

Entwicklung und Validierung immunologischer Nachweisverfahren für asymmetrisches Dimethyl-L-arginin (ADMA)

Zusammenfassung

Asymmetrisches Dimethyl-L-arginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der NO-Synthase. Es entsteht durch Freisetzung bei dem Abbau methylierter Proteine und wird entweder renal eliminiert oder durch das Enzym DDAH, abgebaut. Die Plasma-ADMA-Konzentrationen sind bei einer Reihe von Erkrankungen, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen, erhöht. Die endotheliale Dysfunktion zeichnet sich durch ein Missverhältnis von NO-Angebot und NO-Bedarf aus.

Bisher wurden ADMA-Konzentrationen in der Regel mittels HPLC bestimmt, was relativ zeitaufwändig und für größere klinische Studien zu langwierig ist. In den letzten drei Jahren wurden neben der HPLC auch Methoden mittels LC-tandem MS, GC-tandem MS und GC-MS entwickelt. Mit diesen Methoden lassen sich die Messungen zwar schneller und einfacher durchführen, die benötigten Geräte sind jedoch teuer und nicht überall verbreitet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine Methode zur Messung von ADMA-Konzentrationen auf der Basis eines immunologischen Nachweisverfahrens zu entwickeln.

Zu diesem Zweck wurden ein monoklonaler Antikörper und ein polyklonales Antiserum gegen ADMA entwickelt. Zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers wurden vier Balb/c-Mäuse mit einem ADMA-KLH-Konjugat immunisiert. Nach erfolgreicher Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entnommen und die B-Lymphozyten präpariert. Die B-Lymphozyten wurden mit Myelomzellen des gleichen genetischen Hintergrundes fusioniert und Hybridome etabliert. Aus den Hybridomen wurden durch ein Screening diejenigen herausgesucht, die einen gegen ADMA gerichteten Antikörper sezernierten. Aus diesen Hybridomen wurden diejenigen selektioniert, welche in einem stark vereinfachten Test auf Kreuzreaktivität eine bevorzugte Bindung an ein ADMA-BSA-Konjugat im Vergleich zu einem SDMA-BSA-Konjugat zeigten. Hier wurde das Hybridom 142D6 selektioniert und rekloniert. Aus dem Zellkulturüberstand des monoklonalen Hybridom 142D6-4E8 wurde ein ELISA entwickelt.

Parallel dazu wurde von der Firma DLD Diagnostika, Hamburg ein polyklonales Antiserum gegen ADMA im Kaninchen gezogen und aus dem Antiserum ein ELISA entwickelt. Dieser ELISA wurde von uns validiert. Zur Validierung wurden die Variation, die Richtigkeit und

die Präzision bestimmt. Diese Validierungsschritte wurden für Proben von Mensch, Maus und Ratte durchgeführt. Der ELISA wurde im Anschluss mit LC-tandem MS und GC-MS verglichen. Für den LC-tandem MS-Vergleich wurden 29 humane Serumproben sowohl mit dem ELISA als auch mit LC-tandem MS gemessen. Die Ergebnisse wurden mittels linearer Regression verglichen. Zum Vergleich von ELISA und GC-MS wurden 15 Zellkulturüberstände sowohl mit ELISA als auch mit GC-MS gemessen. Die Mittelwerte der mit den beiden Methoden erhobenen Werte wurden mittels t-Test verglichen, da die Spannweite der einzelnen Konzentrationen zu gering für einen Vergleich mittels linearer Regression waren. Im Ergebnis waren die mittels ELISA ermittelten Messwerte mit denen von LC-tandem MS und GC-MS vergleichbar.

Mit dem validierten ELISA auf der Basis des polyklonalen Antiserum wurden die ADMA-Konzentrationen im Rahmen einer klinischen Studie gemessen. 213 Patienten mit Zustand nach akutem Myokardinfarkt wurden entweder mit Captopril (n = 108) oder Losartan (n = 105) behandelt. Das Follow-up betrug drei Jahre (Median 27 Monate). Die Plasma-ADMA-Konzentrationen wurden zu Beginn der Studie und am Ende des Follow-up gemessen. Endpunkte der Studie waren Tod, erneuter Myokardinfarkt, Schlaganfall und Reanimation. Die Auswertung der Studie ergab, dass die Plasma-ADMA-Konzentration zu Beginn der Studie ein prognostischer Faktor für das Auftreten eines der Endpunkte unabhängig von weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren war. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass eine Therapie mit Captopril oder Losartan keinen Einfluss auf die Plasma-ADMA-Konzentration hat.