

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

Longitudinale Studie zur Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Plasma – ADMA – Konzentration während normaler Schwangerschaften

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Ninja Hoffmann
aus Bremen

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.08.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. R. Böger

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. K.Hecher

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. P. Arck

Prüfungsausschuss, vierter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. med. B.Hüneke

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	5
2. Einleitung	6
2.1 Präeklampsie	6
2.1.1 Definition und Diagnosekriterien	6
2.1.2 Risikofaktoren	7
2.1.3 Pathophysiologie	7
2.1.4 Asymmetrisches Dimethylarginin und endotheliale Dysfunktion.....	8
2.2 Stickstoffmonoxid – NO	9
2.2.1 NO – Synthese	9
2.2.2 Funktion – NO	9
2.3 Asymmetrisches Dimethylarginin – ADMA	10
2.3.1 Aufbau	10
2.3.2 Biosynthese.....	10
2.3.3 Funktion.....	11
2.3.4 Transport.....	12
2.3.5 Eliminierung	12
2.4 Dimethylarginin- Dimethylaminohydrolase – DDAH.....	13
2.4.1 Lokalisation	13
2.4.2 DDAH- Regulationsmechanismen der Enzymaktivität.....	13
2.4.3 DDAH – Genetische Polymorphismen	15
2.5 ADMA während Präeklampsie und gesunder Schwangerschaft	17
3. Material und Methoden	19
3.1 Genehmigung.....	19
3.2 Studienverlauf und Datenerhebung	19
3.3 Ein – und Ausschlusskriterien	20
3.4 Bestimmung der DDAH Polymorphismen	20
3.4.1 DNA Isolation aus Blutkuchen.....	20
3.4.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	21
3.4.3 Bestimmung der DDAH1 und DDAH2 Polymorphismen mittels	21
real time – PCR	
3.5 Bestimmung von ADMA und SDMA im Blutplasma.....	23
3.5.1 Methode	23
3.5.2 Durchführung	24
3.6 Statistische Auswertung	25
4. Ergebnisse	26
4.1 Patientinnen	26
4.1.1 Basischarakteristika	26
4.1.2 Klinische Parameter.....	27
4.2 Dimethylarginine	29
4.2.1 ADMA und SDMA Plasmakonzentration.....	29
4.2.2 ADMA – Plasmakonzentration und klinische Parameter.....	30
4.3 Einzelnukleotid – Polymorphismen der DDAH1 oder DDAH2	31
und ADMA-Plasmakonzentrationen	
4.3.1 DDAH1 Polymorphismus rs18582.....	31
4.3.2 DDAH1 Polymorphismus rs2268667.....	34
4.3.3 DDAH1 Polymorphismus rs233112.....	37
4.3.4 DDAH2 Polymorphismus rs805305.....	40
5. Diskussion	44
5.1 Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Schwangerschaft.....	44

5.2	Blutdruckänderungen im Verlauf der Schwangerschaft.....	46
5.3	Korreliert die ADMA – Plasmakonzentration mit klinischen Parametern? ..	47
5.4	Einzelnukleotid – Polymorphismen der DDAH im Zusammenhang mit der ADMA – Plasmakonzentration.....	48
5.5	Klinische Relevanz der Ergebnisse	49
5.6	Limitationen	50
5.7	Zusammenfassende Bewertung	51
6.	Zusammenfassung	52
7.	Literaturverzeichnis.....	53
8.	Appendix	63
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	63
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	65
8.3	Tabellenverzeichnis	66
8.4	Materialien und Geräte	67
8.4.1	DNA Isolation und Messung	67
8.4.2	rt-PCR.....	67
8.4.3	LC-MS/MS	67
8.5	Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie	69
8.6	Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Genetik- Untersuchung.....	70
9.	Danksagung	71
10.	Lebenslauf.....	72
11.	Eidesstattliche Versicherung.....	73

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein Methylderivat der Aminosäure L - Arginin und ein endogener Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). ADMA wird in vielen Studien als ein Marker und Mediator für endotheliale Dysfunktion beschrieben und gilt als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen.

Präeklampsie ist eine häufige Erkrankung in der Schwangerschaft und eine der bedeutendsten Ursachen perinataler Morbidität und Mortalität. Bislang konnten die genauen pathogenetischen Vorgänge der Präeklampsie nicht abschließend geklärt werden. Bisherige klinische Studien haben gezeigt, dass die ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie erhöht ist. Es ist jedoch wenig über den zeitlichen Verlauf der ADMA- Plasmakonzentration in einer normalen Schwangerschaft bekannt.

ADMA wird hauptsächlich von dem Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) metabolisiert. Eine mögliche Ursache für erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen könnte eine verringerte Expression oder Aktivität der DDAH sein, die durch einen Einzelbasen-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism* SNP) verursacht werden.

Um Vergleichswerte für eine präzise Einordnung der ADMA-Konzentration im Verlauf der Schwangerschaft zu erhalten und die Rolle von Einzelnukleotid-Polymorphismen der DDAH zu ermitteln, werden im Rahmen der vorliegende Studie folgende Fragestellungen untersucht:

- Wie verhält sich die Konzentration von ADMA im Verlauf einer gesunden Schwangerschaft?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen ADMA, klinischen und laborchemischen Parametern und Einzelbasen- Polymorphismen in den Genen der DDAH?

2. Einleitung

Die Präeklampsie ist eine Multisystemerkrankung, die sich bevorzugt an Niere und zentralem Nervensystem manifestiert [1]. Die Inzidenz der Präeklampsie wird auf 2-8% aller Schwangerschaften geschätzt [3,4,8]. Sie ist nach thromboembolischen Ereignissen in Westeuropa die viert häufigste Ursache für mütterliche Mortalität [98]. Verschiedene Studien haben außerdem gezeigt, dass mit einer Präeklampsie das Risiko für spätere kardiovaskuläre Erkrankungen ansteigt [95-97]. Auch die möglichen Auswirkungen auf das Kind sind erheblich. Gemäß der WHO ist die Präeklampsie eine der bedeutendsten Ursachen perinataler Morbidität und Mortalität und kann zu intrauteriner Wachstumsretardierung und Frühgeburtlichkeit führen [2,4]. Bisher konnten die genauen pathogenetischen Vorgänge der Präeklampsie nicht abschließend geklärt werden, dennoch existieren zur Entstehung zahlreiche Erklärungsmodelle. Ein Molekül, das in aktuellen Studien als möglicher Risikofaktor für die Genese einer Präeklampsie diskutiert wird, ist das asymmetrische Dimethylarginin. ADMA wird in vielen Studien als ein Marker und Mediator für endotheliale Dysfunktion beschrieben und als solcher auch in Zusammenhang mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, chronischen Nierenerkrankungen und Diabetes gebracht [99-102]. Da es bis heute kaum präventive Behandlung der Präeklampsie gibt, ist eines der wichtigsten Mittel zur Verringerung der Komplikationsrate die frühzeitige Diagnose. In dieser Studie soll der zeitliche Verlauf der ADMA-Konzentration im Plasma gesunder Schwangerer untersucht werden, um Vergleichswerte für eine präzise Einordnung der ADMA-Konzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft zu erhalten. Zudem sollen Einzelbasen-Polymorphismen des Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-Gens untersucht werden. DDAH ist am Abbau von ADMA beteiligt, so dass eine verminderte Aktivität des Enzyms für erhöhte Plasmakonzentrationen von ADMA verantwortlich sein könnte [4].

2.1 Präeklampsie

2.1.1 Definition und Diagnosekriterien

Die Präeklampsie ist definiert als ein schwangerschaftsassoziierter Bluthochdruck von über 140/90 mmHg und einer Proteinurie von mindestens 300 mg/24h, die nach der 20. Schwangerschaftswoche auftritt [5]. Die schwere Form der Präeklampsie ist

definiert mit Blutdruckwerten von diastolisch ≥ 110 mmHg, systolisch ≥ 160 mmHg und einer Proteinurie von ≥ 5 mg im 24h-Urin [5,6]. Davon abzugrenzen ist die Gestationshypertonie, die nach der 20. Schwangerschaftswoche Blutdruckwerte $\geq 140/90$ mmHg ohne Proteinurie aufweist und zwölf Wochen nach der Geburt regredient ist [7]. Das HELLP-Syndrom (Hämolyse, erhöhte Leberenzyme und Thrombozytopenie) und die Eklampsie sind Sonderformen der Präeklampsie. Die Präeklampsie ist durch eine verminderte uteroplazentare Perfusion gekennzeichnet. Eine dopplersonographisch messbare Widerstandserhöhung in den Aa. uterinae ist bei Präeklampsiepatientinnen häufig nachweisbar [1]. Zudem kann bei einer Präeklampsie eine Thrombozytopenie vorliegen. Auch Veränderungen der renalen Funktion sind zu beobachten, wie beispielsweise ein erhöhter Kreatinin – und Harnsäurespiegel [6].

2.1.2 Risikofaktoren

Die Kenntnis von Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie und deren gezielte Erfassung durch Anamnese und erweiterte Diagnostik spielt eine wichtige Rolle in der Beratung und Betreuung von Schwangeren. Bekannte Risikofaktoren, im Verlauf der Schwangerschaft eine Präeklampsie zu entwickeln, sind eine positive Familien- und Eigenanamnese [1], Nulliparität [1], Mehrlingsgravidität [6], hohes maternales Alter [1], Adipositas (2-3-faches Risiko bei BMI >26) [2], starke Gewichtszunahme in der Schwangerschaft (2-4-faches Risiko bei Gewichtszunahme >1 kg/Woche), Diabetes mellitus [6] und chronischer Bluthochdruck.

2.1.3 Pathophysiologie

Die genauen pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung der Präeklampsie sind noch ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass die Entwicklung einer Präeklampsie in zwei Schritten erfolgt. Zu Beginn steht eine gestörte Plazentation in der ersten Hälfte der Schwangerschaft. In der zweiten Hälfte erfolgt die Reaktion des mütterlichen Organismus und die Manifestation klinischer Symptome, die von zahlreichen klinischen und experimentellen Studien in Zusammenhang mit einer endothelialen Dysfunktion gestellt wird [4,8,80-82]. Es existieren verschiedene Erklärungsmodelle zur Entstehung der Präeklampsie:

- Reduktion der plazentaren Durchblutung infolge gestörter Plazentation und Angiogenese [4].
- Maladaption des mütterlichen Immunsystems an die Interaktion zwischen maternalem und fetalem Gewebe [3,4].
- Vermehrtes Vorkommen von nicht veresterten Fettsäuren, das eine Hyperlipidämie zur Folge haben kann. Die Hyperlipidämie kann zu einer endothelialen Dysfunktion führen und so zu der Entstehung einer Präeklampsie beitragen [9].
- Abgabe von löslichen Faktoren in den mütterlichen Kreislauf infolge einer hypoxischen Plazenta [4,10,11].
- Ein Prostaglandin-Ungleichgewicht von vasodilatierenden Prostazyklin und Stickstoffmonoxid zugunsten vasokonstriktiven Thromboxan A₂ kann zu endothelialer Dysfunktion führen [3,6].
- Asymmetrisches-Dimethylarginin-ADMA ist als kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase mit dem Auftreten einer endothelialen Dysfunktion assoziiert [2].

2.1.4 Asymmetrisches Dimethylarginin und endotheliale Dysfunktion

Mehrere Studien haben gezeigt, dass ADMA als kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase mit dem Auftreten endothelialer Dysfunktion assoziiert ist [24,99-102]. Während der Schwangerschaft könnten erhöhte ADMA-Konzentrationen im Blut zu einem Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) und so zu einer verminderten Vasodilatation der Blutgefäße führen. Dieser Mechanismus könnte zur Entwicklung einer Präeklampsie beitragen.

Buhimschi et al. [12] verwendeten in einer Studie die Infusion von N^G-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME), einem Inhibitor der NO-Synthase, um bei Ratten Symptome der Präeklampsie auszulösen. Aufgrund ihrer Ergebnisse vermuteten sie, dass bei der Präeklampsie ein NO-Mangel vorliegen könnte [12]. Tsukimori et al. [13] untersuchten in einer Studie den Einfluss von L-NAME auf den Blutdruck von schwangeren Ratten. Im Vergleich zu schwangeren Kontrollratten, die eine Natriumchloridlösung (NaCl) erhielten, führte die Applikation von L-NAME zu einem signifikant erhöhten Blutdruck. Bei einer Studie von Ebose et al. [14], die sich mit Elektrolyt- und pH-Veränderungen bei schwangeren Ratten beschäftigte, wurde ebenfalls L-NAME verabreicht. Auch hier waren bei den Ratten ein signifikant

erhöhter arterieller Blutdruck und eine Proteinurie zu beobachten. Diese sind klinische Parameter, die bei einer Präeklampsie zu finden sind. Nevo et al. [15] untersuchten in einer Studie den Einfluss von Isosorbid Dinitrat, einem NO-Donor, auf die zerebrale Blutversorgung bei Schwangerschaftshypertonie und Präeklampsie. Es konnte ein signifikanter Einfluss des NO-Donors auf den maternalen Blutdruck und die Flussgeschwindigkeit beobachtet werden, jedoch nicht auf die zerebrale Durchblutung [15].

2.2 Stickstoffmonoxid – NO

2.2.1 NO – Synthese

Stickstoffmonoxid wurde Anfang 1980 von Furchgott et al. als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) beschrieben. Es ist ein wichtiger Mediator, der für die Funktion des Endothels und die Regulation des Gefäßtonus eine entscheidende Rolle spielt [84]. Die NO-Synthese im Endothel erfolgt mittels einer kalziumabhängigen Isoform der NO-Synthase [17]. Das Enzym setzt NO von der terminalen Guanidino-Stickstoffgruppe des L-Arginin frei, indem es L-Arginin zu L-Citrullin oxidiert [18].

2.2.2 Funktion – NO

NO aktiviert nach Diffusion in die unter dem Endothel liegenden glatten Muskelzellen die lösliche Guanylatzyklase und erhöht dort die intrazelluläre Konzentration des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) [19]. cGMP ist ein „second messenger“, der für viele der biologischen Effekte von NO verantwortlich ist. Er führt u.a. zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und somit zu einer Vasodilatation der Blutgefäße [19]. Auf der Ebene der Zellinteraktion inhibiert NO die Thrombozytenaggregation und die Adhäsion von Monozyten und Leukozyten am Gefäßendothel [19,20]. Es hemmt zudem die LDL-Oxidation und die Proliferation von glatten Muskelzellen [21,22]. Weiterhin reduziert es die Freisetzung von Superoxidradikalen, welche an vielen inflammatorischen und zytotoxischen Prozessen beteiligt sind [23]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Funktionen wird NO eine gefäßprotektive Wirkung zugeschrieben. NO kann durch guanidino-substituierte Analoge von L-Arginin kompetitiv gehemmt werden [16,74]. Zu den Hemmstoffen gehören N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und N-Nitro-L-Arginin (L-NNA) [16,74]. Vallance et al. [24] beschrieben 1992 erstmals asymmetrisches Dimethylarginin

(ADMA) als einen weiteren endogenen Inhibitor der NO-Synthase. Das isomere symmetrische Dimethylarginin (SDMA) führt hingegen nicht zu einer Hemmung der NO-Synthase [85].

2.3 Asymmetrisches Dimethylarginin – ADMA

2.3.1 Aufbau

Asymmetrisches Dimethylarginin ist ein Methylderivat der Aminosäure L-Arginin und ein endogener Inhibitor der NO-Synthase [25]. Es wurde 1987 zum ersten Mal von Ogawa et al. [26] aus den Nieren von Ratten isoliert.

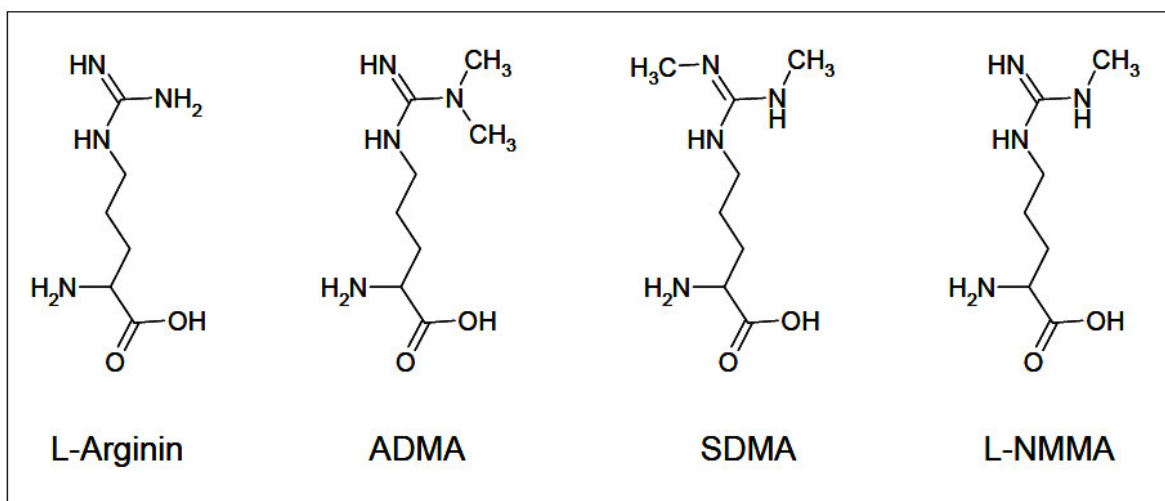


Abbildung 1: Strukturformeln von L-Arginin, ADMA, SDMA und L-NMMA [3]

2.3.2 Biosynthese

ADMA und SDMA werden ubiquitär in allen Zellen des Körpers gebildet. Sie entstehen durch zweifache posttranslationale Methylierung von L-Argininresten innerhalb von Proteinen und anschließender Proteolyse [27,28]. Die Methylierung erfolgt durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) [27,28]. Es gibt verschiedene Typen der Protein-Arginin-Methyltransferase. Asymmetrisch methylierte Arginine werden durch PRMT Typ 1 synthetisiert und symmetrisch methylierte Arginine durch PRMT Typ 2 [27,28]. Beide Typen der PRMT können auch nur eine Methylgruppe übertragen, dadurch entsteht N-Monomethyl-L-Arginin [27,28]. Die Funktion der Methylierung von Argininresten innerhalb von Proteinen konnte noch nicht abschließend geklärt werden, sie wird jedoch mit Regulation der Transkription, Reparaturmechanismen der DNA, Signaltransduktion und Proteininteraktionen in Zusammenhang gebracht [29]. Sowohl ADMA als auch SDMA

werden im normalen Proteinumsatz hydrolytisch aus Proteinen freigesetzt. Bisher wurde noch kein direkter Weg der ADMA-Synthese aus freiem L-Arginin im Zytosol gefunden [29]. Somit können sich die Methylierung in Proteinen und die Rate des Proteinumsatzes entscheidend auf die Höhe der ADMA- Konzentration auswirken [29].

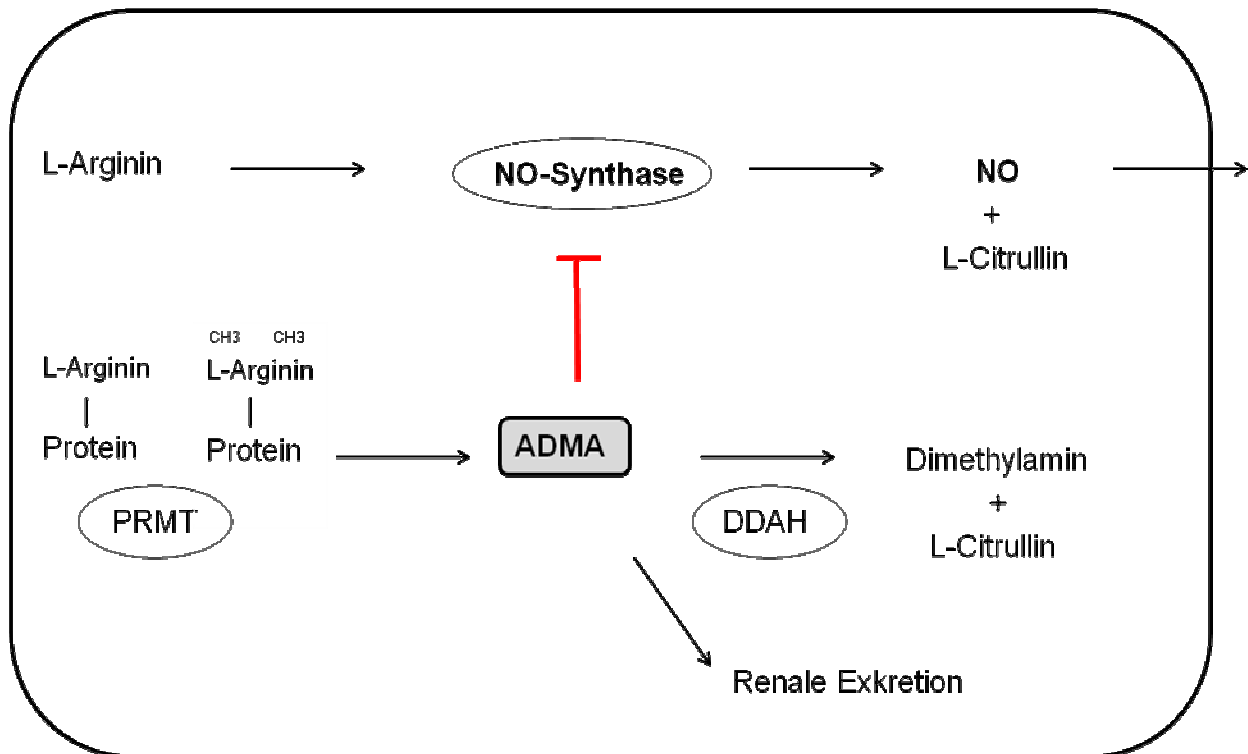


Abbildung 2: Übersicht der Synthese und Elimination von ADMA. ADMA=Asymmetrisches Dimethylarginin, DDAH=Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, NO=Stickstoffmonoxid, PRMT=Protein-Arginin-Methyltransferase. Modifiziert nach Böger [2]

2.3.3 Funktion

Asymmetrisches Dimethylarginin inhibiert alle drei Isoformen der NO-Synthase und ist in seiner Hemmstärke vergleichbar zu L-NMMA [86,87]. Das isomere symmetrische Dimethylarginin führt hingegen zu keiner kompetitiven Hemmung der NO-Synthase [85]. Der Mechanismus erfolgt vermutlich, indem ADMA und L-NMMA L-Arginin aus seiner Bindungsstelle der NO-Synthase verdrängen [2]. Die Hemmung der NO- Synthase ist eine der wichtigsten Funktionen von ADMA, es scheint aber noch weitere Angriffspunkte zu geben. ADMA und SDMA konkurrieren mit L- Arginin

um den γ -Transporter, wodurch sie die L-Arginin-Aufnahme in die Zelle reduzieren können. Zudem scheinen sie im millimolaren Bereich die Na^+/K^+ ATPase zu hemmen [30,31]. Ein weiterer Angriffspunkt ist die Arginin-Glycin-Amidino-transferase. Studien haben gezeigt, dass die Verabreichung von L-NMMA eine Entkopplung der NO-Synthase bewirkt und so zu einer vermehrten Bildung von Superoxiden führt [88,89]. Vermutlich kann ADMA die gleiche Reaktion bewirken [29]. Superoxide gehören zu den reaktiven Sauerstoffspezies. Da oxidativer Stress ein bekannter Mechanismus für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion ist, könnte ADMA auch auf diesem Wege zu der Entstehung einer Präeklampsie beitragen [29].

2.3.4 Transport

ADMA ist relativ stabil und kann zwischen Zellen diffundieren. Fickling et al. [90] haben gezeigt, dass ADMA, welches innerhalb einer Zelle gebildet wird, fähig ist in einer anderen Zelle die NO-Synthase zu hemmen. Dieser Mechanismus wurde an Makrophagen und Endothelzellen untersucht [90]. Zudem werden ADMA und SDMA im Austausch gegen L-Arginin über kationische Aminosäuretransporter (CATs) sowohl nach extrazellulär als auch nach intrazellulär transportiert [32]. Fällt intrazellulär vermehrt ADMA an, inhibiert es nicht nur die eNOS, sondern auch die CATs und somit die zelluläre Aufnahme von L-Arginin. Dadurch steht intrazellulär der eNOS weniger L-Arginin für die NO-Produktion zur Verfügung.

2.3.5 Eliminierung

Die Eliminierung von ADMA kann über unterschiedliche Wege erfolgen. Die Wichtigsten sind der enzymatische Abbau durch die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase und die Ausscheidung über die Niere [33]. Mehr als 70% des zirkulierenden ADMA werden von DDAH metabolisiert, wohingegen SDMA nicht durch dieses Enzym abgebaut werden kann [33,34]. Die Elimination des verbleibenden ADMA erfolgt durch renale Exkretion [33]. Ein alternativer Abbauweg von ADMA ist die Metabolisierung durch die mitochondriale Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2 (AGXT 2) [35]. AGXT 2 ist v.a. in der Niere und Leber lokalisiert und nutzt ADMA als Amino-Donator [42]. Bei der Transamination wird ADMA zu α -keto- δ -(N,N-dimethylguanidino)-Valeriansäure (DGMV) abgebaut [35]. SDMA wird nahezu vollständig über die Niere ausgeschieden und kann ebenfalls durch AGXT2 metabolisiert werden [105,106].

2.4 Dimethylarginin- Dimethylaminohydrolase – DDAH

2.4.1 Lokalisation

Die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase wird in vielen Organen, vor allem in der Leber, der Niere, im Pankreas und in Endothelzellen exprimiert [36]. Sie spaltet ADMA hydrolytisch zu L-Citrullin und Dimethylamin [91,92]. Bisher wurden beim Menschen zwei unterschiedliche Isoformen des Enzyms beschrieben. DDAH 1 ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert und DDAH 2 auf Chromosom 6 [93,94]. DDAH1 konnte v.a. in Leber und Niere in Co-Lokalisation mit der neuronalen Isoform der NOS nachgewiesen werden [93,94]. DDAH2 wurde vorrangig im endothelialen Gewebe zusammen mit der eNOS gefunden und wird auch in der Plazenta exprimiert [93,94]. Durch die plazentare DDAH könnte die Plazenta während der Schwangerschaft zur Eliminierung von ADMA beitragen.

2.4.2 DDAH- Regulationsmechanismen der Enzymaktivität

Die DDAH Aktivität und Expression ist bereits Gegenstand zahlreicher Studien gewesen. Wang et al. [37] untersuchten mit Hilfe der RNA-Interferenz den Einfluss der zwei DDAH Subtypen. Sie konnten zeigen, dass bei einer Hemmung der DDAH1 Expression die ADMA-Konzentration im Plasma um 30% erhöht ist. Es war jedoch kein Effekt auf die Blutgefäße zu beobachten. Die Hemmung der DDAH2 Expression führte zu keiner veränderten ADMA-Plasmakonzentration, jedoch zu einer verminderten Vasodilatation als Zeichen einer endothelialen Dysfunktion [37]. Hu et al. [38] erzeugten für eine Studie DDAH1-defiziente Mäuse. Die ADMA-Konzentration in Plasma- und Gewebeproben war signifikant höher als beim Wildtyp. Auch der Blutdruck war signifikant erhöht. Im Gegensatz zu einer früheren Studie wurde kein Unterschied bei der Entwicklung und dem Wachstum der Mäuse beobachtet [38]. Obgleich die DDAH2-Expression in dieser Studie nicht beeinflusst wurde, war keine DDAH Aktivität in den getesteten Geweben messbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Eliminierung von ADMA primär DDAH1 verantwortlich ist und DDAH2 den Verlust von DDAH1 nicht kompensieren kann [38]. Im Gegensatz dazu wurde in verschiedenen Studien die Überexpression von DDAH1 untersucht. So untersuchte Cooke et al. [36] die erhöhte Expression von DDAH1 in transgenen Mäusen. Sie führte zu einer Halbierung der ADMA-Konzentration im Plasma. Außerdem wurde gezeigt, dass die Reduktion von ADMA mit einer Verdopplung der renalen Exkretion von NO-Stoffwechselprodukten assoziiert ist. Dies spricht für eine

erhöhte NO-Synthese. Die erhöhte Aktivität der NO-Synthase führte bei den transgenen Mäusen zu einem um 10% verminderten Gefäßwiderstand im Vergleich zum Wildtyp [36]. Auch Dayoub et al. [39] untersuchten die Überexpression der humanen DDAH1 in transgenen Mäusen. Im Vergleich zum Wildtyp war die ADMA-Plasmakonzentration erniedrigt und der systolische Blutdruck um 13 mmHg niedriger. Dies ist möglicherweise auf eine gesteigerte NO-Synthese zurückzuführen. Zur Rolle von DDAH2 im Metabolismus von ADMA existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben. Die Überexpression von DDAH2 führt ebenfalls zu erhöhter NO-Synthese und vermehrter endothel-abhängiger Vasodilatation [40]. Auch wurde, wie oben erwähnt, in einer Studie mit Hilfe der RNA-Interferenz eine verminderte Vasodilatation, jedoch kein Effekt auf die Höhe der ADMA-Konzentration beobachtet [37]. Im Gegensatz dazu wurden in einer anderen Studie bei Lysophosphatidylcholin vermittelter Unterdrückung der DDAH2 Transkription und Aktivität eine erhöhte ADMA-Konzentration und erniedrigte NO-Metabolite gefunden [41]. Weitere Studien geben Hinweise darauf, dass DDAH1 und DDAH2 die Endothelfunktion unabhängig von ADMA via Protein-Protein-Interaktion beeinflussen [40,42]. Die Aktivität von DDAH unterliegt zahlreichen Regulationsmechanismen. Ito et al. [43] haben in einer Studie den Einfluss von oxidierten LDL und TNF α auf die Enzymaktivität untersucht. Der oxidative Stress, der durch diese Moleküle herbeigeführt wurde, resultierte in einer verminderten Aktivität von DDAH, jedoch nicht in einer reduzierten Genexpression des Enzyms [43]. Die oxidative Inaktivierung der DDAH erfolgt vermutlich durch die Modifikation eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum, zudem unterliegt der Cysteinrest einer Regulation durch Stickstoffmonoxid [29]. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob oxidativer Stress zu einer irreversiblen Hemmung von DDAH führt [29]. Die Hemmung durch NO ist reversibel [29]. So scheinen eine erhöhte NO- Konzentration oder Veränderungen im Redoxsystem, über die Hemmung von DDAH zu einer erhöhten ADMA-Konzentration und somit zu einer verminderten NO-Bildung zu führen [29]. Eine andere Forschungsgruppe konnte 2001 zeigen, dass auch Homocystein einen Einfluss auf die DDAH-Aktivität hat. Homocystein hemmt DDAH durch eine redoxvermittelte Reaktion und führt so zu einer Erhöhung der ADMA Konzentration [44]. Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass eine verminderte Aktivität von DDAH zu einer Erhöhung der Plasmakonzentration von ADMA führt und somit für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion mitverantwortlich sein kann [2].

2.4.3 DDAH – Genetische Polymorphismen

Als Polymorphismus bezeichnet man das Auftreten von Sequenzvariationen in den Genen einer Population. Per Definition muss die Auftretenshäufigkeit der Genvariante $\geq 1\%$ sein, andernfalls spricht man von einer Mutation. Es werden drei Arten von Sequenzvariationen unterschieden: 1. Insertion- und Deletionspolymorphismen, 2. Multiplikationen und 3. Einzelnukleotidpolymorphismen. Bei einem Einzelnukleotid-Polymorphismus kommt es zum Austausch eines Nukleotids innerhalb des DNA-Moleküls. Liegt die Sequenzvariation im kodierenden Bereich eines Gens, kann dies einen Aminosäureaustausch im entsprechenden Protein zur Folge haben.

Sowohl für die DDAH1 als auch für die DDAH2 sind Einzelnukleotid-Polymorphismen beschrieben worden, die möglicherweise zu einer veränderten DDAH-Expression führen bzw. in den Zusammenhang mit erhöhter Prävalenz von Hypertonus oder Präeklampsie gestellt wurden [45-47]. 2004 führte eine finnische Arbeitsgruppe genetische Untersuchungen bei 132 Frauen mit Präeklampsie und einer gesunden Kontrollgruppe durch. Bei der Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen der DDAH1 und DDAH2 Gene fanden sie sieben DDAH1 SNPs (IVS2-33, IVS3-7, c.561 (Ala187Ala), IVS4-68, IVS5-88, IVS-71, 3'UTR + 16) aus denen sich, durch die Maximum-Likelihood-Methode, vier Haplotypen (H1-H4) des DDAH1 Gens ergaben, die mit unterschiedlichem Risiko für die Entwicklung einer Präeklampsie assoziiert waren [45]. Zwei von den vier Haplotypen (H2 und H3) korrelierten signifikant mit dem Auftreten einer Präeklampsie während der Schwangerschaft. Das größte Risiko bestand bei Patientinnen die beide Risikoallele trugen (Odds ratio: 3,93; KI 95%) [45]. Jones et al. [46] identifizierten in einer Studie einen Polymorphismus mit einer Insertion/Deletion (6G/7G) in Position -871, innerhalb der Promoter-Region des DDAH-2-Gens, der die basale Transkriptionsrate von DDAH-2 beeinflusst. Maas et al. [47] untersuchten in einer Studie den Zusammenhang zwischen den Polymorphismen -1151 A/C (rs805304) und -449 G/C (rs805305) in der Promotor-Region des DDAH-2-Gens und der Höhe des Blutdruckes, der Prävalenz von Hypertonie und der kardialen Funktion. Ihre Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und einer erhöhten Prävalenz von Hypertonie, jedoch bestand kein Zusammenhang zu ADMA-Plasmakonzentration und kardialer Funktion [47]. In einer neueren Studie von 2012 wurden zwei DDAH1 Polymorphismen (rs10158674, rs233115) in einer indianischen Population in Amerika

untersucht [48]. Die Forschungsgruppe von Best et al. konnte jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Prävalenz von Präeklampsie und den einzelnen SNPs nachweisen [48].

In der vorliegenden Studie werden ein Polymorphismus der DDAH2, sowie acht Polymorphismen der DDAH1 untersucht. Basis für die Auswahlkriterien der Einzelnukleotid–Polymorphismen sind bisherige Veröffentlichungen im internationalen HapMap Projekt (*HapMap project 2003*) und Studien des Institutes für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Basierend auf dem Verteilungsmuster des Kopplungsungleichgewichtes (*linkage disequilibrium, LD*) von Proben der kaukasischen Bevölkerung, die im internationalen HapMap Projekt (2003) genotypisiert wurden, wird versucht aus jedem LD Block 1-2 SNPs ($r^2 \geq 0.8$) auszuwählen. DDAH 1 besteht aus sieben LD-Blöcken, DDAH2 aus einem. Tabelle 1 zeigt die Lokalisation des jeweiligen SNP im Gen der DDAH, sowie die *Minor allele frequency* (MAF).

Tabelle 1: Einzelnukleotid-Polymorphismen der DDAH

DDAH	Bereich	SNP	MAF
DDAH2	Promoter	rs805305	G=0.471/1029
DDAH1	Intron	rs18582	G=0.327/715
DDAH1	Intron	rs2268667	A=0.2761/603
DDAH1	Exon	rs233112	C=0.3622/791
DDAH1	Intron	rs11161606	C=0.4011/876
DDAH1	Intron	rs11161614	G=0.1896/414
DDAH1	Intron	rs1146381	A=0.4986/1089
DDAH1	Intron	rs7555486	A=0.2193/479
DDAH1	Intron	rs506733	C=0.3333/728

DDAH=Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, MAF=Minor allele frequency

SNP= Single nucleotide polymorphism

2.5 ADMA während Präeklampsie und gesunder Schwangerschaft

Fickling et al. [49] führten 1993 eine Studie durch, in der sie die ADMA-Konzentrationen im Plasma von nicht schwangeren Frauen, gesunden Schwangeren, Schwangeren mit Gestationshypertonie und Präeklampsie untersuchten. Sie fanden heraus, dass die gesunden Schwangeren, im Vergleich zu den nicht schwangeren Frauen, signifikant niedrigere und die präeklampsischen Frauen signifikant höhere ADMA-Werte aufwiesen [49]. In einer longitudinalen Studie von Holden et al. wurden niedrige ADMA-Konzentrationen im Blut von gesunden Frauen zu Beginn der Schwangerschaft gefunden, diese gingen mit einem physiologischen Blutdruckabfall einher. Im Laufe des dritten Trimenons stiegen sowohl die ADMA-Werte, als auch der Blutdruck wieder an. In der Präeklampsie-Gruppe konnte keine Reduktion der ADMA-Werte beobachtet werden [50]. Savvidou et al. [51] haben 2003 den Zusammenhang von erhöhten ADMA-Konzentrationen im Plasma, endothelialer Dysfunktion und Präeklampsie untersucht. Sie verglichen hierbei den dopplersonographisch gemessenen Widerstand in den Aa. uterinae, die Plasmakonzentration von ADMA und die flussvermittelte Dilatation der A. brachialis (nicht invasive Methode, um eine endothelvermittelte Vasodilatation zu messen) von gesunden und präeklampsischen Schwangeren. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass Schwangere, die eine Präeklampsie entwickelten, sowohl einen erhöhten placentaren Widerstand, als auch signifikant erhöhte ADMA-Werte im Serum zeigen [51]. Eine norwegische Arbeitsgruppe fand ebenfalls erhöhte Plasmakonzentrationen von ADMA bei Frauen mit einer Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren [52]. Sie untersuchten in Ihrer Studie das Blut von präeklampsischen Schwangeren, einer gesunden Kontrollgruppe und das Blut der Neugeborenen beider Gruppen auf die Konzentration von ADMA, SDMA und L-Arginin. Die Beobachtungen ergaben deutlich erhöhte Konzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin im Blut der Präeklampsiepatientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den Neugeborenen waren in der Gruppe der präeklampsischen Mütter die SDMA-Spiegel erhöht und in beiden Gruppen die mediane ADMA-Konzentration im fetalen Kreislauf drei Mal höher als im Kreislauf der Mutter [52]. Auch in vielen neueren Studien wurden erhöhte ADMA-Werte im Plasma von präeklampsischen Frauen im Vergleich zu gesunden Schwangeren gefunden [53-60]. Einzelne Studien haben keinen

Unterschied der ADMA-Plasmakonzentration zwischen gesunden und präeklampsischen Schwangeren gefunden [103,104].

Bezüglich einer veränderten DDAH-Aktivität bei Präeklampsie bzw. bei erhöhten Zell-ADMA-Konzentrationen existieren unterschiedliche Ergebnisse. Siroen et al. [61] fanden keine signifikanten Unterschiede der DDAH-Aktivität in der Plazenta, des fetomaternalen ADMA-Gradienten und der ADMA-Konzentration in der Plazenta zwischen Schwangeren mit Präeklampsie und gesunden Schwangeren. Bei den Probanden mit einem HELLP-Syndrom konnten sie jedoch eine erhöhte ADMA-Konzentration feststellen [61]. Eine histomorphologische Studie des Uterusgewebes nach Hysterektomie von 52 Patientinnen zeigte jedoch eine Korrelation von ADMA-Konzentration in endothelialen Zellen und der Intima-Media-Ratio (IMT) der uterinen Arteriolen [62]. Zudem fanden die Forscher eine verminderte DDAH-Aktivität bei den Patientinnen mit einer erhöhten Zell-ADMA Konzentration [62]. In einer neueren Studie von Anderssohn et al. [59] wurde die ADMA-Plasmakonzentration sowie die plazentare DDAH-Expression und Aktivität von 18 Frauen mit Präeklampsie und 28 gesunden Schwangeren gemessen [59]. Die plazentare DDAH-Aktivität konnte bei der Gruppe mit Präeklampsie kaum nachgewiesen werden, in der Kontrollgruppe war sie signifikant höher. Die ADMA-Plasmakonzentration war bei den präeklampsischen Frauen höher als bei den gesunden Schwangeren. Der feto-maternale ADMA Gradient war in der Präeklampsiegruppe geringer. Außerdem war bei den erkrankten Schwangeren die mRNA Expression von DDAH2 signifikant erniedrigt, während die PRMT1 Expression bei beiden Gruppen gleich war [59]. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse der Studien darauf hin, dass die Plasmakonzentration von ADMA in einer normalen Schwangerschaft sinkt, wohingegen die Konzentration bei Frauen mit Präeklampsie erhöht ist [49-60]. Zudem sind die ADMA-Werte bereits erhöht, bevor klinische Symptome einer Präeklampsie auftreten [51,55]. Dieses Phänomen könnte für die frühe Diagnose von Präeklampsie genutzt werden. Es konnte noch nicht sicher geklärt werden, was die genauen Ursachen für die erhöhten ADMA-Werte bei einer Präeklampsie sind. Die hohen ADMA-Konzentrationen im fetalen Blut und Urin im Vergleich zur mütterlichen ADMA-Plasmakonzentration, sowie die niedrigere DDAH-Aktivität in der Plazenta deuten jedoch darauf hin, dass die Ursache in einer verminderten DDAH-Aktivität in der Plazenta liegen könnte.

3. Material und Methoden

3.1 Genehmigung

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg bewilligt (UKE – KP 2004/006). Die Aufklärung der Frauen wurde mittels einer standardisierten Aufklärungs- und Einverständniserklärung durchgeführt. Es wurde kenntlich gemacht, dass die Teilnahme freiwillig ist und die Studie jederzeit und ohne Angabe von Gründen abgebrochen werden kann.

3.2 Studienverlauf und Datenerhebung

Die Rekrutierung erfolgte im ersten Trimenon in drei niedergelassenen Frauenarztpraxen in Hamburg-Eimsbüttel und Hamburg-Eppendorf. Von den Studienteilnehmern wurden im Verlauf der Schwangerschaft in jedem Trimenon eine Blutprobe à 3 ml und eine Urinprobe gewonnen. Diese wurden im Zeitraum von Juli 2010 bis August 2011 entnommen. Die Blutproben wurden venös mit einer EDTA-Monovette entnommen und bis zum Transport bei 4°C gelagert. Der Transport erfolgte am gleichen oder darauffolgenden Tag der Blutentnahme. Die Blutproben wurden bei 4°C und 2000 UPM (Umdrehungen pro Minute) zwanzig Minuten lang zentrifugiert. Aus der zentrifugierten Blutprobe wurden je zwei Aliquots Serum à 600 µl mittels einer Eppendorf-Pipette entnommen und in einem 1,5 ml Eppendorf - Gefäß bei - 80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Der Blutkuchen verblieb in der EDTA-Monovette und wurde ebenfalls bei -80° C gelagert. Mittels eines Urinstreifenschnelltestes (U–Stix) wurde in den Praxen der Harnstatus der Probandinnen erhoben. Mit dem Test wurde im Harn, semi-quantitativ, die Glukose-Eiweiß- und Leukozytenkonzentration bestimmt und auf einer Skala von 0-3 angegeben. Zudem wurde der pH-Wert ermittelt. Die Messung des Blutdruckes erfolgte am Oberarm mittels Blutdruckmanschette und Stethoskop auskultatorisch nach Riva-Rocci in 5mmHg Schritten. Bei Studieneinschluss und in jedem Trimenon wurden mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens folgende anamnestische, klinische und laborchemische Parameter erhoben:

- Alter bei Feststellung der Schwangerschaft
- Anzahl der Schwangerschaften und Geburten
- Gewicht und Körpergröße

- NIBP (Nicht invasiv gemessener Blutdruck)
- Eiweiß- und Glukosevorkommen im Urin, mittels U-Stix
- Medikamenteneinnahme während der Schwangerschaft
- Komplikationen in früheren Schwangerschaften (Früh-, Mangel-, und Fehlgeburten, EPH- Gestosen, HELLP- Syndrom und Gestationsdiabetes)
- Bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren (Adipositas, Diabetes, Rauchen, Hypertonie, Dyslipidämie)
- Bekannte schwerwiegende Erkrankungen (Blutungs- und Thromboseneigung, Herz, Leber, Nieren und ZNS- Erkrankungen)

3.3 Ein – und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien

- Klinisch gesunde schwangere Frauen im ersten Trimenon

Ausschlusskriterien

- Komplikationen in dieser Schwangerschaft (Früh-, Mangel-, und Fehlgeburten, EPH- Gestosen, HELLP- Syndrom und Gestationsdiabetes)
- Bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren (Adipositas, Diabetes, Rauchen, Hypertonie, Dyslipidämie)
- Bekannte schwerwiegende Erkrankungen (Blutungs- und Thromboseneigung, Herz, Leber, Nieren und ZNS- Erkrankungen)

3.4 Bestimmung der DDAH Polymorphismen

3.4.1 DNA Isolation aus Blutkuchen

Die DNA Isolation wurde mittels eines vorgefertigten Kits „Nucleo Spin® Blood Quick Pure“ (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Bis zu Beginn der DNA Isolation wurden die Blutkuchen in EDTA-Monovetten 3 - 10 Monate bei - 80°C gelagert. Für die Lyse der Zellen wurde je 100 µl Blutkuchen und 100 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1:1 in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nach Zugabe von je 25 µl Proteinase K und 200 µl BQ1 Pufferlösung wurden die Proben 20 s lang gevortext und anschließend bei 70°C für 15 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 200 µl Ethanol pipettiert und die Proben erneut 20 s lang gevortext. Für die Bindung der DNA wurden Nucleo Spin® Blood Säulen in 2 ml

Zentrifugenröhrchen platziert und mit den DNA-Lysaten beladen. Die Proben wurden bei 11.000 * g 1 min lang zentrifugiert und der Durchfluss im Anschluss verworfen. Die Säule wurde erneut in einem 2 ml Zentrifugenröhrchen platziert, mit 350 µl Pufferlösung BQ2 gewaschen und bei 11.000 * g 3 min lang zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Trocknung der Nucleo Spin® Blood Säule erfolgte durch die 3 min dauernde Zentrifugation. Die Säulen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gesetzt und die DNA mittels 50 µl vorgewärmter Pufferlösung BE (70°C) eluiert. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert und anschließend bei 11.000 * g für 1 min zentrifugiert.

3.4.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsmessung der isolierten DNA erfolgte mit Hilfe des Nano Drop® 1000 Spectrophotometers (Fa. Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Dafür wurde je Probe 1 µl der isolierten DNA verwendet und die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

3.4.3 Bestimmung der DDAH1 und DDAH2 Polymorphismen mittels real time – PCR

Die Bestimmung der DDAH1 und DDAH2 Polymorphismen erfolgte anhand eines auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) basierenden Verfahrens. Die PCR wurde im ABI PRISM 7900 HAT Thermocycler (Fa. Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA) durchgeführt.

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode, bei der DNA-Abschnitte in vitro amplifiziert werden [63]. Dieser Vorgang wird mit einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) in mehreren aufeinander folgenden Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA. Hierbei wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt um die Stränge voneinander zu trennen. Danach wird rasch auf 60°C hinunter gekühlt. Nach dem Prinzip der spezifischen Basenpaarung folgt nun die Primerhybridisierung (primer annealing) an die einzelsträngigen DNA-Templates. Bei Primern handelt es sich um Startermoleküle aus DNA-Oligonukleotiden. Um eine spezifische DNA-Sequenz zu amplifizieren, wird ein gegenläufig orientiertes Primerpaar verwendet. In

der Elongationsphase wird mittels der Taq-Polymerase der zwischen den Primern eingeschlossenen Sequenzabschnitt vom 3' Ende aus synthetisiert. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch der entsprechende Sequenzabschnitt exponentiell vervielfacht wird [63].

Für die Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen ist in der Regel die Durchführung einer qualitativen PCR mit Endpunktmessung ausreichend. In der vorliegenden Studie wurde jedoch eine quantitative real time-PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden durchgeführt, um mögliche Probleme während der Messung feststellen zu können. Dabei wurden nach jedem Zyklus die PCR-Produkte über ein Fluoreszenzsignal quantifiziert. Die Fluoreszenzintensität verhält sich dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, einem 5' Fluoreszenz-Reporter und einem 3' Quencher. Solange der Quencher an die Sonde gebunden ist wird das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Die Sonde enthält außerdem einen 3' minor groove binder (MGB). Der MGB ist ein Protein, das in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix bindet und dadurch die Bindung der Sonde stabilisiert. Er ermöglicht die Verwendung von verkürzten Sonden und somit eine exakte Diskrimination der gesuchten Sequenz, sowie die Detektion eines einzelnen Basenaustausches. Während der Elongation erreicht die Taq-Polymerase die Sonde, durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität wird die Sonde hydrolisiert und Quencher und Reporter voneinander getrennt. Das vorher durch den Quencher unterdrückte Fluoreszenzsignal wird nun sichtbar und führt zu einer messbaren Fluoreszenzemission des Reporters. Da jedem Allel ein spezifisches Fluoreszenzsignal zugeordnet ist, kann aus der jeweiligen Fluoreszenzemission auf das entsprechende Allel geschlossen werden.

Die DDAH1 und DDAH2 Polymorphismen (siehe Tabelle 1) wurden mit vorgefertigten SNP-Assays (Fa. Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA) bestimmt. Dafür wurden in 386 - Well PCR-Platten für jede Probe nach folgendem Schema pipettiert:

- 25 ng isolierte DNA
- 2,5 µl Taq Man® Genotyping Master Mix (Fa. Applied Biosystems)
- 0,125 µl Taq Man® SNP Genotyping Assay Mix (Fa. Applied Biosystems)
- 2,375 µl Aqua dest.

Tabelle 1: Einzelnukleotid-Polymorphismen der DDAH

DDAH	Bereich	SNP	MAF
DDAH2	Promoter	rs805305	G=0.471/1029
DDAH1	Intron	rs18582	G=0.327/715
DDAH1	Intron	rs2268667	A=0.2761/603
DDAH1	Exon	rs233112	C=0.3622/791
DDAH1	Intron	rs11161606	C=0.4011/876
DDAH1	Intron	rs11161614	G=0.1896/414
DDAH1	Intron	rs1146381	A=0.4986/1089
DDAH1	Intron	rs7555486	A=0.2193/479
DDAH1	Intron	rs506733	C=0.3333/728

DDAH=Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, MAF=Minor allele frequency

SNP= Single nucleotide polymorphism

In der Negativkontrolle wurde die genomische DNA durch Aqua dest. ersetzt. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und 1 min lang bei 1000 UPM abzentrifugiert. Die PCR erfolgte im ABI PRISM 7900 HAT Thermocycler (Fa. Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA) nach folgendem Schema:

1. 50°C 2 min
2. 95°C 10 min
3. 92°C 15 s *40 Zyklen
4. 60°C 1 min

Die Auswertung des Assays erfolgte mittels der Geräte-Software SDS 2.3 (Fa. Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA) durch den Allelic- Discrimination-Plot.

3.5 Bestimmung von ADMA und SDMA im Blutplasma

3.5.1 Methode

Die ADMA - und SDMA-Plasmakonzentration wurde mittels der Flüssigkeitschromatographie Tandem-Massenspektrometrie (*liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS*) bestimmt. Die Analyse der Proben erfolgte nach der im Institut etablierten Methode, die im Folgenden kurz dargestellt wird [64,65].

Bei der praktischen Durchführung wurde gemäß der „Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von ADMA, SDMA und L-Arginin in Plasmaproben“ des Laborbereiches AG Klinische Pharmakologie Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf vorgegangen.

ADMA und SDMA wurden nach Butylierung als entsprechende Ester bestimmt. Für die Bestimmung von ADMA und SDMA wurde im Multiple Reaction Monitoring (MRM) der Übergang der Ionen m/z 259.3 zu m/z 214, m/z 259.3 zu m/z 228, m/z 245.3 zu m/z 172 und m/z 231.3 zu m/z 70 verfolgt. Durch Zusatz internen deuterierten Standards konnte eine Quantifizierung erfolgen. Als interne Standards wurden d6-ADMA, d6-NMMA und d7-Arginin zugesetzt.

3.5.2 Durchführung

Das Plasma wurde, wie eingangs beschrieben, durch Zentrifugation gewonnen. Die Stocklösung des internen Standards wurde 1:1000 mit Methanol verdünnt. Vorher wurde der bei -20 °C gelagerte interne Standard auf Raumtemperatur gebracht. Eine Multi Screen 96-Well-Filterplatte wurde auf einer 96-Well-Unterplatte positioniert. Vom verdünnten Standard wurden jeweils $100\ \mu\text{l}$ in die Vertiefungen der Multi Screen 96-Well-Platte pipettiert (Multipette), danach wurden $25\ \mu\text{l}$ Kalibrierlösung, bzw. Plasma, bzw. Qualitätskontroll-Lösung zugegeben. Die Platte wurde bei Raumtemperatur 15 min geschüttelt. Die Multi Screen 96-Well-Platte wurde zusammen mit einer 96-Well-Polypropylenplatte bei 2000 UPM in einer Plattenzentrifuge für 15 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Erfolg optisch kontrolliert. Die Polypropylenplatte wurde auf den Heizblock gestellt, der zuvor auf 75 °C geheizt wurde. Nach ca. 30 min, wenn die Flüssigkeit komplett verdampft war, wurde die Platte kurz unter den Abzug gestellt und je Vertiefung $100\ \mu\text{l}$ butanolische Salzsäure zugegeben. Die Platte wurde mit einer Abdeckmatte verschlossen. Die Platte muss gut verschlossen sein, um eine quantitative Derivatisierung zu gewährleisten. Die verschlossene Platte wurde bei 65 °C 30 min lang auf dem Heizblock geheizt. Danach wurde sie für 1 min bei 2500 UPM (4 °C) zentrifugiert und die Abdeckmatte wurde wieder entfernt. Die butanolische Salzsäure wurde bei 75 °C ca. 60 min lang auf der Heizplatte verdampft. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Platte mit einer Abdeckmatte verschlossen und bei -20 °C bis zur Messung gelagert.

Vor der Messung wurde mit einer Mehrkanalpipette in jedes Well $100\ \mu\text{l}$ Methanol/Wasser 50/50 (v/v), pH 5 (gepuffert mit HCOOH/NH_3), gegeben. Für das

Lösen der Analyten wurden die 96 Well-Platten mit einer Klebefolie verschlossen und 30 min lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Proben auf eine neue Multi Screen 96-Well-Platte pipettiert (Mehrkanalpipette) und 5 min bei 2000 UPM (4°C) zentrifugiert. Die Messung auf dem Varian L1200 Triple Quadrupole Massenspektrometer (Fa. Varian, Walnut Creek, CA, USA) erfolgte isokratisch mit den HPLC Varian Pro Star Pumpen, 66% Acetonitril, 33 % (0,1 %ige) Ameisensäure.

Die Berechnung der Plasmakonzentrationen erfolgte durch die Star Workstation. Angaben zur Messunsicherheit: Der Variationskoeffizient des Assays beträgt ca. 3%. Die Nachweisgrenze liegt bei 0.05 µM. Sind die Streuungen der Qualitätskontroll-Proben für Genauigkeit und Präzision >20%, so kommt es zur Wiederholung der Platte.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der klinischen und laborchemischen Parameter wurde mit dem Statistik-Programm SPSS 18.0 für Windows (Superior Performing Software Systems Inc., Chicago, USA) und Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test geprüft. Die Daten werden als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen wurde ein ANOVA-Test angewendet. Um Zusammenhänge von metrischen Variablen aufzuzeigen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet. Für die Untersuchung der Abhängigkeit von Variablen wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Für alle Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95% angewendet. Ein p-Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Für die Genotypen- Datenanalyse wurde ein Test auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Patientinnen

4.1.1 Basischarakteristika

In der Rekrutierungsphase wurden 65 Frauen in die Studie eingeschlossen.

Im Studienzeitraum entwickelten drei Probandinnen Komplikationen in ihrer Schwangerschaft. Jeweils eine der Frauen hatte eine Präeklampsie, ein HELLP-Syndrom und einen Gestationsdiabetes. Drei der Studienteilnehmerinnen erlitten einen Abort. Insgesamt wurden diese sechs Frauen von der Studie ausgeschlossen. Bei 59 Probanden wurden kontinuierliche Blutentnahmen zu definierten Zeitintervallen durchgeführt. Die statistische Auswertung der laborchemischen und klinischen Daten erfolgte bei diesen 59 Probanden. Die Tabelle 1 zeigt die demographischen und klinischen Basischarakteristika der Studienteilnehmer:

Tabelle 2: Basischarakteristika und demographische Parameter

Alter (Jahre)	32 ± 4
Größe (cm)	168,8 ± 5,3
Gewicht vor Schwangerschaft (kg)	64 ± 11,3
BMI vor Schwangerschaft (kg/m ²)	22,4 ± 3,6
Nullipara (n, %)	33 (56%)
Multipara (n, %)	26 (44%)
Erstgravida (n,%)	27 (46%)
Multigravida (n,%)	32 (54%)

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. Häufigkeit und Prozent

Neben den demographischen Daten wurden bei Studieneinschluss mit einem standardisierten Fragebogen bestehende Vorerkrankungen, der Medikamentenstatus und Komplikationen in früheren Schwangerschaften erhoben. Folgende Grunderkrankungen der Probanden bestanden bei Studieneinschluss:

- Hypothyreose n=4
- Faktor-V-Leiden n=2

Jeweils zwei Probandinnen nahmen zum Zeitpunkt der Studie Blutgerinnungshemmer (Heparin und Acetylsalicylsäure) und vier Probanden

L-Thyroxin ein. Eine der Frauen hatte eine Präeklampsie in einer vorhergegangenen Schwangerschaft. Elf Frauen hatten einen Abort und zwei Frauen eine Frühgeburt in einer früheren Schwangerschaft. Eine der Studienteilnehmerinnen gab an, bis zu Beginn der Schwangerschaft geraucht zu haben.

4.1.2 Klinische Parameter

Bei den Frauen wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahmen definierte klinische Untersuchungen durchgeführt. Aufgrund der pathogenetischen Zusammenhänge wurden der systolische und diastolische Blutdruck, das Gewicht und der BMI der Frauen erhoben. Tabelle 2 zeigt die klinischen Parameter zum jeweiligen Zeitpunkt der Blutentnahme im ersten, zweiten und dritten Trimenon, sowie das Gewicht und den BMI vor der Schwangerschaft.

Tabelle 3: Klinische Parameter

N=59	Vor Schwangerschaft	1.Trimester	2.Trimester	3.Trimester	P
Alter Studienbeginn (Jahre)	-	32.5 ± 4.0	-	-	-
Gestationsalter (Wochen)	-	10.3 ± 2.9	22.6 ± 2.9	31.9 ± 2.1	
SBP (mmHg)	-	108.7 ± 8.1	107.2 ± 9.1	109.2 ± 8.6	0.32
DBP (mmHg)	-	66.2 ± 8.1	66.2 ± 7.3	65.3 ± 6.3	0.62
Gewicht (kg)	64.0 ± 11.3	66.2 ± 11.3	70.9 ± 10.9	76.1 ± 10.8	<0.001
BMI (kg/m ²)	22.4 ± 3.6	23.2 ± 3.6	24.9 ± 3.5	26.7 ± 3.5	<0.001

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung

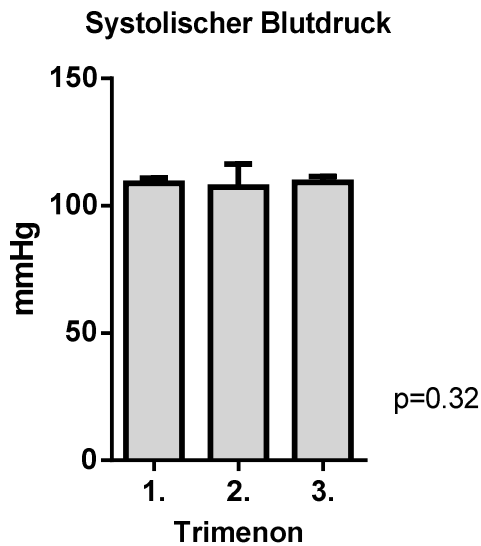


Abb. 3:
Systolischer Blutdruck im Verlauf der Schwangerschaft Mittelwert (KI 95%).
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

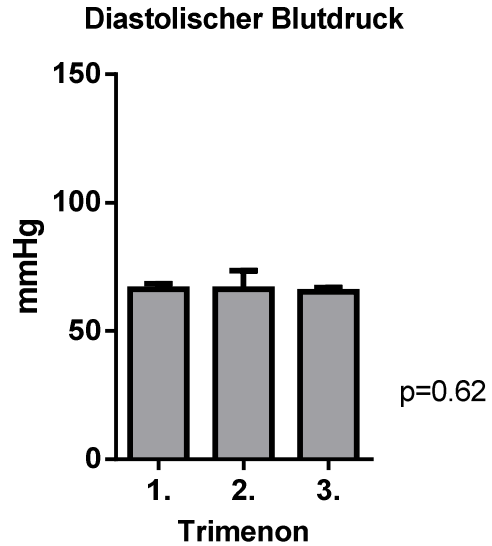


Abb.4:
Diastolischer Blutdruck im Verlauf Schwangerschaft Mittelwert (KI 95%).
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Der mittlere systolische und diastolische Blutdruck zeigte keine signifikante Änderung im Verlauf der Schwangerschaft (Abbildung 3 und 4). Analog zum Schwangerschaftsfortschritt stiegen das mittlere Gewicht und der mittlere Body-Mass-Index der Frauen signifikant an. Zudem wurde bei den Probandinnen mittels eines Urinstreifenschnelltestes der Harnstatus erhoben. Dieser Test auf Glukose, Eiweiß, Leukozyten und den PH-Wert zeigte bei keiner der Frauen Auffälligkeiten im Sinne einer dreifach-positive Anzeige.

4.2 Dimethylarginine

4.2.1 ADMA und SDMA Plasmakonzentration

Tabelle 4 und Abbildung 5 zeigen die mittlere ADMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Schwangerschaft.

Tabelle 4: ADMA-Plasmakonzentration ($\mu\text{mol/l}$)

1. Trimenon	$0,50 \pm 0,08$
2. Trimenon	$0,53 \pm 0,07$
3. Trimenon	$0,55 \pm 0,12$

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SD

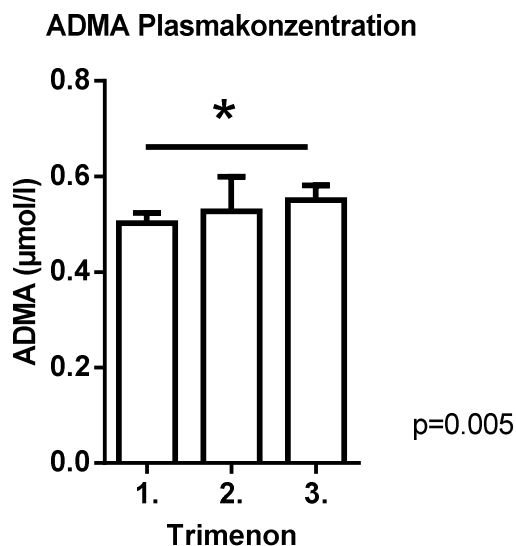


Abb. 5:
ADMA-Plasmakonzentration im Verlauf
der Schwangerschaft Mittelwert (KI 95%).
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Die mittlere ADMA-Plasmakonzentration stieg über den Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich an. Die Bonferroni post hoc Analyse zeigte, dass sich die Mittelwerte der ADMA-Plasmakonzentration im ersten und dritten Trimenon signifikant voneinander unterscheiden ($p=0.005$). Zwischen dem Mittelwert der ADMA-Plasmakonzentration des ersten und zweiten Trimenons, sowie des zweiten und dritten Trimenons gab es keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 5: SDMA-Plasmakonzentration ($\mu\text{mol/l}$)

1. Trimenon	$0,39 \pm 0,06$
2. Trimenon	$0,42 \pm 0,07$
3. Trimenon	$0,43 \pm 0,08$

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SD

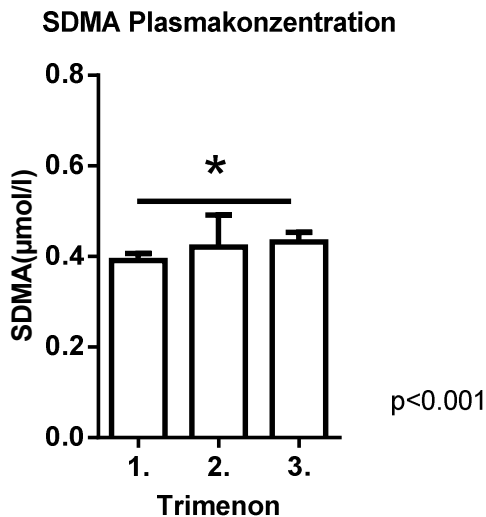


Abb. 6:

SDMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Schwangerschaft Mittelwert (KI 95%).

Die Ergebnisse wurden mit eine ANOVA ermittelt.

Auch die mittlere SDMA-Plasmakonzentration stieg über den Verlauf der Schwangerschaft an. Die Mittelwerte der SDMA-Plasmakonzentration im ersten und dritten Trimenon unterschieden sich signifikant voneinander ($p < 0.001$). Zwischen dem Mittelwert der SDMA-Plasmakonzentration des ersten und zweiten Trimenons, sowie des zweiten und dritten Trimenons gab es keinen signifikanten Unterschied.

4.2.2 ADMA – Plasmakonzentration und klinische Parameter

Es bestand zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation zwischen der mittleren ADMA-Plasmakonzentration und der Höhe des systolischen/diastolischen Blutdrucks oder dem Body-Mass-Index; lediglich zwischen dem Alter und der mittleren ADMA-Plasmakonzentration im 3. Trimenon gab es eine schwache Korrelation ($p = 0,05$; $r = 0,3$).

4.3 Einzelnukleotid – Polymorphismen der DDAH1 oder DDAH2 und ADMA-Plasmakonzentrationen

Bei den Studienteilnehmerinnen wurden die oben genannten acht Einzelnukleotid-Polymorphismen der DDAH1 und DDAH2 und deren Einfluss auf die ADMA-Plasmakonzentration untersucht. Bei drei SNPs der DDAH1 (rs18582, rs2268667, rs233112) und einem SNP der DDAH2 (rs805305) konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der ADMA-Plasmakonzentration beobachtet werden. Dieser stellte sich dar als Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration von den Probandinnen, die homozygot für das major Allel waren bis zu den Probandinnen, die homozygot für das minor Allel waren.

4.3.1 DDAH1 Polymorphismus rs18582

Tabelle 6: ADMA-Plasmakonzentration nach Genotypen DDAH1 rs18582

	AA (n=22)	AG (n=30)	GG (n=4)	P
1. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.48 ± 0.07	0.50 ± 0.07	0.63 ± 0.10	0.001
2. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.52 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.60 ± 0.11	0.1
3. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.52 ± 0.10	0.56 ± 0.13	0.65 ± 0.05	0.15
ADMA Trimeton kombiniert (µmol/l)	0.51 ± 0.08	0.53 ± 0.10	0.63 ± 0.09	<0.001

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung

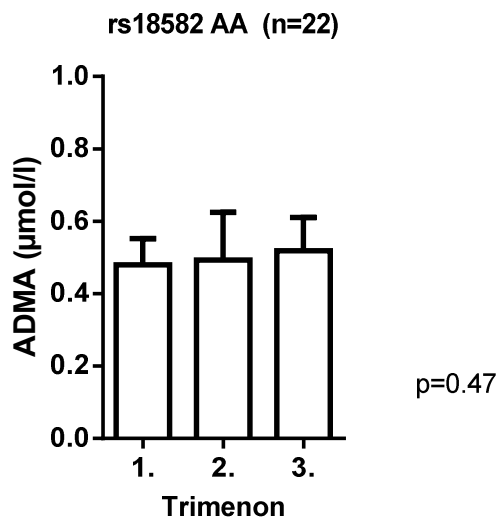


Abb. 7:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp AA
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

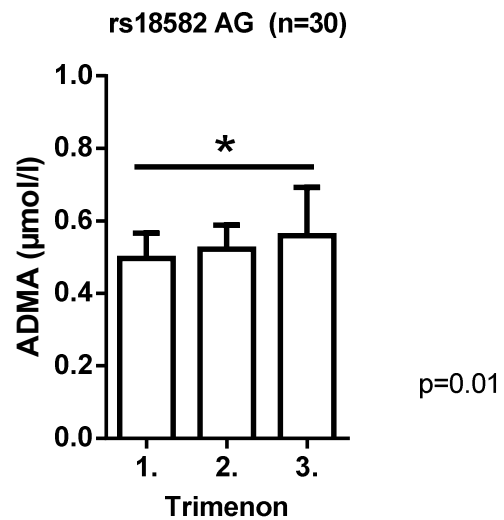


Abb.8:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp AG
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

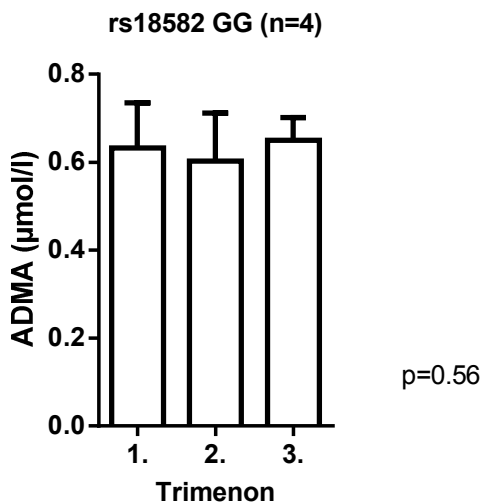


Abb. 9:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp GG
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Für den Polymorphismus DDAH1 rs18582 A>G konnte ein signifikanter Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration (p=0.01) im Verlauf der Schwangerschaft beobachtet werden. Dieser war weniger ausgeprägt für den Genotyp AA und nicht nachweisbar für den Genotyp GG.

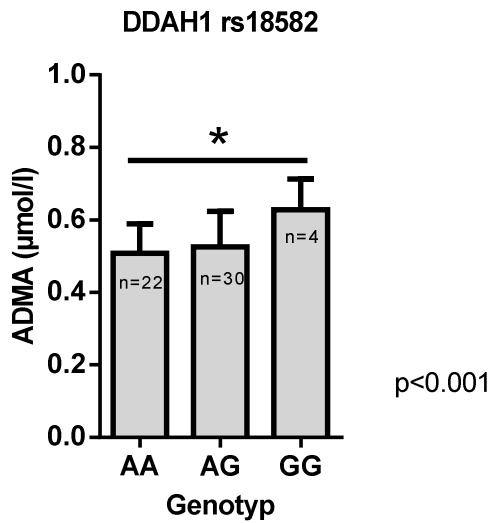


Abb.10:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
gesamte Schwangerschaft.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

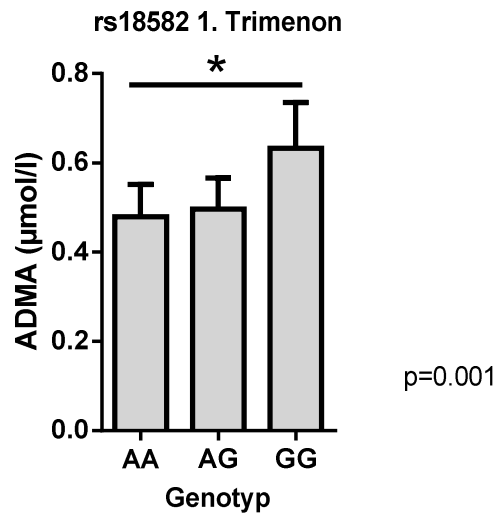


Abb.11:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
1. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

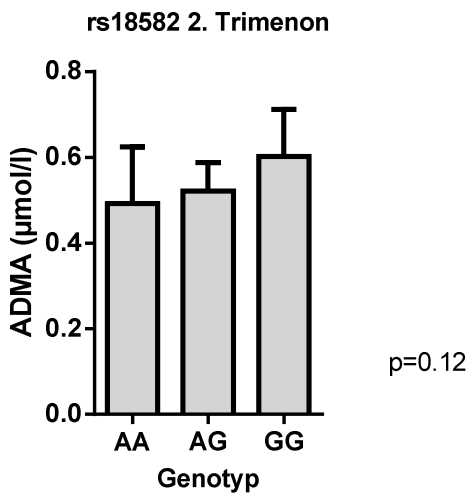


Abb.12:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
2. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

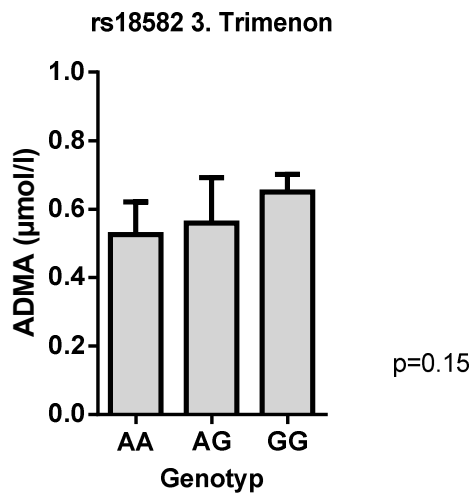


Abb.13:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
3. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Bei den Frauen mit dem Genotyp GG wurde im ersten Trimenon ($p=0.001$), sowie bei den zusammengefassten Trimenen ($p < 0.001$) die im Mittel signifikant höchste ADMA-Plasmakonzentration gemessen.

4.3.2 DDAH1 Polymorphismus rs2268667

Tabelle 7: ADMA-Plasmakonzentration nach Genotypen DDAH1 rs2268667

	GG (n=20)	AG (n=30)	AA (n=5)	P
1. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.48 ± 0.08	0.49 ± 0,07	0.63 ± 0.09	<0.001
2. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.51 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.58 ± 0.10	0.13
3. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.52 ± 0.05	0.55 ± 0.13	0.65 ± 0.10	0.13
ADMA Trimenon kombiniert (µmol/l)	0.51 ± 0.08	0.52 ± 0.09	0.62 ± 0.08	<0.001

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung

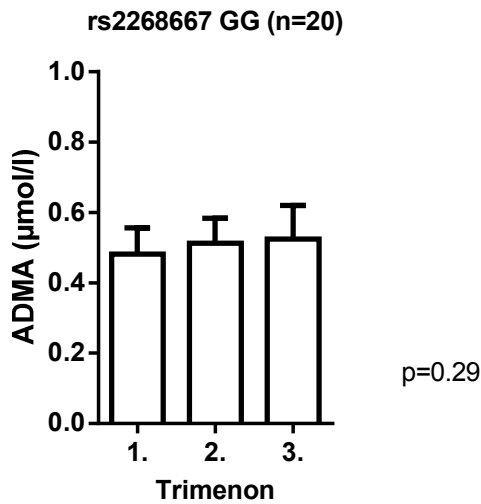


Abb.14:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp GG
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

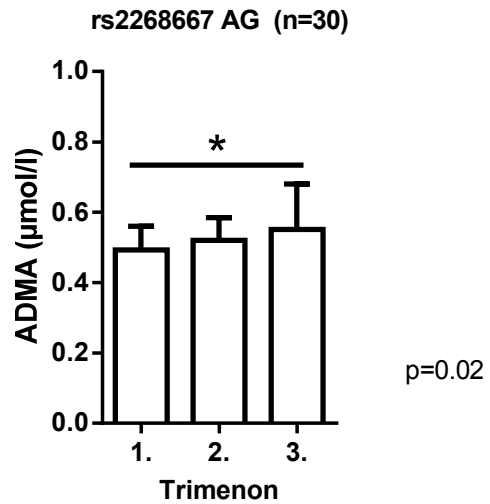


Abb.15:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp AG
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

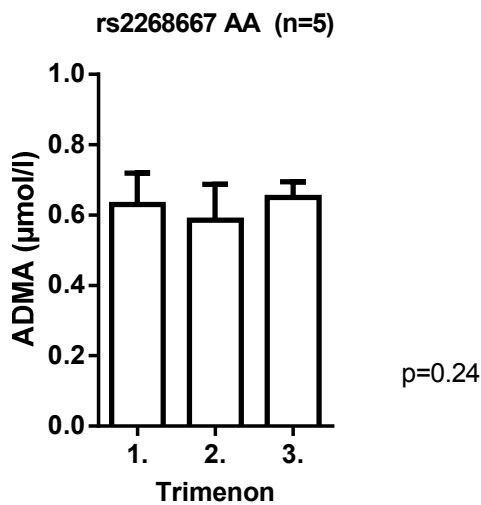


Abb. 16:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp AA
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Für den Polymorphismus DDAH1 rs2268667 G>A konnte ein signifikanter Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration ($p=0.02$) im Verlauf der Schwangerschaft beobachtet werden. Dieser war weniger ausgeprägt für den Genotyp GG und nicht nachweisbar für den Genotyp AA.

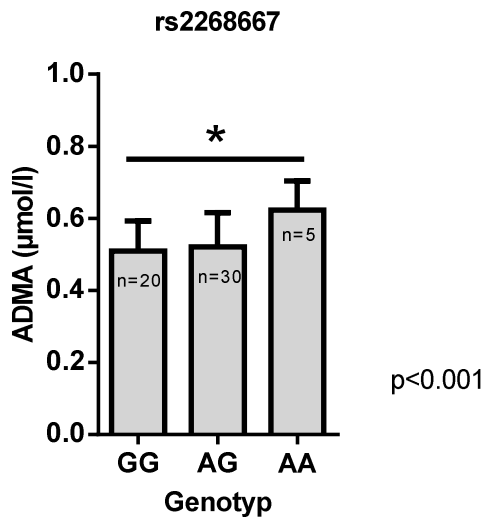


Abb.17:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen.
gesamte Schwangerschaft.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

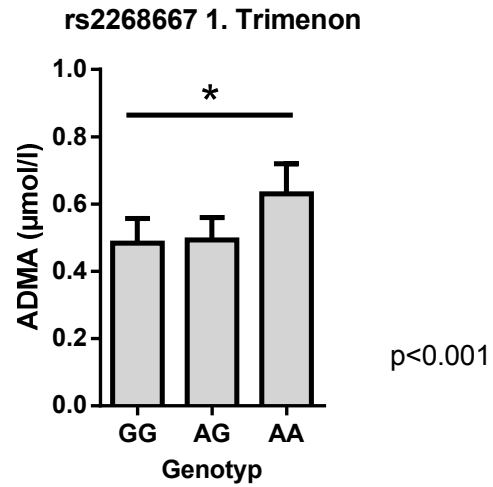


Abb.18:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
1. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

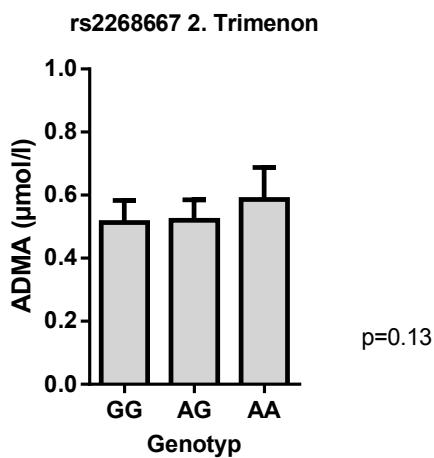


Abb.19:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen.
2. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

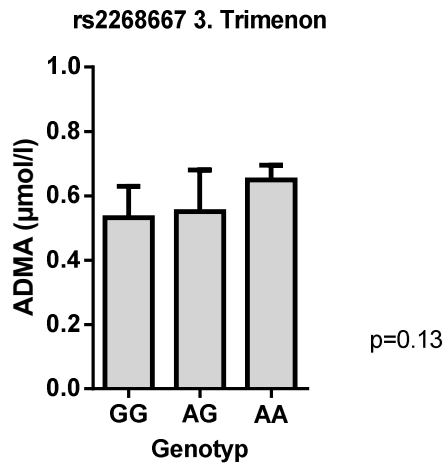


Abb.20:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
3. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Bei den Probandinnen mit dem Genotyp AA wurde im ersten Trimenon sowie bei den zusammengefassten Trimenen die im Mittel signifikant höchste ADMA-Plasmakonzentration gemessen ($p < 0.001$).

4.3.3 DDAH1 Polymorphismus rs233112

Tabelle 8: ADMA-Plasmakonzentration nach Genotypen DDAH 1 rs233112

	TT (n=19)	CT (n=30)	CC (n=8)	P
1. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.47 ± 0.07	0.50 ± 0.07	0.59 ± 0.09	0.002
2. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.52 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.58 ± 0.10	0.11
3. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.52 ± 0.10	0.54 ± 0.13	0.65 ± 0.04	0.03
ADMA Trimenon kombiniert (µmol/l)	0.51 ± 0.08	0.52 ± 0.10	0.61 ± 0.09	<0.001

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung

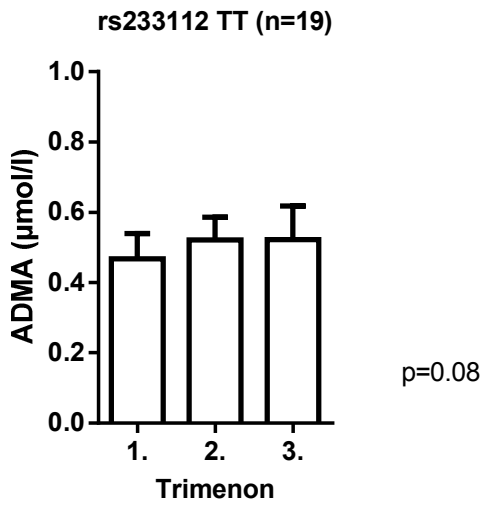


Abb. 21:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp TT
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

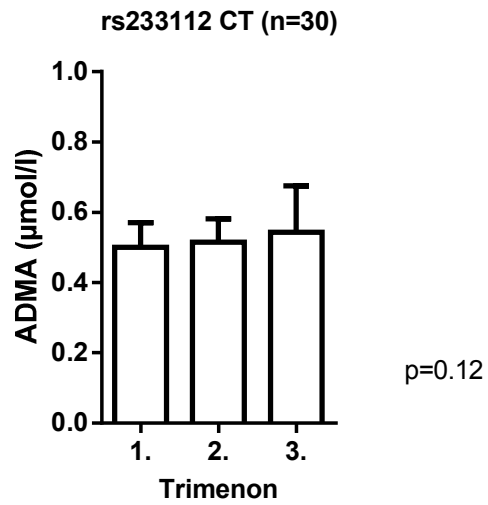


Abb.22:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp CT
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

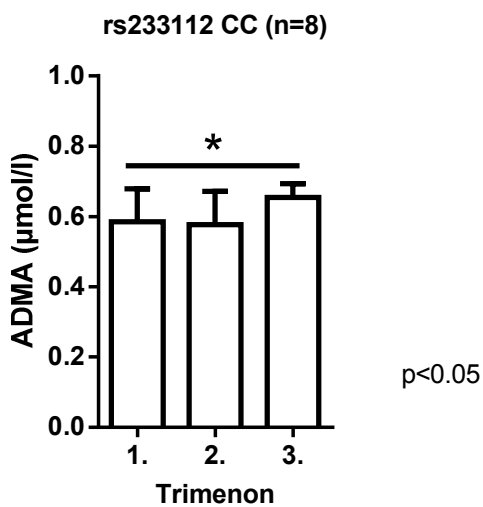


Abb. 23:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp CC
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Für den Polymorphismus DDAH1 rs233112 bei dem Genotyp CC ein signifikanter Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration ($p<0.05$) im Verlauf der Schwangerschaft beobachtet werden. Dieser war weniger ausgeprägt für die Genotypen CT und TT.

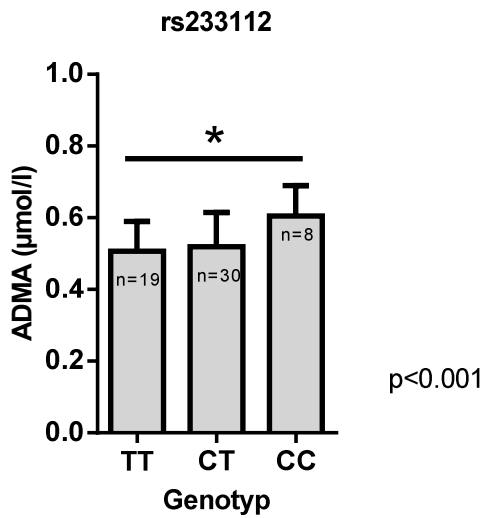


Abb. 24:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
gesamte Schwangerschaft.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

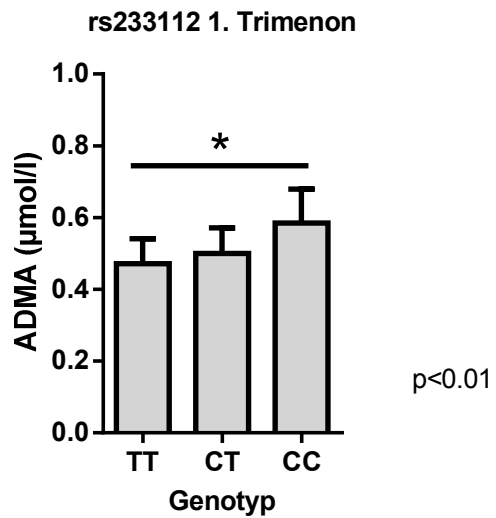


Abb.25:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
1. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

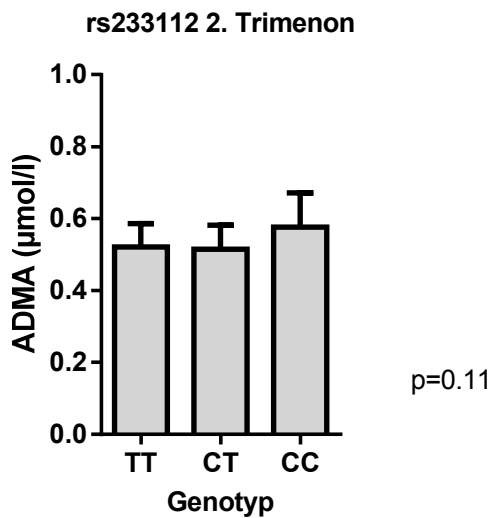


Abb. 26:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
2. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

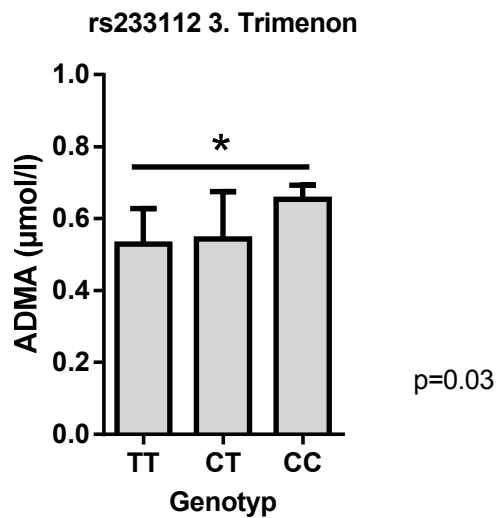


Abb.27:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
3. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Bei den Frauen mit dem Genotyp CC wurde im ersten und dritten Trimenon ($p < 0.01$, $p = 0.03$) sowie bei den zusammengefassten Trimenen ($p < 0.001$) die im Mittel signifikant höchste ADMA-Plasmakonzentration gefunden.

4.3.4 DDAH2 Polymorphismus rs805305

Tabelle 9: ADMA-Plasmakonzentration nach Genotypen DDAH2 rs805305

	CC (n=32)	CG (n=21)	GG (n=5)	p
1. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.52 ± 0.08	0.48 ± 0.08	0.51 ± 0.05	0.20
2. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.54 ± 0.07	0.52 ± 0.08	0.46 ± 0.06	0.046
3. Trimenon ADMA (µmol/l)	0.55 ± 0.12	0.55 ± 0.13	0.55 ± 0.07	0.95
ADMA Trimenon kombiniert (µmol/l)	0.54 ± 0.09	0.52 ± 0.10	0.50 ± 0.07	0.22

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung

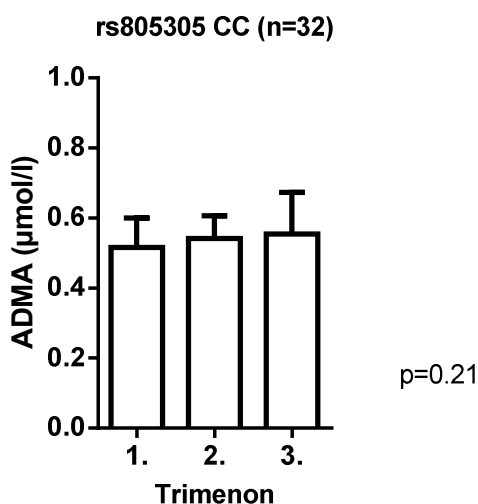


Abb. 28:
Mittelwerte (KI 95%) Genotypen CC
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

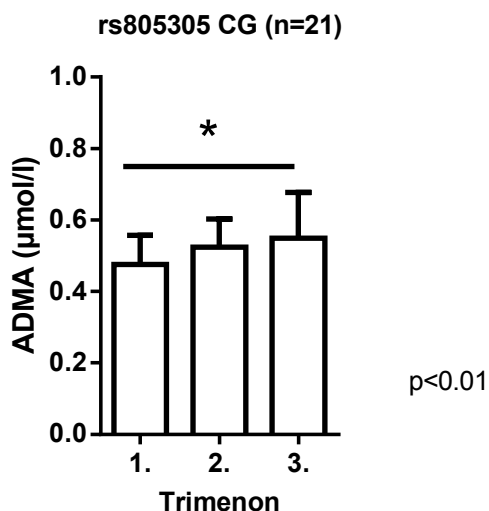


Abb.29:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp CG
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

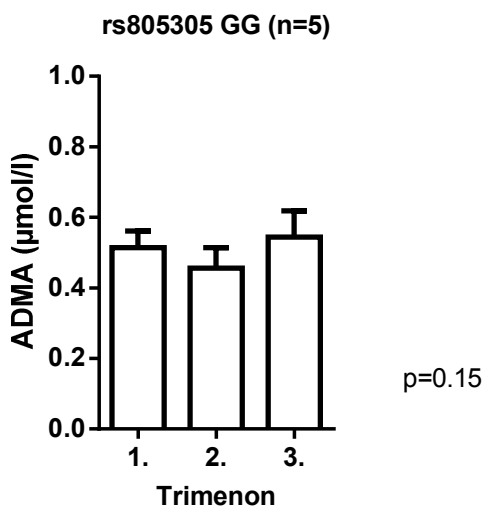


Abb. 30:
Mittelwerte (KI 95%) Genotyp GG
im Schwangerschaftsverlauf.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Für den Polymorphismus DDAH2 rs805305 -449 C>G konnte ein signifikanter Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration ($p=0.05$) im Verlauf der Schwangerschaft beobachtet werden. Dieser war weniger ausgeprägt für den Genotyp CC und nicht nachweisbar für den Genotyp GG.

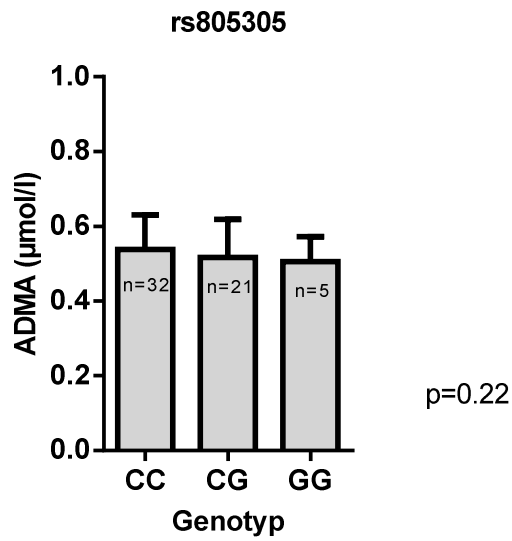


Abb. 31:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
gesamte Schwangerschaft.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

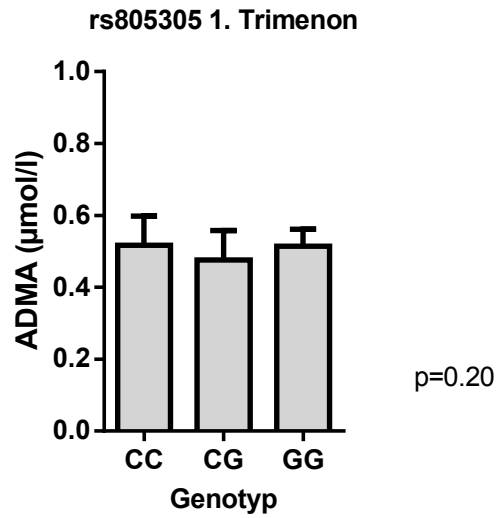


Abb.32:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
1. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

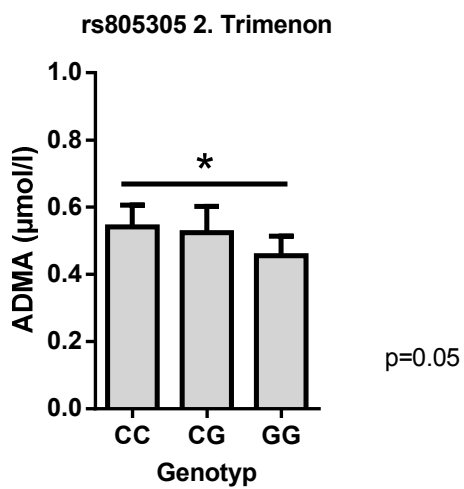


Abb. 33:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
2. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

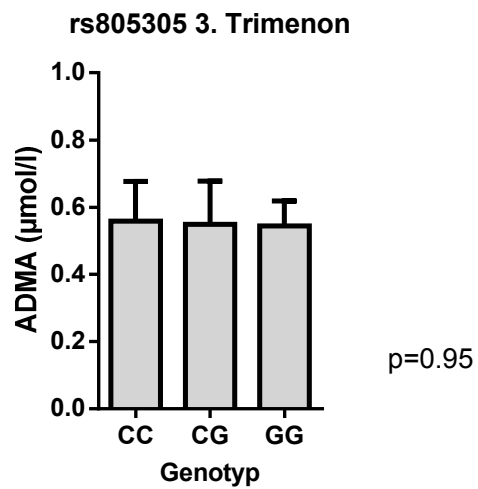


Abb.34:
Mittelwerte (KI 95%) der Genotypen
3. Trimenon.
Die Ergebnisse wurden mit einer ANOVA ermittelt.

Bei den Frauen mit dem Genotyp CC wurde im zweiten Trimenon die im Mittel signifikant höchste ADMA-Plasmakonzentration gemessen (p=0.05).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie beobachtet werden, dass für die DDAH1 bei den Frauen die homozygot für das minor Allel waren im ersten Trimenon und bei den zusammengefassten Trimenen die signifikant höchste ADMA-Plasmakonzentration nachgewiesen werden konnten. Zudem wurde für die DDAH1 bei den Frauen die homozygot für das minor Allel waren oder einen heterozygoten Genotyp hatten ein signifikanter Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Schwangerschaft beobachtet.

Insbesondere ist noch aufgefallen, dass in der Gruppe der Frauen mit Schwangerschaftskomplikationen, wie Präeklampsie oder HELLP-Syndrom, für zwei SNPs (rs 18585 und rs2268667) jeweils der heterozygote Genotyp nachgewiesen werden konnte. Zudem war eine Probandin, die eine Präeklampsie entwickelte, für den SNP rs 233112 homozygot für das minor Allel. Für die genannten Genotypen konnte in dieser Studie ein signifikanter Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Schwangerschaft beobachtet werden.

Für weitere Einzelnukleotid-Polymorphismen wurde, bezüglich der ADMA-Plasmakonzentration, keine signifikanten Korrelationen festgestellt.

5. Diskussion

Präeklampsie ist eine häufige Erkrankung in der Schwangerschaft und eine der bedeutendsten Ursachen perinataler Morbidität und Mortalität [4]. Bislang konnten die genauen pathogenetischen Vorgänge der Präeklampsie nicht abschließend geklärt werden. Bisherige klinische Studien haben gezeigt, dass die ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie erhöht ist [49-60]. Es ist jedoch wenig über den zeitlichen Verlauf der ADMA-Plasmakonzentration in einer normalen Schwangerschaft bekannt.

Da es bis heute kaum präventive Behandlungsansätze der Präeklampsie gibt, ist eines der wichtigsten Mittel zur Verringerung der Komplikationsrate die frühzeitige Diagnose. Um Vergleichswerte für eine präzise Einordnung der ADMA-Konzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft zu erhalten, ist es notwendig die ADMA-Konzentration im Plasma während einer normalen Schwangerschaft zu kennen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den zeitlichen Verlauf der ADMA-Plasmakonzentration bei gesunden Schwangeren zu untersuchen. Zudem wurden genetische Polymorphismen des abbauenden Enzyms Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase analysiert, um herauszufinden, ob zwischen der ADMA-Plasmakonzentration, klinischen und laborchemischen Parametern und den DDAH-Polymorphismen Zusammenhänge bestehen.

5.1 Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Schwangerschaft

In der vorliegenden Arbeit stieg die mittlere ADMA-Plasmakonzentration bei den gesunden Frauen über den Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich an. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer klinischer Studien überein [50, 56, 60]. Zudem nahm auch die mittlere SDMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Schwangerschaft zu. In einer longitudinalen Studie haben Holden et al. [50] niedrige ADMA-Konzentrationen im Blut von gesunden Frauen zu Beginn der Schwangerschaft gefunden, diese gingen mit einem physiologischen Blutdruckabfall einher. Im Laufe des dritten Trimenons stiegen sowohl die ADMA-Werte, als auch der Blutdruck signifikant an. Zugleich war die mittlere ADMA Konzentration im Plasma bei nicht schwangeren Frauen im Vergleich zu schwangeren Frauen signifikant höher [50].

Tabelle 10 zeigt eine Übersicht von Studienergebnissen zum Verlauf der ADMA-Plasmakonzentration während einer normalen Schwangerschaft und von nicht schwangeren Frauen.

Tabelle 10: ADMA-Plasmakonzentration in der Schwangerschaft und bei nicht Schwangeren

	1.Trimenon	2.Trimenon	3.Trimenon	Nicht Schwangere	
ADMA $\mu\text{mol/l}$	0.4	0.52	0.56	0.82	(Holden et al.1998)
ADMA $\mu\text{mol/l}$		0.34	0.49		(Speer et al. 2008)
ADMA $\mu\text{mol/l}$	0.51	0.52	0.58		(Rizos et al. 2012)

In der Schwangerschaft laufen unterschiedliche physiologische Veränderungen ab. Durch einen verminderten systemischen Gefäßwiderstand und einer Erhöhung der Herzfrequenz steigt das Herzzeitvolumen an [66,67]. NO trägt wesentlich zu den hämodynamischen Anpassungsvorgängen in der Schwangerschaft bei [68-71]. Es steigert den Blutfluss in der Plazenta, setzt die Kontraktilität der glatten Muskelzellen herab und ist an der Regulation der fetoplazentaren Gefäßreaktivität beteiligt [68-71].

Mehrere Studien haben gezeigt, dass ADMA ein endogener Inhibitor der NO-Synthese ist [16, 24, 29]. Kommt es während der Schwangerschaft zu erhöhten ADMA-Spiegeln im Blut, führt dies zu einem Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) und infolge dessen zu einer verminderten Vasodilatation der Blutgefäße [2].

In der Frühschwangerschaft könnte eine verminderte ADMA-Plasmakonzentration Bestandteil der hämodynamischen Anpassung des Organismus sein. Die verminderte ADMA-Plasmakonzentration kann eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid bewirken und somit zu einer vermehrten Perfusion und Relaxation des Uterusgewebes beitragen. In der Spätschwangerschaft hingegen ist es möglich, dass physiologisch erhöhte ADMA-Werte daran beteiligt sind, die NO induzierte Wirkung zu antagonisieren und den Uterus auf die Geburt vorzubereiten.

Für einen Anstieg von Plasma-Dimethylargininen im Verlauf der Schwangerschaft kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Ein möglicher Auslöser könnte eine erhöhte Expression oder Aktivität von Protein-Arginin-Methyltransferasen sein, die an der Synthese von Dimethylargininen beteiligt sind [27,28]. Eine weitere Möglichkeit für einen Anstieg von Dimethylargininen ist der verminderte enzymatische Abbau durch DDAH oder eine verminderte renale Ausscheidung.

ADMA wird zu mehr als 70% durch Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase metabolisiert, somit könnte auch eine verminderte DDAH-Expression oder Aktivität zu einer Erhöhung der ADMA-Plasmakonzentration beitragen [33,34].

5.2 Blutdruckänderungen im Verlauf der Schwangerschaft

Im Verlauf einer normalen Schwangerschaft ist bis zum zweiten Trimenon ein leichter Blutdruckabfall zu beobachten. Dabei nimmt der systolische Blutdruck nur gering, der diastolische mit 10-15mmHg deutlicher ab [1,66]. Zwischen der 20. und 24. Schwangerschaftswoche können die niedrigsten Blutdruckwerte gemessen werden [1,66]. Bis zur Entbindung steigt der arterielle Blutdruck etwa auf das Niveau des Ausgangswertes an [1,66].

In dieser Studie konnten die beschriebenen Blutdruckänderungen nicht nachvollzogen werden. Im Trend fiel der mittlere systolische Blutdruck bis zum zweiten Trimenon leicht ab und stieg zum Ende der Schwangerschaft über den Ausgangswert an. Insgesamt waren die Änderungen des mittleren systolischen und diastolischen Blutdrucks im Verlauf der Schwangerschaft jedoch nicht signifikant.

Eine Ursache hierfür könnten Probleme bei der methodischen Erfassung des Blutdrucks gewesen sein. Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) empfiehlt die Durchführung der Blutdruckmessung wie folgt: Die Messung ist manuell mit einer an den Oberarmumfang adaptierten Manschetten durchzuführen. Die erste Messung sollte nach einer zwei - bis dreiminütigen Ruhephase in sitzender Position erfolgen. Die Messung ist primär an beiden Armen und später - bei geringen Differenzen - am rechten Arm zu messen [7]. In der vorliegenden Studie konnten diese Bedingungen nicht vollständig gewährleistet werden, da die Erhebung der Blutdruckwerte in den gynäkologischen Praxen durch unterschiedlich geschulte Mitarbeiter durchgeführt wurde. Zudem haben verschiedene Studien gezeigt, dass es, abhängig vom Untersucher, bei der manuellen Blutdruckmessung zu erheblichen Unterschieden der Messergebnisse kommen kann [75, 76]. Eine weitere Ursache könnte der Zeitpunkt der Blutdruckmessung innerhalb der einzelnen Trimenen gewesen sein. Die erste Blutdruckmessung erfolgte vergleichsweise spät, am Ende des ersten Trimenons, im Mittel um die 10.3 ± 2.9 (MW \pm SD) Schwangerschaftswoche. Die letzte Blutdruckmessung wurde zu Beginn des dritten Trimenons, im Mittel um die 31.9 ± 2.1 (MW \pm SD) Schwangerschaftswoche durchgeführt. Diese Gegebenheiten

könnten in der vorliegenden Studie zu den insgesamt geringen gemessenen mittleren Blutdruckänderungen über den Verlauf der Schwangerschaft beitragen haben.

5.3 Korreliert die ADMA – Plasmakonzentration mit klinischen Parametern?

Die Kenntnis von Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie spielt eine wichtige Rolle in der Beratung und Betreuung von Schwangeren. Da es bis heute kaum präventive Behandlungen der Präeklampsie gibt, ist eines der wichtigsten Mittel zur Verringerung der Komplikationsrate die frühzeitige Diagnose. Bekannte Risikofaktoren, im Verlauf der Schwangerschaft eine Präeklampsie zu entwickeln, sind u.a. ein erhöhter Blutdruck und ein BMI > 26 [2]. In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Auftreten einer Präeklampsie die ADMA-Werte analog zu einem erhöhten Blutdruck ansteigen [50,60]. In dieser Studie wurde untersucht, ob auch in gesunden Schwangerschaften ein Zusammenhang zwischen der ADMA-Plasmakonzentration und klinischen Markern, insbesondere der Höhe des Blutdruckes und des BMI besteht.

In der vorliegenden Studie konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation zwischen der mittleren ADMA-Plasmakonzentration und der Höhe des systolischen oder diastolischen Blutdrucks nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Holden et al. [50]. In dieser Studie ging der physiologische Blutdruckabfall während einer gesunden Schwangerschaft im ersten Trimenon mit signifikant verminderten ADMA-Werten einher. Über den Verlauf der Schwangerschaft stiegen sowohl der Blutdruck, als auch die ADMA-Plasmakonzentration signifikant an [50]. Der fehlende Zusammenhang zwischen der ADMA-Plasmakonzentration und der Höhe des Blutdrucks in der vorliegenden Studie könnte aus den oben beschriebenen geringen systolischen und diastolischen Blutdruckänderungen im Verlauf der Schwangerschaft resultieren.

5.4 Einzelnukleotid – Polymorphismen der DDAH im Zusammenhang mit der ADMA – Plasmakonzentration

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der ADMA-Plasmakonzentration und verschiedenen Genotypen der DDAH1 und DDAH2 bei Frauen während einer gesunden Schwangerschaft gibt. Bei drei der Einzelnukleotid-Polymorphismen der DDAH1 (rs18582, rs226866, rs233112) und einem Polymorphismus der DDAH2 (rs805305) konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der ADMA-Plasmakonzentration beobachtet werden.

In dieser Studie wurde besonders am Anfang der Schwangerschaft ein starker Zusammenhang zwischen der ADMA-Plasmakonzentration und bestimmten Genotypen der DDAH festgestellt. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass besonders zu Beginn einer Schwangerschaft genetische Aspekte eine größere Rolle spielen und dass bei fortgeschrittener Schwangerschaft andere physiologische Faktoren in den Vordergrund rücken.

DDAH ist maßgeblich für den Abbau von ADMA verantwortlich, sodass eine verminderte Expression oder Aktivität des Enzyms für erhöhte Plasmakonzentrationen von ADMA verantwortlich sein kann [4]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie könnten darauf hindeuten, dass sowohl für die DDAH1 als auch für die DDAH2 Einzelnukleotid-Polymorphismen existieren, die möglicherweise zu einer veränderten DDAH-Expression oder Aktivität führen und somit die Höhe der ADMA-Plasmakonzentration beeinflussen.

Es existieren wenige Studien, die den Zusammenhang von Polymorphismen der DDAH und der ADMA-Plasmakonzentration untersucht haben. In einer Studie von O'Dwyer et al. [72] wurde bei septischen Patienten erstmals ein Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus der DDAH2 (-449 G/C) und der Höhe der ADMA-Plasmakonzentration gefunden. In einer Studie von Abhary et al. [77] über Patienten mit Diabetes mellitus Typ2 wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen ADMA-Plasmakonzentrationen und Polymorphismen der DDAH1 und DDAH2 nachgewiesen. Dieser Zusammenhang konnte in einer anderen Studie an Patienten mit Diabetes mellitus Typ2 für DDAH1 unterstützt werden [78]. Lind et al. [79] zeigten in einer neueren Studie ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen der ADMA-Plasmakonzentration und Polymorphismen der DDAH1.

Bisher sind aus der Literatur keine Studien über den Zusammenhang zwischen der ADMA-Plasmakonzentration und Polymorphismen der DDAH in einer gesunden Schwangerschaft bekannt. Bisherige Studien weisen bereits auf einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen der DDAH und Präeklampsie oder Hypertonus hin [45-47]. Sowohl für die DDAH1 als auch für die DDAH2 sind Einzelnukleotid-Polymorphismen beschrieben worden, die möglicherweise zu einer veränderten DDAH-Expression führen bzw. in den Zusammenhang mit erhöhter Prävalenz von Hypertonus oder Präeklampsie gestellt wurden [45-47]. Eine finnische Arbeitsgruppe identifizierte bei der Analyse von sieben Einzelnukleotid-Polymorphismen der DDAH1 mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode zwei Haplotypen (H2 und H3), die das Risiko für das Auftreten einer Präeklampsie erhöhten (Odds ratio:3,93; 95%CI) [45]. In der Studie konnte jedoch aufgrund fehlender Daten zur ADMA-Plasmakonzentration der Einfluss der Polymorphismen auf die ADMA-Plasmakonzentrationen nicht geklärt werden [45]. Eine Studie von Maas et. al [47] zeigte einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen der DDAH2 (rs 805304, rs805305) und der Prävalenz von Präeklampsie. Die Arbeitsgruppe konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und der ADMA-Konzentration nachweisen.

5.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Die bisherige Datenlage lässt vermuten, dass die Aussagekraft eines einzelnen Polymorphismus zu gering ist, um als Marker für das komplexe Krankheitsbild Präeklampsie zu dienen. So konnten schon Akbar et al. [45] zeigen, dass ein Polymorphismus alleine nicht zu einer erhöhten Prävalenz von Präeklampsie beiträgt. Erst bei der Betrachtung von Haplotypen ergab sich ein erhöhtes Risiko, an Präeklampsie zu erkranken [45]. Auch Williams et al. [73] beschrieben die Präeklampsie als eine Erkrankung, der komplexe genetische Veränderungen zugrunde liegen. Er nimmt an, dass die Präeklampsie aus Varianten an unterschiedlichen Loci begünstigt werden kann, die für sich betrachtet nur einen kleinen Effekt ausüben, jedoch zusammengefasst möglicherweise die Suszeptibilität für die Erkrankung erhöhen [73].

Bislang steht ein aussagekräftiger Test zur sicheren Früherkennung der Präeklampsie nicht zur Verfügung, eine frühzeitige Diagnose der Präeklampsie ist somit aufgrund fehlender Marker und Kriterien nicht möglich.

Bisherige Studien lassen einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen der DDAH und einer erhöhten Prävalenz der Präeklampsie oder Hypertonus vermuten [45-47]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass bei gesunden Schwangeren sowohl für die DDAH1 als auch für die DDAH2 Einzelnukleotid-Polymorphismen existieren, die möglicherweise zu einer veränderten DDAH-Expression oder Aktivität führen und somit die Höhe der ADMA-Plasmakonzentration beeinflussen. Sollten diese Beobachtungen auch für Schwangere mit einer Präeklampsie reproduzierbar sein, könnten ADMA und Polymorphismen der DDAH zusammen mit anderen klinischen und laborchemischen Parametern zur Risikoabschätzung für die Entwicklung einer Präeklampsie beitragen. Diese Hypothese kann ein Ansatzpunkt für weitergehende Forschung sein, um besser zu verstehen wie Polymorphismen der DDAH die ADMA-Konzentration und DDAH-Aktivität bei gesunden und präeklampsischen Schwangeren beeinflussen.

Zudem weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass die ADMA-Plasmakonzentration im Verlauf einer gesunden Schwangerschaft ansteigt. Diese Ergebnisse können als Vergleichswerte für eine präzise Einordnung der ADMA-Konzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft dienen und Anhaltspunkte für die Beurteilung der ADMA-Plasmakonzentration bei präeklampsischen Frauen liefern.

5.6 Limitationen

Die Fallzahl in dieser Studie war mit n=59 Probandinnen größer als die in bisherigen Studien über den Verlauf der ADMA-Plasmakonzentration in einer normalen Schwangerschaft (n=23–41) [50,56,60]. Die klinischen und laborchemischen Daten wurden von gesunden Schwangeren aus der kaukasischen Bevölkerung erhoben. Dies sollte beim Vergleich der Ergebnisse mit präeklampsischen Frauen, nicht Schwangeren und anderen ethnischen Gruppen berücksichtigt werden. In den bisherigen Studien über die ADMA-Plasmakonzentration während einer gesunden Schwangerschaft und präeklampsischen Frauen wurden unterschiedliche Messverfahren verwendet (*high performance liquid chromatography*, *ELISA-kit*). In

der vorliegenden Studie wurde die ADMA-Konzentration mittels der Flüssigkeitschromatographie Tandem-Massenspektrometrie (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) bestimmt. Diese ist der derzeitige Goldstandard für die Analyse von Dimethylargininen.

Bei der Analyse des Zusammenhangs von Polymorphismen der DDAH und der Höhe der ADMA-Plasmakonzentration ergaben sich unterschiedlich große Subgruppen für die jeweiligen Genotypen (n=4–30). Aufgrund der teils kleinen Fallzahlen ist eine generalisierte Schlussfolgerung aus den Ergebnissen nicht möglich. Die Messung der Blutdruckwerte wurde in den gynäkologischen Praxen nicht standardisiert durch unterschiedlich geschulte Mitarbeiter durchgeführt. Dieses ist vermutlich die Ursache dafür, dass die physiologischen Blutdruckänderungen einer normalen Schwangerschaft nicht nachvollzogen werden konnten.

5.7 Zusammenfassende Bewertung

In der vorliegenden Arbeit stieg die mittlere ADMA-Plasmakonzentration bei den gesunden Frauen über den Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich an, womit die Ergebnisse einiger anderer Studien bestätigt werden konnten. Zudem konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der ADMA-Plasmakonzentration und Einzelbasen-Polymorphismen des Dimethylaminohydrolase-Gens gezeigt werden. DDAH ist am Abbau von ADMA beteiligt, so dass eine verminderte Expression oder Aktivität des Enzyms für erhöhte Plasmakonzentrationen von ADMA verantwortlich sein könnte [4]. Diese Studienergebnisse könnten darauf hindeuten, dass bei gesunden Schwangeren sowohl für die DDAH1 als auch für die DDAH2 Einzelnukleotid-Polymorphismen existieren, die möglicherweise zu einer veränderten DDAH-Expression oder Aktivität führen. Dies zu untersuchen war jedoch nicht Gegenstand der Studie.

6. Zusammenfassung

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und wird in vielen Studien als Marker für endotheliale Dysfunktion beschrieben. ADMA wird hauptsächlich durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut. Präeklampsie ist eine häufige Erkrankung in der Schwangerschaft und eine der bedeutendsten Ursachen perinataler Morbidität und Mortalität. Bisherige klinische Studien haben gezeigt, dass die ADMA-Plasmakonzentration bei Frauen mit Präeklampsie erhöht ist. Es ist jedoch wenig über den zeitlichen Verlauf der ADMA-Plasmakonzentration in einer normalen Schwangerschaft bekannt. In dieser Studie wurde der zeitliche Verlauf der ADMA-Konzentration im Plasma gesunder Schwangerer untersucht, um Vergleichswerte für eine präzise Einordnung der ADMA-Konzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft zu erhalten. Zudem haben wir den Zusammenhang von Einzelbasen-Polymorphismen des Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-Gens und klinischen und laborchemischen Parametern untersucht.

Bei 59 Frauen wurde die ADMA-Plasmakonzentration mittels der LC-MS/MS bestimmt. Für die Detektion der Einzelnukleotid-Polymorphismen der DDAH wurde eine quantitative PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden durchgeführt.

Die mittlere ADMA-Plasmakonzentration der Frauen stieg im Verlauf der Schwangerschaft an. Bei drei Einzelnukleotid-Polymorphismen der DDAH1 (rs18582, rs2268667, rs233112) und einem Polymorphismus der DDAH2 (rs805305) konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der ADMA-Plasmakonzentration beobachtet werden. Es bestand jedoch zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation zwischen der mittleren ADMA-Plasmakonzentration und klinischen Parametern.

Die Studienergebnisse könnten darauf hindeuten, dass sowohl für die DDAH1 als auch für die DDAH2 Einzelnukleotid-Polymorphismen existieren, die möglicherweise zu einer veränderten DDAH-Expression oder Aktivität führen und somit die Höhe der ADMA-Plasmakonzentration beeinflussen. Der Anstieg der ADMA-Konzentration im Verlauf der Schwangerschaft könnte Bestandteil der hämodynamischen Anpassungsvorgänge sein. Weitere Studien bei gesunden und präeklampischen Frauen werden notwendig sein, um besser zu verstehen, wie die Polymorphismen der DDAH die ADMA-Plasmakonzentrationen und die DDAH Aktivität beeinflussen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Kiechle M., Gynäkologie und Geburtshilfe. Urban und Fischer 2006;1:362-370
- [2] Böger RH, Diemert A, Schwedhelm E, Lüneburg N, Maas R, Hecher K. The Role of Nitric Oxide Synthase Inhibition by Asymmetric Dymethylarginine in the Pathophysiology of Preeclampsia. Gynecol Obstet Invest 2010; 69:1-13
- [3] Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. Lancet 2005; 365:785–99
- [4] Redman CW, Sargent IL. Latest Advances in Understanding Preeclampsia Science 2005; 308:1592-94
- [5] National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000; 183:1–22
- [6] Klockenbusch W, Fischer T., Präeklampsie. 1. Auflg. Uni-Med 2005; 17-53.
- [7] Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG), Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Schwangerschaftshochdruck/Gestose, Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen. AWMF 015/018 (S1) 2010; 1-4
- [8] Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. The Lancet 2001; vol. 357, no. 9249: 53–56
- [9] Sattar N, Gaw A, Packard CJ, Greer IA. Potential pathogenic roles of aberrant lipoprotein and fatty acid metabolism in pre-eclampsia. British Journal of Obstetrics and Gynaecology 1996; 103: 614-620
- [10] James JL, Whitley GS, Cartwright JE. Pre-eclampsia: fitting together the placental, immune and cardiovascular pieces. J Pathol 2010; 221:363–78
- [11] Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. Placenta 2009; 30:43–8
- [12] Bushimi IA, Saade GR, Chawlisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. Hum Reprod Update 1998; 4:25-42
- [13] Tsukimori K, Komatsu H, Fukushima K, Kaku T, Nakano H, Wake N. Inhibition of nitric oxide synthase at mid-gestation is associated with increases in arterial

- blood pressure, serum tumor necrosis factor-alpha and placental apoptosis. *Am J Hypertens* 2008; 21(4):477-81
- [14] Ebose EJ, Campell PI, Okorodudu AO. Elektrolytes and pH changes in pre-eclamptic rats. *Clin Chim Acta* 2007; 384(1-2):135-40
- [15] Nevo O, Thaler I, Shik V, Vortman T, Soustiel JF. The effect of isorbide dinitrate, a donor of nitric oxide, on maternal cerebral blood flow in gestational hypertension and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188(5):1360-65.
- [16] Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC. The L--arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis* 1996;127:1-11
- [17] Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and function. *Hypertension* 1994;23:1121- 31
- [18] Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 Jun;153(3):1251-6
- [19] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329(27):2002-12
- [20] Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 199; 88(11):4651-5
- [21] Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 1990;189(6):347-53
- [22] Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett.* 1993; 334(2):170-4
- [23] Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A, Kienke S, Brandes R, Dwenger A, Frölich JC. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* 1995;117(2):273-84
- [24] Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339:572-75

- [25] Faccinetti F, Longo M, Piccinini F, Neri I, Volpe A. L- Arginine reduces blood pressure in preeclamptic women through nitric oxide release.. J Soc Gynecol Invest 1999; 6:202-07
- [26] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of N^G, N^G-dimethyl-L-arginine to L-citrullin in rats. Biochem Biophys Res Commun 1987; 148:671-77
- [27] Clarke S. Protein methylation. Curr Opin Cell Biol. 1993; 5: 977–98.
- [28] McBride AE, Silver PA. State of the Arg: protein methylation at arginine comes of age. Cell. 2001; 106: 5–8
- [29] Vallance P, Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:1023-30.
- [30] Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P. Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibitor of NO synthases? Am J Physiol. 1995; 269: C750–756
- [31] Matsumoto M, Mori A. Effects of guanidino compounds on rabbit brain microsomal Na⁺-K⁺ ATPase activity. J Neurochem. 1976; 27: 635–636
- [32] Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: Regulation and action. Pharmacol Res 2009;60:447-60
- [33] Nijveldt RJ, Siroen MPC, Teerlink T, van Leeuwen PAM. Elimination of asymmetric dimethylarginine by the kidney and the liver: A link to the development of multiple organ failure? American society for nutritional sciences 2004; 134:2848-52
- [34] Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, Mac Allister R. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23(8):1455-59
- [35] Rodionov RN, Murry DJ, Vaulman SF, Stevens JW, Lentz SR. Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production. J of Biol Chem 2010;285(8):5385-91
- [36] Cooke JP. ADMA and its role in vascular disease. Vasc Med 2005;10:3-9
- [37] Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendoca M, Dennehy K, Li M, Modlinger P, Leiper J, Vallance P, Adler O, Tojo A, Welch

- WJ, Wilcox CS. Isoform- specific regulation by N(G), N(G)- dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular – endothelium derived relaxing factor/NO. *Circ Res* 2007; 101:627-35
- [38] Hu X, Atzler D, Xu X, Zhang P, Guo H, Lu Z, Fassett J, Schwedhelm E, Böger RH, Bache RJ, Chen Y. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:1540–1546
- [39] Dayoub H, Achan V, Adimoolam S et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003; 108:3042–47
- [40] Pope AJ, Karrupiah K, Kearns PN, Xia Y, Cardounel AJ. Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolases in the regulation of endothelial nitric oxide production. *J Biol Chem.*2009; 284:35338 –35347
- [41] Feng M, Liu L, Guo Z, Xiong Y. Gene transfer of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 improves the impairments of DDAH/ADMA/NOS/NO pathway in endothelial cells induced by lysophosphatidylcholine. *Eur J Pharmacol.* 2008 Apr 14; 584(1):49-56
- [42] Zhang P, Hu X, Xu X, Chen Y, Bache RJ. Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1 modulates endothelial cell growth through nitric oxide and Akt. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:890–897
- [43] Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction. Dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99:3092-95
- [44] Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway. Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104:2569-75
- [45] Akbar F, Heinonen S, Pirskanen M, Uimari P, Tuomainen TP, Salonen JP. Haplotypic association of DDAH1 with susceptibility to pre- eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2004;11:73-77
- [46] Jones LC, Tran CTL, Leiper JM, Hingorani AD, Vallance P. Common genetic variation in basal promotor element alters DDAH2 expression in endothelial cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 2003;310:836-43
- [47] Maas R, Erdmann J, Lüneburg N, Stritzke J, Schwedhelm E, Meisinger C, Peters A, Weil J, Schunkert H, Böger RH, Lieb W. Polymorphisms in the

- promoter region of the dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of hypertension. *Pharma Res* 2009; 60:488-93
- [48] Best LG, Nadeau M, Davis K, Lamb F, Bercier S, Anderson CM. Genetic variants, immune function, and risk of pre-eclampsia among American Indians. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 67(2):152-9
- [49] Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GSJ. Plasma concentration of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre- eclampsia. *Lancet* 1993; 342:242-43
- [50] Holden DP, Fickling SA, Whitley GSJ, Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:551-56
- [51] Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaidea KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentration of asymmetric dimethylarginine in women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003; 361:1511-17
- [52] Braekke K, Ueland PM, Harsem NK, Staff AC. Asymmetric dimethylarginine in the maternal and fetal circulation in preeclampsia. *Pediatr Res* 2009;66:411-15
- [53] Mao D, Che J, Li K, Han S, Yue Q, Zhu W, Li L. Association of homocysteine, asymmetric dimethylarginine, and nitric oxide with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 282:371-75
- [54] Turan F, Ilhan N, Kaman D, Ateş K, Kafkasli A. Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in Turkish pre-eclamptic women without fetal growth retardation. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010 Jun;36(3):495-501
- [55] Savvidis A, Daniilidis A, Giannoulis C, Tantanasis T, Koiou K, Zournatzi V, Tzafettas J. Correlation between asymmetric dimethylarginine maternal plasma levels and preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2011;38(2):134-6
- [56] Rizos D, Eleftheriades M, Batakis E, Rizou M, Haliassos A, Hassiakos D, Botsis D. Levels of asymmetric dimethylarginine throughout normal pregnancy and in pregnancies complicated with preeclampsia or had a small for gestational age baby. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012 Aug;25(8):1311-5
- [57] Demir B, Demir S, Pasa S, Guven S, Atamer Y, Atamer A, Kocyigit Y. The role of homocysteine, asymmetric dimethylarginine and nitric oxide in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol*. 2012 Aug;32(6):525-8

- [58] Khalil AA, Tsikas D, Akolekar R, Jordan J, Nicolaides KH. Asymmetric dimethylarginine, arginine and homoarginine at 11-13 weeks' gestation and preeclampsia: a case-control study. *J Hum Hypertens*. 2013;27(1):38-43
- [59] Anderssohn M, Maass LM, Diemert A, Lüneburg N, Atzler D, Hecher K, Böger RH. Severely decreased activity of placental dimethylarginine dimethylaminohydrolase in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;161(2):152-6
- [60] Speer PD, Powers RW, Frank MP, Harger G, Markovic N, Roberts JM. Elevated asymmetric dimethylarginine concentrations precede clinical preeclampsia, but not pregnancies with small-for-gestational-age infants. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198(1):112.e1–7
- [61] Siroen MPC, Teerlink T, Bolte AC, van Elburg RM, Richir MC, Nijveldt RJ, van der Hoven B, van der Leeuwen PAM. No compensatory upregulation of placental dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2006;62:7-13
- [62] Loyaga-Rendon RY, Sakamoto S, Beppu M, Aso T, Ishisaka M, Takahashi R, Azuma T. Accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors, enhanced arginase activity, attenuated dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and intimal hyperplasia in premenopausal human uterine arteries. *Artherosclerosis* 2005;178:231-39
- [63] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-73
- [64] Schwedhelm E, Tan-Andresen J, Maas R, Riedere U, Schulze F, Böger RH. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric dimethylarginine in human plasma. *Clin Chem* 2005;51:1268-71.
- [65] Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH. Highthroughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2007;851:211–9
- [66] Moutquin JM, Rainville C, Giroux L, Raynauld P, Amyot G, Bilodeau R. A prospective study of blood pressure in pregnancy: prediction of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151:191–196

- [67] Lees MM, Taylor SH, Scott DB, Kerr MG. A study of cardiac output at rest throughout pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1974; 74: 319–328
- [68] López-Jaramillo P, Arenas WD, García RG, Rincon MY, López M. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2008;2(4):261-75
- [69] Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J. Physiol*. 2006; 572:25–30
- [70] Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Vonnahme KA, Luther JS, Buchanan DS, Hafez SA, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Uteroplacental vascular development and placental function: An update. *Int. J. Dev. Biol*. 2010; 54:355–366
- [71] Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta* 2011; 32:797–805
- [72] O'Dwyer MJ, Dempsey F, Crowley V, Kelleher DP, McManus R, Ryan T. Septic shock is correlated with asymmetrical dimethyl arginine levels, which may be influenced by a polymorphism in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase II gene: a prospective observational study. *Crit Care* 2006;10(5):R139
- [73] Williams PJ, Morgan L. The role of genetics in pre-eclampsia and potential pharmacogenomic interventions. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2012;5:37-51.
- [74] Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990 Nov;101(3):746-52
- [75] Sebo P, Pechère-Bertschi A, Herrmann FR, Haller DM, Bovier P. Blood pressure measurements are unreliable to diagnose hypertension in primary care. *J Hypertens*. 2014 Mar;32(3):509-17
- [76] Myers MG, Godwin M, Dawes M, Kiss A, Tobe SW, Kaczorowski J. Conventional versus automated measurement of blood pressure in the office (CAMBO) trial. *Fam Pract*. 2012 Aug;29(4):376-82
- [77] Abhary S, Burdon KP, Kuot A, Javadiyan S, Whiting MJ, Kasmeridis N, Petrovsky N, Craig JE. Sequence variation in DDAH1 and DDAH2 genes is strongly and additively associated with serum ADMA concentrations in individuals with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2010;5(3)

- [78] Anderssohn M, McLachlan S, Lüneburg N, Robertson C, Schwedhelm E, Williamson RM, Strachan MW, Ajjan R, Grant PJ, Böger RH, Price JF. Genetic and environmental determinants of dimethylarginines and association with cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2014 Mar;37(3):846-54
- [79] Lind L, Ingelsson E, Kumar J, Syvänen AC, Axelsson T, Teerlink T. Genetic variation in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 gene (DDAH1) is related to asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels, but not to endothelium-dependent vasodilation. *Vasc Med*. 2013;18(4):192-9
- [80] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–6
- [81] Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:944-948
- [82] Lopez-Jaramillo P, Naravez M, Calle A, Rivera J, Jacome P, Ruano C, Nava E. Cyclic guanosine 3' 5' monophosphate concentrations in preeclampsia: Effects of hydralazine. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103: 33-38
- [83] Calver A, Collier J, Leone A, Moncada S, Vallance P. Effect of local intraarterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens* 1993; 7:193-194
- [84] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–6
- [85] Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetric dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*. 2000;87(2):99-105
- [86] Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992;339:572–576
- [87] MacAllister R, Whitley G, Vallance P. Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int*. 1994;45:737–742

- [88] Olken NM, Marletta MA. NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry*.1993;32:9677–9685
- [89] Pou S, Keaton L, Surichamorn W, Rosen GM. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1999;274:9573–9580
- [90] Fickling SA, Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Vallance P, Whitley G. Regulation of macrophage nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for NG, NG dimethylarginine. *Acta Physiol Scand*. 1999;167:145–150
- [91] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme. NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. *J Biol Chem*. 1989;264:10205–10209
- [92] Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, Ogawa T. Detection of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. *J Biochem (Tokyo)*. 1995;117:237–238
- [93] Tran Cam TL, Fox MF, Vallance P, Leiper J. Chromosomal localization, gene structure and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000;68:101–105
- [94] Leiper J, MacAllister R, Whitley G, Santa Maria J, Chubb A, Charles I, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology to microbial arginine deiminases. *Biochem J*. 1999; 343:209–214
- [95] Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007 335(7627):974
- [96] McDonald SD, Malinowski A, Zhou Q, Yusuf S, Devereaux PJ. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. *Am HeartJ* 2008 156(5):918–30
- [97] Berks D, Hoedjes M, Raat H, Duvekot JJ, Steegers EA, Habbema JD. Risk of cardiovascular disease after pre-eclampsia and the effect of lifestyle interventions: a literature-based study. *BJOG* 2013 120(8):924–31
- [98] Welsch H, Krone HA. Mütterliche Mortalität bei HELLP-Syndrom in Bayern 1983-1992. *Zentralbl Gynäkol* 1994; 116:202-206

- [99] Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet*. 2001 Dec 22-29; 358(9299):2127-8
- [100] Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998 Nov 3; 98(18):1842-7
- [101] Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine concentrations are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001; 88:1201-03
- [102] Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Schäffer J, Barbey M, Koch KM, Frölich JC. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Mar; 10(3):594-600
- [103] Khalil AA, Tsikas D, Akolekar R, Jordan J, Nicolaides KH. Asymmetric dimethylarginine, arginine and homoarginine at 11-13 weeks' gestation and preeclampsia: a case-control study. *J Hum Hypertens*. 2013 ;27(1):38-43.
- [104] Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, Yoo HS. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia Placenta. 2006 ;27(4-5):438-44
- [105] Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K. Metabolism of NG,NG-and NG,N'G-dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys* 1987; 252: 526–537
- [106] Lüneburg N, Lieb W, Schwedhelm E, Zeller T, Carter A. Genomewide association study of dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for SDMA . *Circulation* 2011; 1 24: A1 2560

8. Appendix

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGXT	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
BMI	Body Mass Index in kg/m ²
CAT	<i>Cationic Acid Transporter</i> = Kationischer Aminosäuretransporter
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
DDAH	Dimethylarginin – Dimethylaminohydrolase
DGMV	α -keto- δ -(N,N-dimethylguanidino)-Valeriansäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid – Synthase
EPH	Edema, Proteinurie, Hypertonie
H	Haplotyp
HELLP	<i>Haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count</i> = Hämolyse, erhöhte Leberenzyme, Thrombozytopenie
IMR	Intima Media Ratio
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
K ⁺	Kalium
KI	Konfidenzintervall
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LDL	Low Density Lipoproteines
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin Methylester
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
L-NNA	N-Nitro-L-Arginin
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MGB	<i>Minor groove binder</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRN	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>

NIBP	Nicht invasiv gemessener Blutdruck
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase = Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
PE	Präeklampsie
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
RR	Blutdruck nach Riva Rocci
rtPCR	<i>real-time Polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
SD	<i>Standard deviation</i> = Standard Abweichung
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i> = Einzelnukleotid – Polymorphismus
SPSS	<i>Superior Performing Software Systems</i>
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
UPM	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Strukturformeln von L-Arginin, ADMA, SDMA und L-NMMA
- Abb. 2: Übersicht der Synthese und Elimination von ADMA
- Abb. 3: Systolischer Blutdruck im Verlauf der Schwangerschaft
- Abb. 4: Diastolischer Blutdruck im Verlauf der Schwangerschaft
- Abb. 5: ADMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Schwangerschaft
- Abb. 6: SDMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Schwangerschaft
- Abb. 7: DDAH1 rs18582 Mittelwerte Genotyp AA im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 8: DDAH1 rs18582 Mittelwerte Genotyp AG im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 9: DDAH1 rs18582 Mittelwerte Genotyp GG im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 10: DDAH1 rs18582 Mittelwerte der Genotypen gesamte Schwangerschaft
- Abb. 11: DDAH1 rs18582 Mittelwerte der Genotypen 1. Trimenon
- Abb. 12: DDAH1 rs18582 Mittelwerte der Genotypen 2. Trimenon
- Abb. 13: DDAH1 rs18582 Mittelwerte der Genotypen 3. Trimenon
- Abb. 14: DDAH1 rs2268667 Mittelwerte Genotyp GG im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 15: DDAH1 rs2268667 Mittelwerte Genotyp AG im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 16: DDAH1 rs2268667 Mittelwerte Genotyp AA im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 17: DDAH1 rs2268667 Mittelwerte der Genotypen gesamte Schwangerschaft
- Abb. 18: DDAH1 rs2268667 Mittelwerte der Genotypen 1. Trimenon
- Abb. 19: DDAH1 rs2268667 Mittelwerte der Genotypen 2. Trimenon
- Abb. 20: DDAH1 rs2268667 Mittelwerte der Genotypen 3. Trimenon
- Abb. 21: DDAH 1 rs233112 Mittelwerte Genotyp TT im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 22: DDAH 1 rs233112 Mittelwerte Genotyp CT im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 23: DDAH 1 rs233112 Mittelwerte Genotyp CC im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 24: DDAH 1 rs233112 Mittelwerte der Genotypen gesamte Schwangerschaft
- Abb. 25: DDAH 1 rs233112 Mittelwerte der Genotypen 1. Trimenon
- Abb. 26: DDAH 1 rs233112 Mittelwerte der Genotypen 2. Trimenon
- Abb. 27: DDAH 1 rs233112 Mittelwerte der Genotypen 3. Trimenon
- Abb. 28: DDAH2 rs805305 Mittelwerte Genotyp CC im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 29: DDAH2 rs805305 Mittelwerte Genotyp CG im Schwangerschaftsverlauf
- Abb. 30: DDAH2 rs805305 Mittelwerte Genotyp GG im Schwangerschaftsverlauf

- Abb. 31: DDAH2 rs805305 Mittelwerte der Genotypen gesamte Schwangerschaft
Abb. 32: DDAH2 rs805305 Mittelwerte der Genotypen 1.Trimenon
Abb. 33: DDAH2 rs805305 Mittelwerte der Genotypen 2.Trimenon
Abb. 34: DDAH2 rs805305 Mittelwerte der Genotypen 3.Trimenon

8.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Einzelnukleotid – Polymorphismen der DDAH
Tabelle 2: Basischarakteristika und demographische Parameter
Tabelle 3: Klinische Parameter
Tabelle 4: ADMA-Plasmakonzentration
Tabelle 5: SDMA-Plasmakonzentration
Tabelle 6: ADMA-Plasmakonzentration nach Genotypen DDAH1 rs18582
Tabelle 7: ADMA-Plasmakonzentration nach Genotypen DDAH1 rs2268667
Tabelle 8: ADMA- Plasmakonzentration nach Genotypen DDAH 1 rs233112
Tabelle 9: ADMA-Plasmakonzentration nach Genotypen DDAH2 rs805305
Tabelle 10: ADMA-Plasmakonzentration in der Schwangerschaft und bei nicht schwangeren Frauen

8.4 Materialien und Geräte

8.4.1 DNA Isolation und Messung

Reagenzien und Geräte:

- Nucleo Spin® Blood Quick Pure“ (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Proteinase K (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Pufferlösung BQ1 (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Pufferlösung BQ2 (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Pufferlösung BE (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Aqua dest.
- Ethanol 96-100% (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (eigene Herstellung)
- Vortexer Reax Control (Fa. Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland)
- Nano Drop® 1000 Spectrophotometers (Fa. Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA)

8.4.2 rt-PCR

Reagenzien und Geräte:

- SNP-Assays (Fa. Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA)
- Taq Man® Genotyping Master Mix (Fa. Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA)
- Taq Man® SNP Genotyping Assay Mix (Fa. Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA)
- Aqua dest.
- ABI PRISM 7900 HAT Thermocycler (Fa. Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA)
- Geräte-Software SDS 2.3 (Fa. Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA)

8.4.3 LC-MS/MS

Materialien und Reagenzien:

- N- ω -Hydroxy-nor-L-arginin (nor-NOHA) (Fa. Calbiochem)
- Multi Screen 96-Well-Filterplatten 0.22 μ m (Fa. Millipore, Molsheim, Frankreich)

- 8-Kanal Transferpipette 20 bis 200 µL (Fa. Eppendorf AG, Hamburg)
- Multipette (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland)
- Acetonitril, gradient grade
- Methanol, gradient grade
- Wasser, gradient grade (Fa. Baker, Griesheim, Deutschland)
- Chirobiotic T, 20x1.0 mm (Fa. Astec, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Butanolische Salzsäure (eigene Herstellung)
- Methanol/Wasser 50:50, pH 5 (gepuffert mit HCOOH/NH₃)
- Deuteriertes (d₇-) Arginin (Fa. Cambridge Isotope Labs, EURISO-Top, DLM-541)
- [²H₆]-ADMA
- ADMA (Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- SDMA (Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- L-Arginin (Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Geräte:

- Varian L1200 Triple Quadrupole MS (Fa. Varian, Walnut Creek, CA, USA)
- HPLC Varian Pro Star
- Zentrifuge (Fa. Christ, Osterode, Deutschland)
- Heizblock (Fa. Fisher Scientific, Illkirch, Frankreich)

8.5 Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf | Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie
- Klinische Pharmakologie -
Prof. Dr. Rainer H. Böger

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

Einverständniserklärung

Herr/ Frau _____ (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 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 einen gesonderten Vordruck eingeholt.

Hamburg, den _____

Unterschrift des aufklärenden Arztes

Hamburg, den _____

Unterschrift der Patientin

Name der Patientin

8.6 Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Genetik-Untersuchung



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf | Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Experimentelle und
Klinische Pharmakologie
- Klinische Pharmakologie -
Prof. Dr. Rainer H. Böger

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

9. Danksagung

Vielen Dank Herr Prof. Dr. med. Böger für die Überlassung dieses interessanten Themas und die beratenden und ermutigenden Gespräche.

Mein herzlicher Dank geht an Frau Dr. med. Maike Anderssohn für die vielen Anregung und Ideen, die große Hilfe beim Auswerten und Zusammentragen der Ergebnisse und die fortwährende Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei den gynäkologischen Praxen Dr. König, Frau Dr. Kühler-Obbarius, Frau Künkel, Dr. Theden-Schow, Frau Dr. Schulze-Stadler und Dr. Hille, ohne deren Beteiligung diese Studie nicht zustande gekommen wäre. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Behrens für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und den Arzthelferinnen für die Hilfe bei der Probengewinnung. Vielen Dank an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der klinischen Pharmakologie. Insbesondere ein großes Dankeschön an das Laborteam für die praktische Unterstützung, die Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit. Lieben Dank Mariola, Anna, Sandra und Waltraud.

Ich danke meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden, die immer an mich geglaubt und mich in allem unterstützt haben.

Vielen Dank liebe Pia für die anregende Zusammenarbeit, dass du immer ein "offenes Ohr" für mich hattest und für eine schöne Zeit.

Christian danke ich für seine Liebe und großartige Unterstützung während meines Studiums und in allen Phasen der Doktorarbeit.

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Ninja Hoffmann
Geboren 13. August 1980 in Bremen

Promotion

07/2010 – 08/2015 Doktorandin am Institut für klinische Pharmakologie bei Prof. Dr.med. Rainer H. Böger, Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf (UKE)

Beruf

Seit 01/2015 Assistenzärztin in der Klinik für Inneren Medizin, Asklepios Westklinikum Hamburg
03/2010 – 03/2012 Gesundheits – und Krankenpflegerin, UKE
11/2007 – 02/2010 Gesundheits – und Krankenpflegerin, Diakoniestation Winterhude

Studium

11/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2009 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2007 – 11/2014 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
10/2002 – 09/2003 Soziologie an der Universität zu Bremen

Praktisches Jahr

05/2014 – 06/2014 Allgemein – und Viszeralchirurgie Asklepios Klinik Altona
04/2014 – 05/2014 Unfallchirurgie und Orthopädie, Asklepios Klinik Altona
03/2014 – 04/2014 Neurochirurgie, Asklepios Klinik Altona
12/2013 – 03/2014 Innere Medizin, Schön Klinik Hamburg Eilbek
08/2013 – 12/2013 Anästhesie und Intensivmedizin, Agaplesion DK Hamburg

Famulaturen

07/2013 Diagnostische und interventionelle Radiologie, UKE
09/2011 Innere Medizin, Kardiologie, Asklepios Klinik St. Georg
10/2010 Frauenarztpraxis Dr. med. Schulz – Züllich, Hamburg
07/2010 Frauenarztpraxis Heussweg, Hamburg

Ausbildung

11/2004 – 10/2007 Gesundheits – und Krankenpflegerin in der Asklepios Klinik Wandsbek, Hamburg

Freiwilliges Soziales Jahr

10/2000 – 10/2001 Camphill Village, Dassenberg, Western Cape, Südafrika

Schulische Ausbildung

1987 – 2000 Freie Waldorfschule Bremen
Abschluss Allgemeine Hochschulreife

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Ninja Hoffmann