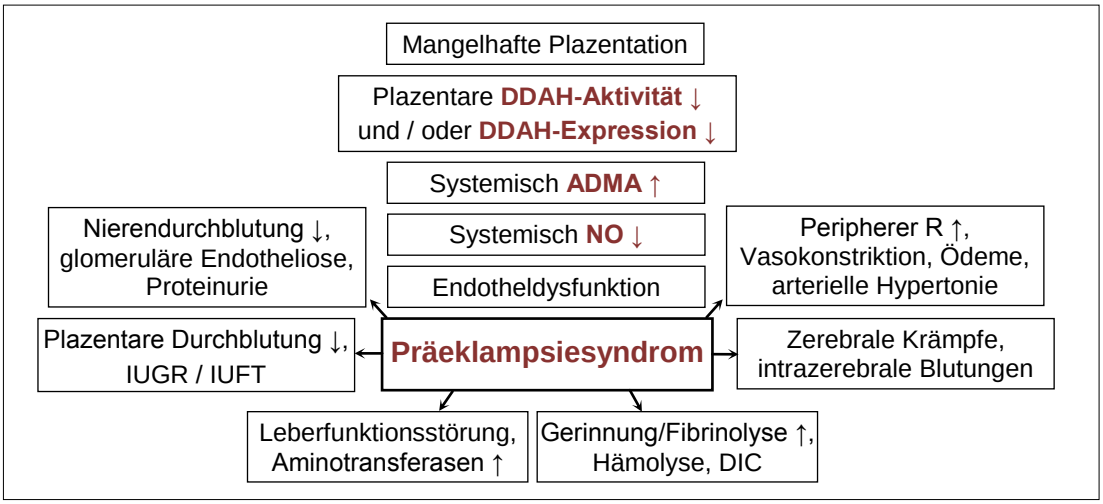

Abb. 5. **Verminderte plazentare Aktivität und/oder Expression der DDAH als mögliche Ursache der erhöhten ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie.** DDAH = Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, ADMA = Asymmetrisches Dimethylarginin, NO = Stickstoffmonoxid, DIC = Disseminierte intravasale Gerinnung, IUGR/IUFT = intrauterine Wachstumsretardierung/Fruchttod

3 Methodik

3.1 Genehmigungen

Vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg mit einem positiven Votum (UKE-KP 2004/008) beurteilt. Alle teilnehmenden Patientinnen wurden von ÄrztInnen eingehend schriftlich und mündlich aufgeklärt und haben vor Studieneinschluss eine Einverständniserklärung unterschrieben. Es wurde ausdrücklich darauf hingewiesen, dass ein Studienabbruch jederzeit und ohne Angabe von Gründen möglich war.

3.2 Studiendesign

Die Durchführung der prospektiven klinischen Studie erfolgte monozentrisch in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Um einen signifikanten Unterschied bezüglich der ADMA-Plasmakonzentration im Vergleich zu gesunden Schwangeren nachweisen zu können, wurde anhand älterer Studien die Anzahl der an Präeklampsie erkrankten Frauen, die in jedem Fall in die Studie eingeschlossen werden sollten, auf 15 festgelegt.

Im Anschluss an die klinische Phase wurden die aufbereiteten Proben im Labor des Instituts für Klinische und Experimentelle Pharmakologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gemessen und ausgewertet.

3.3 Patientinnen

3.3.1 Patientinnenauswahl

Von Dezember 2008 bis Dezember 2009 wurden alle Frauen mit Präeklampsie in die Studie eingeschlossen, die zur stationären Überwachung auf die Pränatalstation des UKE aufgenommen worden waren und die Einverständniserklärung unterschrieben hatten. Sämtliche Einschlusskriterien mussten erfüllt sein und es durften keine Ausschlusskriterien vorliegen (siehe 3.3.3).

Anhand des Alters, des *Body Mass Index* (BMI) vor Schwangerschaftsbeginn sowie der Anzahl geborener Kinder wurden gesunde Schwangere als Kontrollen in die Studie eingeschlossen. Auch in der Kontrollgruppe mussten sämtliche Einschlusskriterien erfüllt sein und es durften keine Ausschlusskriterien vorliegen. Die Frauen kamen zu Kontrollterminen in die Pränatalambulanz des UKE und/oder zur Entbindung in den Kreißsaal des UKE. Im Falle einer Indikationsstellung zur Sectio erfolgte diese unabhängig von der Studie und ausschließlich nach klinisch-geburtshilflicher Situation.

3.3.2 Diagnosestellung der Präeklampsie

Der Großteil der Studienteilnehmerinnen wurde erstmals nach auffälliger Blutdruckmessung zur stationären Diagnostik und Überwachung eingewiesen. Einige Patientinnen wurden primär aufgrund pathologischer Blutflussmuster in den Arteriae uterinae überwiesen, seltener aufgrund stark ausgeprägter Ödeme. Stationär wurde ein Blutdrucktagesprofil erstellt und über eine Dauer von 24 Stunden der Urin der erkrankten Frau gesammelt. Bei gleichzeitigem Bestehen von arterieller Hypertonie, per Definition wiederholte Blutdruckmessungen größer als 140 mmHg systolisch und/oder 90 mmHg diastolisch, und einem Eiweißverlust von mehr als 300 mg im 24-Stunden-Sammelurin wurde die Diagnose *Präeklampsie* gestellt. Alternativ wurde auch eine Urinteststreifenuntersuchung mit einem mindestens zweifach positiven Nachweis einer Proteinausscheidung als Diagnosekriterium akzeptiert (Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group 2000).

Die Diagnosen *schwere Präeklampsie* oder *Pfropf-Präeklampsie* wurden entsprechend der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (siehe 2.1.1) definiert. Ein HELLP-Syndrom bestand nach geltender Definition bei dem gleichzeitigen Auftreten von Hämolyse, erhöhten Serum-Aminotransferasen und erniedrigter Thrombozytenzahl (Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group 2000). Keine der Frauen entwickelte eine Eklampsie.

3.3.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Patientinnen mit Präeklampsie

Einschlusskriterien

- Schwangere Frauen mit den klinischen Symptomen einer Präeklampsie/HELLP-Syndrom, die in der 24.-40. SSW zur stationären Überwachung eingewiesen werden
- Alter zwischen 18 und 45 Jahren
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung der Patientin

Ausschlusskriterien

- Jede weitere schwere akute oder chronische Erkrankung, die eine regelmäßige Medikamenteneinnahme erfordert. Ausnahmen: Hypertonie und Diabetes mellitus
- Bekannter Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenmissbrauch
- Mehrlingsschwangerschaft

Gesunde Kontrollen

Einschlusskriterien

- Klinisch gesunde schwangere Frauen mit normotonen Blutdruckwerten
- Alter zwischen 18 und 45 Jahren
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung der Patientin

Ausschlusskriterien

- Jede schwere akute oder chronische Erkrankung, die eine regelmäßige Medikamenteneinnahme erfordert. Ausnahmen: Hypertonie und Diabetes mellitus
- Bekannter Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenmissbrauch
- Mehrlingsschwangerschaft

3.4 Studienablauf

Von Dezember 2008 bis Dezember 2009 haben 18 Frauen mit Präeklampsie, die zur stationären Überwachung in das UKE eingewiesen worden waren und den Einschlusskriterien der Studie entsprachen sowie keine Ausschlusskriterien erfüllten, eingewilligt, an der Studie teilzunehmen. Allen Frauen wurde anschließend venöses Blut entnommen. Bei 16 der Frauen gelang zum Zeitpunkt der Geburt die Entnahme von mütterlichem Blut, Plazentagewebe und fetalem Blut aus der Nabelvene.

Bei stationärer Aufnahme einer erkrankten Patientin erfolgte zügig nach der Diagnosestellung der Präeklampsie die Aufklärung über die Studie. Mit Hilfe eines demografischen Fragebogens wurden das Alter der Patientin, der BMI vor Schwangerschaftsbeginn, Vorerkrankungen, vorangegangene Schwangerschaften und die Familienanamnese bezüglich der Präeklampsie ermittelt. Nach dem schriftlichen Einverständnis fand die erste Blutentnahme statt. Alle Patientinnen nahmen Methyldopa in unterschiedlicher Dosierung als blutdrucksenkendes Medikament ein.

Von 16 Patientinnen konnten Proben zum Zeitpunkt der Geburt entnommen werden (auswertbar waren 15 maternale Blutproben, 15 fetale Blutproben sowie 15 Plazentagewebeproben). Bei 13 Frauen wurde die Schwangerschaft operativ mit einer Sectio caesarea beendet, drei Frauen hatten vaginale Geburten. Neben einer mütterlichen Blutprobe wurde fetales venöses Nabelschnurblut entnommen sowie bis zu 10 Plazentagewebeproben aus nicht infarzierten Kotyledonen von unterschiedlichen Quadranten. Alle Blutproben wurden für 20 Minuten bei 2000 R/min und 4 °C zentrifugiert. Blutplasma und Blutkuchen wurden getrennt voneinander bis zum Beginn der experimentellen Phase in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Plazentagewebeproben wurden direkt nach der Entnahme aus der Plazenta in flüssigen Stickstoff überführt.

Zudem wurden im Verlauf der Studie venöse Blutentnahmen von 28 gesunden Kontrollen gesammelt (Auswahl entsprechend ihrem Alter, ihrem BMI vor Schwangerschaftsbeginn sowie der Anzahl ausgetragener Schwangerschaften). Bei 16 dieser Frauen wurde zum Zeitpunkt der Geburt mütterliches Blut, Plazentagewebe und venöses Nabelschnurblut entnommen. Wegen der Planbarkeit der Probengewinnung wurden insbesondere Frauen als Kontrollen in die Studie eingeschlossen, für die als Geburtsmodus die primäre Sectio caesarea geplant worden war. Die Indikationsstellung erfolgte dabei nicht aufgrund fetaler

oder maternaler Erkrankungen. 14 der 16 Frauen wurden operativ entbunden, zwei Frauen hatten vaginale Geburten. Alle entnommenen Proben wurden wie bereits beschrieben verarbeitet und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.5 Laborparameter

Die Routine-Laborparameter der mütterlichen Blutproben wurden im Labor des Instituts für Klinische Chemie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf ermittelt.

3.6 Messung von Dimethylargininen und L-Arginin im Plasma

3.6.1 Methode

Die mütterlichen und fetalen ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Plasmakonzentrationen wurden mit Hilfe der Flüssigchromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) ermittelt. Nach Butylierung der Plasmaproben liegen ADMA, SDMA und L-Arginin als entsprechende Ester vor, diese werden ohne vorherige Säulenchromatografie direkt in das Gerät eingeführt. Im *Electrospray-Interface* kommt es zur Ionisierung dieser Ester. Im ersten Massenfilter (Quadrupol) werden bestimmte Ionen selektiert, die in der Stoßzelle mit Argonmolekülen kollidieren und somit weiter fragmentiert werden. Bei diesem Vorgang entstehen typische Fragmente, die im zweiten Massenfilter selektiert werden können und die schließlich ein Signal erzeugen. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, innerhalb eines Laufes simultan ADMA, SDMA und L-Arginin zu erfassen. Durch Zusatz von internen deuterierten Standards (d6-ADMA und d7-L-Arginin) kann eine Quantifizierung erfolgen.

3.6.2 Durchführung

Die Blutproben wurden nach der Entnahme für 20 Minuten bei 2000 R/min und 4 °C zentrifugiert. Überstand und Blutkuchen wurden getrennt voneinander in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Bestimmungen der L-Arginin-, ADMA- und SDMA-Plasmakonzentrationen wurden die Plasmaproben kurz vor der Durchführung der Messung aufgetaut.

Die Stocklösung des internen Standards wurde auf Raumtemperatur gebracht und 1:1000 mit Methanol verdünnt. Eine *MultiScreen* 96well-Filterplatte wurde auf einer 96well-Unterplatte positioniert. Mit Hilfe einer Multipette wurden jeweils 100 µl verdünnter Standard in die Vertiefungen der 96well-Platte pipettiert. Nach Zugabe von jeweils 25 µl Kalibrierlösung beziehungsweise Blutplasma oder QC-Lösung (QC = *quality control* = Qualitätskontrolle) wurde die Platte bei Raumtemperatur 15 Minuten lang geschüttelt.

Die *MultiScreen* 96well-Platte wurde zusammen mit einer Polypropylenplatte in einer Plattenzentrifuge bei 2000 R/min 15 Minuten lang zentrifugiert, anschließend wurde die Polypropylenplatte unter dem Abzug auf den auf 75 °C erhitzten Heizblock gestellt, bis die gesamte Flüssigkeit verdampft war (etwa 30 Minuten). In jede Vertiefung wurden 100 µl butanolische Salzsäure pipettiert, anschließend wurde die Platte mit einer Abdeckmatte verschlossen und 30 Minuten lang auf den 65 °C warmen Heizblock gestellt. Im Anschluss daran wurde die Platte eine Minute lang bei 2500 R/min und 4 °C zentrifugiert. Die Abdeckmatte wurde unter dem Abzug wieder entfernt und die butanolische Salzsäure bei 75 °C auf der Heizplatte verdampft (etwa 60 Minuten). Nach anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Platte erneut mit einer Abdeckmatte verschlossen und bei -20 °C bis zur Messung gelagert.

Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden in jede Vertiefung der 96well-Platte 100 µl Methanol/Wasser (im Verhältnis 1:1) mit dem pH-Wert 5,0 pipettiert. Für das Lösen der Analyten wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Proben mit einer Mehrkanalpipette in eine neue 96well-Platte pipettiert und fünf Minuten lang bei 2000 R/min und 4 °C zentrifugiert. Die Messung auf dem *Varian L1200 MS/MS* Massenspektrometer erfolgte isokratisch mit den *HPLC Varian ProStar* Pumpen.

Die Berechnung der Plasmakonzentrationen erfolgte durch die *StarWorkstation*. Der Variationskoeffizient des *Assays* betrug etwa 3%, die Nachweisgrenze lag bei 0,05 µmol. Waren die Streuungen der QC-Proben größer als 20%, so wurde die Messung der Platte wiederholt.

3.7 Messung der Expression plazentarer Gene

Direkt im Anschluss an die Geburt der Plazenta wurden bis zu 10 Gewebeproben aus verschiedenen Kotyledonen aller Quadranten entnommen, diese waren frei von makroskopisch sichtbaren Veränderungen wie zum Beispiel Infarkten. Die Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verarbeitung asserviert.

3.7.1 Extraktion von Ribonukleinsäure aus dem Plazentagewebe

Die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) wurde entsprechend dem Protokoll des *miRNeasy Mini Kits* (AMBION, Inc., Austin, Texas, USA) durchgeführt.

Direkt nach der Entnahme von 50 mg gefrorenem Gewebe wurde dieses zusammen mit 700 µl *QIAzol Lysis Reagent* in ein passendes Gefäß gegeben und dort zerkleinert und mit Hilfe des *TissueLysers* homogenisiert. Das Homogenat wurde fünf Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 140 µl Chloroform wurde das Gefäß sicher verschlossen und 15 Sekunden lang durch starkes Schütteln gemischt. Nachdem das Homogenat erneut für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur ruhte, wurde es fünf Minuten lang bei 10.000 R/min und 4 °C zentrifugiert. Das Homogenat lag anschließend in drei Phasen vor: eine obere wässrige Phase mit RNA, eine weiße Interphase mit DNA und eine rötliche untere organische Phase mit Proteinen. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 525 µl Ethanol (100%) versetzt. Ethanol präzipitiert selektiv Nukleinsäuren. Diese Mischung wurde mit Hilfe einer Pipette mehrmals gemischt.

Anschließend wurden zügig 700 µl von der gelösten RNA auf eine *RNeasy Mini spin column* (in einem 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß) pipettiert. Nach vorsichtigem Verschließen wurde das Gefäß 15 Sekunden lang bei mehr als 10.000 R/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Wiederholung des Vorganges mit erneut 700 µl der gelösten RNA.

Nach Zugabe von 700 µl RTW-Puffer in die *RNeasy Mini spin column* wurde das Gefäß vorsichtig verschlossen und wiederholt 15 Sekunden lang bei 10.000 R/min und Raumtemperatur zentrifugiert, um die Säule zu waschen. Anschließend wurden 500 µl RPE-Puffer zugefügt und erneut 15 Sekunden lang bei 10.000 R/min und Raumtemperatur zentrifugiert, um die Säule weiter zu waschen. Es wurden nochmals 500 µl RPE-Puffer

zugefügt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur und 10.000 R/min zentrifugiert, um die Säule zu trocknen.

Nach dem Zentrifugieren wurde die Säule sehr vorsichtig aus dem Gefäß entnommen und in ein sauberes 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 30-50 µl RNase-freiem Wasser auf die Membran wurde das Gefäß vorsichtig verschlossen und für eine Minute bei mehr als 10.000 R/min zentrifugiert, um die gereinigte RNA in Lösung zu bringen.

3.7.2 Reverse Transkription der Ribonukleinsäure

Die Qualität der extrahierten RNA wurde in der Gel-Elektrophorese überprüft, dazu wurde 1% Agarosegel verwendet. Es wurden nur solche Proben verwendet, die zwei deutlich sichtbare ribosomale RNA-Banden aufwiesen (26 von 31 Gewebeproben).

Die reverse Transkription der extrahierten RNA in komplementäre DNA (*complementary DNA* = cDNA) wurde mit Hilfe des *RevertAid H Minus First Strand cDNA Kits* (MBI Fermentas Inc., Burlington, Kanada) durchgeführt. Das Kit nutzt eine Reverse Transkriptase (*RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase*) mit einer besonderen Eigenschaft: Durch eine Punktmutation des Enzyms wird ein Abbau der zu transkribierenden RNA durch RNasen komplett verhindert. Der rekombinante *RiboLock RNase Inhibitor* schützt die RNA nochmals vor vorzeitigem Abbau bis zu Temperaturen von 55 °C. Hexamer-Primer binden zufällig und unspezifisch an die RNA und schreiben diese in cDNA um.

Jeweils 1 µg RNA wurde in ein steriles, Nuklease-freies Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien in der genannten Reihenfolge hinzu pipettiert: 1 µl Hexamer-Primer, 10 µl Nuklease-freies Wasser, 4 µl Reaktionspuffer, 1 µl *RiboLock RNase Inhibitor*, 2 µl eines 10 mmol *dNtp Mix* und 1 µl *RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (200 U/µl). Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt und zentrifugiert, anschließend fünf Minuten lang bei 25 °C und dann 60 Minuten lang bei 42 °C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei mindestens -70 °C eingefroren.

3.7.3 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time PCR) der gewonnenen cDNA wurde entsprechend dem Protokoll des *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA) im *ABI PRISM 7900 HAT Thermocycler* durchgeführt. Für die Quantifizierung der cDNA wurden hochspezifische *TaqMan*-Sonden für DDAH1, DDAH2, PRMT1, eNOS, iNOS und GAPDH verwendet.

Die auf Eis aufgetauten Proben wurden vorsichtig geschüttelt und nach folgendem Schema jeweils in ein 1,5 ml Nuklease-freies Reaktionsgefäß pipettiert: 1 µl *TaqMan Gene Expression Assay*, 10 µl *TaqMan Gene Expression Master Mix*, 4 µl cDNA, 5 µl RNase-freies Wasser. Die entstandenen PCR-Reaktionsgemische wurden kurz zentrifugiert und anschließend jeweils 20 µl in die Vertiefungen einer 96well-Platte pipettiert. Im Anschluss an eine kurze Zentrifugation der fest verschlossenen Platte wurde diese in den *ABI PRISM 7900 HAT Thermocycler* gegeben und die Amplifikation und Quantifizierung der cDNA gestartet.

3.8 Messung der plazentaren DDAH-Aktivität

Die plazentare DDAH-Aktivität wurde mit Hilfe der Flüssigchromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS, siehe 3.6.1) ermittelt. Deuteriertes [$^{2}H_{6}$]-ADMA wurde als Substrat der DDAH eingesetzt, C13-markiertes deuteriertes [$^{13}C_{5}{}^{2}H_{6}$]-ADMA als interner Standard zur Quanitifizierung von [$^{2}H_{6}$]-ADMA.

Die Plazenta-Gewebeproben wurden in PBS-Pufferlösung homogenisiert und anschließend fünf Minuten lang bei mehr als 10.000 R/min und 4 °C zentrifugiert. 80 µl des Überstandes wurden zu 20 µl PBS-Puffer mit 50 µmol [$^{2}H_{6}$]-ADMA pipettiert und anschließend 60 Minuten lang bei 37 °C inkubiert.

Durch Zugabe von 100 µl in Methanol gelöstem internen Standard wurden die Reaktionen durch Präzipitation von Proteinen gestoppt. Nach Derivatisierung der Proben durch Zugabe von butanolischer Salzsäure wurden diese in der LC-MS/MS analysiert. Die DDAH-Aktivität wurde anhand der Abnahme der [$^{2}H_{6}$]-ADMA-Konzentration berechnet.

3.9 Angewandte statistische Verfahren

Die statistischen Analysen wurden mit *SPSS 17.0 für Windows* (SPSS Inc., Chicago, USA) und *Graph Pad Prism 5.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit *Graph Pad Prism 5.0* und *Word 2007 für Windows* (Microsoft Word Software, Redmond, USA) erstellt.

Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung oder als Median mit den 25% und 75% Perzentilen. Für die Vergleiche der Gruppen wurde bei parametrischen Daten der *T-Test*, bei nicht parametrischen Daten der *Mann-Whitney-U-Test* herangezogen. Kategorische Daten wurden mit dem *Chi-Quadrat-Test* verglichen. *Spearmans Rang-korrelationskoeffizienten* wurden herangezogen, um Zusammenhänge zwischen zwei jeweiligen Variablen zu bestimmen. Ein p-Wert von 0,05 wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Patientinnen

4.1.1 Patientinnencharakteristika

Entsprechend den Ein- und Ausschlusskriterien wurden in die vorliegende Studie 18 Frauen mit Präeklampsie sowie 28 gesunde Schwangere als Kontrollen eingeschlossen. Tabelle 4 zeigt die klinischen Charakteristika aller Frauen.

Tabelle 4. **Patientinnencharakteristika**. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert±Standardabweichung oder Median (25.-75. Perzentile). BMI = Body Mass Index, RR = Blutdruck nach Riva Rocci

	Kontrollen (n=28)	**Präeklampsie (n=18)**	**p**
Alter (Jahre)	31,7±5,30	31,9±6,20	0,89
BMI vor Schwangerschaft (kg/m²)	23,3±3,00	25,9±5,10	0,56
Nulliparität (n; %)	22 (81,5)	14 (77,8)	0,60
Proteinausscheidung im Urin (g/24 h)	Keine	3,90 (0,90-5,70)	
Kreatinin im Serum (mg/dl)	0,48±0,10	0,70±0,17	**<0,001**
RR systolisch (mmHg)	114,3±26,3	173,1±22,4	**<0,001**
RR diastolisch (mmHg)	70,5±17,7	107,6±12,6	**<0,001**
Gestationsalter bei erster Blutentnahme (Wochen)	36,6±3,50	33,9±3,30	**0,002**
Gestationsalter bei Geburt (Wochen)	39,0±1,00	35,0±3,50	**<0,001**
Geburtsgewicht (g)	3564±426	2216±945	**<0,001**
Gestationsalter-adjustiertes Geburtsgewicht (Perzentile)	58 (37-75)	15 (3-44)	**<0,001**

Bezüglich des Alters, des *Body Mass Index* und des prozentualen Anteils der Erstgebärenden bestanden zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Wie aufgrund der Diagnose zu erwarten, waren bei den Frauen mit Präeklampsie sowohl der systolische Blutdruck als auch der diastolische Blutdruck und die Proteinausscheidung signifikant höher

im Vergleich zu den Kontrollen. Der Entbindungstermin der Frauen mit Präeklampsie lag durchschnittlich fünf Wochen vor dem errechneten Geburtstermin, das gestationsalter-adjustierte Geburtsgewicht deutlich unter dem der Neugeborenen von gesunden Frauen. Die Kreatininserumkonzentration war bei den erkrankten Frauen zwar signifikant höher als bei den gesunden Schwangeren, lag jedoch noch im Normalbereich. Der Einschluss der Frauen mit Präeklampsie und damit der Zeitpunkt der ersten Blutentnahme lagen im Mittel 2,7 Wochen vor dem der Kontrollen.

4.1.2 Laborauswertung der Frauen mit Präeklampsie

Von den 18 Frauen mit Präeklampsie entwickelten 14 eine schwere Verlaufsform. Bei vier dieser 14 Patientinnen trat ein HELLP-Syndrom auf. Keine der Frauen entwickelte eine Eklampsie. Drei Patientinnen waren bereits in einer früheren Schwangerschaft an einer Präeklampsie erkrankt, vier Frauen wiesen eine positive Familienanamnese für das Auftreten einer Präeklampsie auf. Drei Frauen waren an einer Pfropf-Präeklampsie erkrankt, bei diesen war eine arterielle Hypertonie bereits vor Eintreten der Schwangerschaft diagnostiziert worden.

Bei den an HELLP-Syndrom erkrankten Frauen waren entsprechend der Definition dieses Symptomkomplexes folgende Laborwerte außerhalb des Referenzbereiches und signifikant verändert im Vergleich zu den Laborwerten der Frauen mit Präeklampsie ohne HELLP-Syndrom: Als Nachweis einer Hämolyse war das Haptoglobin bis an die Nachweisgrenze erniedrigt sowie die Laktatdehydrogenase (LDH) erhöht. Die Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) waren deutlich angestiegen, die Thrombozytenzahl zeigte sich deutlich erniedrigt. Als Parameter der extrinsischen und intrinsischen Blutgerinnung war die Prothrombinzeit niedriger und die Partielle Thromboplastinzeit etwas länger in der HELLP-Gruppe als in der Präeklampsie-Gruppe, lagen jedoch im Referenzbereich. Keine signifikanten Unterschiede fanden sich bezüglich der Kreatininkonzentration und der Harnstoffkonzentration. Die Ergebnisse der Laborauswertungen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. **Laborwerte der Frauen mit Präeklampsie**. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert±Standardabweichung oder Median (25.-75. Perzentile). Referenzwerte für Frauen gemäß der Normwerte der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. PE = Präeklampsie, ALT = Alanin-Aminotransferase, AST = Aspartat-Aminotransferase, LDH = Laktatdehydrogenase, PTT = Partielle Thromboplastinzeit

	PE ohne HELLP (n=14)	**HELLP-Syndrom (n=4)**	**Referenzwerte**
Kreatinin (mg/dl)	0,68±0,13	0,70±0,00	0,50-1,00
Harnstoff (mg/dl)	16,6±5,90	18,8±5,20	7,00-19,0
ALT (U/l)	15,5 (10,0-21,0)	260 (48,5-466)*	10,0-35,0
AST (U/l)	25,5 (21,3-35,3)	409 (81,5-786)*	10,0-35,0
LDH (U/l)	242 (190-263)	558 (295-1450)*	135-214
Haptoglobin (g/l)	1,06 (0,89-1,39)	0,20 (0,20-0,21)*	0,30-2,00
Quick (% des Standardwerts)	127±6,30	119±12,2*	80,0-130
PTT (s)	28,4±4,40	31,0±4,60	25,0-38,0
Thrombozyten (/nl)	192 (152-253)	110 (60,0-151)*	150-400

* $p \leq 0,05$

4.2 Dimethylarginine und L-Arginin im Plasma

4.2.1 Maternale Plasmakonzentrationen

Die Frauen mit Präeklampsie wiesen signifikant höhere ADMA- und SDMA-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen auf (Abbildung 6). Die L-Arginin-Plasmakonzentration war ebenfalls höher in der Präeklampsie-Gruppe, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Die Daten sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6. **Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin bei gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie**. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert± Standardabweichung.

	Kontrollen (n=28)	**Präeklampsie (n=18)**	**p**
ADMA maternal (µmol/l)	0,42±0,07	0,51±0,15	**0,005**
SDMA maternal (µmol/l)	0,44±0,10	0,59±0,16	**<0,001**
L-Arginin maternal (µmol/l)	43,2±12,9	49,2±19,7	0,16

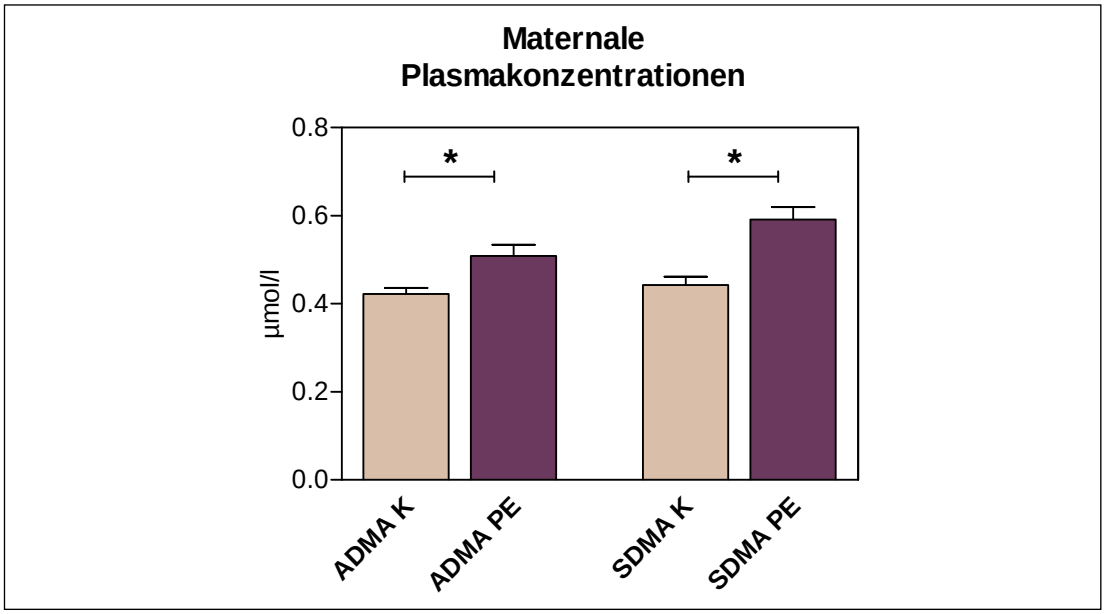

Abb. 6. **Plasmakonzentrationen von ADMA und SDMA bei gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie**. Gemessen in µmol/l. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert± Standardabweichung. K = Kontrollen, PE = Präeklampsie. * signifikant

In den Vergleichsgruppen *Präeklampsie-Patientinnen ohne HELLP-Syndrom* und *Präeklampsie-Patientinnen mit HELLP-Syndrom* waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ADMA-, SDMA- oder L-Arginin-Plasmakonzentrationen messbar (Tabelle 7).

Tabelle 7. **Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin bei Frauen mit Präeklampsie ohne HELLP-Syndrom und Frauen mit HELLP-Syndrom**. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert±Standardabweichung. PE = Präeklampsie

	PE ohne HELLP (n=14)	**HELLP-Syndrom (n=4)**	**p**
ADMA maternal (µmol/l)	0,52±0,15	0,46±0,11	0,42
SDMA maternal (µmol/l)	0,61±0,17	0,52±0,13	0,22
L-Arginin maternal (µmol/l)	47,94±18,94	54,72±24,05	0,46

4.2.2 Fetale Plasmakonzentrationen

Es wurden 16 Plasmaproben von Neugeborenen gesunder Frauen sowie 15 Plasmaproben von Neugeborenen von Frauen mit Präeklampsie untersucht. Die Messungen der aus der Nabelvene entnommenen Blutproben sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8. **Fetale Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin**. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert±Standardabweichung.

	Kontrollen (n=16)	**Präeklampsie (n=15)**	**p**
L-Arginin fetal (µmol/l)	82,3±22,2	67,6±26,8	0,11
ADMA fetal (µmol/l)	1,21±0,19	1,14±0,22	0,32
SDMA fetal (µmol/l)	1,38±0,28	1,51±0,28	0,39

Die fetalen Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin waren zwei- bis dreifach höher als die mütterlichen Plasmakonzentrationen (Abbildung 7). Zwischen den Neugeborenen gesunder Frauen und den Neugeborenen von Frauen mit Präeklampsie waren keine signifikanten Unterschiede messbar. Auch die Plasmakonzentrationen der Neugeborenen von an HELLP-Syndrom erkrankten Patientinnen unterschieden sich nicht signifikant von den anderen Neugeborenen bezüglich ADMA, SDMA oder L-Arginin (Daten nicht gezeigt).

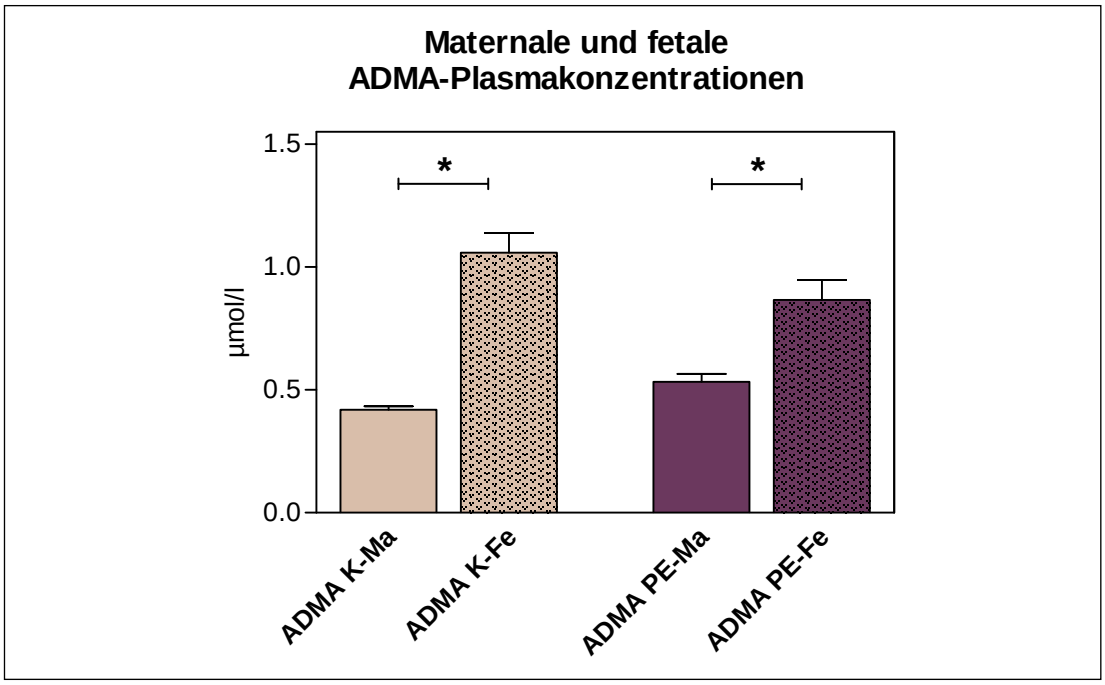

Abb. 7. **Maternale und fetale ADMA-Plasmakonzentrationen**. Gemessen in µmol/l. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert±Standardabweichung. K = Kontrollen, Fe = fetal, Ma = maternal, PE = Präeklampsie. * signifikant

4.2.3 Fetomaternale Konzentrationsgradienten

Der fetomaternale Konzentrationsgradient ist der Unterschied der Plasmakonzentration zwischen dem maternalen und fetalen Blut aus der Nabelvene. Die fetomaternalen Gradienten von ADMA und L-Arginin waren in der Präeklampsie-Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrollen. Der Gradient der SDMA-Plasmakonzentration war in beiden Gruppen gleich (Abbildung 8). In Tabelle 9 sind die Messergebnisse dargestellt.

Tabelle 9. **Fetomaternale Konzentrationsgradienten von ADMA, SDMA und L-Arginin**. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert±Standardabweichung.

	Kontrollen (n=16)	**Präeklampsie (n=15)**	**p**
Fetomaternaler ADMA-Gradient (µmol/l)	0,80±0,18	0,63±0,20	**0,02**
Fetomaternaler SDMA-Gradient (µmol/l)	0,91±0,23	0,91±0,39	0,95
Fetomaternaler L-Arginin-Gradient (µmol/l)	44,8±21,7	23,3±34,7	**<0,05**

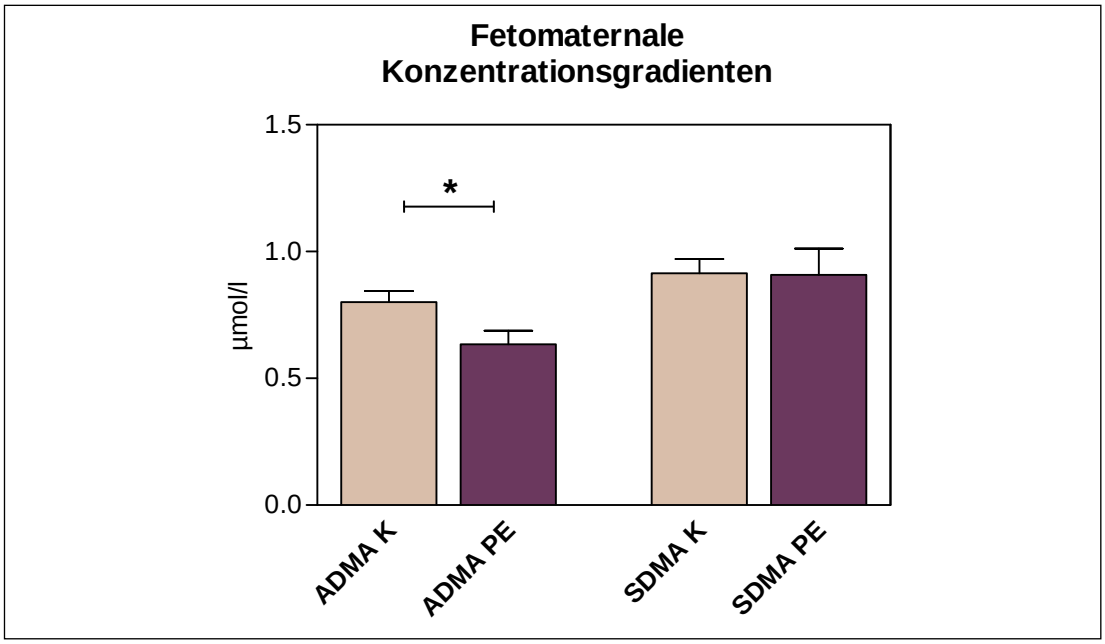

Abb. 8. **Fetomaternale Konzentrationsgradienten von ADMA und SDMA**. Gemessen in µmol/l. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert±Standardabweichung. K = Kontrollen, PE = Präeklampsie. * signifikant

4.3 Aktivität der plazentaren Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase

Die Aktivität der plazentaren Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase war bei den Frauen mit Präeklampsie signifikant niedriger im Vergleich zu der plazentaren DDAH-Aktivität gesunder Frauen. Nur bei drei von 15 Frauen konnte überhaupt Aktivität nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe war in 10 der 16 untersuchten Plazenten DDAH-Aktivität nachweisbar.

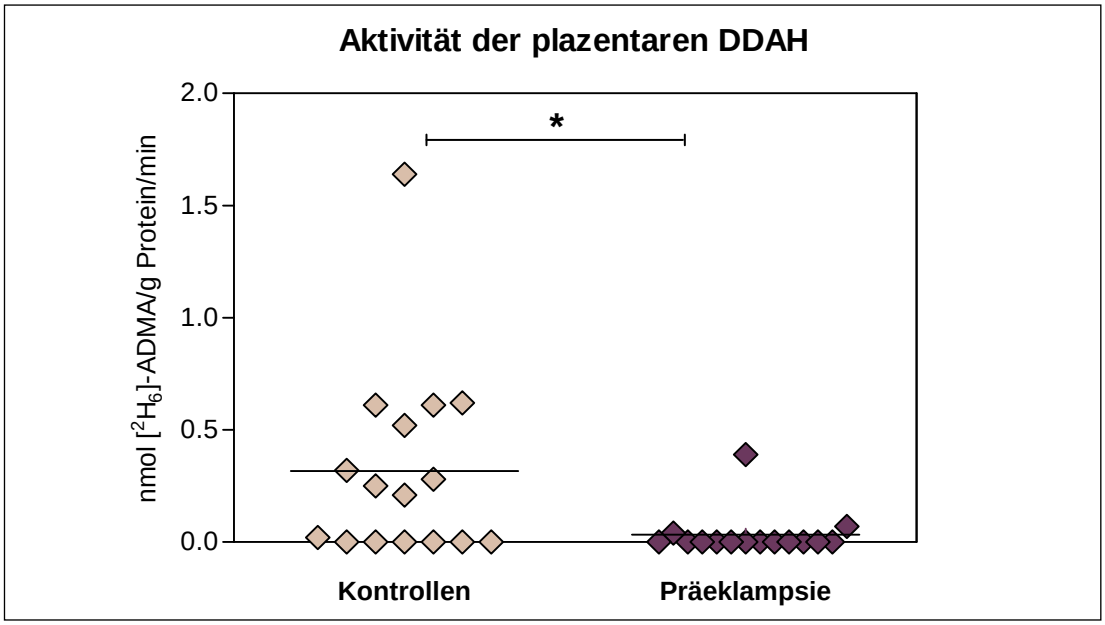

Abb. 9. **Aktivität der plazentaren Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase**. Gemessen in nmol [$^2H_6$]-ADMA/g Protein/Minute. * p=0,019

4.4 Expression plazentarer Gene

Die mRNA-Expression verschiedener plazentarer Gene wurde jeweils in Relation zur Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen. In beiden Gruppen wurde die Expression der DDAH1 und DDAH2, der PRMT1 sowie der eNOS und iNOS bestimmt.

Bei den Kontrollen waren die relativen mRNA-Expressionen der DDAH1, DDAH2, PRMT1 und der eNOS zehn- bis zwanzigmal niedriger als die der GAPDH, eine Expression der iNOS war nicht messbar.

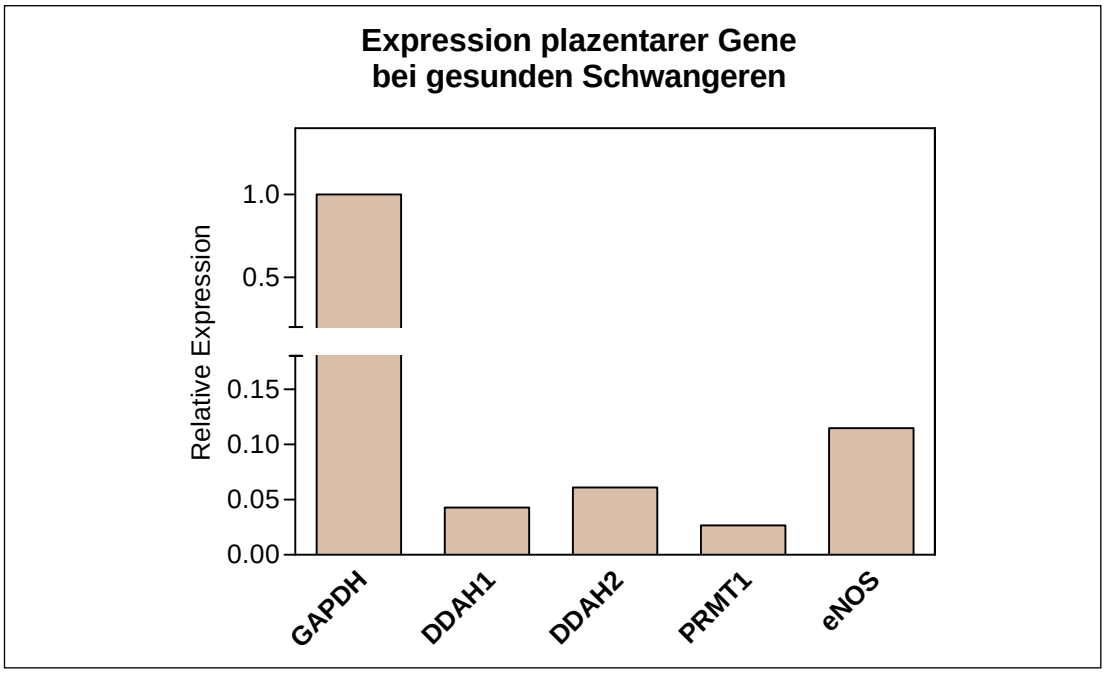

Abb. 10. **Expression der plazentaren DDAH1, DDAH2, PRMT1 und eNOS in Relation zur Expression der plazentaren GAPDH bei gesunden Schwangeren**.

In der Gruppe der Frauen mit Präeklampsie war die mittlere Expression der DDAH2 signifikant niedriger (38%) als bei den Kontrollen. Auch für die Expression der DDAH1 bestand ein ähnlicher, allerdings statistisch nicht signifikanter Trend. Keine signifikanten Unterschiede waren bezüglich der relativen mRNA-Expressionen der PRMT1 oder der eNOS nachweisbar.

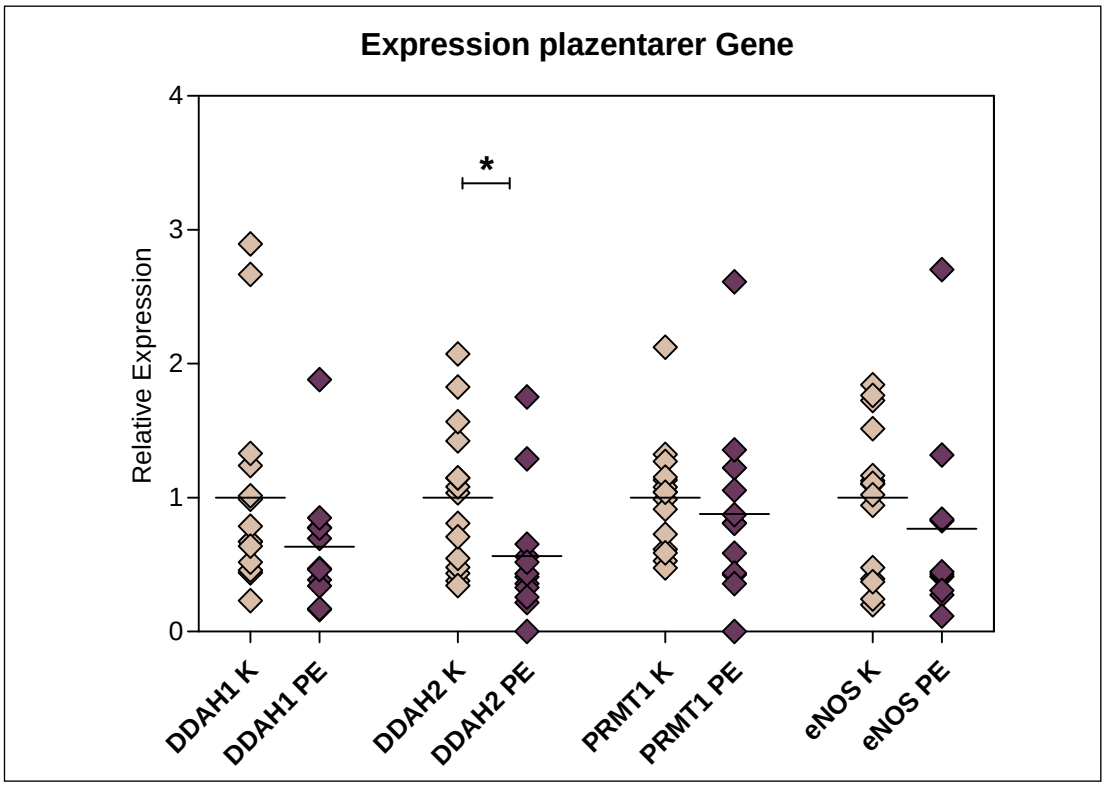

Abb. 11. **Relative Expression der plazentaren DDAH1, DDAH2, eNOS und PRMT1 bei Frauen mit Präeklampsie im Vergleich mit gesunden Kontrollen**. K = Kontrollen, PE = Präeklampsie. * p=0,04

4.5 Korrelationsanalysen

Innerhalb der Gruppe der Frauen mit Präeklampsie wurde die Korrelation der maternalen ADMA-Plasmakonzentration mit der DDAH-Expression sowie die Korrelation des fetomaternalen ADMA-Gradienten mit der DDAH-Expression bestimmt. Die Korrelation von sowohl der DDAH1-Expression als auch der DDAH2-Expression mit der maternalen ADMA-Plasmakonzentration (r=0,41; p=0,22 und r=-0,45; p=0,17) war moderat und nicht von statistischer Signifikanz. Auch die Korrelation der DDAH1-Expression mit dem fetomaternalen ADMA-Gradienten (r=0,35; p=0,32) war schwach und nicht signifikant. Die Korrelation von der plazentaren DDAH2-Expression und dem fetomaternalen ADMA-Gradienten (r=0,60; p=0,07; Abbildung 12) hingegen war deutlicher, erreichte jedoch ebenfalls nicht das von uns gewählte Signifikanzniveau.

Wegen der sehr geringen Anzahl von erkrankten Frauen, die überhaupt DDAH-Aktivität aufwiesen (n=3), wurde die plazentare DDAH-Aktivität nicht in die Korrelationsanalyse eingeschlossen.

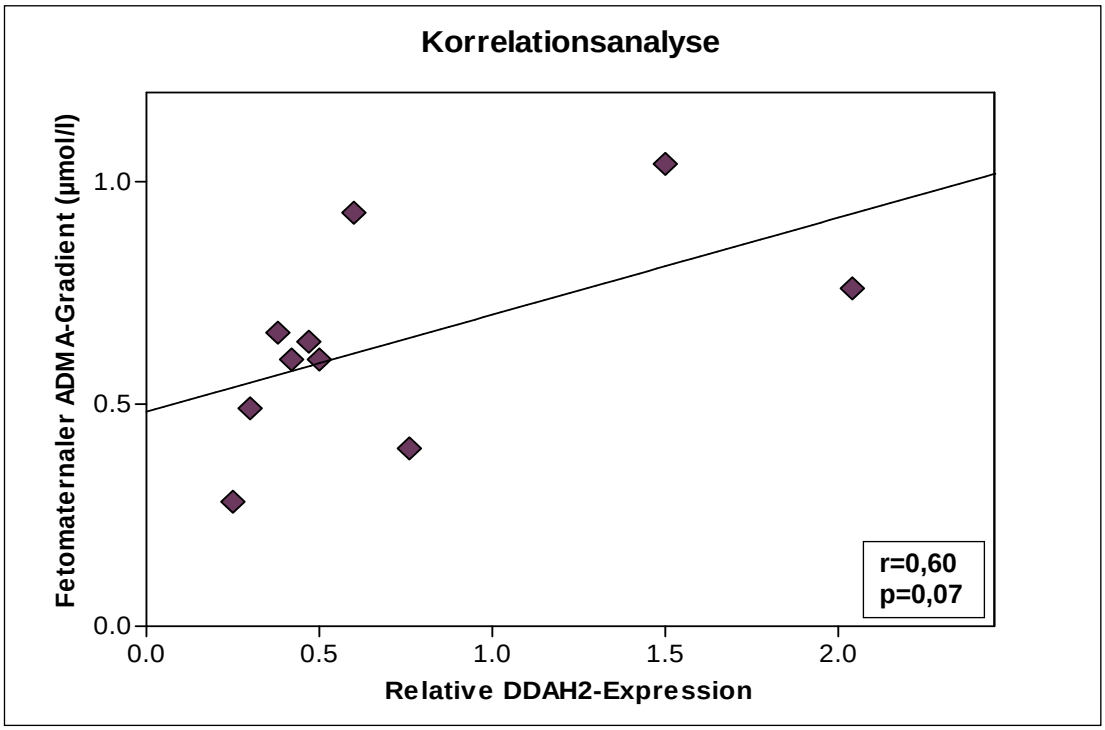

Abb. 12. **Korrelation der relativen DDAH2-Expression mit dem fetomaternalen ADMA-Gradienten bei Frauen mit Präeklampsie**. ADMA-Gradient gemessen in µmol/l.

5 Diskussion

Die Präeklampsie ist eine häufige, teilweise sehr schwer verlaufende Erkrankung, über deren Pathogenese bislang nur wenig bekannt ist. Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob und inwieweit bei Frauen mit Präeklampsie ein Zusammenhang besteht zwischen der Plasmakonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) und der Aktivität oder Expression der plazentaren Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH). Die entscheidenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

- Die Frauen mit Präeklampsie wiesen im Vergleich zu gesunden Schwangeren eine höhere ADMA-Plasmakonzentration auf.
- Die Aktivität der plazentaren DDAH war bei Frauen mit Präeklampsie niedriger als bei gesunden Schwangeren.
- Die Expression der plazentaren DDAH2 war bei Frauen mit Präeklampsie niedriger als bei gesunden Schwangeren.

5.1 Höhere Dimethylarginin-Plasmakonzentrationen bei Frauen mit Präeklampsie

In unserer Studie wiesen Frauen mit Präeklampsie höhere ADMA-Plasmakonzentrationen auf als gesunde Schwangere. Dies stimmt mit den Ergebnissen zahlreicher anderer klinischen Studien überein (Fickling et al. 1993; Holden et al. 1998; Speer et al. 2008; Braekke et al. 2009). Da bereits eine sehr geringe Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration um 0,1 µmol/l in populationsbasierten Studien mit einer erhöhten Rate von kardiovaskulären Ereignissen einhergeht (Böger et al. 2009), können wir annehmen, dass der von uns nachgewiesene Unterschied der ADMA-Plasmakonzentration in diesen beiden Gruppen klinisch bedeutsam ist. Zudem war bei den erkrankten Frauen die Plasmakonzentration des Symmetrischen Dimethylarginins (SDMA) höher als bei den gesunden Schwangeren.

In den Vergleichsgruppen *Präeklampsie-Patientinnen ohne HELLP-Syndrom* und *Präeklampsie-Patientinnen mit HELLP-Syndrom* war kein signifikanter Unterschied

bezüglich der ADMA-Plasmakonzentration messbar. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Ellis et al. (2001). Die Höhe der ADMA-Plasmakonzentration korrelierte in dieser Studie mit der Schwere der Präeklampsie. Die kleine Fallzahl in unserer Studie erlaubt jedoch keine Rückschlüsse aus einer Subgruppenanalyse innerhalb der Gruppe der Frauen mit Präeklampsie, so dass wir keine Aussage darüber treffen können, inwiefern bei den von uns untersuchten Frauen die Höhe der ADMA-Plasmakonzentration mit der Schwere der Erkrankung korreliert.

Eine mögliche Ursache der Erhöhung von sowohl ADMA als auch SDMA ist die vermehrte Produktion von Dimethylargininen durch eine vermehrte Aktivität der Protein-N-Arginin-Methyltransferasen (PRMT, siehe Kapitel 2.3.3). PRMTs katalysieren die Synthese von ADMA, wobei die PRMT1 für den überwiegenden Anteil (circa 85%) der gesamten PRMT-Aktivität verantwortlich ist (Bedford und Clarke 2009). Im Plazentagewebe beider Gruppen konnte kein Unterschied der Expressionsrate des entsprechenden PRMT1-Gens nachgewiesen werden, die höhere ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie hat demnach vermutlich andere Ursachen.

Eine andere mögliche Ursache einer erhöhten Plasmakonzentration von Dimethylargininen ist eine eingeschränkte Nierenfunktion (Vallance et al. 1992). Für ADMA gilt, dass es zu etwa 80% enzymatisch abgebaut wird. SDMA hingegen wird beinahe ausschließlich renal ausgeschieden, so dass auch eine leichte Einschränkung der Nierenfunktion zu einer Erhöhung der SDMA-Plasmakonzentration führen kann (Zoccali et al. 2001). Bei den Frauen mit Präeklampsie lag die Kreatinin-Konzentration als indirekter Parameter der Nierenfunktion zwar im Referenzbereich, war jedoch signifikant höher als bei den gesunden Frauen. Dies könnte ein Hinweis auf eine leichte Einschränkung der Nierenfunktion und somit eine Ursache der höheren SDMA-Plasmakonzentration bei diesen Patientinnen sein.

Wir können nicht ganz ausschließen, dass auch die erhöhte ADMA-Plasmakonzentration bei den Frauen mit Präeklampsie mit einer eingeschränkten Nierenfunktion zusammenhing, wenn auch der weitaus größere Anteil enzymatisch abgebaut wird. Allerdings war die Korrelation von der ADMA-Plasmakonzentration mit der Kreatininkonzentration bei den erkrankten Frauen schwach und nicht signifikant ($r=0,23$; $p=0,27$).

5.2 Verminderte Aktivität der plazentaren Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase bei Frauen mit Präeklampsie

5.2.1 Direkter Nachweis der verminderten Aktivität und Expression der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase im Plazentagewebe

Bei den Neugeborenen sowohl gesunder Frauen als auch von Frauen mit Präeklampsie wurden bis zu dreifach höhere ADMA-Plasmakonzentrationen als bei deren Müttern nachgewiesen (eigene Daten, Braekke et al. 2009). Gesunde Schwangere weisen niedrigere ADMA-Plasmakonzentrationen auf als Frauen mit Präeklampsie und auch als nichtschwangere Frauen (Holden et al. 1998). Dies könnten Hinweise darauf sein, dass die Plazenta in einer gesunden Schwangerschaft eine wichtige Rolle spielt, um die hohe fetale ADMA-Plasmakonzentration zu reduzieren und somit eine niedrige mütterliche ADMA-Plasmakonzentration während der Schwangerschaft sicherzustellen. Dafür verantwortlich könnte die plazentare DDAH sein: Bei einer verminderten lokalen Aktivität bei Präeklampsie würde dann bei unveränderter fetaler ADMA-Plasmakonzentration eine erhöhte ADMA-Plasmakonzentration der betroffenen Frau resultieren.

Savvidou et al. (2003) stellten ebenfalls die Hypothese auf, dass eine mögliche Ursache der erhöhten ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie eine eingeschränkte Aktivität der plazentaren DDAH sein könnte. Sie hatten zuvor gezeigt, dass bei Frauen, die zu einem späteren Zeitpunkt eine Präeklampsie entwickelten, eine erhöhte ADMA-Plasmakonzentration und Endotheldysfunktion schon vor Auftreten klinischer Symptome nachweisbar waren.

Die Aktivität der plazentaren DDAH hängt sowohl von der eigentlichen Aktivität dieses Enzyms als auch von der Expressionsrate des entsprechenden Gens im Plazentagewebe ab. Unsere Messungen ergaben eine niedrigere Aktivität der plazentaren DDAH bei den Frauen mit Präeklampsie als bei den gesunden Frauen. Zudem wiesen die Frauen mit Präeklampsie niedrigere plazentare Expressionsraten der DDAH1 und DDAH2 als gesunde Schwangere auf. Nur der Unterschied der DDAH2-Expression erreichte statistische Signifikanz, jedoch wird von dieser Isoform des Enzyms angenommen, dass sie die dominierende Form in der Plazenta darstellt (Leiper et al. 1999). Die relativen Expressionsraten der PRMT1 und der eNOS unterschieden sich nicht signifikant in den beiden Gruppen.

Unsere Ergebnisse bestätigen somit unsere Arbeitshypothese: Eine mögliche Ursache für die höhere ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie könnte die verminderte Aktivität und/oder Expression der plazentaren DDAH sein. Bisherige Studien sind diesbezüglich widersprüchlich.

Siroen et al. (2006) konnten weder einen signifikanten Unterschied der ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie und gesunden Schwangeren feststellen, noch einen Unterschied der Aktivität der plazentaren DDAH in diesen beiden Gruppen. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen unserer Studie könnte in der Auswahl der erkrankten Patientinnen gelegen haben: Die Anzahl der untersuchten Frauen war klein, außerdem wurden die Messergebnisse der Frauen mit Präeklampsie mit HELLP-Syndrom und die der ohne HELLP-Syndrom getrennt voneinander bewertet. In unserer Studie haben wir Frauen mit Präeklampsie mit und ohne HELLP-Syndrom als eine Gruppe betrachtet. Außerdem litten die Frauen mit Präeklampsie in unserer Studie zu einem überwiegenden Anteil an einer schweren Verlaufsform.

Andere Autoren haben einen Zusammenhang von dem Vorhandensein von bestimmten *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) der DDAH1 und der Präeklampsie nachgewiesen (Akbar et al. 2005). Sie bestätigen damit unsere Ergebnisse und Hypothese, dass die höhere ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie mit einer veränderten Leistung der DDAH zusammenhängen könnte. Leider war die Studie retrospektiv, es wurde kein plazentares Gewebe zur Genanalyse verwendet. Außerdem wurde die ADMA-Plasmakonzentration während der Schwangerschaft nicht bestimmt.

5.2.2 Verminderter fetomaternaler Konzentrationsgradient von Asymmetrischem Dimethylarginin

Da wir die Aktivität und Expression der DDAH im plazentaren Gewebe erst nach der Geburt *ex vivo* messen konnten, haben wir zusätzlich den fetomaternalen Konzentrationsgradienten von ADMA bestimmt. Dieser ergibt sich aus den unterschiedlichen ADMA-Plasmakonzentrationen im fetalen Blut aus der Nabelvene und im mütterlichen Blut als indirekter Hinweis auf die plazentare ADMA-Metabolisierung *in vivo*.

In unserer Studie war bei den Frauen mit Präeklampsie der fetomaternale ADMA-Konzentrationsgradient signifikant niedriger als in der Kontroll-Gruppe, dies könnte für eine geringere ADMA-Metabolisierung in der Plazenta sprechen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass der Konzentrationsgradient für SDMA gleich war bei den Frauen mit Präeklampsie und gesunden Schwangeren. SDMA wird nicht durch die DDAH abgebaut, sondern renal ausgeschieden, so dass eine verminderte Leistung der plazentaren DDAH keinen Einfluss auf den fetomaternalen SDMA-Konzentrations-gradienten haben kann.

5.3 Hohe Konzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin im Nabelschnurblut aller Feten

Unsere Messungen ergaben zwei- bis dreifach höhere fetale Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin im Vergleich zu den mütterlichen Blutproben. Zwischen den Neugeborenen gesunder Frauen und denen von Frauen mit Präeklampsie waren keine signifikanten Unterschiede messbar. Auch die Plasmakonzentrationen der Neugeborenen von an HELLP-Syndrom erkrankten Patientinnen unterschieden sich nicht signifikant von den anderen Neugeborenen bezüglich ADMA, SDMA oder L-Arginin. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe überein (Braekke et al. 2009).

Da auch Neugeborene von Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft eine mehrfach höhere ADMA-Plasmakonzentration aufweisen als deren Mütter und auch als gesunde Schwangere unmittelbar vor der Geburt (Maeda et al. 2003; Tsukahara et al. 2008), kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration im fetalen Kreislauf physiologisch ist. Verschiedene Autoren vermuten, dass ADMA eine zentrale Rolle spielt in der Aufrechterhaltung des fetalen Gefäßtonus und der unter der Geburt stattfindenden Umstellung vom fetalen zum neonatalen Blutkreislauf (Vida et al. 2007; Tsukahara et al. 2008).

5.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

5.4.1 Asymmetrisches Dimethylarginin und Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase: Verwendbarkeit als Prädiktoren der Präeklampsie

2004 postulierte die *Word Health Organization* (WHO) in einem Review, dass es zu dieser Zeit weder in Niedrigrisiko- noch in Hochrisiko-Gruppen ein klinisch brauchbares Screening gab, das zur Prädiktion der Entwicklung einer Präeklampsie geeignet war (Conde-Agudelo et al. 2004).

Die frühzeitige Prädiktion einer Präeklampsie ist außerordentlich wichtig, da dies eine besonders engmaschige Überwachung der Schwangeren und ihres Fetus schon in der frühen Schwangerschaft zulassen würde. Eine optimale Blutdruckeinstellung könnte dann bereits bei den ersten Anzeichen eines steigenden arteriellen Blutdruckes erfolgen und schwere Komplikationen könnten auf diese Weise vermieden werden. Außerdem profitieren Frauen mit erhöhtem Präeklampsie-Risiko von einer Behandlung mit Acetylsalicylsäure (ASS) in einer Dosierung von 50-150 mg pro Tag (Bujold et al. 2010). Dieser Effekt könnte möglicherweise mit einer positiven Beeinflussung von ADMA durch ASS zusammenhängen: Deng et al. (2004) konnten im Tiermodell nach einer LDL-Injektion eine verminderte Acetylcholin-abhängige Vasodilatation als Zeichen einer Endotheldysfunktion nachweisen, gleichzeitig wurde eine Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration gemessen. Sowohl die Zunahme der ADMA-Plasmakonzentration als auch die Abnahme der endothelabhängigen Vasodilatation fielen geringer aus, wenn vor der LDL-Injektion eine ASS-Gabe stattfand.

Giguère et al. (2011) haben aktuell verschiedene biochemische Marker und sonographische Untersuchungen, von denen diskutiert wird, dass sie zukünftig die Entwicklung einer Präeklampsie vorhersagen könnten, alleine und in Kombination verwendet ausgewertet. Die meisten Studien untersuchten die biochemischen Marker Humanes Choriongonadotropin (hCG), Inhibin A, sFlt-1 (*soluble fms-like tyrosine kinase 1* = löslicher Rezeptor für den VEGF = *vascular endothelial growth factor*), Alpha-Fetoprotein (AFP), Activin A, PAPP-A (*pregnancy-associated plasma protein A* = schwangerschaftsassoziiertes Plasmaprotein A) und PlGF (*placental growth factor* = plazentarer Wachstumsfaktor). Der sonographisch messbare Doppler-Pulsatilitäts-Index (PI) der Arteriae uterinae wurde ebenfalls sehr häufig untersucht. In Niedrigrisiko-Gruppen war mit einer Kombination aus biochemischen

Markern eine Prädiktion im ersten Trimenon oder im frühen zweiten Trimenon mit einer Sensitivität von 60-80% und einer Spezifität von 80% möglich (PP13 (*placental protein 13*), PAPP-A, ADAM12 (*a disintegrin and metalloprotease-12*), Activin A oder Inhibin A). In einer einzigen Hochrisiko-Gruppe gelang die Vorhersagewahrscheinlichkeit schwerer Verläufe der Präeklampsie mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von 90%, dazu wurden das PP13 im Serum und der PI der uterinen Arterien im ersten Trimester der Schwangerschaft bestimmt (Giguère et al. 2011). Im Review von Giguère et al. (2011) wurde keine Studie, die sich mit der DDAH befasste, berücksichtigt und lediglich eine Studie, in der ADMA als klinisch anwendbarer Prädiktor der Präeklampsie untersucht wurde: Die ADMA-Plasmakonzentration wurde in zwei Gruppen gemessen, bei Frauen mit erhöhtem PI in der Dopplersonografie der uterinen Arterien als Risikofaktor der Entwicklung einer Präeklampsie, und bei solchen Frauen mit normalem PI. Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der ADMA-Plasmakonzentration messbar. Allerdings entwickelten nur drei der 20 Frauen mit hohem PI eine Präeklampsie, so dass keine Aussage über den Zusammenhang von ADMA und der Präeklampsie getroffen werden konnte (Prefumo et al. 2008).

Die Ergebnisse unserer Studie lassen einen Zusammenhang von verminderter DDAH-Aktivität und-Expression und erhöhter ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie vermuten. Sollten sich diese Veränderungen bereits in frühen Stadien nachweisen lassen, wären ADMA und DDAH zukünftig denkbare Prädiktoren der Präeklampsie in der Frühschwangerschaft. Weitere umfangreiche Studien, in der eine wesentlich größere Anzahl von Frauen schon von der frühen Schwangerschaft an untersucht wird, werden nötig sein, um eine endgültige Aussage über die Zusammenhänge von DDAH, ADMA und dem Auftreten der Präeklampsie treffen zu können.

5.4.2 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase als pharmakologisches Ziel in der Therapie der Präeklampsie

Leiper und Nandi (2011) haben sich kürzlich mit dem therapeutischen Potential von ADMA und der DDAH befasst: Im Maus-Modell führte das Fehlen eines DDAH1-Allels zu einer Reduktion der DDAH-Aktivität um 40-45% und zu einer Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration um 20%. Die NO-vermittelten Effekte waren eingeschränkt, es resultierte eine Endotheldysfunktion sowie ein erhöhter systemischer Gefäßwiderstand und

arterieller Blutdruck. Die Autoren vermuteten, dass diese Effekte bei Erkrankungen mit exzessiver NO-Freisetzung, wie zum Beispiel im septischen Schock, therapeutisch genutzt werden könnten (Leiper et al. 2007).

In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression des DDAH2-Gens zu einer Besserung der Endotheldysfunktion in Aorten von diabetischen Ratten führte. Außerdem konnten die Veränderungen der endothelialen DDAH-, ADMA- und NO-Konzentrationen, die durch die Induktion einer Hyperglykämie in diesen Zellen entstanden waren, positiv beeinflusst werden. Die Autoren vermuteten, dass die Modulation des DDAH2-Gens in Endothelzellen zukünftig als Therapie der Endotheldysfunktion genutzt werden könnte (Lu et al. 2010).

Eine Reihe verschiedener klinisch gebräuchlicher Medikamente hat Einfluss auf die DDAH-Expression oder -Aktivität und damit auf die ADMA-Plasmakonzentration und die NO-Bioverfügbarkeit. Eine Übersicht ist in Tabelle 10 dargestellt. Diese Studien bestätigen die Hypothese, dass die Modulation der DDAH therapeutisch genutzt werden könnte, um verschiedenste mit Endotheldysfunktion assoziierte Erkrankungen günstig zu beeinflussen. Sollte sich bestätigen, dass eine verminderte Leistung der plazentaren DDAH Anteil an der Entwicklung der Präeklampsie hat, könnte die Modulation der DDAH möglicherweise eine Therapieoption dieser Erkrankung sein. Bislang sind jedoch keine Medikamente entwickelt worden, die spezifisch die DDAH modulieren, so dass weitere Studien abzuwarten sind.

Tabelle 10. **Klinisch gebräuchliche Medikamente und ihre Wirkung auf die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase**. Modifiziert nach Leiper und Nandi (2011). DDAH = Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, ADMA-PK = Asymmetrische Dimethylarginin-Plasmakonzentration, NO = Stickstoffmonoxid, PPARγ-L. = Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-gamma-Ligand, TAH = Thrombozytenaggregationshemmer, BB = Beta-blocker = β_1-Adrenorezeptorenantagonist, SHR = spontan hypertensive Ratten, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

Präparat	Spezies/ Gewebe	DDAH	ADMA-PK	NO-Synthase	Quelle
Pioglitazon (PPARγ-L.)	Ratten	DDAH2-Expression ↑	↓	NO-Urinexkretion ↑	(Wakino et al. 2005)
Aspirin (TAH)	Ratten-Aorta	DDAH-Aktivität ↑	↓	nicht beschrieben	(Deng et al. 2004)
Nebivolol (BB)	SHR	DDAH2-Expression ↑	↓	eNOS-Expression ↑	(Wang et al. 2011)

5.5 Limitationen der Studie

5.5.1 Patientinnenauswahl

Die Größe der gewählten Gruppen – Frauen mit Präeklampsie versus gesunde Schwangere – war mit 18 erkrankten beziehungsweise 28 gesunden Frauen klein, eine generalisierte Schlussfolgerung unserer Ergebnisse ist folglich schwierig.

Die Frauen beider Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich verschiedener präexistenter Risikofaktoren für das Auftreten einer Präeklampsie (Alter, BMI, Nulliparität) und eigneten sich somit für einen Vergleich. Andere Risikofaktoren waren jedoch nur in der Präeklampsie-Gruppe vorhanden: Drei Frauen waren bereits vor Eintritt der Schwangerschaft an einer arteriellen Hypertonie erkrankt, eine Patientin hatte einen Myokardinfarkt vor dem 30. Lebensjahr erlitten. Das Vorliegen dieser klinischen Parameter könnte bei den betreffenden Frauen auch schon vor der Entwicklung der Präeklampsie mit einer erhöhten ADMA-Plasmakonzentration einhergegangen sein (Böger 2004).

Von den 18 Frauen mit Präeklampsie entwickelten 14 eine schwere Verlaufsform. Bei vier dieser 14 Patientinnen trat ein HELLP-Syndrom auf. Bei den Ergebnisvergleichen wurden alle Frauen mit Präeklampsie berücksichtigt und als eine Gruppe der Kontroll-Gruppe gegenübergestellt. Diese Verteilung von mild und schwer erkrankten Frauen entspricht nicht der klinischen Realität (Kuklina et al. 2009).

5.5.2 Probengewinnung

Die Gewebeentnahmen aus der Plazenta fanden nach Abnabelung des Kindes und außerhalb des Uterus, also nach Unterbrechung der mütterlichen Blutzufuhr statt. Dies könnte Einfluss auf die Qualität und Intaktheit des Gewebes gehabt haben. Alle Plazenten wurden deshalb makroskopisch untersucht und die Proben wurden nur aus Kotyledonen entnommen, die frei von sichtbaren Infarkten oder Verkalkungen waren. Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme zügig in flüssigen Stickstoff überführt. Die Qualität der aus dem Gewebe gewonnenen RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. In die statistischen Analysen gingen nur Messergebnisse von Gewebeproben mit hoher RNA-Qualität ein.

5.5.3 Ergebnisauswertung

Wir können nicht ganz ausschließen, dass die erhöhte ADMA-Plasmakonzentration bei den Frauen mit Präeklampsie mit einer eingeschränkten Nierenfunktion bei diesen Frauen zusammenhing, auch wenn die Korrelation der ADMA-Plasmakonzentration mit der Kreatininkonzentration bei den erkrankten Frauen schwach und nicht signifikant war (r=0,23; p=0,27; siehe auch 5.1).

Die Bestimmung der Korrelation der DDAH-Aktivität mit der ADMA-Plasmakonzentration bei den erkrankten Frauen war aufgrund der geringen Anzahl von Frauen mit nachweisbarer DDAH-Aktivität (n=3) nicht sinnvoll möglich. In der Gruppe der Frauen mit Präeklampsie waren sowohl die mittlere Expression der DDAH1 als auch die der DDAH2 niedriger als bei den Kontrollen, jedoch erreichte nur der Unterschied der DDAH2-Expression statistische Signifikanz. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht nur die Einschränkung der plazentaren DDAH-Aktivität, sondern auch die Einschränkung der DDAH in anderen Geweben die Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie bewirkt.

5.6 Zusammenfassende Bewertung

Wir konnten die Ergebnisse einiger anderer Studien bestätigen und nachweisen, dass Frauen mit Präeklampsie eine signifikant höhere ADMA-Plasmakonzentration aufweisen als gesunde Schwangere. Unsere Arbeitshypothese war die Annahme, dass eine Beeinträchtigung der plazentaren DDAH-Aktivität oder eine verminderte Expression dieses Enzyms eine mögliche Ursache für die erhöhte ADMA-Plasmakonzentration bei diesen Frauen sein könnte. Wir konnten außerdem bestätigen, dass die Frauen mit Präeklampsie in unserer Studie sowohl eine niedrigere Aktivität der plazentaren DDAH als auch eine niedrigere Expression der plazentaren DDAH2 aufwiesen als die gesunden Kontrollen.

Letztlich können wir jedoch anhand unserer Querschnitt-Studie keine Aussage über die Kausalität der verminderten DDAH-Aktivität und -Expression und der Entwicklung der Präeklampsie bei unseren Patientinnen treffen. Größere longitudinale Studien, die Frauen mit erhöhtem Präeklampsie-Risiko von Beginn der Schwangerschaft an begleiten, wären dafür nötig. Das Auftreten einer erhöhten ADMA-Plasmakonzentration sowie einer verminderten

Aktivität der plazentaren DDAH bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome würden unsere Annahme weiter bestätigen. Während der Schwangerschaft sind Gewebeentnahmen aus der Plazenta zu Studienzwecken nicht vertretbar, die endgültige Bestätigung unserer Hypothese, dass in erster Linie die DDAH-Aktivität und -Expression in der Plazenta vermindert sind und in der Folge die ADMA-Plasmakonzentration steigt und damit die Symptome der Präeklampsie verursacht, gestaltet sich dadurch schwierig.

6 Zusammenfassung

Präeklampsie ist eine schwangerschaftsinduzierte Erkrankung noch weitgehend unklarer Ätiologie und stellt weltweit eine der Hauptursachen maternaler und perinataler Mortalität dar. Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthese und mit Endotheldysfunktion assoziiert. ADMA wird hauptsächlich von der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut, welche auch in der Plazenta exprimiert wird. Frauen mit Präeklampsie weisen eine höhere ADMA-Plasmakonzentration auf als gesunde Schwangere. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob bei Präeklampsie ein Zusammenhang besteht zwischen der erhöhten ADMA-Plasmakonzentration und einer als möglichen Ursache in Frage kommenden eingeschränkten Leistung der plazentaren DDAH, haben wir die Aktivität und Expression dieses Enzyms in Plazentagewebeproben von Frauen mit Präeklampsie und gesunden Schwangeren untersucht.

In venösen Blutproben von 18 Frauen mit Präeklampsie und 28 gesunden Schwangeren wurde die ADMA-Plasmakonzentration mit der LC-MS/MS gemessen. In Plazentagewebeproben von 15 Frauen mit Präeklampsie sowie 16 gesunden Schwangeren wurde die DDAH-Aktivität mit der LC-MS/MS durch Messung von deuteriertem [$^2H_6$]-ADMA als Substrat der DDAH bestimmt. Zudem wurde mit der RT-PCR die mRNA-Expression verschiedener Gene gemessen (DDAH1, DDAH2, endotheliale und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase und Protein-N-Arginin-Methyltransferase 1).

Frauen mit Präeklampsie wiesen eine höhere ADMA-Plasmakonzentration auf als gesunde Schwangere. Eine plazentare DDAH-Aktivität war bei den erkrankten Frauen im Gegensatz zu den gesunden kaum nachweisbar. Außerdem war bei Frauen mit Präeklampsie die Expression der plazentaren DDAH2 signifikant niedriger. Die Expression der plazentaren PRMT1 hingegen war in beiden Gruppen gleich. Der fetomaternale ADMA-Gradient, der Unterschied der maternalen und fetalen ADMA-Plasmakonzentrationen, war bei den erkrankten Frauen ebenfalls geringer als bei den gesunden. Die Korrelation der DDAH1- und DDAH2-Expression mit der maternalen ADMA-Plasmakonzentration war schwach, stärker war die Korrelation der DDAH2-Expression mit dem fetomaternalen ADMA-Gradienten.

Die eingeschränkte Aktivität und Expression der plazentaren DDAH könnte mit der erhöhten ADMA-Plasmakonzentration bei den von uns untersuchten Frauen mit Präeklampsie zusammenhängen. Sollte diesbezüglich ein kausaler Zusammenhang nachgewiesen werden, könnte die Modulation der DDAH eine zukünftige Therapieoption dieser Erkrankung sein.

7 Literaturverzeichnis

1. Abhary S, Burdon KP, Kuot A, Javadiyan S, Whiting MJ, Kasmeridis N et al. (2010) Sequence variation in DDAH1 and DDAH2 genes is strongly and additively associated with serum ADMA concentrations in individuals with type 2 diabetes. PLoS ONE. 5(3):e9462.

2. Aisaka K, Gross SS, Griffith OW, Levi R (1989) NG-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? Biochem Biophys Res Commun. 160(2):881–6.

3. Akbar F, Heinonen S, Pirskanen M, Uimari P, Tuomainen T-P, Salonen JT (2005) Haplotypic association of DDAH1 with susceptibility to pre-eclampsia. Mol Hum Reprod. 11(1):73–7.

4. Alheid U, Frölich JC, Förstermann U (1987) Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. Thromb Res. 47(5):561–71.

5. Baylis C, Beinder E, Sütö T, August P (1998) Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. Semin Nephrol. 18(2):208–30.

6. Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. Mol Cell. 33(1):1–13.

7. Böger RH (2003) The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Cardiovasc Res. 59(4):824–33.

8. Böger RH (2004) Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the „L-arginine paradox“ and acts as a novel cardiovascular risk factor. J Nutr. 134(10 Suppl):2842S-2847S; discussion 2853S.

9. Böger RH, Bode-Böger SM, Gerecke U, Frölich JC (1994) Long-term administration of L-arginine, L-NAME, and the exogenous NO donor molsidomine modulates urinary nitrate and cGMP excretion in rats. Cardiovasc Res. 28(4):494–9.

10. Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A, Kienke S, Brandes R, Dwenger A et al. (1995) Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. Atherosclerosis. 117(2):273–84.

11. Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC (1996a) The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. Atherosclerosis. 127(1):1–11.

12. Böger RH, Bode-Böger SM, Gerecke U, Gutzki FM, Tsikas D, Frolich JC (1996b) Urinary NO3-excretion as an indicator of nitric oxide formation in vivo during oral administration of L-arginine or L-name in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 23(1):11–5.

13. Böger RH, Bode-Böger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R, Frölich JC (1998) Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis. 136(1):67–77.

14. Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E (2009) Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and mortality-an update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. Pharmacol Res. 60(6):481–7.

15. Braekke K, Ueland PM, Harsem NK, Staff AC (2009) Asymmetric dimethylarginine in the maternal and fetal circulation in preeclampsia. Pediatr Res. 66(4):411–5.

16. Brosens IA (1995) The role of the uterine junctional zone in the pathogenesis of pre-eclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 63(2):199.

17. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S et al. (2010) Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. Obstet Gynecol. 116(2 Pt 1):402–14.

18. Calver A, Collier J, Leone A, Moncada S, Vallance P (1993) Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. J Hum Hypertens. 7(2):193–4.

19. Cantoni GL (1975) Biological methylation: selected aspects. Annu Rev Biochem. 44:435–51.

20. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M (2004) World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia. Obstet Gynecol. 104(6):1367–91.

21. Dechend R, Viedt C, Muller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G et al. (2003) AT1 Receptor Agonistic Antibodies From Preeclamptic Patients Stimulate NADPH Oxidase. Circulation. 107(12):1632–9.

22. Deng S, Deng P-yue, Jiang J-lin, Ye F, Yu J, Yang T-lun et al. (2004) Aspirin protected against endothelial damage induced by LDL: role of endogenous NO synthase inhibitors in rats. Acta Pharmacol Sin. 25(12):1633–9.

23. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Arbeitsgemeinschaft Schwangerenhochdruck / Gestose (2010) Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen. AWMF 015/018 (S2). 1–3, 7–8.

24. Duckitt K, Harrington D (2005) Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. BMJ. 330(7491):565.

25. Ellis J, Wennerholm UB, Bengtsson A, Lilja H, Pettersson A, Sultan B et al. (2001) Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 80(7):602–8.

26. Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GS (1993) Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. Lancet. 342(8865):242–3.

27. Fleischer A, Schulman H, Farmakides G, Bracero L, Grunfeld L, Rochelson B et al. (1986) Uterine artery Doppler velocimetry in pregnant women with hypertension. Am J Obstet Gynecol. 154(4):806–13.

28. Förstermann U, Mülsch A, Böhme E, Busse R (1986) Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. Circ Res. 58(4):531–8.

29. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I et al. (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension. 23(6 Pt 2):1121–31.

30. Furchgott RF (1983) Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. Circ Res. 53(5):557–73.

31. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 288(5789):373–6.

32. Garg UC, Hassid A (1998) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest. 83(5):1774–7.

33. Giguère Y, Charland M, Bujold E, Bernard N, Grenier S, Rousseau F et al. (2011) Combining biochemical and ultrasonographic markers in predicting preeclampsia: a systematic review. Ann Biol Clin (Paris). 69(3):257–71.

34. Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR (1987) L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. J Immunol. 138(2):550–65.

35. Hiby SE, Walker JJ, O’Shaughnessy KM, Redman CWG, Carrington M, Trowsdale J et al. (2004) Combinations of Maternal KIR and Fetal HLA-C Genes Influence the Risk of Preeclampsia and Reproductive Success. J Exp Med. 200(8):957–65.

36. Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS (1998) Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 178(3):551–6.

37. Ignarro LJ (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 30:535–60.

38. Ignarro L, Byrns R, Buga G, Wood K (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. Circ Res. 61(6):866–79.

39. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Frölich JC et al. (2004) Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. Circulation. 109(2):172–7.

40. Kielstein JT, Tsikas D, Fliser D (2005) Effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) infusion in humans. Eur J Clin Pharmacol. 62(S1):39–44.

41. Klockenbusch W, Fischer T (2005) Präeklampsie, 1. Auflage. UNI-MED, Bremen. 19.

42. Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(11):4651–5.

43. Kuc S, Wortelboer EJ, van Rijn BB, Franx A, Visser GHA, Schielen PCJI (2011) Evaluation of 7 serum biomarkers and uterine artery Doppler ultrasound for first-trimester prediction of preeclampsia: a systematic review. Obstet Gynecol Surv. 66(4):225–39.

44. Kuklina EV, Ayala C, Callaghan WM (2009) Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States. Obstet Gynecol. 113(6):1299–306.

45. Lam C, Lim K-H, Karumanchi SA (2005) Circulating Angiogenic Factors in the Pathogenesis and Prediction of Preeclampsia. Hypertension. 46(5):1077–85.

46. Leiper J, Nandi M (2011) The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. Nat Rev Drug Discov. 10(4):277–91.

47. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS et al. (1999) Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. Biochem J. 343 Pt 1:209–14.

48. Leiper J, Nandi M, Torondel B, Murray-Rust J, Malaki M, O'Hara B et al. (2007) Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. Nat Med. 13(2):198–203.

49. Leitinger N, Oguogho A, Rodrigues M, Sinzinger H (1995) The effect of NO/EDRF and monocytes/macrophages on LDL-oxidation. J Physiol Pharmacol. 46(4):385–408.

50. Levine RJ, Lindheimer MD (2009) First-Trimester Prediction of Early Preeclampsia: A Possibility at Last! Hypertension. 53(5):747–8.

51. López-Jaramillo P, Terán E, Moncada S (1995) Calcium supplementation prevents pregnancy-induced hypertension by increasing the production of vascular nitric oxide. Med Hypotheses. 45(1):68–72.

52. López-Jaramillo P, Arenas WD, García RG, Rincon MY, López M (2008) Review: The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. Ther Adv Cardiovasc Dis. 2(4):261–75.

53. Lu C-W, Guo Z, Feng M, Wu Z-Z, He Z-M, Xiong Y (2010) Ex vivo gene transferring of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 improved endothelial dysfunction in diabetic rat aortas and high glucose-treated endothelial cells. Atherosclerosis. 209(1):66–73.

54. Luft FC (2003) Pieces of the preeclampsia puzzle. Nephrol Dial Transplant. 18(11):2209–10.

55. Maas R, Dentz L, Schwedhelm E, Thoms W, Kuss O, Hiltmeyer N et al. (2007) Elevated plasma concentrations of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine predict adverse events in patients undergoing noncardiac surgery. Crit Care Med. 35(8):1876–81.

56. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H et al. (1996) Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Br J Pharmacol. 119(8):1533–40.

57. Maeda T, Yoshimura T, Okamura H (2003) Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, in maternal and fetal circulation. J Soc Gynecol Investig. 10(1):2–4.

58. Mayer B, John M, Heinzel B, Werner ER, Wachter H, Schultz G et al. (1991) Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. FEBS Lett. 288(1-2):187–91.

59. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA (2008) Preeclampsia and angiogenic imbalance. Annu Rev Med. 59:61–78.

60. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S et al. (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J Clin Invest. 111(5):649–58.

61. McBride AE, Silver PA (2001) State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. Cell. 106(1):5–8.

62. Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med. 329(27):2002–12.

63. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 43(2):109–42.

64. Myers J, Mires G, Macleod M, Baker P (2005) In preeclampsia, the circulating factors capable of altering in vitro endothelial function precede clinical disease. Hypertension. 45(2):258–63.

65. Nakajima T, Matsuoka Y, Kakimoto Y (1971) Isolation and identification of N-G-monomethyl, N-G, N-G-dimethyl- and N-G,N' G-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. Biochim Biophys Acta. 230(2):212–22.

66. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (2000) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 183(1):S1–22.

67. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K (1989) Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. J Biol Chem. 264(17):10205–9.

68. Osanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K (2003) Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. Hypertension. 42(5):985–90.

69. Paik WK, Kim S (1968) Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. J Biol Chem. 243(9):2108–14.

70. Palmer R, Ferrige A, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 327(6122):524–6.

71. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 333(6174):664–6.

72. Pettersson A, Hedner T, Milsom I (1998) Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 77(8):808–13.

73. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M et al. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(23):10480–4.

74. Pope AJ, Karuppiah K, Cardounel AJ (2009) Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. Pharmacol Res. 60(6):461–5.

75. Póvoa AM, Costa F, Rodrigues T, Patrício B, Cardoso F (2008) Prevalence of hypertension during pregnancy in Portugal. Hypertens Pregnancy. 27(3):279–84.

76. Prefumo F, Thilaganathan B, Whitley GS (2008) First-trimester uterine artery resistance and maternal serum concentration of asymmetric dimethylarginine. Ultrasound Obstet Gynecol. 31(2):153–7.

77. Rath W (2005) Erkrankungen in der Schwangerschaft, 6. Auflage. Georg Thieme, Stuttgart. 75–77.

78. Redman CW, Sargent IL (2005) Latest Advances in Understanding Preeclampsia. Science. 308(5728):1592–4.

79. Reister F, Heyl W, Kaufmann P, Rath W (2008) The etiology of disturbed trophoblast invasion in pre-eclampsia. Geburtsh Frauenheilk. 58(12):625–31.

80. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK (1989) Preeclampsia: an endothelial cell disorder. Am J Obstet Gynecol. 161(5):1200–4.

81. Robertson WB (1976) Uteroplacental vasculature. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol). 10:9–17.

82. Ross R (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med. 340(2):115–26.

83. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA (2003) Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. Circ Res. 93(4):280–91.

84. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaides KH (2003) Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. Lancet. 361(9368):1511–7.

85. Schmidt M, Kimmig R (2007) Pathophysiology of preeclampsia. Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch. 47(4):199–204.

86. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB (1994) The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 171(4):944–8.

87. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005) Pre-eclampsia. Lancet. 365(9461):785–99.

88. Siroen MPC, Teerlink T, Bolte AC, van Elburg RM, Richir MC, Nijveldt RJ et al. (2006) No compensatory upregulation of placental dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in preeclampsia. Gynecol Obstet Invest. 62(1):7–13.

89. Speer PD, Powers RW, Frank MP, Harger G, Markovic N, Roberts JM (2008) Elevated asymmetric dimethylarginine concentrations precede clinical preeclampsia, but not pregnancies with small-for-gestational-age infants. Am J Obstet Gynecol. 198(1):112.e1–7.

90. Steegers EAP, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R (2010) Pre-eclampsia. Lancet. 376(9741):631–44.

91. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(17):7773–7.

92. Tolins JP, Palmer RM, Moncada S, Raij L (1990) Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. Am J Physiol. 258(3Pt 2):H655–62.

93. Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, Nishijima K, Kotsuji F, Kawakami H et al. (2008) Determination of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in umbilical blood. Metab Clin Exp. 57(2):215–20.

94. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet. 339(8793):572–5.

95. Vida G, Sulyok E, Ertl T, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM (2007) Plasma asymmetric dimethylarginine concentration during the perinatal period. Neonatology. 92(1):8–13.

96. Wagner SJ, Barac S, Garovic VD (2007) Hypertensive Pregnancy Disorders: Current Concepts. J Clin Hypertens (Greenwich). 9(7):560–6.

97. Wakino S, Hayashi K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, Kanda T et al. (2005) Pioglitazone lowers systemic asymmetric dimethylarginine by inducing dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rats. Hypertens Res. 28(3):255–62.

98. Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M et al. (2007) Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylamino-hydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. Circ Res. 101(6):627–35.

99. Wang Y, Zhang M, Liu Y, Liu Y, Chen M (2011) The effect of nebivolol on asymmetric dimethylarginine system in spontaneously hypertension rats. Vascul Pharmacol. 54(1-2):36–43.

100. Waterstone M, Bewley S, Wolfe C (2001) Incidence and predictors of severe obstetric morbidity: case-control study. BMJ. 322(7294):1089–93; discussion 1093–4.

101. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S et al. (1993) Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. Circ Res. 73(6):1121–7.

102. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L et al. (2001) Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. Lancet. 358(9299):2113–7.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A

ADAM 12	*A disintegrin and metalloprotease-12*
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALT	Alanin-Aminotransferase
ASS	Acetylsalicylsäure
AST	Aspartat-Aminotransferase

B

BB	Betablocker = β_1-Adrenorezeptorantagonist
BMI	*Body Mass Index* in kg/m2

C

Ca^{2+}	Calcium
cDNA	C*omplementary* DNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat

D

DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DIC	*Disseminated Intravasal Coagulation* = Disseminierte Intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

EDRF	*Endothelium Derived Relaxing Factor* (= NO)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	Endotheliale Sickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum

G

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat

H

hCG	Humanes Choriongonadotropin
HELLP	*Haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count* = Hämolyse, erhöhte Leberenzyme, erniedrigte Thrombozytenzahl

I

iNOS	Induzierbare Sickstoffmonoxid-Synthase
IUFT	Intrauteriner Fruchttod
IUGR	*Intrauterine Growth Restriction* = intrauterine Wachstumsretardierung

K

K	Kontrollen

L

LC-MS/MS	Liquid chromatography mass spectrometry = Flüssigchromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	*Low Density Lipoproteines*
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin

M

mRNA	*Messenger* Ribonukleinsäure

N

NO	Stickstoffmonoxid
NO_2^-	Nitrit
NO_3^-	Nitrat
NOS	NO-Synthase = Stickstoffmonoxid-Synthase

P

PAPP-A	*Pregnancy-associated plasma protein A* = schwangerschaftsassoziiertes Plasmaprotein A
PBS	*Phosphate buffered saline* = Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	*Polymerase chain reaction* = Polymerase-Kettenreaktion
PDE 5	Phosphodiesterase 5
PE	Präeklampsie
PI	Pulsatilitäts-Index (in der Dopplersonografie)
PlGF	*Placental growth factor* = plazentarer Wachstumsfaktor

PP13	*placental protein 13* = Plazentaprotein 13
PPAR-γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-gamma
PRMT	Protein-N-Arginin-Methyltransferase
PTT	Partielle Thromboplastinzeit

Q

QC	Q*uality control* = Qualitätskontrolle-Lösung

R

RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Puffer aus dem *miRNeasy Mini Kit*. Genaue Zusammensetzung unbekannt
RR	Blutdruck (nach Riva Rocci) *sowie* Relative Risikoreduktion

S

SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
sFlt-1	*Soluble fms-like tyrosine kinase 1* = löslicher Rezeptor für den VEGF (s.u.)
SHR	Spontan hypertensive Ratten
SNPs	*Single nucleotide polymorphisms*
SSW	Schwangerschaftswoche

T

TAH	Thrombozytenaggregationshemmer

U

UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

V

VEGF	*Vascular endothelial growth factor* (Wachstumsfaktor)

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren für das Auftreten einer Präeklampsie.

Tabelle 2: Erkrankungen, die mit einer erhöhten Plasmakonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin einhergehen.

Tabelle 3: Plasmakonzentration von Asymmetrischem Dimethylarginin bei gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie.

Tabelle 4: Patientinnencharakteristika.

Tabelle 5: Laborwerte der Frauen mit Präeklampsie.

Tabelle 6: Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin bei gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie.

Tabelle 7: Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin bei Frauen mit Präeklampsie ohne HELLP-Syndrom und Frauen mit HELLP-Syndrom.

Tabelle 8: Fetale Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin.

Tabelle 9: Fetomaternale Konzentrationsgradienten von ADMA, SDMA und L-Arginin.

Tabelle 10: Klinisch gebräuchliche Medikamente und ihre Wirkung auf die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase.

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Arginin-Stickstoffmonoxid-Kaskade.

Abbildung 2: Effekte von Stickstoffmonoxid.

Abbildung 3: L-Arginin und Strukturanaloga Asymmetrisches Dimethylarginin und Symmetrisches Dimethylarginin.

Abbildung 4: Synthese und Abbau von Asymmetrischem Dimethylarginin.

Abbildung 5: Verminderte plazentare Aktivität und/oder Expression der DDAH als mögliche Ursache der erhöhten ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie.

Abbildung 6: Plasmakonzentrationen von ADMA und SDMA bei gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie.

Abbildung 7: Maternale und fetale ADMA-Plasmakonzentrationen.

Abbildung 8: Fetomaternale Konzentrationsgradienten von ADMA und SDMA.

Abbildung 9: Aktivität der plazentaren Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase.

Abbildung 10: Expression der plazentaren GAPDH, DDAH1, DDAH2, PRMT1 und eNOS bei gesunden Schwangeren.

Abbildung 11: Relative Expression der plazentaren DDAH1, DDAH2, eNOS und PRMT1 bei gesunden Schwangeren und Frauen mit Präeklampsie.

Abbildung 12: Korrelation der relativen DDAH2-Expression mit dem fetomaternalen ADMA-Gradienten bei Frauen mit Präeklampsie.

8.4 Materialien

8.4.1 Substanzen, Lösungen und Kits

- [$^{2}H_{6}$]-ADMA
- Acetonitril
- ADMA
- Butanolische Salzsäure
- Chloroform
- Deuteriertes [$^{2}H_{7}$]-L-Arginin
- Ethanol (70% und 96-100%)
- Interner Standard ([$^{13}C_{5}{}^{2}H_{6}$]-ADMA) in Methanol
- L-Arginin
- L-NMMA
- Methanol
- *miRNeasy Mini Kit*
- N-ω-Hydroxy-nor-L-Arginin
- PBS-Puffer
- Probenpuffer
- *RevertAid H Minus First Strand cDNA Kit*
- SDMA
- *TaqMan Gene Expression Assay*

8.4.2 Verbrauchsmaterialien

- 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße
- 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße
- Abdeckmatte für MegaBlock 1,2 ml (rund)
- Acetat-Klebefolie
- Astec Chirobiotic T Vorsäule 20 x 1,0 mm
- *Butterfly*-Kanülen
- EDTA-Monovetten
- Einmalhandschuhe
- Eppendorf epTIPS 100 µl
- Flüssiger Stickstoff
- Greiner PP Mikrotiterplatten
- Millipore 96well-Filterplatten 0,22 µm
- Pipettenspitzen
- Sterile Einmalhandschuhe
- Sterile, Nuklease-freie Reaktionsgefäße
- Sterile, RNase-freie Pipettenspitzen

8.4.3 Geräte

- *ABI PRISM 7900 HAT Thermocycler*
- Brand Multipette
- Eppendorf 8-Kanal Transferpipette 20 bis 200 µl
- Eppendorf Zentrifuge 5810R

- Heizblock
- *HPLC Varian ProStar*
- Inkubator
- Mikrozentrifuge für 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße
- Pipette
- *Varian L1200 MS/MS* inklusive Computer und Drucker
- Zentrifuge

8.5 Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatatalmedizin
Prof. Dr. Kurt Hecher

Martinistrasse 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 42803-7832
www.uke.uni-hamburg.de

Longitudinale Studie zur Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Serum-ADMA-Konzentration während normaler Schwangerschaft und bei Präeklampsie
UKE-KP 2004/006

Einverständniserklärung

Herr/ Frau Dr. med. _____ (Name des aufklärenden Arztes/Ärztin) hat mich vollständig über das Wesen und die Bedeutung der geplanten Studie aufgeklärt. Ich konnte dabei alle mich interessierenden Fragen stellen. Ferner hatte ich Gelegenheit, das Aufklärungsblatt genau durchzulesen und auch dazu Fragen zu stellen. Ein Exemplar der Aufklärung/Einwilligung ist mir zum Verbleib ausgehändigt worden.

Ich weiß, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angaben von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile bezüglich einer laufenden oder zukünftigen Behandlung entstehen.

Ich weiß, dass die im Rahmen der Studie erhobenen Daten und persönlichen Mitteilungen der ärztlichen Schweigepflicht unterliegen und zur Auswertung nur ohne meinen Namen (pseudonymisiert) zusammengeführt werden.
Ich bin damit einverstanden, dass werden meine personenbezogenen Daten im Rahmen der klinischen Prüfung aufgezeichnet und pseudonymisiert, d.h. ohne Namensnennung zur wissenschaftlichen Auswertung verarbeitet sowie ggf. an die zuständige Überwachungsbehörde zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie weiter gegeben werden und in Form der pseudonymisierten Daten auf Fragebögen und elektronischen Datenträgern für die Dauer von mindestens 15 Jahren gespeichert können.

Zugleich erkläre ich, dass ich mit der im Rahmen der klinischen Prüfung erfolgenden Aufzeichnung von Krankheitsdaten einverstanden bin.

Ich bestätige durch meine Unterschrift, dass ich die Aufklärung verstanden habe und mich mit der Durchführung der vorgenannten Studie einverstanden erkläre.

Für die zugleich geplante genetische Untersuchung wird ein gesondertes und unabhängiges Einverständnis auf einem gesonderten Vordruck eingeholt.

Hamburg, den _____ _____
Unterschrift des aufklärenden Arztes

Hamburg, den _____ _____
Unterschrift der Patientin

_____
Name der Patientin

8.6 Einverständniserklärung zur Entnahme von Gewebe

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatatalmedizin
Prof. Dr. Kurt Hecher
Martinistrasse 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 42803-7832
www.uke.uni-hamburg.de

Longitudinale Studie zur Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Serum-ADMA-Konzentration während normaler Schwangerschaft und bei Präeklampsie
UKE-KP 2004/006

Einverständniserklärung zur Entnahme und Untersuchung von Gewebe des Mutterkuchens und Nabelschnurblut nach Entbindung

Herr/ Frau Dr. med. _____ (Name des aufklärenden Arztes/Ärztin) hat mich vollständig über das Wesen und die Bedeutung der geplanten Studie aufgeklärt. Ich konnte dabei alle mich interessierenden Fragen stellen. Ferner hatte ich Gelegenheit, das Aufklärungsblatt genau durchzulesen und auch dazu Fragen zu stellen. Ein Exemplar der Aufklärung/Einwilligung ist mir zum Verbleib ausgehändigt worden.

Ich weiß, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angaben von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile bezüglich einer laufenden oder zukünftigen Behandlung entstehen.

Ich weiß, dass die im Rahmen der Studie erhobenen Daten und persönlichen Mitteilungen der ärztlichen Schweigepflicht unterliegen und zur Auswertung nur ohne meinen Namen (pseudonymisiert) zusammengeführt werden.
Ich bin damit einverstanden, dass werden meine personenbezogenen Daten im Rahmen der klinischen Prüfung aufgezeichnet und pseudonymisiert, d.h. ohne Namensnennung zur wissenschaftlichen Auswertung verarbeitet sowie ggf. an die zuständige Überwachungsbehörde zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie weiter gegeben werden und in Form der pseudonymisierten Daten auf Fragebögen und elektronischen Datenträgern für die Dauer von mindestens 15 Jahren gespeichert können.

Ich bestätige durch meine Unterschrift, dass ich die Aufklärung verstanden habe und mich mit der Durchführung der vorgenannten Studie einverstanden erkläre.

Hamburg, den _____ _____
Unterschrift des aufklärenden Arztes

Hamburg, den _____ _____
Unterschrift der Patientin

_____
Name der Patientin

8.7 Einverständniserklärung zur genetischen Untersuchung

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatatalmedizin
Prof. Dr. Kurt Hecher

Martinistrasse 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 42803-7832
www.uke.uni-hamburg.de

Longitudinale Studie zur Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Serum-ADMA-Konzentration während normaler Schwangerschaft und bei Präeklampsie
UKE-KP 2004/006

Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Genetik-Untersuchung

Herr/ Frau Dr. med. _____ (Name des aufklärenden Arztes/Ärztin) hat mich vollständig über das Wesen und die Bedeutung der geplanten genetischen Untersuchungen aufgeklärt. Ich konnte dabei alle mich interessierenden Fragen stellen. Ferner hatte ich Gelegenheit, das Aufklärungsblatt zur genetischen Untersuchung genau durchzulesen und auch dazu Fragen zu stellen. Ein Exemplar der Aufklärung/Einwilligung ist mir zum Verbleib ausgehändigt worden.
Ich weiß, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angaben von Gründen widerrufen kann und dass ich die Vernichtung der Blutprobe fordern kann, ohne dass mir daraus Nachteile bezüglich einer laufenden oder zukünftigen Behandlung entstehen.
Mir ist bewusst, dass mir keine persönlichen Vorteile aus dieser zusätzlichen wissenschaftlichen Untersuchung entstehen werden und dass mir die Ergebnisse nicht mitgeteilt werden. Ich stimme zu, dass das Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf alleiniger Inhaber der aus der wissenschaftlichen Untersuchung meiner Blutprobe gewonnenen Erkenntnisse wird.

Datenschutzerklärung Ich bin damit einverstanden, dass meine Blutproben und die benötigten Daten aus der klinischen Studie jeweils separat mit einer unterschiedlichen Code-Nummer ohne Angabe meines Namens gekennzeichnet werden. Die Untersuchungsergebnisse werden in doppelt codierter Form ermittelt und aufgezeichnet, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen archiviert. Die geplanten genetischen Analysen dienen ausschließlich der wissenschaftlichen Untersuchung möglicher zellbiologischer Ursachen veränderter Konzentrationen des körpereigenen Botenstoffes ADMA sowie der Erfassung eines möglichen genetisch determinierten Risikos im Zusammenhang mit dem ADMA-Stoffwechsel. Darüber hinausgehende Genanalysen werden nicht durchgeführt. Nur die an der wissenschaftlichen Studie beteiligten Personen haben Zugang zu den doppelt codierten Daten, die meiner Person nicht zugeordnet werden können. Auch im Falle einer Publikation der Ergebnisse der Studie bleibt die Vertraulichkeit meiner personenbezogenen Daten gewährleistet.

Ich bestätige durch meine Unterschrift, dass ich die Aufklärung verstanden habe und mich mit der Durchführung der vorgenannten genetischen Untersuchung einverstanden erkläre.

Hamburg, den _____ _____
Unterschrift des aufklärenden Arztes

Hamburg, den _____ _____
Unterschrift der Patientin

_____
Name der Patientin

8.8 Demografischer Fragebogen

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatatalmedizin
Prof. Dr. Kurt Hecher

Martinistrasse 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 42803-7832
www.uke.uni-hamburg.de

Longitudinale Studie zur Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Serum-ADMA-Konzentration während normaler Schwangerschaft und bei Präeklampsie
UKE-KP 2004/006

Sehr geehrte Patientin,

wir freuen uns sehr, dass Sie eingewilligt haben, an unserer Studie teilzunehmen. Wir benötigen für die Auswertung der gewonnenen Messergebnisse einige persönliche Angaben und bitten Sie deshalb, den folgenden Fragebogen auszufüllen bzw. anzukreuzen, falls zutreffend.

Diese Angaben werden genau wie die Blut- und Urinproben und die daraus gemessenen Werte streng vertraulich behandelt und liegen nur uns, den Sie behandelnden Ärzten vor.

Wir bitten um Ihre Emailadresse für eventuelle Rückfragen. Sollten Sie keine Emailadresse besitzen, schreiben Sie bitte Ihre Telefonnummer auf.

Herzlichen Dank!

Eigene Daten

- Email-Adresse:
- Alter:
- Größe:
- Gewicht (vor der Schwangerschaft):
- ☐ Neuaufgetretener Bluthochdruck während dieser Schwangerschaft; seit wann? Wie behandelt?
- Blutdruck momentan:
- ☐ Eiweißausscheidung im Urin; seit wann?
- ☐ Wasseransammlungen in den Beinen; seit wann? Wie behandelt?
- ☐ Neuaufgetretener Diabetes während dieser Schwangerschaft; seit wann? Wie behandelt?
- ☐ Sonstige Komplikationen? _____

Vorerkrankungen

- Bluthochdruck vor der Schwangerschaft; seit wann?

  ☐ bei Ihnen; Medikamente? ☐ in der Familie ☐ gar nicht

- Angina pectoris; seit wann?

  ☐ bei Ihnen; Medikamente? ☐ in der Familie ☐ gar nicht

- Herzinfarkt; wann?

  ☐ bei Ihnen; Medikamente? ☐ in der Familie ☐ gar nicht

- Schlaganfall; wann?

  ☐ bei Ihnen; Medikamente? ☐ in der Familie ☐ gar nicht

- Diabetes mellitus Typ I; seit wann?

  ☐ bei Ihnen; Medikamente? ☐ in der Familie ☐ gar nicht

- Diabetes mellitus Typ II; seit wann?

  ☐ bei Ihnen; Medikamente? ☐ in der Familie ☐ gar nicht

- Chronische Nierenerkrankung; seit wann?

  ☐ bei Ihnen; Medikamente? ☐ in der Familie ☐ gar nicht

- Thromboseneigung; wann welche Ereignisse?

  ☐ bei Ihnen; Medikamente? ☐ in der Familie ☐ gar nicht

- ☐ Dauer-Medikamente vor und/oder während der Schwangerschaft; welche?

Angaben zu vorangegangenen Schwangerschaften

- Anzahl lebend geborener Kinder:
- Anzahl von Fehlgeburten/Schwangerschaftsabbrüchen:

Komplikationen während der Schwangerschaft mit Ihrem **1. Kind**

- ☐ Präeklampsie (Bluthochdruck und Eiweißausscheidung im Urin)
- ☐ Bluthochdruck alleine (während Schwangerschaft neu aufgetreten)
- ☐ Diabetes (während Schwangerschaft neu aufgetreten)
- ☐ Mangelgeburt (zu kleines oder zu leichtes Neugeborenes)
- ☐ Frühgeburt (vor Ende der 37. Woche)
- ☐ Sonstiges: _____

Komplikationen während der Schwangerschaft mit Ihrem **2. Kind**

- ☐ Präeklampsie (Bluthochdruck und Eiweißausscheidung im Urin)
- ☐ Bluthochdruck alleine (während Schwangerschaft neu aufgetreten)
- ☐ Diabetes (während Schwangerschaft neu aufgetreten)
- ☐ Mangelgeburt (zu kleines oder zu leichtes Neugeborenes)
- ☐ Frühgeburt (vor Ende der 37. Woche)
- ☐ anderer Vater als beim 1. Kind
- ☐ Sonstiges: _____

Komplikationen während der Schwangerschaft mit Ihrem **3. Kind**

- ☐ Präeklampsie (Bluthochdruck und Eiweißausscheidung im Urin)
- ☐ Bluthochdruck alleine (während Schwangerschaft neu aufgetreten)
- ☐ Diabetes (während Schwangerschaft neu aufgetreten)
- ☐ Mangelgeburt (zu kleines oder zu leichtes Neugeborenes)
- ☐ Frühgeburt (vor Ende der 37. Woche)
- ☐ anderer Vater als beim 2. Kind
- ☐ Sonstiges: _____

Komplikationen während der Schwangerschaft mit Ihrem **4. Kind**

- ☐ Präeklampsie (Bluthochdruck und Eiweißausscheidung im Urin)
- ☐ Bluthochdruck alleine (während Schwangerschaft neu aufgetreten)
- ☐ Diabetes (während Schwangerschaft neu aufgetreten)
- ☐ Mangelgeburt (zu kleines oder zu leichtes Neugeborenes)
- ☐ Frühgeburt (vor Ende der 37. Woche)
- ☐ anderer Vater als beim 3. Kind
- ☐ Sonstiges: _____

Angaben zu Schwangerschaftskomplikationen in der Familie

- ☐ Sind in Ihrer engeren Verwandtschaft Fälle von Präeklampsie oder Bluthochdruck während der Schwangerschaft aufgetreten?

- ☐ Sind Kinder in Ihrer engeren Verwandtschaft zu früh (vor Ende der 37. Woche) geboren?

- ☐ Gab es Mangelgeburten (zu kleines oder zu leichtes Neugeborenes) in Ihrer engeren Verwandtschaft?

- ☐ Sind Kinder in Ihrer engeren Verwandtschaft tot auf die Welt gekommen? Wenn ja, wissen Sie die Ursache?

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Rainer Böger und Herrn Prof. Dr. med. Kurt Hecher. Danke für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, meine Arbeit bei Ihnen durchzuführen. Herzlichen Dank für die beratenden Gespräche.

Vielen Dank Frau Dr. med. Maike Anderssohn für die große Unterstützung. Danke insbesondere für Deine Hilfe beim Auswerten und Zusammentragen der Ergebnisse. Vielen Dank Frau Dr. med. Anke Diemert für die beinahe 5 Jahre andauernde große Unterstützung. Danke vor allem Dein Durchhaltevermögen.

Vielen Dank allen Krankenschwestern und Hebammen sowie Ärztinnen und Ärzten der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin. Danke für die Unterstützung bei der Patientinnenrekrutierung und Probengewinnung. Insbesondere danke für den Unterricht im Kreißsaal, danke dafür vor allem Frau Dr. med. Manuela Tavares de Sousa.

Vielen Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinischen Pharmakologie für ihre freundliche Unterstützung, insbesondere Mariola Kastner, Sandra Maak, Anna Steenpaß und Dorothee Atzler. Vielen Dank Kerstin Martinsen und Thomas Andreas (Experimentelle Feto-Maternale Medizin) für die immer freundliche Unterstützung.

Danke Christian Latus.

Danke meinen Freunden Kaja Haelbich, Jan Kiepe, Aneta Schieferdecker, Jan Schollmeyer und Sarah Teising für die schöne Zeit.

Danke meiner Familie, insbesondere Anna-Lena Maaß für die schöne Zeit.

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Laura Marie Maaß
Geboren	21. Februar 1985 in Hamburg

Promotion und Veröffentlichung

01/2008 - 11/2012	Doktorandin in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin bei Prof. Dr. med. Kurt Hecher, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)
04/2012	Anderssohn M, Maass LM, Diemert A, Lüneburg N, Atzler D, Hecher K, Böger RH (2012) *Severely decreased activity of placental dimethylarginine dimethylaminohydrolase in pre-eclampsia.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 161(2):152-6.

Beruf

seit 01/2012	Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin, UKE

Schulische und universitäre Ausbildung

06/2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2009 - 07/2009	Wahlblock „Experimentelle und Klinische Pharmakologie“
08/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2004 - 06/2011	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
06/2004	Allgemeine Hochschulreife
09/1995 - 06/2004	Gymnasium Langenhorn, Hamburg

Praktisches Jahr und Famulaturen

11/2010 - 01/2011	Gynäkologie und Geburtshilfe, Diakonieklinikum Elim, Hamburg
09/2010 – 11/2010	Gynäkologie und Geburtshilfe, Maternidad de Enrique C. Sotomayor, Guayaquil, Ecuador
06/2010 - 09/2010	Innere Medizin, Asklepios Klinik Harburg, Hamburg
04/2010 - 06/2010	Hepatobiliäre Chirurgie, Royal London Hospital, London, England
02/2010 - 04/2010	Allgemeinchirurgie, Diakonieklinikum Alten Eichen, Hamburg
12/2009 - 01/2010	Geburtshilfe und Pränatalmedizin, UKE
08/2009 - 09/2009	Innere Medizin, Zentrale Notaufnahme, UKE
02/2009 - 03/2009	Geburtshilfe und Pränatalmedizin, UKE
08/2007 - 09/2007	Radiologie, Charité Campus Mitte, Berlin

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegeben Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Laura Maaß