

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen

## **Molekularbiologische Untersuchung der DDAH-Defizienz**

Dissertation zur Erlangung des Naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
des Department Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Nicole Lüneburg

Hamburg 2008



1. Gutachter: Prof. Dr. M. Korth

2. Gutachter: Prof. Dr. R.H. Böger

Tag der Disputation: 18.07.2008



Das Leben ist wert, gelebt zu werden, sagt die Kunst, die schönste Verführerin; das Leben ist wert, erkannt zu werden, sagt die Wissenschaft.

Friedrich Nietzsche



Mareintje





1	Einleitung .....	1
1.1	NO-Stoffwechsel und ADMA .....	1
1.2	Die pathophysiologische Bedeutung der DDAH.....	3
1.3	Genetische Polymorphismen der DDAH .....	4
1.3.1	Genetische Polymorphismen der DDAH1 .....	5
1.3.2	Genetische Polymorphismen der DDAH2 .....	6
1.4	Die pathophysiologische Bedeutung der eNOS .....	7
1.5	Genetische Polymorphismen der eNOS .....	7
1.6	Haplotypen .....	8
2	Methoden und Material .....	9
2.1	Versuchstiere und Genehmigungen.....	9
2.2	DNA-Klonierung .....	9
2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter Escherichia coli-Zellen .....	9
2.2.2	Transformation .....	10
2.2.3	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab .....	10
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab .....	11
2.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	12
2.2.6	Restriktionsverdau von DNA .....	12
2.2.7	Dephosphorylierung von DNA.....	12
2.2.8	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	13
2.2.9	Agarosegelelektrophorese.....	15
2.2.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	16
2.2.11	Fällung von DNA .....	16
2.2.12	Ligation von DNA-Fragmenten.....	17
2.2.13	Sequenzierung .....	17
2.2.14	Verwendete Vektoren und E.coli-Stämme.....	18

2.2.15	Verwendete Primer und Sonden.....	19
2.3	Murine embryonale Stammzellen .....	20
2.3.1	Kultur von murinen embryonalen Stammzellen .....	20
2.3.2	Elektroporation von linearisierter DNA in mES-Zellen .....	21
2.3.3	Selektion transgener mES-Zellen .....	21
2.3.4	DNA-Präparation aus mES-Zellen.....	22
2.3.5	Einfrieren und Auftauen von mES-Zellen .....	22
2.3.6	Restriktionsverdau der mES-Zell-DNA für die Southern-Blot-Analyse .....	23
2.3.7	Southern-Blot-Analyse.....	23
2.4	Knock-Out Mauslinien .....	24
2.4.1	DNA- Präparation aus Mausschwanzbiopsien .....	24
2.4.2	Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe.....	25
2.5	Polymorphismen in humaner genomischer DNA.....	25
2.5.1	DNA Isolierung aus Vollblut.....	25
2.5.2	Bestimmung von ADMA in humanem Blutplasma .....	26
2.5.3	Bestimmung der DDAH Polymorphismen.....	26
2.5.4	Bestimmung des eNOS Glu298Asp Polymorphismus.....	29
2.6	Klinische Studien .....	30
2.6.1	iP4-Studie .....	30
2.6.2	MONICA/KORA-Studie.....	30
2.6.3	Baldus-Studie .....	31
2.6.4	Atorvastatin-Studie .....	32
2.7	Statistische Auswertungen .....	33
2.7.1	Statistische Auswertungen der klinischen Studien .....	33
2.7.2	Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	33
2.8	Laborgeräte .....	34
2.9	Substanzen.....	35

3	Ziel der Arbeit .....	37
3.1	DDAH Knock-out-Mauslinien.....	37
3.2	DDAH-Polymorphismen in klinischen Studien .....	37
3.3	eNOS-Polymorphismen in klinischen Studien.....	37
4	Ergebnisse .....	39
4.1	Generierung der DDAH-Knock-out-Mauslinien .....	39
4.1.1	Die DDAH1-Knock-out-Mauslinie .....	39
4.1.2	Die DDAH2-Knock-out-Mauslinie .....	41
4.2	Charakterisierung der DDAH-Knock-out-Mauslinien.....	45
4.2.1	Die DDAH2-Knock-out-Mauslinie .....	45
4.3	DDAH Polymorphismen in klinischen Studien.....	47
4.3.1	DDAH1-Polymorphismus Studie .....	47
4.3.2	iP4 Studie .....	48
4.3.3	MONICA Studie.....	64
4.3.4	Baldus-Studie .....	74
4.3.5	Zusammenfassung der klinischen Studien.....	83
4.4	eNOS-Polymorphismen in klinischen Studien.....	85
4.4.1	Atorvastatin-Studie .....	85
5	Diskussion.....	89
5.1	DDAH-Knock-Out-Mäuse .....	89
5.1.1	Der DDAH1-Knock-Out .....	89
5.1.2	Der DDAH2-Knock-Out .....	90
5.1.3	Ausblick .....	90
5.2	DDAH-Polymorphismen in klinischen Studien .....	92
5.2.1	Ausblick .....	97
5.3	eNOS-Polymorphismus.....	97
6	Zusammenfassung .....	99

## Inhaltsverzeichnis

---

7	Summary.....	100
8	Abkürzungsverzeichnis .....	101
9	Literatur .....	103
10	Lebenslauf .....	110
11	Publikationen .....	111
12	Erklärung .....	112
13	Danksagung .....	113

Abbildung 1: ADMA- und NO-Synthese; ADMA hemmt kompetitiv die NO-Synthase, welche L-Arginin zu NO und L-Citrullin umsetzt. Durch die DDAH wird ADMA zu Dimethylamin und L-Citrullin abgebaut. ....	2
Abbildung 2: Strukturformeln von L-Arginin und den endogen vorkommenden methylierten L-Argininanaloge; ADMA: Asymmetrisches N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethylarginin; SDMA: Symmetrisches N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethylarginin; L-NMMA: N <sup>G</sup> -Monomethylarginin .....	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung des hDDAH1 Gens inkl. SNP im kodierenden Bereich des Exon 1; Transkriptionsstart liegt im Exon 1.....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des DDAH2 Gens inkl. SNPs in der Promoterregion; Transkriptionsstart liegt im Exon 2. ....	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips eines konditionalen Knock-outs. Die loxP-Sequenzen werden nach Integration des Targetingvektors ins Genom von der Cre-Rekombinase erkannt. Der DNA-Bereich zwischen den loxP-Sequenzen wird durch die Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt.....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines SNP-Assays; nur bei einer 100%igen Sequenz-Übereinstimmung bindet die Sonde an der DNA und wird durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut und gibt das entsprechende Fluoreszenzsignal ab. ....	27
Abbildung 7: Exemplarischer Allelic-Discrimination-Plot; die Cluster-Wolken sind farblich markiert; blaue Punkte: homozygot für Allel 2; rote Punkte: homozygot für Allel 1; grüne Punkte: heterozygote Allel; schwarze Kreuze: unbestimmbare Allele [Software SDS 2.2 (Fa. Applied Biosystems)].....	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Prinzips der Homologen Rekombination; der 5'-homologe Bereich hat eine Größe von 4,4 kb und der 3'-homologe Bereich von 2,6 kb. DT= Diptherie-Toxin-Kassette (wird nicht mit ins Genom integriert); Neo: Neomycin-Kassette.....	39
Abbildung 9: Schematische Darstellung des ploxDDAH1 Targetingvektors; Neo: Neomycinphosphotransferase-Gen; DT: Diptherie-Toxin-A-Gen.....	40
Abbildung 10: Kontroll-Restriktionsverdau des ploxDDAH1 Targetingvektors; alle Fragmentgrößen entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen.....	41

Abbildung 11: Targetingvektor zur Generierung einer konditionalen DDAH2 Knock-out Mauslinie. Neo: Neomycin-Resistenz-Gen; DT: Diphtherie-Toxin-A; loxP= Cre-spezifische Erkennungssequenzen..... 42

Abbildung 12: Ausschnitt der Sequenzierung zur Überprüfung der loxP-Sequenzen; die 34 bp der loxP-Sequenz sind durch den roten Kasten markiert..... 42

Abbildung 13: Schematische Darstellung der Schnittstellen und der Lage der 5'-Sonde für die Southern-Blot-Analyse; blaue Balken: Restriktionsschnittstellen für das NcoI Restriktionsenzym; nach Restriktionsverdau entsteht ein kleineres Fragment, welches durch die 5'Sonde detektiert werden kann..... 43

Abbildung 14: Chimäre mDDAH2-flox Maus (F0-Generation); die gescheckte Fellfärbung lässt den Grad der Chimärität optisch abschätzen. Je mehr braune Fellfarbe, desto höher ist der Chimäritätsgrad. Die Tiere mit der höchsten Chimärität wurden für die Verpaarung eingesetzt. .... 44

Abbildung 15: Verpaarungsschema zur Generierung heterozygoter und homozygoter DDAH2-Knock-out-Mäuse..... 44

Abbildung 16: Schematische Darstellung des Prinzips zur Genotypisierung mit Hilfe einer PCR; ↓: Primer; die Primer in der Neo-Kassette binden nur, wenn der Targetingvektor integriert hat. .... 45

Abbildung 17: <sup>32</sup>P-hybridisierter Blot der F1-Generation des konditionalen DDAH2-Knock-outs; -/-: Wildtyp; +/-: Heterozygot; wt: Wildtyp Kontroll-DNA; der Wildtyp liefert ein Fragment mit einer Größe von 6000 Basenpaaren und das heterozygote Allel ein entsprechend kleineres Fragment..... 46

Abbildung 18: Genotypverteilung der DDAH2-Promoterpolymorphismen in der iP4-Studie im Vergleich zu den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten des Hap Map-Projektes; die Verteilung zeigt keine Abweichung vom HWE: p(-1415 G/A)=0,15, p(-1151 C/A)=0,78, p(-449 G/C)=0,89..... 49

Abbildung 19: Allelic-Discrimination-Plot aus der iP4-Studie beispielhaft für den rs805305 Polymorphismus. Allel X (rote Punkte): GG; Allel Y (blaue Punkte): CC; Allel XY (grüne Punkte): CG. Ausgewertet durch SDS 2.2 Auto-Caller-Funktion 95% CI ..... 50

Abbildung 20: -1151 C/A Polymorphismus und ADMA- bzw. SDMA-Plasmakonzentration. Träger des -1151CC-Genotyps hatten niedrigere ADMA-Plasmakonzentrationen als Träger des -1151CA- und -1151AA-Genotyps (\*p=0,049).

Die verschiedenen Genotypen zeigten keine Unterschiede in den SDMA-Plasmakonzentrationen.....	54
Abbildung 21: : -449 G/C-Polymorphismus und ADMA- bzw. SDMA-Plasmakonzentration. Träger des -449CC-Genotyps hatten niedrigere ADMA-Plasmakonzentrationen als Träger des -449GC- und -449GG-Genotyps (*p=0,049). Die verschiedenen Genotypen zeigten keine Unterschiede in den SDMA-Plasmakonzentrationen.....	56
Abbildung 22: Zusammenhang zwischen ADMA-Quartilen und der zurückgelegten Gehstrecke in % der altersüblichen berechneten Gehstrecke (p=0,034) .....	60
Abbildung 23: Assoziation der -1151 C/A- und -449 G/C-Polymorphismen mit dem systolischen und diastolischen Blutdruck. *p<0,05 .....	62
Abbildung 24: Einfluss des Haplotyps H3 auf den arteriellen Blutdruck; *p=0,039; #p=0,001.....	63
Abbildung 25: Exemplarischer Allelic-Discrimination-Plot aus der MONICA-Studie für den -449 G/C-Polymorphismus; Allel X (rote Punkte): GG; Allel Y (blaue Punkte):CC; Allel XY (grüne Punkte): GC; Ausgewertet durch SDS 2.2 Auto-Caller-Funktion 95% CI .....	65
Abbildung 26: Genotypverteilung der DDAH2-Promoterpolymorphismen in der MONICA/KORA- Studie im Vergleich zu den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten des Hap Map-Projektes; die Verteilung zeigt keine Abweichung vom HWE: p(-1415 G/A)=0,80, p(-1151 C/A)=0,25, p(-449 G/C)=0,80.....	67
Abbildung 27: Prävalenz der Hypertonie in den -1151 C/A Genotypen; *p=0,009 .....	72
Abbildung 28: Prävalenz der Hypertonie in den -449 G/C Genotypen; *p=0,004 .....	72
Abbildung 29: Einfluss des Haplotyps H3 auf die Prävalenz einer Hypertonie; *p=0,005 .....	73
Abbildung 30: Exemplarischer Allelic-Discrimination-Plot aus der Baldus-Studie für den -1415 G/A-Polymorphismus. Allel x (rote Punkte): GG; Allel Y (blaue Punkte): AA; Allel XY (grüne Punkte): GA; Ausgewertet SDS 2.2 Auto-Caller-Funktion 95% CI .....	75
Abbildung 31: Genotypverteilung der DDAH2-Promoterpolymorphismen in der Baldus-Studie im Vergleich zu den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten des Hap Map-Projektes; die Verteilung zeigt keine Abweichung vom HWE: p(-1415 G/A)=0,42, p(-1151 C/A)=0,51, p(-449 G/C)=0,28.....	76

Abbildung 32: Zusammenhang zwischen -1415 G/A-Allelen und der Prävalenz der Hypertonie unter Annahme eines dominanten Effekt des -1415G-Allels. \*p=0,029..... 79

Abbildung 33: Zusammenhang zwischen -1151 C/A-Allelen und der Prävalenz der Hypertonie unter der Annahme eines dominanten Effekt des -1151C-Allels. \*p=0,02179

Abbildung 34: Zusammenhang zwischen -449 G/C-Allelen und der Prävalenz der Hypertonie unter der Annahme eines dominanten Effekts des -449C-Allels. \*p=0,03180

Abbildung 35: Subgruppenanalyse für Patienten mit und ohne KHK; Zusammenhang zwischen -1151 C/A-Allelen und Hypertonie; \*p=0,003..... 81

Abbildung 36: Subgruppenanalyse für Patienten mit und ohne KHK; Zusammenhang zwischen -449 G/C-Allelen und Hypertonie; \*p=0,017 ..... 81

Abbildung 37: Zusammenhang zwischen dem Haploytpe H3 und der Prävalenz der Hypertonie. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden (p=0,107) . 82

Abbildung 38: Genotypverteilung des Glu298Asp-Polymorphismus in der Atorvastatin-Studie im Vergleich zu den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten des Hap Map-Projektes; die Verteilung zeigt keine Abweichung vom HWE: p(Atorvastatin)=0,46, p(Placebo)=0,55..... 85

Abbildung 39: eNOS-Expression in den Blutplättchen und <sup>15</sup>N-Nitrat-Ausscheidung über 24 Stunden in allen Patienten an Tag 1 stratifiziert nach Glu298Asp-Genotypen; \*p<0,05..... 87

Abbildung 40: 24 Stunden <sup>15</sup>N-Nitrat-Ausscheidung vor und nach der Behandlung mit Atorvastatin bzw. Placebo stratifiziert nach eNOS Glu298Asp-Genotypen; Tag 1: Ausgangswert; Tag 2: Wert nach 6 Wochen Behandlung mit Atorvastatin bzw. Placebo ..... 88



Tabelle 1: Sequenzabschnitte der einzelnen Polymorphismen, die zur Synthese der SNP-Assays herangezogen wurden. Die Primer binden innerhalb dieser Sequenzabschnitte. Der jeweilige Polymorphismus ist in den eckigen Klammern dargestellt .....	29
Tabelle 2: Demographische und klinische Ausgangscharakteristika der 18 Patienten aus der DDAH1-Fall-Kontroll-Studie; als Fall wird das Vorliegen eines heterozygoten Allels des Thr87Met-Polymorphismus definiert.....	47
Tabelle 3: Demographische und klinische Ausgangscharakteristika bei 112 Patienten mit pulmonaler Hypertonie aus der iP4-Studie.....	51
Tabelle 4: Alter und BMI stratifiziert nach -1151 C/A-Genotypen und die Genotypenverteilung in einzelnen Subgruppen der iP4-Studienpopulation.....	52
Tabelle 5: Alter und BMI stratifiziert nach -449 G/C-Genotypen und die Genotypenverteilung in einzelnen Subgruppen der iP4-Studienpopulation.....	52
Tabelle 6: Pulmonale und vaskuläre Charakteristika für den -1151 C/A-Polymorphismus unter Annahme eines dominanten oder rezessiven Effekts des -1151C-Allels .....	58
Tabelle 7: Pulmonale und vaskuläre Charakteristika für den -449 G/C-Polymorphismus unter Annahme eines dominanten oder rezessiven Effekts des -449G-Allels .....	59
Tabelle 8: Demographische und klinische Charakteristika 783 Teilnehmer der MONICA/KORA Studie (Augsburg).....	66
Tabelle 9: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -1151 C/A-Genotypen .....	67
Tabelle 10: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -449 G/C-Genotypen .....	68
Tabelle 11: Zusammenhang zwischen dem -1151 C/A-Polymorphismus und ADMA-Plasmakonzentrationen und systolischem/diastolischem Blutdruck unter Annahme eines dominanten/rezessiven Effekts des -1151A-Allels.....	68
Tabelle 12: Zusammenhang zwischen dem -449 G/C-Polymorphismus und ADMA-Plasmakonzentrationen und systolischem/diastolischem Blutdruck unter Annahme eines dominanten/rezessiven Effekts des -449G-Allels.....	69

Tabelle 13: Odds-Berechnungen für die -1151 C/A-Genotypen unter Annahme eines rezessiven oder dominanten Effekts des -1151A-Allels .....	70
Tabelle 14: Odds-Berechnungen für die -449 G/C-Genotypen unter Annahme eines rezessiven oder dominanten Effekts des -449G-Allels.....	71
Tabelle 15: Demographische und klinische Ausgangscharakteristika der 608 Patienten aus der Baldus-Studie .....	74
Tabelle 16: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -1415 G/A-Genotypen und Genotypenverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation.....	76
Tabelle 17: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -1151 C/A-Genotypen und Genotypenverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation.....	77
Tabelle 18: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -449 G/C-Genotypen und Genotypenverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation.....	78
Tabelle 19: Die demographischen und klinischen Ausgangscharakteristika der 24 Teilnehmer zu Beginn der Atorvastatin-Studie.....	86

# 1 Einleitung

## 1.1 NO-Stoffwechsel und ADMA

Stickstoffmonoxid (NO) wird in den Endothelzellen aus der Aminosäure L-Arginin durch das Enzym NO-Synthase (NOS) gebildet und reguliert verschiedene, wichtige Funktionen des Herz-Kreislaufsystems. NO bewirkt unter anderem eine Blutgefäßerweiterung und hemmt die Aktivität von Blutplättchen und Leukozyten [1]. Insgesamt wird der endothelialen NO-Bildung ein gefäßprotektiver Effekt zugeschrieben.

Biochemische Störungen oder mechanische Verletzungen des Endothels können dazu führen, dass die Bildung von NO eingeschränkt ist, man spricht in diesem Fall von einer endothelialen Dysfunktion. In solch einem Fall kommt es zu einer Vasokonstriktion, Plättchenaktivierung und Leukozytenaktivierung, was zu einer lokalen Entzündung der Gefäßwand mit Fortschreiten zur Atherosklerose führt [2].

Experimentelle und epidemiologische Daten sprechen für einen substantiellen Zusammenhang zwischen Hemmung der NO-Synthese, Endotheldysfunktion und Atherosklerose [3-5].

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), ein endogener Inhibitor der NO-Synthese, wurde erstmals 1992 von Vallance und Kollegen beschrieben [6]. ADMA wird im Körper durch posttranslationale, enzymatische Methylierung von L-Argininresten in Proteinen durch Protein-Arginin-Methyl-Transferasen (PRMT) und anschließender Proteolyse gebildet [7]. Bisher sind neun PRMT-Subtypen im Menschen bekannt [8]. An der Bildung von ADMA ist hauptsächlich der PRMT Subtyp 1 (PRMT1) beteiligt. ADMA ist ein potenter Inhibitor der NOS. Es verdrängt L-Arginin, das natürliche Substrat der NOS, von seiner Enzyymbindungsstelle und kann so in entsprechend höherer Plasmakonzentration die NOS katalysierte Bildung von NO deutlich reduzieren [9] (Abbildung 1).

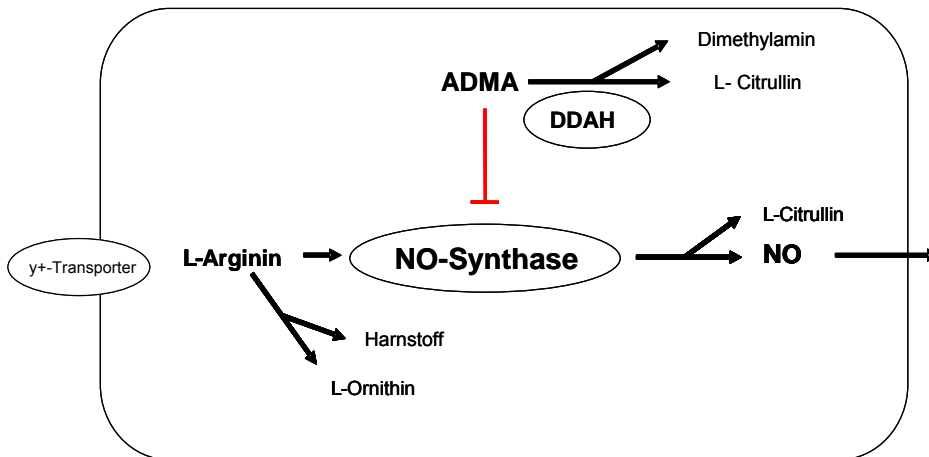


Abbildung 1: ADMA- und NO-Synthese; ADMA hemmt kompetitiv die NO-Synthase, welche L-Arginin zu NO und L-Citrullin umsetzt. Durch die DDAH wird ADMA zu Dimethylamin und L-Citrullin abgebaut.

Zwei weitere L-Arginin-Analoga, Symmetrisches-N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethylarginin (SDMA) und N<sup>G</sup>-Monomethylarginin (L-NMMA), werden ebenfalls durch Proteinmethylierung gebildet (Abbildung 2). L-NMMA ist wie ADMA ein potenter Inhibitor der NOS, während SDMA gegenüber der NOS inaktiv ist [2].

Eine Infusion von ADMA beim Menschen führt zu einer Vasokonstriktion des betroffenen Gefäßgebietes [6, 10]. Diese Vasokonstriktion ist nach Co-Infusion von L-Arginin reversibel [11].

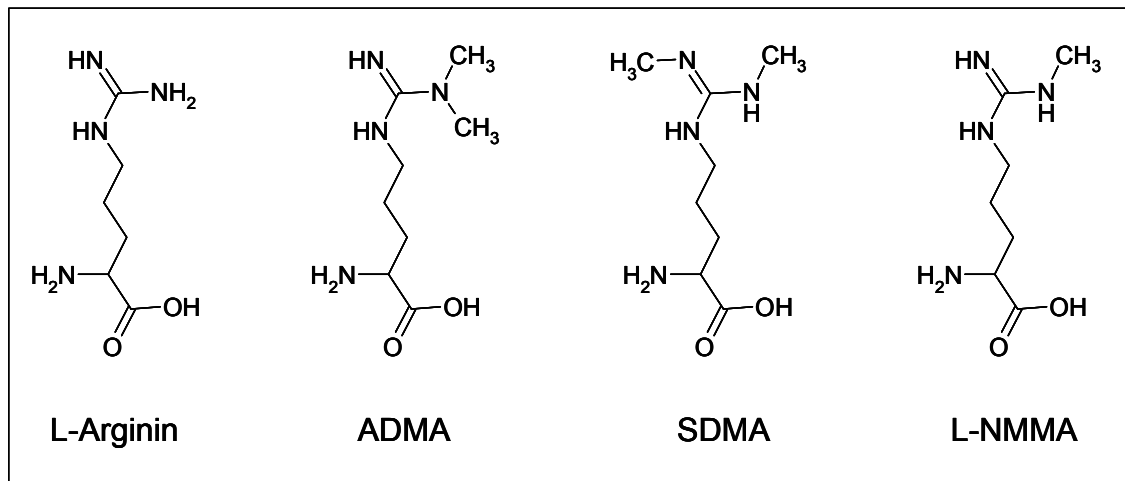


Abbildung 2: Strukturformeln von L-Arginin und den endogen vorkommenden methylierten L-Argininanaloga; ADMA: Asymmetrisches N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethylarginin; SDMA: Symmetrisches N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethylarginin; L-NMMA: N<sup>G</sup>-Monomethylarginin

Durch erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen bzw. bei einem erniedrigten Verhältnis von L-Arginin zu ADMA ist die NO-Bildung, katalysiert durch die NOS, deutlich erniedrigt [12]. Erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen gehen einher mit zahlreichen Erkrankungen und kardiovaskulären Risikofaktoren wie der koronaren Herzkrankheit, der Hypercholesterinämie, dem Diabetes mellitus, dem Bluthochdruck, der Niereninsuffizienz oder der chronischen Herzinsuffizienz [3, 10, 13-16]. Ein Zusammenhang zwischen erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen und dem Auftreten schwerwiegender Herzkreislauferkrankungen konnte in zahlreichen prospektiven klinischen Studien nachgewiesen werden [14, 17-20].

Prinzipiell können erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen sowohl die Folge einer gesteigerten Neubildung als auch eines verzögerten enzymatischen Abbaus bzw. einer verminderten (renalen) Ausscheidung sein [21].

## **1.2 Die pathophysiologische Bedeutung der DDAH**

ADMA wird ubiquitär in allen Zellen des Körpers gebildet. ADMA wird entweder durch sogenannte Cationic-Aminoacid-Transporter (CAT) aus der Zelle ins Cytoplasma transportiert oder intrazellulär durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH), welches ADMA zu Dimethylamin und L-Citrullin hydrolytisch spaltet [7], metabolisiert. Bisher wurden zwei Isoformen der DDAH - DDAH1 und DDAH2 - mit jeweils unterschiedlicher Gewebeverteilung im Menschen und in der Maus beschrieben. DDAH1 wird überwiegend in der Leber und Niere und in Co-Lokalisation mit der neuronalen NOS (nNOS) in neuronalem Gewebe exprimiert. Die DDAH2 ist überwiegend in vaskulärem Gewebe in Co-Lokalisation mit der endothelialen NOS (eNOS) anzutreffen [22, 23]. ADMA wird hauptsächlich in der Leber und den Nieren metabolisiert [24].

DDAH1 ist auf dem Gen 1p22.3 lokalisiert und kodiert für ein aus 285 Aminosäuren bestehendes Protein. DDAH2, lokalisiert auf dem Gen 6p21.3, kodiert ebenfalls für ein 285 Aminosäuren langes Protein. Die Aminosäuresequenz der humanen DDAH2 weist eine 98%ige Identität mit ihrem Homolog bei der Maus und eine 62%ige Übereinstimmung mit derjenigen der DDAH1 auf.

Die DDAH1-Proteinexpression wird durch IL-1 $\beta$  erhöht und durch oxidiertes LDL oder TNF- $\alpha$  erniedrigt [25]. Tanaka und Kollegen [26] konnten zeigen, dass oxidativer Stress einen Einfluss sowohl auf die DDAH2-Gen- als auch die DDAH2-Protein-Expression

hat. Coupling factor 6 (CF6), ein wichtiges Cytokin im ATP-Stoffwechsel, welches die Bildung von Phospholipase A<sub>2</sub> hemmt, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) begünstigt und somit zu einer Vasokonstriktion führt, vermindert die DDAH2-Expression. Vitamin A hingegen erhöht in Endothelzellen sowohl die DDAH2-Gen- als auch die DDAH2-Protein-Expression, reduziert die ADMA-Konzentration und erhöht die NO-Synthese. Vitamin A ist ein wichtiger Faktor in der embryonalen Entwicklung des kardiovaskulären Systems. Der Effekt auf die NO-Synthese kann durch DDAH-Inhibition rückgängig gemacht werden. Dieses zeigt, die massgebliche Funktion der DDAH auf die NO-Synthese in vivo [10].

Eine Überexpression der humanen DDAH1 in transgenen Mäusen führt zu erniedrigten ADMA-Plasmakonzentrationen und einer gesteigerten Angiogenese, die auf eine gesteigerte NO-Synthese zurückzuführen ist [27, 28]. In vitro führt eine pharmakologische Hemmung der DDAH in isolierten Arteriensegmenten zu einer Vasokonstriktion [29].

Mit Hilfe der RNA-Interferenz (*siRNA*) untersuchten Wang und Kollegen den Einfluss der verschiedenen DDAH Subtypen auf den NO-Stoffwechsel [30]. Bei der siRNA handelt es sich um kurze RNA Stücke, die an die mRNA der DDAH1 und DDAH2 binden und somit die Translation hemmen. Die Hemmung der DDAH1-Translation führte zu 25% höheren ADMA-Plasmakonzentrationen. Die Hemmung der DDAH2-Translation zeigte keinen wesentlichen Effekt auf die ADMA-Plasmakonzentration, führte jedoch zu einer reduzierten Acetylcholin-induzierten Relaxation von MRVs (*mesenteric resistance vessels*) und zu einer verminderten NO-Aktivität.

### 1.3 Genetische Polymorphismen der DDAH

Als Polymorphismus bezeichnet man das Auftreten einer Genvariante (d.h. eines veränderten Allels) in der Population. Ist das Auftreten der Genvariante in der Population  $\leq 1\%$ , spricht man von einer Mutation. Es gibt drei Arten von Polymorphismen: 1. Einzelnukleotidpolymorphismus, 2. Deletions- und Insertionspolymorphismus und 3. Multiplikation. Bei einem Einzelnukleotidpolymorphismus (*single-nucleotide-polymorphism*, SNP) handelt es sich um einen Austausch eines einzelnen Nukleotids im DNA-Molekül. Liegt dieser Austausch im kodierenden Bereich eines Gens, kann dies zu einem Aminosäureaustausch führen, was zu einer veränderten oder fehlerhaften Genexpression führen kann. Unter einem Deletions- bzw. Insertionsaustausch versteht man den Verlust bzw. Einbau von mindestens einem Nukleotid.

Auch diese Polymorphismen können zu einer massiven Beeinflussung des betroffenen Proteins führen. Multiplikationen betreffen das gesamte Gen und können zu einer erheblichen Erhöhung der Stoffwechsellkapazität des betroffenen Gens führen.

Sowohl für die DDAH1 als auch für die DDAH2 sind Genpolymorphismen bzw. Basenaustausche in der Gensequenz beschrieben worden, die möglicherweise zu einer verringerten Proteinexpression bzw. zur Expression eines veränderten DDAH Proteins führen [29, 31].

### **1.3.1 Genetische Polymorphismen der DDAH1**

Bisher konnte erst in einer genetischen Studie gezeigt werden, dass ein eventueller Zusammenhang zwischen dem Auftreten von bestimmten DDAH1-Polymorphismen und daraus resultierenden Haplotypen und der Wahrscheinlichkeit, während einer Schwangerschaft an Präeklampsie zu erkranken, besteht. Eine finnische Arbeitsgruppe identifizierte in einer Studie mit 132 an Präeklampsie erkrankten Frauen und 112 gesunden Kontrollen acht DDAH1 SNPs, aus denen vier gemeinsame DDAH1 Haplotypen resultierten. Zwei von den vier Haplotypen korrelierten signifikant mit dem Auftreten einer Präeklampsie während der Schwangerschaft. Patientinnen, die beide Risikoallele trugen, hatten das höchste Risiko, während der Schwangerschaft an einer Präeklampsie zu erkranken (Odds ratio: 3,93; 95% CI) [32].

In der gleichen Studie wurde ein DDAH1 SNP im kodierenden Bereich des Exon 1 identifiziert (Abbildung 3). Durch den Austausch der Base Cytosin an Position 260 gegen ein Thymin erfolgt ein Aminosäureaustausch von Threonin zu Methionin. SNPs die einen Aminosäureaustausch zur Folge haben führen zu einer veränderten/ fehlerhaften Proteinsequenz und können dadurch einen starken Einfluß auf die Funktion/ Aktivität des Proteins haben. Auf Grund dieser möglichen Eigenschaft wurde dieser SNP zur Bestimmung in den klinischen Studien, welche in dieser Arbeit beschrieben sind, ausgewählt.

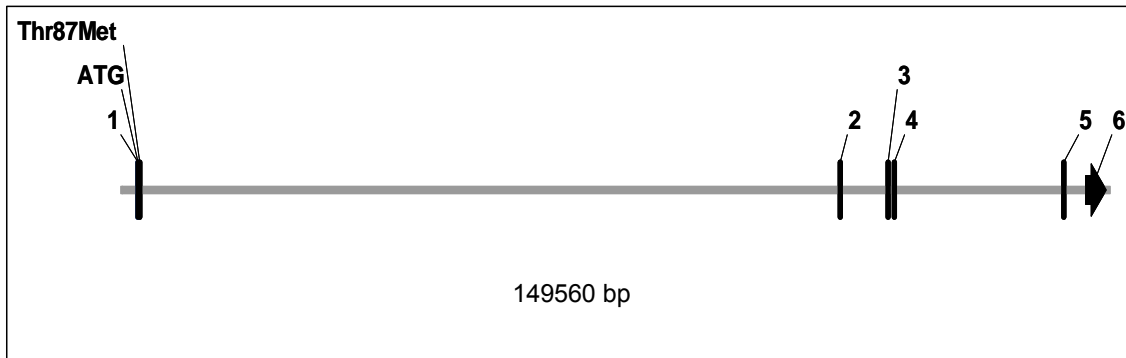


Abbildung 3: Schematische Darstellung des hDDAH1 Gens inkl. SNP im kodierenden Bereich des Exon 1; Transkriptionsstart liegt im Exon 1.

### 1.3.2 Genetische Polymorphismen der DDAH2

In vitro Daten belegen, dass die Expression der DDAH2 durch Polymorphismen, die in der Promoterregion der DDAH2 liegen, beeinflusst wird [31]. In dieser Arbeit werden drei der bisher fünf bekannten Polymorphismen in der Promoterregion des DDAH2-Gens (Abbildung 4), -1415 G/A (rs2272592), -1151 C/A (rs805304) und -449 G/C (rs805305) näher untersucht.

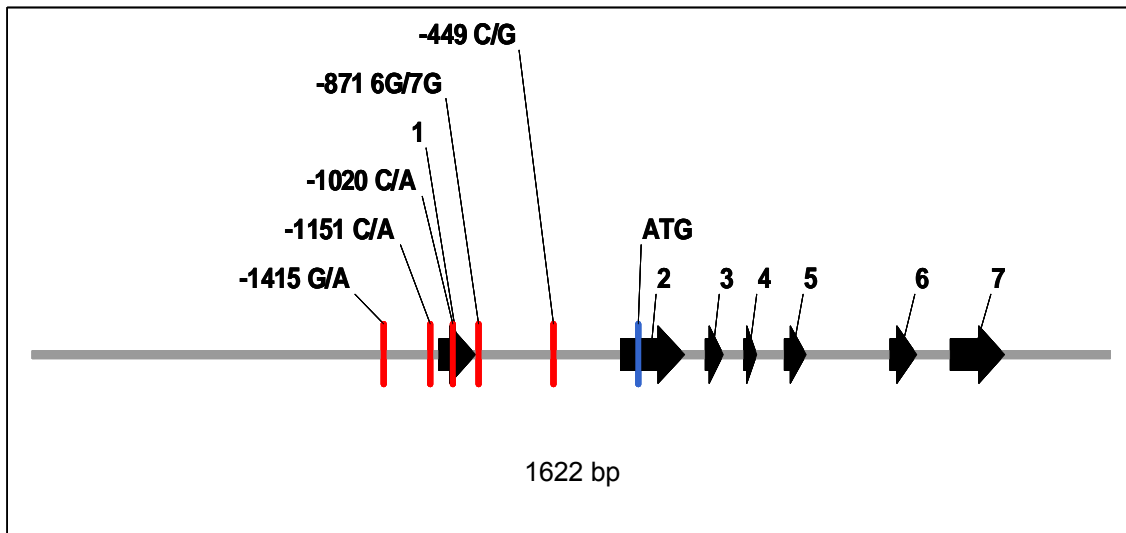


Abbildung 4: Schematische Darstellung des DDAH2 Gens inkl. SNPs in der Promoterregion; Transkriptionsstart liegt im Exon 2.

Auswahlkriterien für diese SNPs waren die bisherigen Veröffentlichungen und die Daten der Häufigkeitsverteilungen basierend auf dem Hap Map-Projekt (<http://www.hapmap.org/>).



Die Promoterregion eines Gens ist eine wichtige regulatorische Einheit der Genexpression. Die Promoterregion umfasst Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, welche den Start der Transkription durch die RNA-Polymerase vermitteln. Polymorphismen in dieser Region können zu wesentlichen Veränderungen in der Regulation der Genexpression führen. Für den -449 G/C Polymorphismus konnten O'Dwyer und Kollegen [33] bereits zeigen, dass bei 47 Patienten mit einer schweren Sepsis die ADMA-Plasmakonzentrationen mit dem -449G-Allel korrelieren. Patienten mit Sepsis hatten im Verlauf von 7 Tagen die signifikant höheren ADMA-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $p=0,001$ ). Gleichzeitig zeigten Träger des -449G-Allels im Verlauf von 7 Tagen die signifikant höheren ADMA-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Trägern des -449C-Allels ( $p=0,04$ ).

## **1.4 Die pathophysiologische Bedeutung der eNOS**

Bisher sind drei verschiedene Subtypen der NOS bekannt, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Die induzierbare NOS (iNOS) wird hauptsächlich in Immunzellen exprimiert. Makrophagen und Granulozyten können durch Cytokine oder Lipopolysaccharide zur Expression von NO stimuliert werden. So können Makrophagen über NO cytotoxische Wirkungen auf intrazelluläre Bakterien, Pilze oder Tumorzellen u.a. ausüben. Dies kann auch die Grundlage für bestimmte Autoimmun- und Immunkomplexerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1 oder chronische Arthritiden u.a. sein. Im zentralen und peripheren Nervengewebe und in der Macula densa der Nieren wird hauptsächlich die konstitutive neuronale Form der NOS (nNOS) exprimiert. Der dritte Subtyp der NOS, die so genannte konstitutive endotheliale NOS (eNOS) wird in dem Gefäßendothel exprimiert und synthetisiert dort das gefäßdilatierende NO. Das eNOS-Gen ist auf Chromosom 7q36 lokalisiert und umfasst 27 Exons. Der Translationsstart befindet sich in Exon 2. Aus experimentellen Daten ist bekannt, dass NO nicht nur eine Gefäßdilatation bewirkt, sondern auch als endogener Inhibitor der Thrombozytenaggregation [34, 35] wirkt, sowie die Leukozytenadhäsion [36] und die Proliferation [37] von vaskulären, glatten Muskelzellen hemmt.

## **1.5 Genetische Polymorphismen der eNOS**

In diversen Metaanalysen werden als funktionell wichtige Polymorphismen der eNOS hauptsächlich die Polymorphismen Glu298Asp in Exon 7, -786T>C in der Promoter Region und 4b/4a tandem repeats im Intron 4 beschrieben. Alle drei Polymorphismen

werden in Zusammenhang mit der Koronaren-Herz-Krankheit (KHK), Atherosklerose und Herzinfarkt gebracht [38].

Bei dem Glu298Asp-Polymorphismus handelt es sich um einen G/T Basenaustausch, der einen Aminosäureaustausch von Glutaminsäure (Glu) zu Asparaginsäure (Asp) zur Folge hat. In einer in Kooperation mit Testa und Kollegen [39] durchgeführten Studie mit 261 Patienten mit Niereninsuffizienz konnte bereits ein Zusammenhang zwischen dem Glu298Asp-Polymorphismus als Risikomarker zusammen mit erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen in Bezug auf die Gesamtsterblichkeit gezeigt werden. Metaanalysen haben gezeigt, dass homozygote Patienten ein ca. 1,3- fach höheres Risiko haben, an einer KHK oder Atherosklerose zu erkranken oder einen akuten Herzinfarkt zu erleiden, als Patienten ohne Mutation [38]. Serrano und Kollegen konnten zeigen, dass das Risiko während einer Schwangerschaft an Präeklampsie zu erkranken, verbunden mit eventueller Placentaablösung oder einer folgenden Fehlgeburt, bei Frauen mit dem Glu298Asp-Polymorphismus erhöht ist [40].

## 1.6 Haplotypen

Betrachtet man mehrere Loci auf einem Chromosom, so bezeichnet ein Haplotyp die Folge der Allele, die von einem Elternteil vererbt worden sind, d.h. die auf denselben Chromatiden liegen. Wenn eine starke Kopplung zwischen zwei oder mehreren Genorten vorliegt, werden die Haplotypen meistens als Ganzes von Eltern auf ihre Kinder vererbt. Wenn Allelkombinationen zweier Loci auf einem Haplotypen in einer Population häufiger vorkommen als man es bei unabhängiger Kombination der Allele entsprechend ihrer Allelhäufigkeiten erwarten würde, spricht man von einem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium, LD*). Die Existenz eines Kopplungsungleichgewichtes bedeutet, dass man mit dem Wissen über das Vorliegen der ersten Variante mit einer hohen Wahrscheinlichkeit das Vorliegen der zweiten Variante vorhersagen kann. Es besteht die Möglichkeit, dass ein alleiniger SNP nicht direkt zur Entstehung einer Krankheit beiträgt, häufig aber die Vererbung einer bestimmten Allelkombination, d.h. eines Haplotypen mit der Prävalenz einer Erkrankung in Zusammenhang stehen kann.

## 2 Methoden und Material

### 2.1 Versuchstiere und Genehmigungen

Zur Herstellung embryonaler Fibroblastenkulturen (MEF; *mouse embryonic fibroblasts*) wurden transgene *Naval Medical Research Institute* (NMRI)-Mäuse (ED 13-16; Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf), transgene C57/bl6-Mäuse (ubiquitäre Expression einer Hygromycinresistenz; ED 13; generiert von Frau PD Dr. rer. nat. I. Hermans-Borgmeyer) und CF1-Mäuse (ED 13,5; Jackson Laboratory-Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) verwendet.

Die Generierung der DDAH-Knock-Out-Mäusen und die damit zusammenhängenden Versuche an Wirbeltieren wurde vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg unter der Nummer 66/04 genehmigt.

### 2.2 DNA-Klonierung

#### 2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurde die klassische Calciumchlorid-Methode nach einem modifizierten Protokoll von Hanahan [41] verwendet. 100 mL LB-Medium wurden mit dem gewünschten Bakterienstamm angeimpft. Bis zum Erreichen einer Bakteriendichte von  $4-7 \times 10^7$  Zellen/ mL ( $OD_{600} = 0,6$ ) wurde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Es wurde 15 min. auf Eis abgekühlt und anschließend die Kultur 15 min. bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 16,7 mL kaltem RF I-Puffer resuspendiert und erneut 15 min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min. bei 1000 x g und 4 °C wurde das Zellpellet in 4 mL kaltem RF II-Puffer resuspendiert und für 15 min. auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in 200 µL Aliquots in einem Ethanol/Trockeneisbad langsam eingefroren und bei -80 °C gelagert.

LB-Agarplatten: 1 L LB-Medium und 15 g Agar autoklavieren; jeweils 10 mL für eine 10 mm Platte verwenden; Gemisch aushärten lassen und bei 4 °C lagern

LB-Medium: 10 g Tryptone, 5 g Hefe Extrakt und 10 g NaCl mit Wasser auf 1 L auffüllen und autoklavieren; Lagerung bei 4 °C

RF I-Puffer: 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM K-acetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 15% Glycerin in Wasser lösen, pH 8,5 mit Essigsäure einstellen und steril filtrieren; Lagerung bei 4 °C

RF II-Puffer: 10 mM MOPS (3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure), 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub> und 15% Glycerin in Wasser lösen, pH 6,8 mit Essigsäure einstellen und steril filtrieren; Lagerung bei 4 °C

### 2.2.2 Transformation

Das Einbringen von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien erfolgte mittels der „Hitzeschock-Methode“ [41]. Hierfür wurden 200 µL chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*) bei 4°C aufgetaut. Der komplette Ligationsansatz wurde zu den *E. coli* gegeben und für 30 min. auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der „Hitzeschock“ bei 42 °C für 90 sek. mit anschließender 3-minütiger Kühlungszeit auf Eis. Nach Zugabe von 900 µL vorgewärmten LB-Medium wurde für 30 min. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der komplette Ansatz wurde auf einer Ampicillin LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg Ampicillin-Trihydrat in 1 mL 10M NaOH

### 2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Für die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde eine *Boiling-Prep*-Methode basierend auf dem Protokoll von Holmes und Quigley [42] angewendet. Die Vorteile dieser Methode liegen in der schnellen Durchführung, einem geringen Materialeinsatz und der guten Einsetzbarkeit für verschiedene *E. coli*-Laborstämme. 2 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Reagenzglas geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde vollständig in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und für 1 min. bei 5.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µL STET- Puffer pH 8 resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µL Lysozym (10 mg/mL) und mehrfachem Invertieren wurde für 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die

Inkubation für 90 sec. im Heizblock bei 95 °C unter Schütteln fortgesetzt und anschließend für 5 min. bei 13.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mit 50 µL 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,5) und 500 µL Isopropanol (reinst) gefällt und abschließend in 35 µL *low*-TE aufgenommen.

STET-Puffer: 4 g Saccharose, 25 mL Triton X-100, 8,4 g Na-EDTA und 3 g Tris-Base mit MilliQ-Wasser bis 500 mL auffüllen; pH 8 mit HCl einstellen

#### **2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab**

Für die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit [Fa. Qiagen] verwendet. 250 mL LB-Medium mit Ampicillin wurden mit dem entsprechenden Klon angeimpft und für 12-16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde bei 6000 x g für 15 min. zentrifugiert und das Pellet in 10 mL P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 10 mL P2-Puffer hinzugefügt und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde mit 10 mL auf 4 °C vorgekühlten P3-Puffer versetzt und in die mitgelieferte, verschlossene Kartusche überführt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lysat vorsichtig mit dem Stopfen durch die Kartusche gedrückt. Nach Zugabe von 2,5 mL ER-Puffer wurde das Eluat für 30 min. auf Eis inkubiert. Das Filtrat wurde über eine QIAGEN-Tip®-Säule, die vorher mit 10 mL QBT-Puffer equilibriert wurde, gegeben und zweimal mit QC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit QN-Puffer eluiert, mit Isopropanol ausgefällt und 60 min. bei 5000 x g zentrifugiert und in 50 µL *low*-TE aufgenommen.

Qiagen P1-Puffer: 50 mM Tris-Cl (pH8), 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNaseA

Qiagen P2-Puffer : 200 mM NaOH, 1% SDS

Qiagen P3-Puffer: 3 M K-acetat pH 5,5

Qiagen ER-Puffer : 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH- 8,5), 15% Isopropanol (v/v)

Qiagen QBT-Puffer : 750 mM NaCl, 50mM MOPS (pH 7), 15% Isopropanol (v/v), 0,15% Triton® X-100 (v/v)

Qiagen QC-Puffer : 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7), 15% Isopropanol (v/v)

### 2.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration isolierter DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 entsprach einer Konzentration von 50 mg/mL doppelsträngiger DNA. Parallel wurde die Extinktion bei 280 nm bestimmt und durch anschließende Berechnung des 260 nm/280 nm-Quotienten die Reinheit der DNA bestimmt. Gereinigte Plasmid-DNA wies einen 260 nm/280 nm-Quotient von >1,8 auf.

### 2.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Plasmid-DNA und genomische DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen (Fa. Fermentas) in den entsprechenden Restriktionspuffern, bei der für die Enzyme optimalen Aktivitätstemperatur geschnitten. Dabei wurde 1 µg DNA mit 2 U Enzym für 1-3 h in einem Gesamtvolumen von 25 µL verdaut. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme mit der entsprechenden Temperatur oder durch Zugabe von 0,25 M EDTA-Lösung inaktiviert.

10x Puffer B: 10 mM Tris-HCl (pH7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/mL BSA (*bovine serum albumine*)

10x Puffer G: 10 mM Tris-HCl (pH7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 0,1 mg/mL BSA

10x Puffer O: 50 mM Tris-HCl (pH7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0,1 mg/mL BSA

10x Puffer R: 10 mM Tris-HCl (pH8,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,1 mg/mL BSA

### 2.2.7 Dephosphorylierung von DNA

Um die 5'-Enden linearisierter DNA zu dephosphorylieren, wurden 500 nmol DNA mit 1 U alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (CIP) (Fa. Roche) in Dephosphorylation-spuffer in 25 µL für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 2,5 µL 200 mM EDTA-Lösung und Erhitzen auf 65 °C für 10 min. wurde die CIP inaktiviert.

10x Dephosphorylations-Puffer: 0,5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5

## 2.2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der Polymerasen-Ketten-Reaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine Methode, bestimmte DNA-Bereiche zu vervielfältigen [43]. Die Amplifikation der doppelsträngigen DNA wird mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase und sequenzspezifischen Primern (Starter-Oligonukleotide mit einer Länge von 20- 30 Basenpaaren) durchgeführt. In einer Reaktion von bis zu 35 thermozyklischen Reaktionen erfolgt jeweils eine Verdoppelung des entsprechenden DNA-Bereiches. Die amplifizierte DNA wurde in einem 1,5%igen horizontalen Agarosegel elektrophoretisch in 1x TAE-Puffer aufgetrennt und unter UV-Licht abfotografiert (ChemGenius<sup>2</sup> Bio-Imaging System, Syngene).

TAE-Puffer: 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH8

### 2.2.8.1 PCR-Bedingungen für die Amplifikation der homologen Bereiche zur Generierung des DDAH1-Targeting-Vektors

3'-homologer Bereich:

PCR-Ansatz:

DNA	2	µL
dNTPs (10 mM)	2,5	µL
DDAH1-9182_for (15 pmol)	1	µL
DDAH1-11876_rev (15 pmol)	1	µL
Taq-Polymerase (Fa. Roche)	0,75	µL
Puffer 3 (Roche)	5	µL
H <sub>2</sub> O	37,75	µL

Der PCR-Ansatz wurde komplett in ein 0,5 mL PCR-Eppendorf-Gefäß pipettiert und vorsichtig gemischt. Die PCR lief nach folgendem Temperaturschema ab:

1. 95 °C 5 min.
2. 94 °C 30 sek.
3. 58 °C 30 sek.
4. 72 °C 4 min. → 35 x ab Schritt 2.
5. 72 °C 7 min.

5'-homologer Bereich:

PCR-Ansatz:

Master-Mix 1:

DNA (30ng/ $\mu$ L)	3	$\mu$ L
DDAH1-22750_for (15 pmol)	1	$\mu$ L
DDAH1-27118_rev (15 pmol)	1	$\mu$ L
H <sub>2</sub> O	15	$\mu$ L

Master-Mix 2:

dNTPs (10 mM)	2,5	$\mu$ L
Taq-Polymerase (Fa. Eppendorf)	0,2	$\mu$ L
Tunning-Puffer (Fa. Eppendorf)	5	$\mu$ L
H <sub>2</sub> O	22,3	$\mu$ L

Diese PCR wurde nach der von dem Hersteller vorgegebenen 2-Master-Mix-Methode durchgeführt. Master-Mix 1 und 2 wurden separat angefertigt. 30  $\mu$ L des Master-Mix 2 wurden in einem 0,5 mL PCR-Eppendorf-Gefäß vorgelegt und 20  $\mu$ L des Master-Mix 1 hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die PCR lief nach folgendem Temperaturprogramm ab:

1. 93 °C 5 min.
2. 93 °C 30 sek.
3. 60 °C 30 sek. + 5s je Zyklus
4. 68 °C 4 min. → 35 x ab Schritt 2.
5. 68 °C 7 min.

Das Einfügen der XhoI-Schnittstellen an die Enden des 5'-homologen Bereiches erfolgte nach der Ligation in den Hilfsvektor pGEM-Teasy (Fa. Promega) ebenfalls über eine PCR.



Einfügen der XhoI-Schnittstellen:

PCR-Ansatz:

Master-Mix 1:

DNA (30ng/μL)	3	μL
DDAH1-22750_for XhoI (15 pmol)	1	μL
DDAH1-27118_rev XhoI (15 pmol)	1	μL
H <sub>2</sub> O	15	μL

Master-Mix 2:

dNTPs (10 mM)	2,5	μL
Taq-Polymerase (Fa. Eppendorf)	0,2	μL
Tunning-Puffer (Fa. Eppendorf)	5	μL
H <sub>2</sub> O	22,3	μL

Der PCR-Ansatz wurde wie bereits oben beschrieben nach der 2-Master-Mix-Methode gemischt und lief nach folgendem Temperaturschema ab:

1. 93 °C 5 min.
2. 93 °C 30 sek.
3. 60 °C 30 sek. + 5s je Zyklus
4. 68 °C 4 min. → 35 x ab Schritt 2.
5. 68 °C 7 min.

Das neue PCR-Produkt mit den XhoI-Schnittstellen wurde in den Hilfsvektor pGEM-Teasy ligiert (siehe 2.2.12) und über die XhoI-Schnittstellen in den Targetingvektor kloniert.

Puffer 3 (Fa. Roche): keine Angaben vom Hersteller

Tunning-Puffer (Fa. Eppendorf): keine Angaben vom Hersteller

### 2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Sowohl die PCR-Produkte als auch die DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. In Abhängigkeit des zu trennenden Molekulargewichtes wurden Agarosekonzentrationen im Bereich von

0,7%-1,5% gewählt. An das Agarosegel wurde eine elektrische Gleichspannung von 5-10 V/cm Gellänge angelegt. Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA durch das Gel bewegt wird, wird durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die Höhe der angelegten Spannung beeinflusst. Als Molekulargewichtsmarker wurde der 1kb DNA-Ladder-Mix (Fa. Fermentas) verwendet. Durch Zugabe von 0,1 µg/mL Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird, wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht.

### **2.2.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte über eine suspendierte Kieselsäure-Matrix mit Hilfe des QIAEX-II Kit (Fa. Qiagen). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel. Die entsprechenden Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Für DNA Fragmente größer als 4 kb wurden 3 Volumenteile QX-Puffer und 30 µl der Kieselsäure Suspension hinzugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 50 °C und wiederholtem Mischen, wurde für 30 s bei 11.800 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde in 500 µl QX-Puffer resuspendiert und erneut für 30 s bei 11.800 x g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 500 µl PE-Puffer wurde das Pellet für 30 min. luftgetrocknet und anschließend in 20 µl vorgewärmten Tris-HCl-Puffer resuspendiert, 30 s bei 11.800 x g zentrifugiert und der Überstand, der die gelöste DNA enthielt in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Qiagen QX-Puffer: keine Angaben vom Hersteller

Qiagen PE-Puffer: keine Angaben vom Hersteller

### **2.2.11 Fällung von DNA**

Den wässrigen DNA-Lösungen wurden 0,7 Volumenteile Ethanol 96% und 0,1 Volumenteile 3 M wässrige Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) zugesetzt. Danach wurde die DNA für 30 min. bei 12.000 x g (4 °C) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, nach

Zentrifugation (12.000 x g, 4 °C, 20 min) luftgetrocknet und in einer adäquaten Menge *low*-TE-Puffer aufgenommen.

*low*-TE-Puffer: 500 mM Tris-HCl (pH 7,4), 250 mM EDTA (pH 8)

### 2.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Für alle Ligationsschritte wurde die *Quick*-Ligase (Fa. New England Biolabs) verwendet. 50 ng Vektor und die 3- fache Menge an Insert wurden mit Wasser auf 10 µL aufgefüllt, mit 10 µL 2 x *Quick*-Ligationspuffer und 1 µL *Quick*-T4-DNA-Ligase versehen und 5 min. bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde ohne Inaktivierung der Ligase in chemisch kompetente *E. coli*s transformiert.

2 x *Quick*-Ligationspuffer: 132 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Dithioereitol, 2 mM ATP, 15% Polyethylenglycol, pH7,6

### 2.2.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung mit *BigDye*-Terminatoren (Fa. Applied Biosystems) basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode [44].

200 ng Plasmid DNA oder 100-400 ng PCR-Produkt wurden in zwei Ansätzen mit jeweils 1 µl des entsprechenden Primers, 4 µl *BigDye-Terminator-Ready-Mix*, 2 µl Puffer und der entsprechenden Menge Wasser versetzt. Der PCR-Lauf wurde nach folgendem Temperaturschema durchgeführt:

- |    |       |                             |
|----|-------|-----------------------------|
| 1. | 95 °C | 1 min.                      |
| 2. | 96 °C | 30 sek.                     |
| 3. | 60 °C | 15 sek.                     |
| 4. | 60 °C | 4 min. → 25 x ab Schritt 2. |

Die DNA wurde mit 3 M Na-Acetatlösung und Ethanol 96% gefällt und im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf sequenziert.

BigDye-Terminator-Ready-Mix (Fa. Applied Biosystems): Keine Angaben vom Hersteller

### 2.2.14 Verwendete Vektoren und E.coli-Stämme

Das Rückgrat des Targetingvektors zur Generierung der DDAH1- und DDAH2- Knock-out-Mauslinien wurde freundlicherweise von Dr. Olaf Friesse (Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Das Rückgrat des Targetingvektors umfasste für die positive Selektion das bakterielle Aminoglykosid-Phosphotransferase-(Neo-) Gen, welches unter Kontrolle des eukaryotischen Phosphoglycerat-Kinase-1-(PGK-1-) Promoters stand und für Genitacin (G418), ein Neomycin Analogon, selektionierte. Zur negativen Selektion stand eine Diphtherie-Toxin A (DT) Kasette zur Verfügung, die nur bei zufälliger Integration in das Genom durch Expression des Toxins auf die mES-Zellen tödlich wirkte.

Für die Generierung der DDAH2-Knock-out-Maus wurde das Prinzip eines konditionalen Knock-outs gewählt [45]. Zusätzlich zu den homologen Bereichen wurden spezifische Cre-Rekombinase-Erkennungssequenzen, die so genannten loxP-Sequenzen, in den Targetingvektor eingefügt. Die loxP-Sequenzen werden von der Cre-Rekombinase erkannt und der Teil der DNA, der sich zwischen den loxP-Sequenzen befindet aus dem Genom entfernt (Abbildung 5). Dieser Schritt kann sowohl in vitro durch zusätzliche Elektroporation eines Cre-exprimierenden Plasmides in die mES-Zelle oder in vivo durch Verpaarung mit einer Cre-exprimierenden Maus durchgeführt werden.

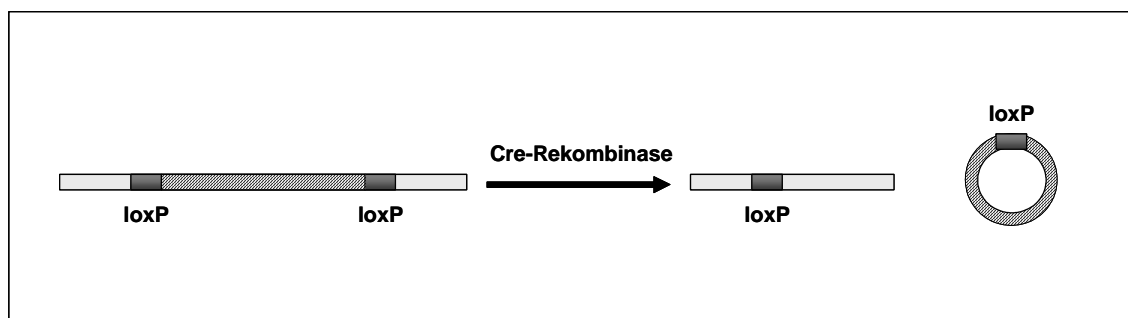


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips eines konditionalen Knock-outs. Die loxP-Sequenzen werden nach Integration des Targetingvektors ins Genom von der Cre-Rekombinase erkannt. Der DNA-Bereich zwischen den loxP-Sequenzen wird durch die Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt.

Als Hilfsvektor bei allen Klonierungsschritten wurde der Vektor pGEM-Teasy verwendet. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen bereits linearisierten Vektor mit TA-Überhängen, die vor allem das Einbringen von PCR-Produkten erheblich vereinfacht. Das Vorhandensein einer Ampicillinresistenz in dem pGEM-Teasy ermöglicht eine einfache Selektion mit Ampicillin.

Zum Vervielfältigen der entsprechenden Plasmide wurden chemisch kompetente DH10b-E.coli-Stämme (Fa. Invitrogen) verwendet.

### 2.2.15 Verwendete Primer und Sonden

Primersequenzen zur Generierung des 3'-homologen Bereiches für den DDAH1-Knock-Out Targetingvektor:

DDAH1-22750\_for: CATCATTCTAGCCAGGGCTCTTCA  
DDAH1-22750\_for(XhoI): GCTCGAGCATCATTCTAGCCAGGGCTCTCAG  
DDAH1-27118\_rev: AGGAAGGGGCTAGCTTATTCAGGGT  
DDAH1-27118\_rev(XhoI): AGGAAGGGGCTAGCTTATTCAGGGTGCTCGAG

Primersequenzen zur Generierung des 5'-homologen Bereiches für den DDAH1-Knock-Out Targetingvektor:

DDAH1-9182\_for: CAACCTTGTAAGGATTCCACTCCCTCT  
DDAH1-11876\_rev: TCACTTCAAAGATGAGCAGACTGAGGC

Sequenz der 5'-Sonde für die Southern-Blot-Analyse zur Genotypisierung der DDAH2-Knock-out-Mauslinie:

```
CCCTAAAGGAAGAGAAAGTTCAACAGCTTCAAAGCAAAGCAAGCATGCCTTCCCT
GGGGCTAACACACTGACCTCTCTAACCTTTAGGTGGTGTGCAAAAAGTACAGA
GGCTTACCATCCCAGAGGCATTCCGTGGAGTGCATCGGTACTTGAGCAACGCTT
ATGCCCGGAAGAATTTGCCTCCACCTGTCCAGATGATGAAGAGATAGAGCTAGC
CTATGAGCAAGTGGCCAGGGCTCTCAAATGAGCACTTTTTAAAGGGTCTTCCACC
CACTCTGTGCTCTCCACAGAGGCTTCGGGGGGCTTCCACGTTGCTGCATAATGGA
CACACTCCGAAATTGCCAGTGGGCAGGAAATCCGGGGCACTTGTGGGGTGGGGC
TGTGGGATAAGGCAAAGGATAGTGGACAAGGGTAAGATTTTTATTTTGGGATGGG
GTGGGTAGGACAACGCATTTTCAGTAATAAAATACAGAATGGAAAAAATCTAGTGT
TGTTTTTACACAAAGACGGCTTAAAGTGTAGTGGGCT
```

## 2.3 Murine embryonale Stammzellen

### 2.3.1 Kultur von murinen embryonalen Stammzellen

Sowohl die murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen), als auch die murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurden von dem Transgenen Tierservice des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg zur Verfügung gestellt. Um eine spontane Differenzierung zu verhindern, wurden die mES-Zellen in Anwesenheit des Zytokins *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) auf mit Mitomycin C (MMC) wachstumsinaktivierten MEFs kultiviert [46].

Zur Kultur undifferenzierter mES-Zellen wurden MEFs (50.000 MEF/cm<sup>2</sup>) auf mit 0,1%iger Gelatinelösung beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert. Nach 1-2 Tagen wurden auf die Fibroblastenschicht vereinzelt mES-Zellen ausgebracht. Das Kulturmedium (mES-Zell-Medium) wurde täglich gewechselt. Alle 2-3 Tage wurden die subkonfluenten mES-Zellen - abhängig von der mES-Zelldichte - im Verhältnis 1:3 bis 1:6 geteilt.

Zuvor wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ca. 1/5 des üblichen Kulturmedium-Volumens an mES-Trypsin/EDTA zugegeben. Anschließend wurde drei bis fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette vereinzelt (im Mikroskop kontrolliert). Der Trypsin-Verdau wurde mit mindestens dem doppelten Volumen an mES-Medium abgestoppt. Anschließend wurden die mES-Zellen zentrifugiert (1.000 x g, 4 min, 4 °C), in mES-Medium resuspendiert und erneut ausplattiert (Verhältnis 1:3-1:6). Die Kultur der mES-Zellen erfolgte bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 7%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

mES-Zell-Medium: DMEM-Medium mit 4,5 g/L Glucose, 2 mM L-Glutamin, 15% FCS, 1% NEAA, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin, 1% Nucleosidmix, 100 µM 2-Mercaptoethanol, 10 ng/mL LIF

Nucleosidmix: 80 mg Adenosin, 85 mg Guanosin, 73 mg Cytidin, 73 mg Uridin, 24 mg Thymidin in 100 mL PBS bei 37 °C lösen; steril filtrieren

ES-Trypsin/EDTA: 2,5 g/L Trypsin, 0,38 g/L EDTA x 4 Na in Hank's B.S.S. (Fa. Invitrogen)

### **2.3.2 Elektroporation von linearisierter DNA in mES-Zellen**

Für die Elektroporation des linearisierten Targetingvektors wurden ca.  $1 \times 10^7$  mES-Zellen benötigt. Dieses entsprach einer subkonfluent gewachsenen 100 mm Zellkulturschale. Zwei Stunden vor der Elektroporation wurden die Zellen mit frischem mES-Zell-Medium versorgt. Die mES-Zellen wurden zweimal mit 10 mL PBS/EDTA gewaschen und anschließend mit ES-Trypsin/ EDTA bei 37 °C für 4 min. abgelöst. Wichtig ist, dass die mES-Zellen gut vereinzelt vorliegen, bevor sie in ein 15 mL Reaktionsgefäß mit 7 mL mES-Zell-Medium überführt werden. Nach 5 min. Zentrifugation bei 1000 x g wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Durch leichtes Aufschütteln wurde das Pellet in 10 mL PBS resuspendiert und erneut für 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 800 µL PBS resuspendiert und zusammen mit ca. 60 µg linearisierter Vektor-DNA in die Elektroporationsküvette (Fa. Biorad) überführt. Elektroporiert wurde bei 240 V und mit einer Kapazität von 500 µF. Nach 10-minütiger Ruhezeit wurde der gesamte Elektroporationsansatz in 10 mL mES-Zell-Medium überführt, gemischt und gleichmäßig auf fünf mit MEFs (MMC inaktiviert) beschichteten Zellkultur-Schalen (100 mm) verteilt.

Elektroporationspuffer: 20 mM Hepes, 137 mM NaCl, 5,0 mM KCl, 0,7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6,0 mM Dextrose, pH 7,05

### **2.3.3 Selektion transgener mES-Zellen**

Zwei Tage nach der Elektroporation wurde zur Selektion stabil transformierter mES-Zellen 150 µL G418 (Geneticin) als positiver Selektionszusatz hinzugefügt. Resistente Zellklone wurden 7 Tage nach der Elektroporation isoliert. Um die Zelladhäsion während der Isolation zu stabilisieren, wurden die mES-Zellen mit 10 mL D-PBS ( $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ) gewaschen. Es wurden nur die Kolonien isoliert, die unter dem Mikroskop hell waren und eine runde Struktur aufwiesen. In einer 96-well Rundbodenplatte wurden 40 µL ES-Trypsin/EDTA-Lösung vorgelegt und je well eine Kolonie von der

Platte isoliert. Die gut vereinzelt Kolonien wurden auf eine mit MEFs beschichtete 96-well Zellkultur-Schale mit 160  $\mu$ L mES-Zell-Medium überführt.

Dulbecco's Phosphat-Puffer (D-PBS) (1-fach): 100 mg/L  $\text{CaCl}_2$ , 100 mg/L  $\text{MgCl}_2$ , 200 mg/L KCl, 200 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 g/L NaCl, 2160 mg/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

#### **2.3.4 DNA-Präparation aus mES-Zellen**

Die mES-Zellen für die DNA Präparation wuchsen auf Zellkulturschalen ohne MEFs bis sie vollkommen konfluent waren. Das Medium der mES-Zellen für die DNA Präparation wurde nur alle zwei Tage gewechselt. Nach Zugabe von 100  $\mu$ L Lysispuffer wurden die Platten in einer feuchten Kammer über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die DNA wurde am folgenden Tag durch Zugabe 10  $\mu$ L 8 M LiCl-Lösung und 100  $\mu$ L Isopropanol gefällt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Platten für 30 min. bei 2500 x g zentrifugiert und das DNA-Pellet mit 50  $\mu$ L 70%tigem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde über Nacht bei 37°C in 100  $\mu$ L *low*-E-Puffer gelöst.

#### **2.3.5 Einfrieren und Auftauen von mES-Zellen**

Zum Einfrieren wurden die undifferenzierten Zellen mit PBS gewaschen und mit mES-Trypsin/EDTA abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an mES-Zell-Medium inaktiviert. Durch Zentrifugation (1.000 g; 4 min; 4 °C) wurden die Zellen pelletiert und schließlich tropfenweise in eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Das Einfrieren der Zellen erfolgte langsam durch Senkung der Temperatur um 1 °C/h in einem Isopropanol-Einfriergefäß.

Das Auftauen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden mit mindestens dem dreifachen Volumen an mES-Zell-Medium suspendiert. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (1.000 x g, 4 min, 4 °C), das Pellet in mES-Zell-Medium resuspendiert und die Zellen anschließend ausplattiert.

Einfriermedium: 50% *Fetal calf serum* (FCS), 40% mES-Zell-Medium, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)



### 2.3.6 Restriktionsverdau der mES-Zell-DNA für die Southern-Blot-Analyse

Um den Restriktionsverdau für die Genotypisierung mittels Southern-Blot-Analyse durchzuführen, wurden 20 µL mES-Zell-DNA mit 10 U NcoI Restriktionsenzym (Fa. Fermentas), 5 µL Tango™-Restriktionspuffer und der entsprechenden Menge Wasser für einen 50 µL Ansatz versetzt und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Tango™-Restriktionspuffer: 33 mM Tris-acetat (pH 7.9 at 37°C), 10 mM Magnesium acetat, 66 mM Kaliumacetat, 0,1 mg/mL BSA

### 2.3.7 Southern-Blot-Analyse

Für die Southern-Blot-Analyse wurde radioaktives [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (spez. Aktivität 3000 Ci/ mol) (Fa. Perkin Elmer) verwendet. Die Untersuchungen wurden nur in speziell dafür ausgewiesenen Isotopenlaboratorien durchgeführt. Die anfallenden Abfälle wurden gesondert gesammelt und nach den entsprechenden Richtlinien entsorgt. Zu Beginn erfolgte die Übertragung der aufgetrennten DNA aus einem 0,8%igem Agarosegel, mechanisch durch Druck auf eine positiv geladene Polyamidmembran (Gene Screen Plus, Fa. Perkin Elmer). Hierfür wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese in 0,25 M HCl für 10 min. gewaschen. Neutralisiert wurde das Gel durch 15-minütiges Waschen in 0,4 M NaOH. Die Membran wurde für 15 min. in 0,4 M NaOH equilibriert. Die Übertragung der DNA fand im kontinuierlich alkalischen Milieu mit 0,4 M NaOH über Nacht statt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit SSC gewaschen.

#### Hybridisierung

Die Membran wurde vorsichtig mit der DNA- Seite nach oben aufgerollt und mit 5 mL Hybridisierungspuffer (Express Hyb ® Puffer, Clontech) in eine für radioaktives Arbeiten geeignete Quarzglasröhre überführt und bei 60 °C im Hybridisierungssofen für 30 min. vorhybridisiert. Während der Vorhybridisierung wurden die radioaktive Sonde ( $2 \times 10^5$  –  $5 \times 10^5$  cpm) und 300 µL Heringsspermien-DNA (10mg/mL) bei 95-100 °C denaturiert und nach der Vorhybridisierung ebenfalls in die Quarzröhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 60 °C über Nacht.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran 5-10 min. mit 10 mL Waschlösung-1 gewaschen. Es folgte ein zweiter Waschschrift mit Waschlösung-2 für 5-10 min. Die

verbleibende Aktivität auf der Membran sollte zwischen 50 und 100 cps betragen. Die Membran wurde dann auf einer Phospho-Imager-Platte (Fuji Film *Imaging Plate* BAS-MS) über Nacht in einer Radioaktivkassette exponiert.

#### Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Für die radioaktive Markierung der DNA-Sonde wurde das Megaprime-DNA-Labeling Kit (Fa. Amersham) verwendet. Es wurden 20-30 ng (4-6  $\mu\text{L}$  einer 5 ng/ $\mu\text{L}$  Verdünnung) der DNA-Sonde für die radioaktive Markierung benötigt. Die entsprechende Menge Sonde wurde mit 5  $\mu\text{L}$  Random-Prime-Mix für 5 min. bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden 4  $\mu\text{L}$  dGTP, dATP, dTTP, 5  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer, 2  $\mu\text{L}$  Polymerase, 15  $\mu\text{L}$  Wasser und 5  $\mu\text{L}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP hinzugefügt und 15 min. bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5  $\mu\text{L}$  0,2 M EDTA-Lösung abgestoppt und der gesamte Reaktionsansatz zum Abtrennen nicht eingebauter Nukleotide über eine Sephadex-G-50-*Spin*-Säule (Fa. Amersham) gegeben. Die Menge an Radioaktivität der Sonde wurde an 2  $\mu\text{L}$  des Eluates mit Hilfe einer Cerenkov-Messung ermittelt. Für eine 15x15 cm Membran und 5 mL Hybridisierungspuffer wurde Radioaktivität mit  $1 \times 10^6$  cpm verwendet.

Waschlösung-1: 2 x SSC; 0,05% SDS

Waschlösung-2: 0,1x SSC; 0,1% SDS

## **2.4 Knock-Out Mauslinien**

### **2.4.1 DNA- Präparation aus Mausschwanzbiopsien**

Für die Genotypisierung der Mäuse benötigte man Gewebeproben der Tiere, aus denen genomische DNA isoliert werden kann. Hierfür wurde den ca. 3 Wochen alten Mäusen eine ca. 0,5 cm lange Mausschwanzbiopsie entnommen. Die Schwanzbiopsien wurden über Nacht in 500  $\mu\text{L}$  Tail-III-Puffer unter Zusatz von 20  $\mu\text{L}$  (20 mg/mL) Proteinase K (Fa. Roche) bei 56 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  „Isolierungsreagenz für genomische DNA“ (IRG) (Fa. ApplieChem) wurde 5 min. bei Raumtemperatur über Kopf invertiert. Durch Zugabe von 1000  $\mu\text{L}$  abs. Ethanol wurde die DNA 5 min. bei Raumtemperatur gefällt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und

erneut 10 min. bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach 15-minütiger Lufttrocknung konnte die DNA in 100 µL *low*-TE- Puffer gelöst werden.

Tail III-Puffer: 50 mM Tris pH8, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS

Isolierungsreagenz für genomische DNA (Fa. ApplieChem): keine Angaben vom Hersteller

#### **2.4.2 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe**

50 mg Mausgewebe wurden mit 1 mL IRG versetzt und in dem TissueLyser® (Fa. Quiagen) zweimal für 2 min. bei einer Schüttelfrequenz von 30 Hz homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10 min. bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde mit 1 mL 96%igem Ethanol 3 min. bei Raumtemperatur gefällt und anschließend für 5 min. bei 5000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einer Mischung aus IRG und 96%igem Ethanol im Verhältnis 1:1 gewaschen. Das Pellet wurde 5 min. bei Raumtemperatur getrocknet, in 100 µL *low*-TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln gelöst. 20 µL der gelösten DNA wurden für die Southern-Blot-Analyse verwendet.

## **2.5 Polymorphismen in humaner genomischer DNA**

### **2.5.1 DNA Isolierung aus Vollblut**

Die Isolierung von DNA aus Vollblutproben wurde mit Hilfe des QIAmp® DNA Blood Mini Kit (Fa. Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurden 20 µl Proteinkinase in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß vorgelegt und 200 µl Vollblut hinzugefügt. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer wurde die Probe 15 s lang gemischt und anschließend für 10 min. bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol und erneutem Mischen wurde die Probe über die QIAmp®-Säule gegeben und 1 min. bei 6500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen und erneut für 1 min. bei 6500 x g zentrifugiert. Ein zweiter Waschschrift wurde mit AW2-Puffer und anschließender Zentrifugation für 3 min. bei 11.000 x g durchgeführt. Die auf der Säule gebundene DNA wurde mit 200 µL AE-Puffer eluiert.

Qiagen AL-Puffer: keine Angaben vom Hersteller

Qiagen AW1-Puffer: keine Angaben vom Hersteller

Qiagen AW2-Puffer: keine Angaben vom Hersteller

Qiagen AE-Puffer: keine Angaben vom Hersteller

### 2.5.2 Bestimmung von ADMA in humanem Blutplasma

Die ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Plasmakonzentrationen wurden mittels *Liquid-chromatography-tandem-mass-spectrometry* (LC-MS/MS) bestimmt. Die Bestimmung von ADMA, SDMA und L-Arginin erfolgte in Form ihrer Butylester. Als interne Standards für eine Quantifizierung dienten d6-ADMA, d6-SDMA und d7-L-Arginin. Die Probenvorbereitung und die Messung der Proben wurde wie in [47] beschrieben durchgeführt. 5 µL einer 20 µM Lösung des internen Standards [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA wurden zu 50 µL Plasma hinzugefügt. Die enthaltenen Proteine wurden durch Zugabe von 100 µL Aceton präzipitiert. Der getrocknete Überstand wurde durch Zugabe von 100 µL 1 M butanolischer HCl für 17 min. bei 65 °C derivatisiert. Die Probe wurde in 1 mL Wasser resuspendiert und 20 µL dieser Lösung zur Bestimmung in die LC-MS/MS injiziert.

### 2.5.3 Bestimmung der DDAH Polymorphismen

Die Bestimmung der DDAH1 und DDAH2 Polymorphismen erfolgte mittels einer auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basierenden Methode. Die Amplifizierung der entsprechenden Genabschnitte erfolgte mittels PCR nach folgendem Temperaturschema:

1. 95 °C 10 min.
2. 92 °C 15 sek.
3. 60 °C 1 min. → 40x ab Schritt 2

Die Detektion der SNPs erfolgte durch eine allelspezifische fluoreszenzmarkierte Sonde. Die Sonde besteht aus ca. 20 Basenpaaren, einem für das jeweilige Allel spezifische Fluoreszenzfarbstoff und einem Stabilisierungsprotein (*minor groove binder*, MGB), das in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix bindet. Die Stabilisierung durch das MGB ist am effektivsten, wenn eine 100%ige

Übereinstimmung mit dem Template gegeben ist. Diese erhöhte Trennschärfe erlaubt die Detektion eines einzelnen Basenaustausches. Bindet die Sonde an der DNA wird der entstehende Doppelstrang durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Das vorher durch den Fluoreszenz-Blocker unterdrückte Fluoreszenzsignal wird sichtbar und kann detektiert werden (Abbildung 6). So kann durch das jeweilige Fluoreszenzsignal auf das entsprechende Allel geschlossen werden.

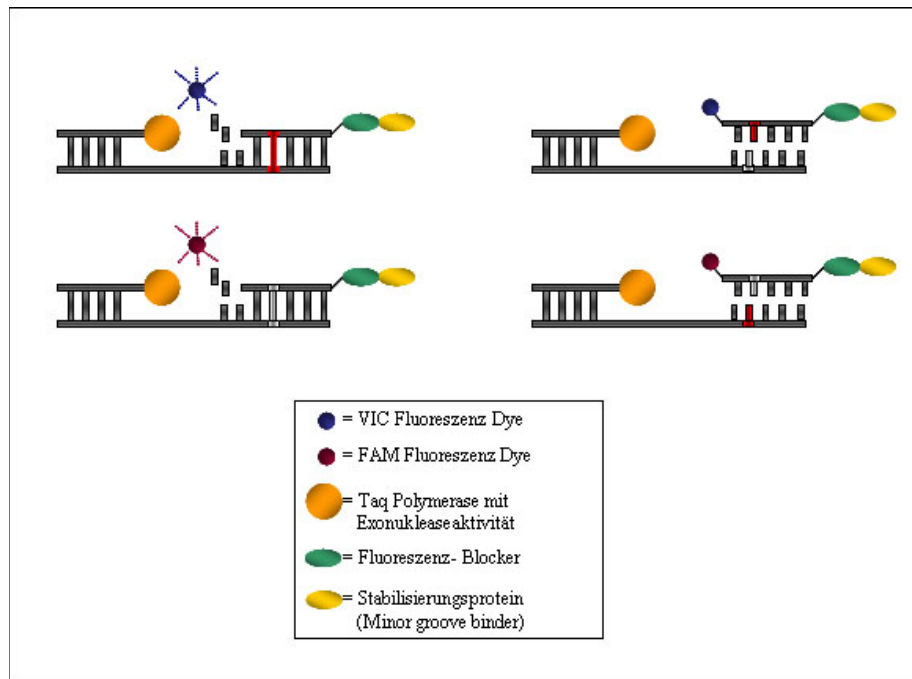


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines SNP-Assays; nur bei einer 100%igen Sequenz-Übereinstimmung bindet die Sonde an der DNA und wird durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut und gibt das entsprechende Fluoreszenzsignal ab.

Die DDAH2 Polymorphismen g.(-1415)G>A (rs2272592), g.(-1151)C>A (rs805304) und g.(-449)C>G (rs805305) wurden mit bereits vorgefertigten SNP-Assays (Fa. Applied Biosystems) bestimmt.

In 384-well PCR-Platten wurden für die SNP-Bestimmung 10-25 ng genomische DNA, 2,5 µL TaqMan® Universal-PCR-Master-Mix (Fa. Applied Biosystems) und 0,25 µL SNP-Assay-Mix eingesetzt.

Die Auswertung des Assays erfolgt über die Geräte-Software (SDS 2.2; Fa. Applied Biosystems) durch den *Allelic-Discrimination-Plot*. Bei diesem Plot werden die verschiedenen Fluoreszenzsignale gegeneinander aufgetragen und so genannte

Cluster-Wolken gebildet. Je nachdem, in welchem Drittel des Plots sich das Signal befindet, kann das entsprechende Allel vorhergesagt werden (Abbildung 7).

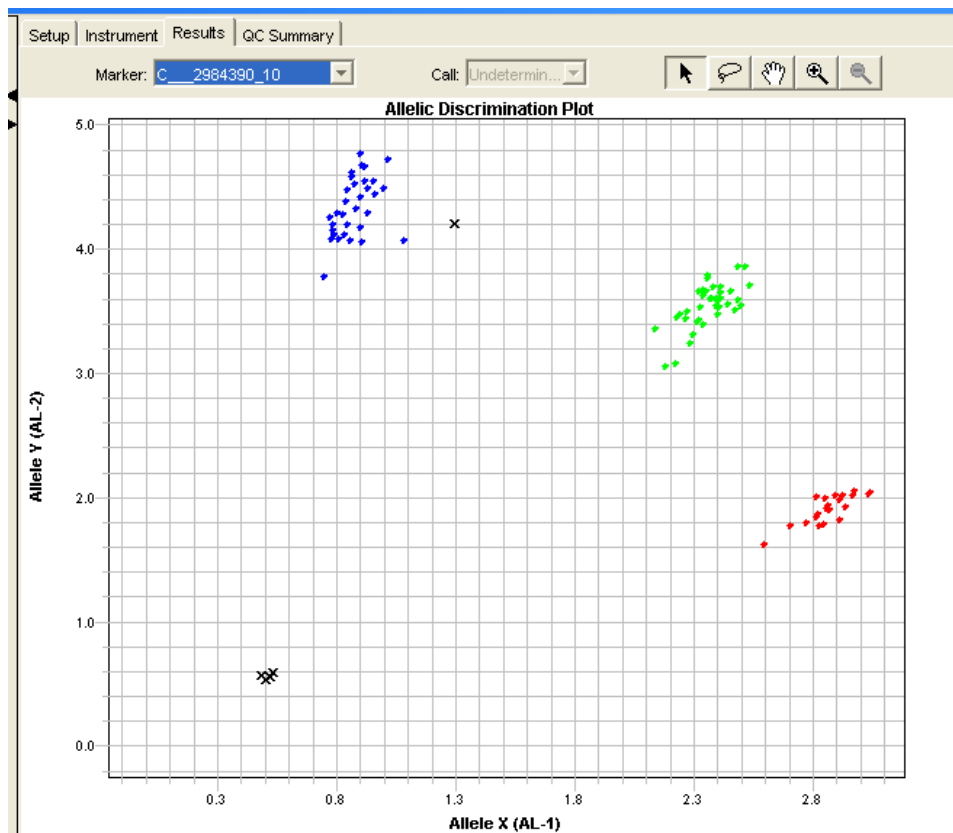


Abbildung 7: Exemplarischer Allelic-Discrimination-Plot; die Cluster-Wolken sind farblich markiert; blaue Punkte: homozygot für Allel 2; rote Punkte: homozygot für Allel 1; grüne Punkte: heterozygote Allel; schwarze Kreuze: unbestimmbare Allele [Software SDS 2.2 (Fa. Applied Biosystems)]

Zur Bestimmung des g.260C>T Polymorphismus gab es keinen vorgefertigten SNP-Assay. Deswegen wurde der entsprechende DDAH1-Sequenzbereich, in dem sich der SNP befindet, identifiziert und bearbeitet. Kritische Sequenzbereiche, die das Binden der Sonde beeinflussen könnten, oder kritische Tertiärstrukturen wurden identifiziert und maskiert. Für den so bearbeiteten Sequenzabschnitt wurde durch die Firma TibMolbiol ein SNP-Assay synthetisiert. Die entsprechenden Sequenzabschnitte, in denen sich die Polymorphismen befinden sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Sequenzabschnitte der einzelnen Polymorphismen, die zur Synthese der SNP-Assays herangezogen wurden. Die Primer binden innerhalb dieser Sequenzabschnitte. Der jeweilige Polymorphismus ist in den eckigen Klammern dargestellt

DDAH2 -1415 G/A- Polymorphismus	CATTCCATGTGCGCCACACTTTAAA[C/T] CCCCATTGCGTAAAAACACTTGATT
DDAH2 -1151 C/A- Polymorphismus	CACGCCATTCCGCCCTGCTAAGCC[G/T] CGCCCATTACATCCAGACTGCGCCC
DDAH2 -449 G/C- Polymorphismus	CCGCAGGGACTGGAAGTCCAGCCCG[C/G] GACCCGCAGGGGTTATGGGACAGAA
DDAH1 Thr87Met- Polymorphismus	AGTCGGAGTTACCTCCTTCCTCCGGCTCGG CGCCCCCGGGTCGGGTGATGAGGGCCG[T/C] CTCCTCGCCACACCACGGGCCACGTTCTCC

TaqMan® PCR Universal Master Mix: AmpliTaq Gold®, dNTPs, Puffer (keine weiteren Angaben vom Hersteller)

#### 2.5.4 Bestimmung des eNOS Glu298Asp Polymorphismus

Bei dem eNOS Glu298Asp Polymorphismus handelt es sich um einen SNP - in diesem Fall ein G/T-Austausch - der mittels Restriktionsfragment-Längenunterschiede nachgewiesen werden kann. Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um eine modifizierte Variante der Methode nach Noiri und Kollegen [48]. Die aus Vollblut gewonnene DNA wurde mittels einer PCR amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym Ban II (Fa. Roche) geschnitten. Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 3 µl DNA, 0,5 µl des jeweiligen Primers, 1,25 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl (1 Unit) rekombinante Taq-Polymerase (Fa. Fermentas) und 2,5 µl des entsprechenden Puffers in einem Endvolumen von 25 µL. Die PCR erfolgte nach folgendem Temperaturschema:

1. 96 °C 2 min.
2. 96 °C 1 min.
3. 70,5 °C 1 min.
4. 72 °C 1 min. → 30 x ab Schritt 2
5. 72 °C 4 min

Anschließend wurden 15 µl des PCR-Produktes mit 1 Unit des Restriktionsenzym Ban II (Fa. Roche) unter Zugabe des SuRE/ Cut-Buffer-B (Fa. Roche) geschnitten. Die Inkubationszeit betrug 90 min. bei 37 °C. Folgende Fragmente wurden erwartet und gefunden:

Asp/Asp	(Homozygot G/G)	457 bp
Glu/ Glu	(Homozygot T/T)	320, 137 bp
Glu/Asp	(Heterozygot G/T)	457, 320, 137 bp

SuRE/ Cut-Buffer-B: 100 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 0,05% Polydocanol, 50% Glycerol (v/v), pH8

## 2.6 Klinische Studien

### 2.6.1 iP4-Studie

Bei der iP4 Studie handelt es sich um eine in Frankreich unter Leitung von Crakowski durchgeführte Studie mit 112 Patienten, die an pulmonarer Hypertonie erkrankt sind. Die Patienten wurden durch den „Service of Pneumology of CHU“ in Clamart, Marseille, Grenoble, Strassburg, Nancy, Toulouse und Lyon in die Studie aufgenommen. Alle Patienten wurden laut Studienprotokoll über die Studie informiert und unterschrieben die Einwilligungserklärung. Ausgeschlossen wurden Patienten, die an Herzinsuffizienz litten, einen Herzinfarkt und / oder ein Malignom hatten, HIV-Patienten und Patienten, die eine Prostacyclin- und / oder Bosentan-Therapie erhielten. Die Studie startete im November 2003 mit einem geplanten Verlauf von 3 Jahren.

### 2.6.2 MONICA/KORA-Studie

Bei dieser Studienpopulation handelte es sich um 783 Teilnehmer aus der Echokardiographie-Substudie (n=1674) der 3. Erhebung der MONICA (MONitoring trends and determinants In Cardiovascular disease)/ KORA (KOoperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg)-Studie 1994/1995 [49, 50]. Die



Teilnehmer repräsentieren einen zufälligen, gesunden Querschnitt der deutschen Bevölkerung in der Region um Augsburg. Die 3. Erhebung umfasste Teilnehmer im Alter von 25 bis 75 Jahren. Die Teilnehmer wurden ärztlich untersucht und in Form eines standardisierten Interviews über ihre medizinische Vorgeschichte, ihre Medikation und ihre körperliche Aktivität befragt. Der Blutdruck in Ruhe wurde nach den MONICA-Richtlinien mit Hilfe einer random-zero Methode und Quecksilber Sphygmomanometer nach 30-minütigem aufrechten Sitzen bestimmt. Hypertonie wurde definiert als ein Blutdruck gleich oder über 140/90 oder die Einnahme antihypertensiver Arzneimittel. Für die Studie lag ein positives Votum der lokalen Ethikkommission und ein schriftliches Einverständnis der Teilnehmer vor.

Zusätzlich wurde jedem Studienteilnehmer Blut entnommen und die L-Arginin-, ADMA- und SDMA-Plasmakonzentrationen sowie die DDAH2-Promoterpolymorphismen bestimmt.

### **2.6.3 Baldus-Studie**

Der Originaltitel der Studie lautete: "Blutentnahme bei Patienten mit Koronarkrankheit zur Evaluation von Myeloperoxidase Polymorphismen als genetischer Risikofaktor für die Koronarkrankheit". Die Studie wurde von Baldus und Kollegen am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt und wird der Einfachheit halber in dieser Arbeit als Baldus-Studie bezeichnet.

Bei dieser Studie handelte es sich um eine prospektive Kohortenstudie zur Untersuchung der Frage, ob ADMA und/oder genetische Polymorphismen im DDAH-Gen eine prospektive Risikoabschätzung von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (KHK) erlauben.

Im Zeitraum vom 15.08.2003 bis 15.08.2005 wurden 680 Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen im Rahmen einer Koronarangiographie eine Koronarkrankheit ausgeschlossen wurde, als auch Patienten mit einer nachgewiesenen stabilen Koronarkrankheit. Ausgeschlossen wurden Patienten mit einer Anämie (jeglicher Ursache) und auch Patienten mit konsumierenden Erkrankungen (Tumorerkrankungen, Leukämie etc.) sowie Patienten mit stark eingeschränkter Nierenfunktion.

Alle Patienten wurden gemäß Studienprotokoll über die Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Bei Aufnahme in die Studie wurde den Patienten Blut abgenommen und an Hand eines Fragebogens eine

Anamnese erhoben. Aus dem Blutplasma wurden die ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Plasmakonzentrationen bestimmt. Aus den Leukozyten wurde die genomische DNA isoliert. Ein Follow-Up erfolgte nach durchschnittlich drei Jahren und wurde über ein telefonisches Interview durchgeführt.

Als primärer Endpunkt wurde eine Kombination der Ereignisse Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse, Myokardinfarkt, Revaskularisation, Schlaganfall und Arrhythmien definiert. Jeder dieser Endpunkte - separat vorkommend - wurde als sekundärer Endpunkt definiert. Bei verstorbenen Patienten erfolgte die Erfassung der Daten anhand der Krankenakte bzw. über den Hausarzt.

Bei 608 Patienten der ursprünglich 680 in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden die DDAH2-Promoterpolymorphismen und die ADMA-, SDMA-, und L-Arginin-Plasmakonzentrationen bestimmt.

#### **2.6.4 Atorvastatin-Studie**

Bei der Atorvastatin-Studie handelt es sich um eine durch Maas und Kollegen [51] an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchgeführte Fall-Kontroll-Studie mit insgesamt 24 gesunden Teilnehmern. Es sollte der Einfluss des eNOS Glu298Asp-Polymorphismus auf die eNOS-Expression in Blutplättchen und die NO-Synthese in vivo untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von Atorvastatin auf die eNOS-Expression und die NO-Synthese untersucht werden. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen einer KHK, Diabetes oder Niereninsuffizienz. Alle Teilnehmer wurden laut Studienprotokoll über die Studie informiert und unterschrieben die Einwilligungserklärung.

Zur Bestimmung der NO-Synthese in vivo erhielten alle Patienten eine Infusion von nichtradioaktivem L-[guanidino-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-L-Arginin), welches durch die NOS zu <sup>15</sup>N-markiertem NO oxidiert und als <sup>15</sup>N-markiertes Nitrat (<sup>15</sup>N-Nitrat) über die Niere ausgeschieden wird. Das <sup>15</sup>N-Nitrat kann mit Hilfe der GC-MS (gas-chromatography-mass-spectrometry) vom natürlich vorkommenden <sup>14</sup>N-Nitrat unterschieden werden [52]. Das Verhältnis von <sup>15</sup>N-Nitrat zu <sup>14</sup>N-Nitrat lässt auf die NOS-Aktivität schließen. Die eNOS-Expression in den Blutplättchen wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers – anti-eNOS - (Fa. BD Biosciences) mittels Western-Blot-Analyse bestimmt.

## 2.7 Statistische Auswertungen

### 2.7.1 Statistische Auswertungen der klinischen Studien

Die klinischen Studien wurden mit *Superior Performing Software Systems* (SPSS) Version 13 ausgewertet. Die Zusammenhänge zweier nominaler Variablen wurden durch einen Chi-Quadrat-Test ermittelt. Als parametrischer Test zum Vergleich der Mittelwerte wurde bei Variablen mit mehr als zwei Gruppen ein ANOVA-Test durchgeführt. Der Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen erfolgte durch einen T-Test.

Für die Vorhersage einer Hypertonie in der MONICA-Studie wurde ein logistisches Regressionsmodell mit den erklärenden Variablen Genotyp, Alter, Geschlecht und BMI gewählt. Für alle Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt.

### 2.7.2 Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Starke Abweichungen von dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Equilibrium; HWE) werden oft durch Datenfehler oder durch die Existenz von Subpopulationen erzeugt. Daher stehen Tests auf das HWE immer am Anfang der Genotyp-Datenanalyse.

Zunächst wurden die Allelhäufigkeiten nach einer einfachen Allelzählmethode geschätzt, d.h. die Anzahl beobachteter Allele wird durch die Gesamtanzahl der Allele  $2N$  geteilt, wobei  $N$  die Anzahl der Personen in der untersuchten Studienpopulation darstellt. Anschließend wurde berechnet, wie die erwarteten Genotypenhäufigkeiten unter Annahme des HWE wären und mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests verglichen.

## 2.8 Laborgeräte

Autoklav	Wesarg, Medizintechnik, Deutschland
Bio-Rad SmartSpec 3000	Bio-Rad-Laboratories GmbH, München
Elektroporationsküvette	BioRad Laboratories, USA
Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Gel-Elektrophorese-System Horizon	Gibco/BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Heidolph Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Heraeus-Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Herasafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Hybridization Bottles HB-OV-BM	Thermo EC, USA
Hybridization mini oven MKII HYBAID	Thermo EC, USA
Incubator shaker C25 classic series	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Phosphor-Imaging-System	Fujifilm Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf
Phospho-Imager FLA 3000	Fujifilm, Deutschland
Power Pac Basic supply	Bio-Rad Laboratories, USA
Pipettierhilfe accu-jet	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Rotina 35 R Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Sartorius Laborwaage CP 225D	Sartorius AG, Göttingen
Sartorius Laborwaage BP 3100S	Sartorius AG, Göttingen

Sephadex G-50 Spin Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland
Sharp R-212 Mikrowelle	Sharp Electronics (Europe) GmbH, Hamburg
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Zellkultur CO <sub>2</sub> - Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen

## 2.9 Substanzen

Aceton	R: 11-36-37-66 S: 9-16-26	Apotheke Roth, Deutschland
Agarose		Invitrogen, Deutschland
Ampicillintrihydrat		Serva, Deutschland
Aqua ad injectabilia		Pharmacia & Upjohn GmbH, Deutschland
Bacto Trypton		Becton Dickinson, USA
Bacto Yeast-Extract		Becton Dickinson, USA
Calciumchlorid	R: 36 S: 22-24	Merck, Deutschland
Chloroform	R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	Merck, Deutschland
Dimethylsulfoxid		Sigma, Deutschland
DMEM		Gibco-BRL, Deutschland
Ethanol	R: 11 S: 7-16	Apotheke Roth, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung 1%	R: 23-68 S: 36/37	Fluka, Deutschland

Methoden und Material

---

Na <sub>2</sub> EDTA	R: 22	Merck, Deutschland
ExpressHyp Hybridisierungspuffer		BD Bioscience, Deutschland
Formaldehyd 37%	R: 23/24/25-34-39/23/24/25-40-43 S: 26-36/37/39-45-51	Merck, Deutschland
Gelatine		Sigma, Deutschland
Geniticinsulfat		Gibco, Deutschland
Glycerol		Merck, Deutschland
Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid		Sigma, Deutschland
Isopropanol	R: 11-36-37 S: 7-16-24/25-26	Merck, Deutschland
Kaliumacetat		Merck, Deutschland
Manganchlorid	R: 22-51/53 S: 61	
Methanol	R: 11-23/24/25-39/23/24/25 S: 7-16-36/37-45	Merck, Deutschland
Natriumchlorid		Merck, Deutschland
Natriumhydroxid	R: 35 S: 26-36/37/39-45	Merck, Deutschland
Rubidiumchlorid		Merck, Deutschland
Salzsäure 25%	R: 34-37 S: 26-36/37/39-45	Merck, Deutschland
Triton X-100	R: 36 S: 24-26	Merck, Deutschland
<sup>32</sup> P-dCTP		Perkin Elmer, Deutschland

### **3 Ziel der Arbeit**

Die Hypothese ist, dass eine DDAH1- bzw. DDAH2-Defizienz zu erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen und in folge dessen zu einer gestörten NO-Synthese und daraus resultierenden pathophysiologischen Veränderungen im Herz-Kreislaufsystem führt.

Ziel der Arbeit ist es deshalb zum einen, ein Tiermodell einer DDAH-Defizienz (DDAH-Knock-out-Mauslinien) zu generieren und zum anderen, die Bedeutung von Polymorphismen der DDAH beim Menschen zu untersuchen.

#### **3.1 DDAH Knock-out-Mauslinien**

Um die Folgen chronisch erhöhter ADMA-Plasmakonzentrationen und die physiologische Bedeutung der ADMA abbauenden Stoffwechselwege aufklären zu können, sollen zwei DDAH-Knock-out-Mauslinien generiert werden. Diese Mauslinien können wesentliche, neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Therapie von Erkrankungen liefern, die mit Mutationen oder Funktionsstörungen der DDAH assoziiert sind.

#### **3.2 DDAH-Polymorphismen in klinischen Studien**

Die Hypothese ist, dass Polymorphismen der DDAH zu erhöhten/erniedrigten ADMA-Plasmakonzentrationen und in folge dessen zu einer gestörten NO-Synthese führen. Es soll die Bedeutung von Polymorphismen der DDAH für die NO-Synthese und die daraus resultierenden Veränderungen im Herz-Kreislaufsystem aufgeklärt werden.

#### **3.3 eNOS-Polymorphismen in klinischen Studien**

Die Hypothese ist, dass die Kombination von erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen und bestimmte Polymorphismen der eNOS mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden sind.

## Ziel der Arbeit

---

Es soll die Interaktion von erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen und eNOS-Polymorphismen bezüglich des kardiovaskulären Risikos untersucht werden.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Generierung der DDAH-Knock-out-Mauslinien

#### 4.1.1 Die DDAH1-Knock-out-Mauslinie

Zur Generierung einer DDAH1-Knock-out-Mauslinie mittels homologer Rekombination wurde ein Targetingvektor (Abbildung 9) mit zwei der genomischen DNA homologen Bereiche kloniert. Da die Größe der DDAH1 im Genom ca. 130 kb umfasst, konnten die homologen Bereiche nur so gewählt werden, dass nicht alle Exons mit Hilfe des Vektors entfernt werden können. Der Targetingvektor wurde so konzipiert, dass die am dichtesten zusammen liegenden Exons 2, 3 und 4 nach homologer Integration des Targetingvektors fehlen (Abbildung 8). Obwohl der Translationsstart im Exon 1 liegt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein voll funktionstüchtiges DDAH1-Protein ohne die Exons 2,3 und 4 gebildet wird, sehr gering.

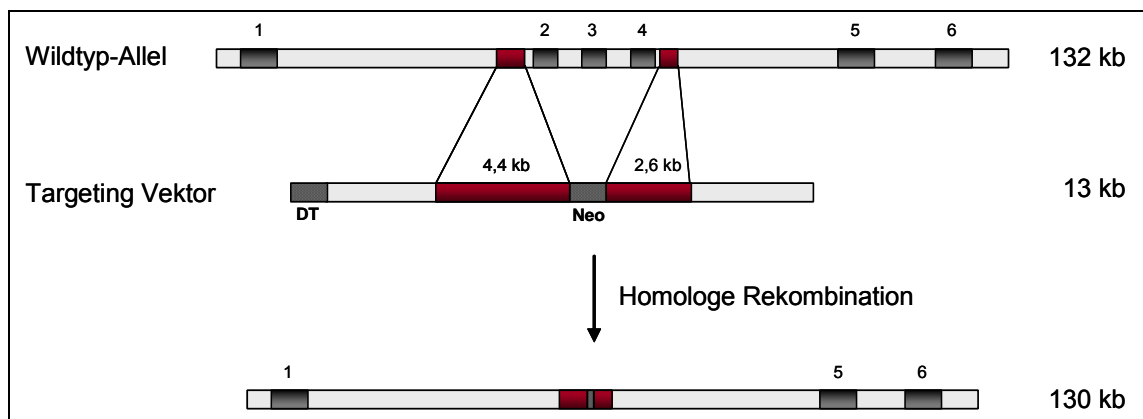


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Prinzips der Homologen Rekombination; der 5'-homologe Bereich hat eine Größe von 4,4 kb und der 3'-homologe Bereich von 2,6 kb. DT= Diphtherie-Toxin-Kassette (wird nicht mit ins Genom integriert); Neo: Neomycin-Kassette

Die beiden homologen Bereiche wurden mittels PCR aus genomischer, muriner DNA amplifiziert und zum Einfügen weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen in den Hilfsvektor pGEM-Teasy ligiert. Beide homologen Bereiche wurden im pGEM-Teasy-Vektor mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Der 5'-homologe Bereich konnte direkt durch die Schnittstellen EcoRI aus dem pGEM-Teasy-Vektor in den Targetingvektor kloniert werden. Für den 3'-homologen Bereich wurden Primer mit XhoI-Schnittstellen synthetisiert, die dann nach einer PCR die XhoI-Schnittstellen an dem 3'-homologen Bereich bilden. Über die neu gebildeten XhoI-Schnittstellen konnte der 3'-homologe Bereich in den Targetingvektor ligiert werden (Abbildung 9).

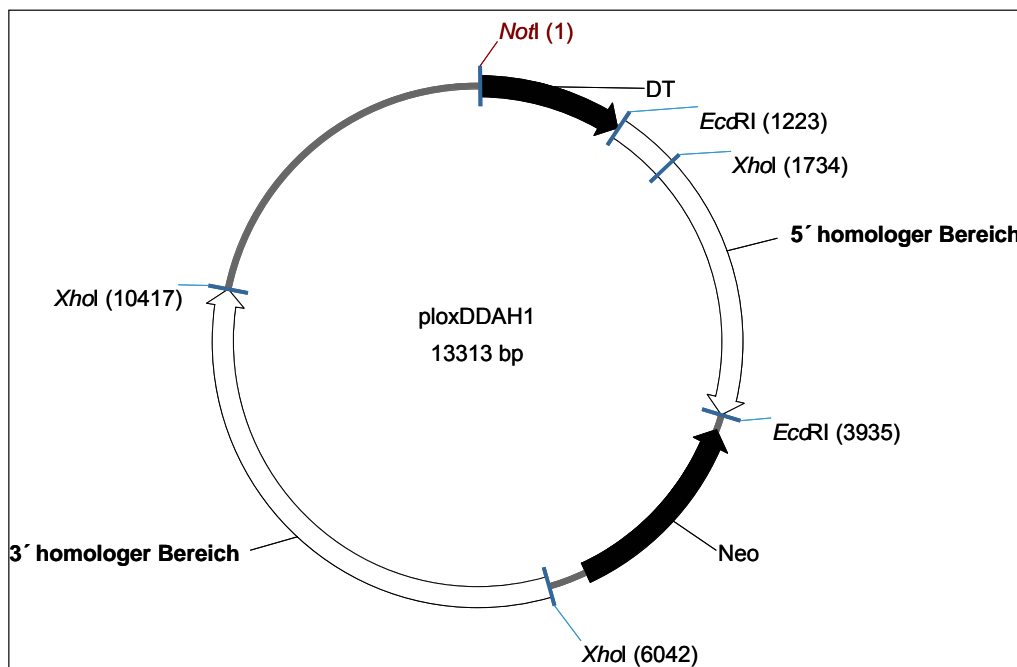


Abbildung 9: Schematische Darstellung des ploxDDAH1 Targetingvektors; Neo: Neomycinphosphotransferase-Gen; DT: Diphtherie-Toxin-A-Gen

Die Richtigkeit der homologen Bereiche und die Orientierung dieser Bereiche im Targetingvektor wurden mittels Restriktionsverdau (Abbildung 10) und Sequenzierung geprüft.

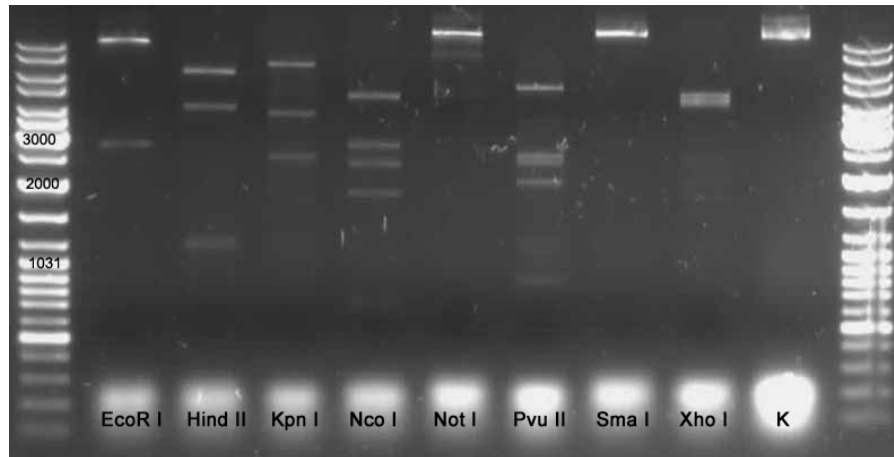


Abbildung 10: Kontroll-Restriktionsverdau des ploxDDAH1 Targetingvektors; alle Fragmentgrößen entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen

Der Targetingvektor kann mit dem Restriktionsenzym NotI linearisiert werden und steht für die Elektroporation in embryonale Stammzellen bereit.

#### 4.1.2 Die DDAH2-Knock-out-Mauslinie

Zur Generierung der DDAH2-Knock-out-Mauslinie stand ein im Arbeitskreis bereits klonierter Targetingvektor für einen konditionalen DDAH2-Knock-out zur Verfügung (Abbildung 11). Der Vektor enthält zwei der genomischen DNA homologe Bereiche, die die homologe Integration im Genom gewährleisten. Der homologe 5'-Bereich umfasst das gesamte DDAH2-Gen. Der homologe 3'-Bereich liegt direkt hinter dem DDAH2-Gen. Da die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination im Vergleich zur zufälligen Rekombination sehr gering ist, wurde ein positiver Selektionsmarker für das bakterielle Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gen (Neo) unter Kontrolle des PGK-1-Promoters eingefügt, welcher für G418 selektioniert. Als zusätzlicher negativer Selektionsmarker wurde eine Diphtherie-Toxin-A Kasette eingefügt. Der Targetingvektor enthält drei loxP-Sequenzen von denen zwei die Neo-Kasette flankieren und eine im homologen 5'-Bereich liegt.

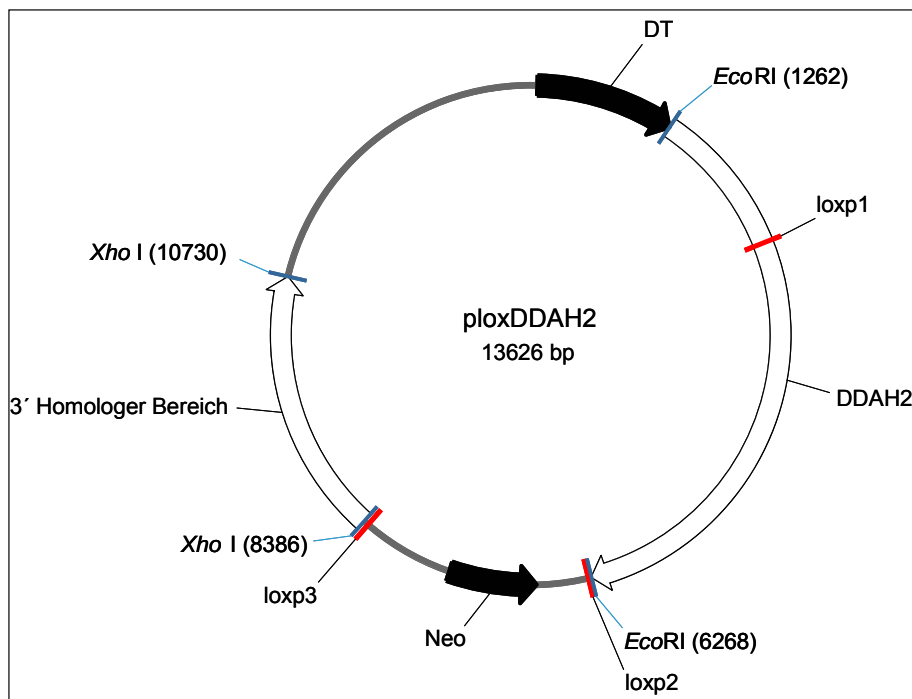


Abbildung 11: Targetingvektor zur Generierung einer konditionalen DDAH2 Knock-out Mauslinie. Neo: Neomycin-Resistenz-Gen; DT: Diphtherie-Toxin-A; loxP= Cre-spezifische Erkennungssequenzen

Die loxP-Sequenzen werden spezifisch von der Cre-Rekombinase erkannt. Dieses ermöglicht es, dass die Bereiche, die zwischen den loxP-Sequenzen liegen, nach der Integration durch die Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt werden können. Dieses hat bei einer möglichen embryonalen Letalität des totalen DDAH2-Knock-outs den Vorteil, dass die konditionale DDAH2-Knock-out-Maus durch Verpaarung mit gewebespezifisch Cre-exprimierenden Mäusen gewebespezifisch ausgeschaltet werden kann.

Die loxP-Sequenzen wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin geprüft (Abbildung 12).

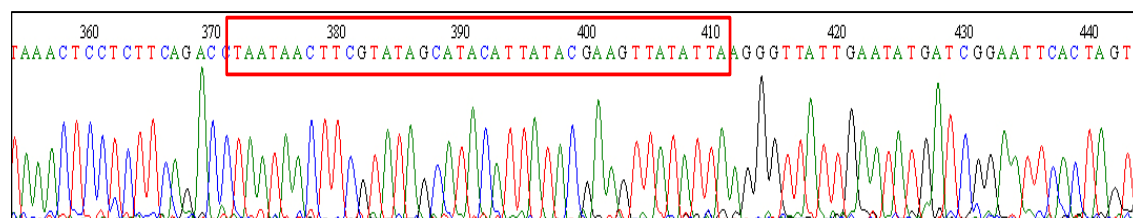


Abbildung 12: Ausschnitt der Sequenzierung zur Überprüfung der loxP-Sequenzen; die 34 bp der loxP-Sequenz sind durch den roten Kasten markiert.

Der DDAH2-Targetingvektor wurde mit Hilfe der Serviceabteilung Transgene Tiere des Zentrums für Molekulare Neurobiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in embryonale Stammzellen des Mausstammes 129/SvP elektroporiert. Sieben Tage nach der Elektroporation und Selektion mit G418 wurden insgesamt 240 mES-Zell-Klone isoliert.

Die Klone wurden mittels Southern-Blot-Analyse genotypisiert. Hierfür wurde eine Sonde der Fragmentgröße von 613 bp im 5'-Bereich vor dem DDAH2-Gen durch eine PCR amplifiziert. Die genomische DNA der mES-Zellen wurde mit dem Restriktionsenzym NcoI (Fa. Fermentas) geschnitten. Mit der loxp1-Sequenz wurde zusätzlich zur Genotypisierung eine NcoI-Schnittstelle in den Targetingvektor eingefügt. Als Wildtypkontrolle wurde genomische mDNA der Linie R1 [53] verwendet. Der Wildtyp zeigte nach NcoI Restriktionsverdau ein Fragment von ungefähr 6000 bp.

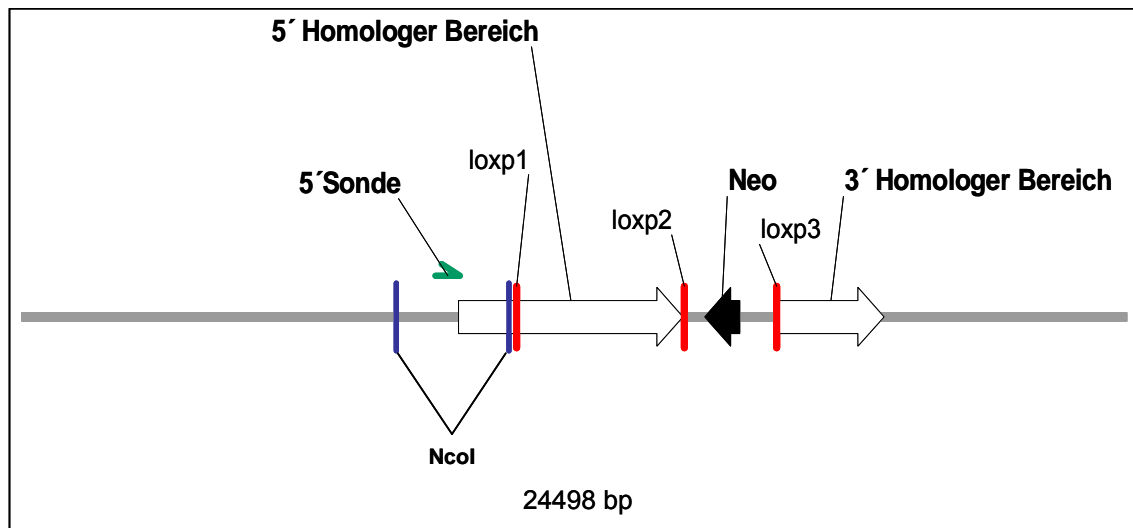


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Schnittstellen und der Lage der 5'-Sonde für die Southern-Blot-Analyse; blaue Balken: Restriktionsschnittstellen für das NcoI Restriktionsenzym; nach Restriktionsverdau entsteht ein kleineres Fragment, welches durch die 5'Sonde detektiert werden kann.

Die positiven mES-Zell-Klone A10 und E10 wurden in Blastozysten der Mauslinie C57Bl/6 injiziert und in den Uterus einer scheinträchtigen Maus (Amme) transferiert. Insgesamt wurden neun chimäre männliche Nachkommen ausgetragen. Drei der männlichen Nachkommen mit dem höchsten Grad an Chimärität wurden mit der Wildtyp-Mauslinie C57BL/6 verpaart und drei weitere mit der endothelsensitiveren Wildtyp-Mauslinie FvB.

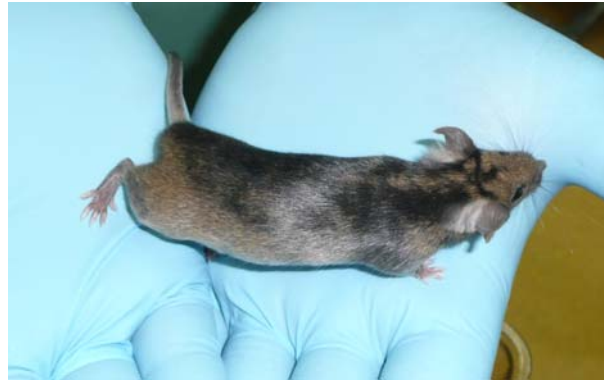


Abbildung 14: Chimäre mDDAH2-flox Maus (F0-Generation); die gescheckte Fellfärbung lässt den Grad der Chimärität optisch abschätzen. Je mehr braune Fellfarbe, desto höher ist der Chimäritätsgrad. Die Tiere mit der höchsten Chimärität wurden für die Verpaarung eingesetzt.

Die konditional heterozygoten Nachkommen wurden dann zum einen direkt mit den Cre-exprimierenden Mäusen - den so genannten Deletern – verpaart, um einen heterozygoten Knock-out zu erhalten. Das Verpaarungsschema ist in Abbildung 15 dargestellt.

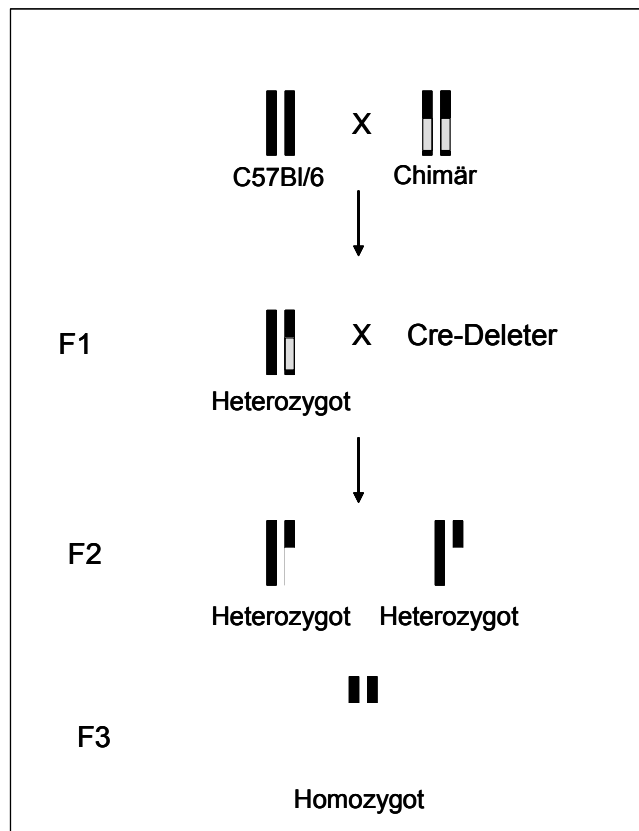


Abbildung 15: Verpaarungsschema zur Generierung heterozygoter und homozygoter DDAH2-Knock-out-Mäuse

## 4.2 Charakterisierung der DDAH-Knock-out-Mauslinien

### 4.2.1 Die DDAH2-Knock-out-Mauslinie

Zur Genotypisierung wurde eine PCR entwickelt. Hierfür wurden vier verschiedene Primer synthetisiert. Um zwischen Wildtyp und integriertem Vektor unterscheiden zu können, wurden zwei Primer über den Integrationsort hinaus und zwei Primer in das Targeting-Konstrukt (Abbildung 16) gelegt. Die Fragmentgröße für den Wildtyp betrug 601 bp und für das Targeting-Konstrukt 1000 bp.

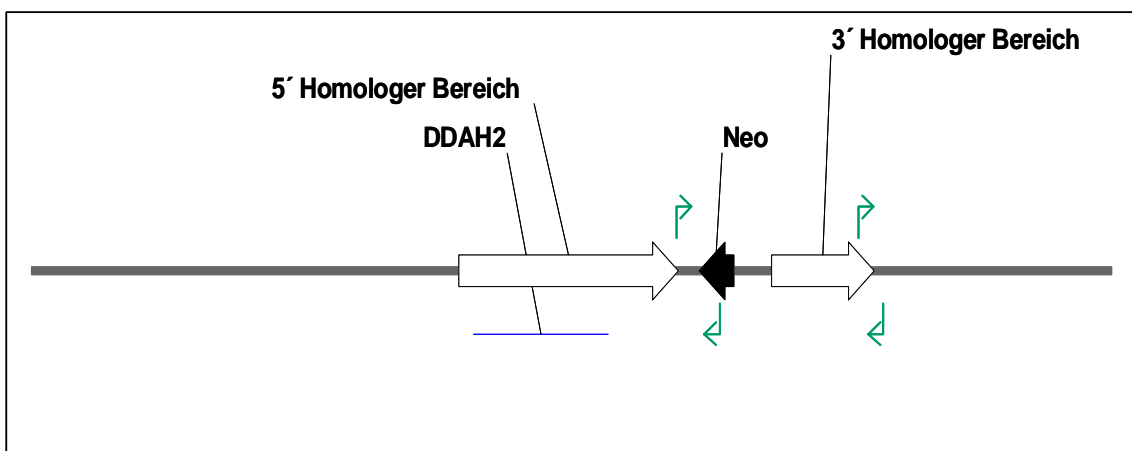


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Prinzips zur Genotypisierung mit Hilfe einer PCR; ↵: Primer; die Primer in der Neo-Kassette binden nur, wenn der Targetingvektor integriert hat.

An Hand dieser PCR kann jedoch nicht zwischen homologer und zufälliger Integration unterschieden werden. Aus diesem Grund ist eine zusätzliche Genotypisierung mittels Southern-Blot-Analyse unerlässlich.

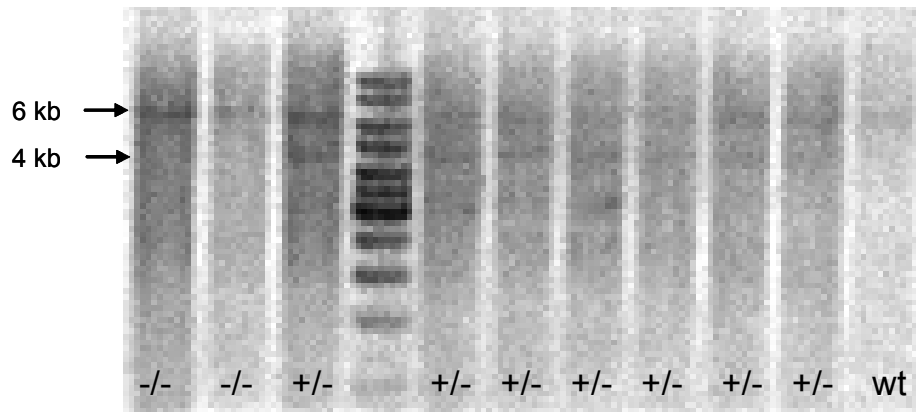


Abbildung 17:  $^{32}\text{P}$ -hybridisierter Blot der F1-Generation des konditionalen DDAH2-Knock-outs; -/-: Wildtyp; +/-: Heterozygot; wt: Wildtyp Kontroll-DNA; der Wildtyp liefert ein Fragment mit einer Größe von 6000 Basenpaaren und das heterozygote Allel ein entsprechend kleineres Fragment.

Abbildung 17 zeigt den mit  $^{32}\text{P}$ -hybridisierten *Southern Blot* zur Genotypisierung der F1-Generation der konditionalen DDAH2-Knock-out-Maus. Die aus den Mausschwanzspitzen gewonnene genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym NcoI (Fa. Fermentas) geschnitten und im alkalischen Milieu unter Druck auf eine Polyamidmembran übertragen. Die Membran wurde mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde hybridisiert. Das Fragment der Größe von 6 kb identifiziert den Wildtyp und das kleinere Fragment die Integration des konditionalen Targetingvektors.



### 4.3 DDAH Polymorphismen in klinischen Studien

#### 4.3.1 DDAH1-Polymorphismus Studie

Der DDAH1 Thr87Met-Polymorphismus ist, mit einer Prävalenz für das heterozygote Allel von nur ca. 0,01% in der Kaukasischen Bevölkerung sehr selten zu finden. Auf Grund der niedrigen Prävalenz wurde für die Untersuchung der möglichen Effekte dieses Polymorphismus ein Fall-Kontroll-Design gewählt und Träger des Polymorphismus und Kontrollen aus mehreren Studien gepoolt. Zu den Patienten, die das heterozygote Allel trugen, wurden jeweils zwei Kontrollen aus demselben Studienkollektiv, die sich nicht in Bezug auf das Alter, BMI, Kreatininkonzentrationen und den Vorerkrankungen unterschieden, zum Vergleich herangezogen. Ziel war es, den Effekt des Thr87Met-Polymorphismus auf die ADMA-Plasmakonzentrationen zu untersuchen. Die demographischen und klinischen Ausgangscharakteristika sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Demographische und klinische Ausgangscharakteristika der 18 Patienten aus der DDAH1-Fall-Kontroll-Studie; als Fall wird das Vorliegen eines heterozygoten Allels des Thr87Met-Polymorphismus definiert.

	Fälle	Kontrollen	p
Patienten, n	6	12	
Männer, n (%)	3 (50)	6 (50)	
Alter [Jahre] *	71,5±8,6	69,5±9,3	0,67
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	25,7±3,6	25,3±3,0	0,81
Kreatinin [µmol/L] *	90,3±17,7	84,8±15,9	0,51
Hypertonie, n (%)	5 (83,3)	12 (100)	0,33
Diabetes, n (%)	0 (0)	1 (8,3)	0,47
L-Arginin [µmol/L] *	91,5±17,6	90,5±35,1	0,95
ADMA [µmol/L] *	0,55±0,22	0,59±0,19	0,68
SDMA [µmol/L] *	0,68±0,13	0,56±0,15	0,11
SDMA/ADMA Quotient *	0,79±0,22	1,06±0,22	0,03

\* Mittelwert±SD

Ein direkter, signifikanter Zusammenhang zwischen dem Thr87Met-Polymorphismus und den ADMA-Plasmakonzentrationen konnte nicht gezeigt werden. Fälle und

Kontrollen unterschieden sich jedoch signifikant in dem ADMA/SDMA-Quotient ( $p=0,03$ ). SDMA wird im Gegensatz zu ADMA nicht durch die DDAH abgebaut.

#### 4.3.2 iP4 Studie

Von 107 der ursprünglich 112 Patienten mit pulmonaler Hypertonie aus der iP4-Studie wurden die DDAH2-Promoterpolymorphismen -1415 G/A, -1151 C/A und -449 G/C bestimmt. Zur Auswertung der *Allelic-Discrimination-Plots* wurde die Software SDS 2.2 (Fa. Applied Biosystems) mit der aktivierten *Auto-Caller-Funktion* (CI: 95%) verwendet. Der *Allelic-Discrimination-Plot* ist in Abbildung 19 beispielhaft für den -449 G/C-Polymorphismus gezeigt. Die Ausgangscharakteristika der Patienten sind in Tabelle 3 dargestellt. Aus dem Blutplasma wurden die L-Arginin-, ADMA- und SDMA-Plasmakonzentrationen mittels einer im Arbeitskreis etablierten LC-MS/MS-Methode bestimmt [54]. Die übrigen Laborparameter (Kreatinin, Cholesterin etc.) wurden in einem klinischen Routinelabor im Studienzentrum vor Ort bestimmt.

Da sich die Polymorphismen in der Promoterregion der DDAH2 befinden, wird erwartet, dass durch eine Mutation in diesem Bereich die Expression und damit die gewebespezifische Aktivität des Enzyms beeinflusst wird. Eine verminderte oder erhöhte Enzymaktivität könnte somit zu erhöhten bzw. verminderten ADMA-Plasmakonzentrationen führen. Aufgrund des wahrscheinlichen Kausalzusammenhangs zwischen ADMA und kardiovaskulären Ereignissen wurde ein auffälliger Phänotyp der Patienten erwartet. Da SDMA nicht durch die DDAH abgebaut wird, wurden keine Veränderungen in den SDMA-Plasmakonzentrationen erwartet.

Die gefundenen DDAH2-Genotyphäufigkeiten in der iP4 Studie wichen nicht von der Verteilung im HWE ab und entsprachen den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten des Hap Map-Projektes (Abbildung 18).

## Ergebnisse

		-1415 G/A			-1151 C/A			-449 G/C		
Studie	n	rs2272592			rs805304			rs805305		
		GG	GA	AA	CC	CA	AA	GG	CG	CC
iP4	107	0,757	0,243	0,000	0,107	0,447	0,447	0,462	0,433	0,106
HapMap	120	0,500	0,417	0,083	0,083	0,467	0,450	0,450	0,467	0,083

Abbildung 18: Genotypverteilung der DDAH2-Promoterpolymorphismen in der iP4-Studie im Vergleich zu den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten des Hap Map-Projektes; die Verteilung zeigt keine Abweichung vom HWE:  $p(-1415\text{ G/A})=0,15$ ,  $p(-1151\text{ C/A})=0,78$ ,  $p(-449\text{ G/C})=0,89$

Für den Polymorphismus -1415 G/A ergaben sich in dieser Studie weder mit den ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Plasmakonzentrationen noch mit funktionellen Charakteristika signifikante Korrelationen.

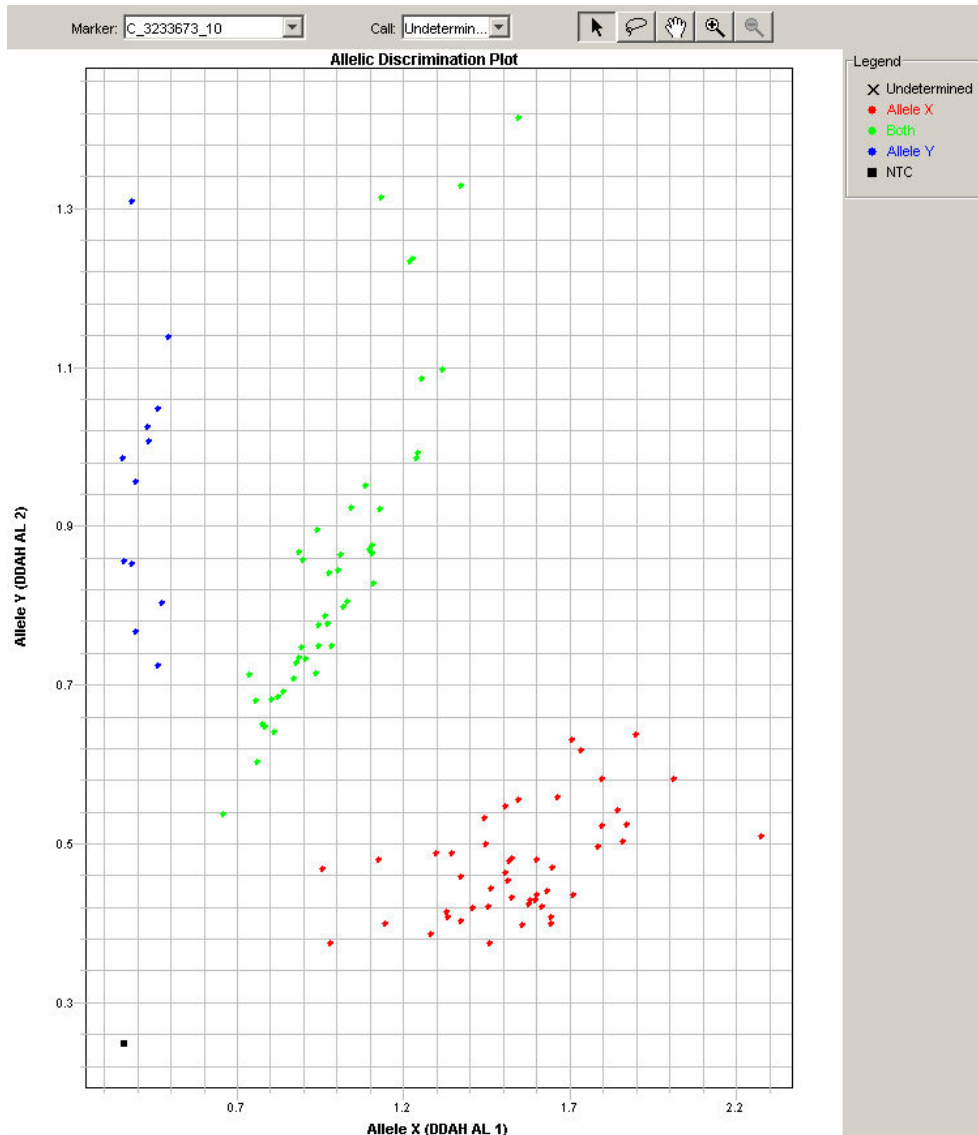


Abbildung 19: Allelic-Discrimination-Plot aus der iP4-Studie beispielhaft für den rs805305 Polymorphismus. Allel X (rote Punkte): GG; Allel Y (blaue Punkte): CC; Allel XY (grüne Punkte): CG. Ausgewertet durch SDS 2.2 Auto-Caller-Funktion 95% CI

## Ergebnisse

---

Tabelle 3: Demographische und klinische Ausgangscharakteristika bei 112 Patienten mit pulmonaler Hypertonie aus der iP4-Studie

---

Patienten, n	112
Männer, n (%)	53 (47,3)
Frauen, n (%)	59 (52,7)
Alter [Jahre] *	53±17,1
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	25,8±5,8
Kreatinin [µmol/L] *	67,9±52,4
Kreatinin-Clearance [mL/min/m <sup>2</sup> ] *	119,6±54,0
Hypertonie, n (%) behandelt/ unbehandelt	20 (26,8)
KHK, n (%)	18 (16,1)
Diabetes Typ 2, n (%)	20 (17,9)
Medikation	
Betablocker, n (%)	10 (9)
Statine, n (%)	18 (16)
Ca-Blocker, n (%)	16 (14)
ACE-Inhibitor n (%)	9 (8)
Diuretika, n (%)	68 (61)
L-Arginin [µmol/L] *	51,4±23,7
ADMA [µmol/L] *	0,68±0,19
SDMA [µmol/L] *	0,51±0,21

---

\* Mittelwert±SD

Die demographischen und klinischen Merkmale der Patienten stratifiziert nach den einzelnen DDAH2-Genotypen sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt. Es konnten keine Unterschiede innerhalb der DDAH2-Genotypen in Bezug auf Alter und BMI gezeigt werden.

Tabelle 4: Alter und BMI stratifiziert nach -1151 C/A-Genotypen und die Genotypenverteilung in einzelnen Subgruppen der iP4-Studienpopulation

Variable	-1151 C/A-Genotyp			p
	CC	CA	AA	
n	11	46	46	
Alter, [Jahre] *	48,0±17,4	53,2±17,7	55,6±14,5	0,37
BMI, [kg/m <sup>2</sup> ] *	25.2±6,3	25,5±5,8	27,1±5,6	0,34
Männer, n (%)	3 (6,1)	20 (40,8)	26 (53,1)	0,17
Frauen, n (%)	8 (14,8)	26 (48,1)	20 (37,1)	0,17
Hypertonie, n (%)	2 (6,9)	12 (41,4)	15 (51,7)	0,58
Diabetes, n (%)	3 (15)	7 (35)	10 (50)	0,57

\* Mittelwert±SD

Tabelle 5: Alter und BMI stratifiziert nach -449 G/C-Genotypen und die Genotypenverteilung in einzelnen Subgruppen der iP4-Studienpopulation

Variable	-449 G/C-Genotyp			p
	GG	GC	CC	
n	48	45	11	
Age, [Jahre] *	56,0±14,5	53,6±18,4	45,6±15,6	0,17
BMI, [kg/m <sup>2</sup> ] *	26,9±5,9	25,7±5,9	25,6±6,3	0,57
Männer, n (%)	27 (56,3)	19 (39,6)	2 (4,1)	0,14
Frauen, n (%)	21 (37,5)	26 (46,4)	9 (16,1)	0,14
Hypertonie, n (%)	15 (51,7)	12 (41,4)	2 (6,9)	0,46
Diabetes, n (%)	10 (52,6)	7 (36,8)	2 (10,5)	0,92

\* Mittelwert±SD

#### **4.3.2.1 Effekt der -1151 C/A und -449 G/C Polymorphismen auf die ADMA- und SDMA-Plasmakonzentrationen**

Es konnten in Bezug auf die ADMA-Plasmakonzentrationen signifikante Unterschiede zwischen den Polymorphismen -1151 C/A und -449 G/C gezeigt werden. Die ADMA-Ausgangskonzentration lag im Mittelwert bei 0,68 ( $\pm 0,19$ )  $\mu\text{mol/L}$ . Der -1151CC-Genotyp war mit 11 Patienten der seltenste Genotyp und zeigte die signifikant niedrigsten ADMA-Plasmakonzentrationen ( $p=0,049$ ). Diese Patienten wiesen ADMA-Plasmakonzentrationen von 0,56 ( $\pm 0,14$ )  $\mu\text{mol/L}$  auf, während Patienten, die den -1151CA-Genotyp trugen, ADMA-Plasmakonzentrationen von 0,71 ( $\pm 0,20$ )  $\mu\text{mol/L}$  und Träger des -1151AA-Genotyps 0,70 ( $\pm 0,18$ )  $\mu\text{mol/L}$  zeigten (Abbildung 20).

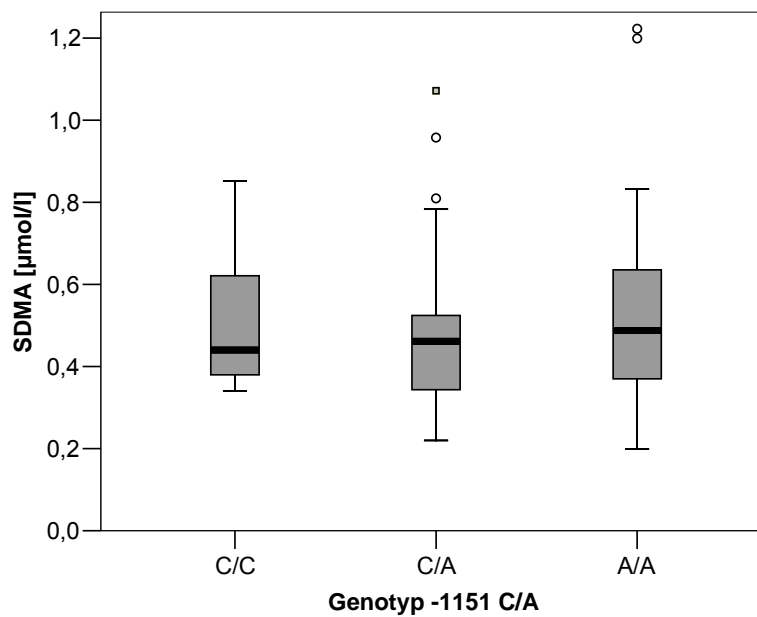
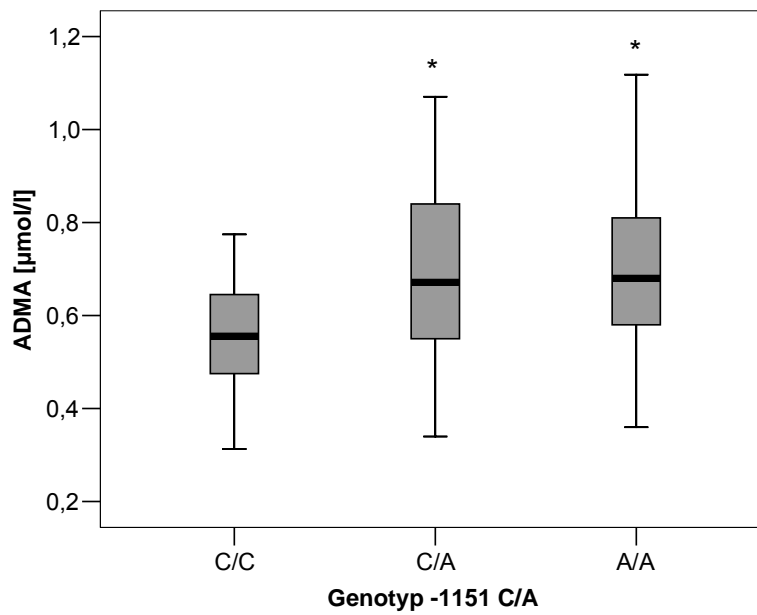


Abbildung 20: -1151 C/A Polymorphismus und ADMA- bzw. SDMA-Plasmakonzentration. Träger des -1151CC-Genotyps hatten niedrigere ADMA-Plasmakonzentrationen als Träger des -1151CA- und -1151AA-Genotyps (\* $p=0,049$ ). Die verschiedenen Genotypen zeigten keine Unterschiede in den SDMA-Plasmakonzentrationen



Für den -449 G/C Polymorphismus zeigte der -449CC-Genotyp mit 11 Patienten die im Mittel signifikant niedrigsten ADMA-Plasmakonzentrationen ( $p=0,049$ ). Im Mittel lagen bei diesen Patienten die ADMA-Plasmakonzentrationen bei  $0,55 (\pm 0,14) \mu\text{mol/L}$ .

Den -449GC-Genotyp wiesen 45 Patienten auf, bei denen ADMA-Plasmakonzentrationen von  $0,70 (\pm 0,19) \mu\text{mol/L}$  gemessen wurden. Der -449GG-Genotyp mit 48 Patienten zeigte ADMA-Plasmakonzentrationen von  $0,70 (\pm 0,18) \mu\text{mol/L}$  (Abbildung 21).

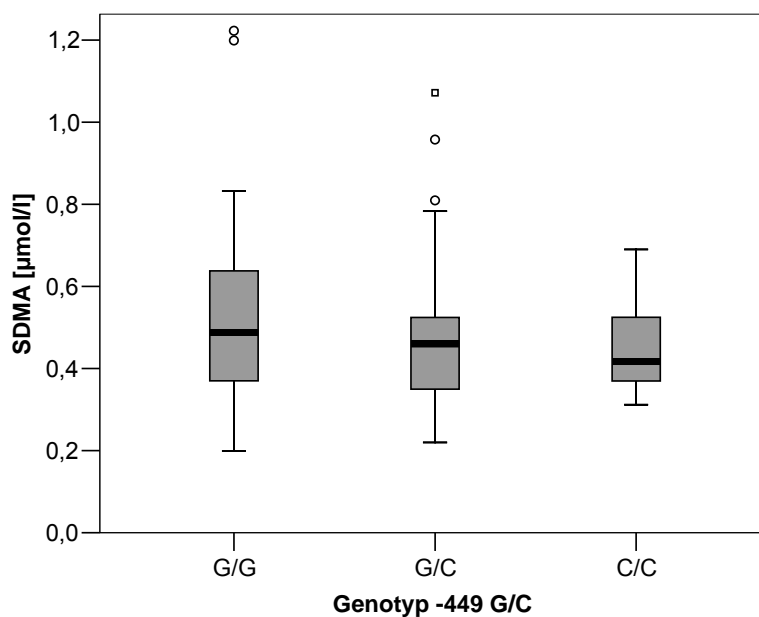
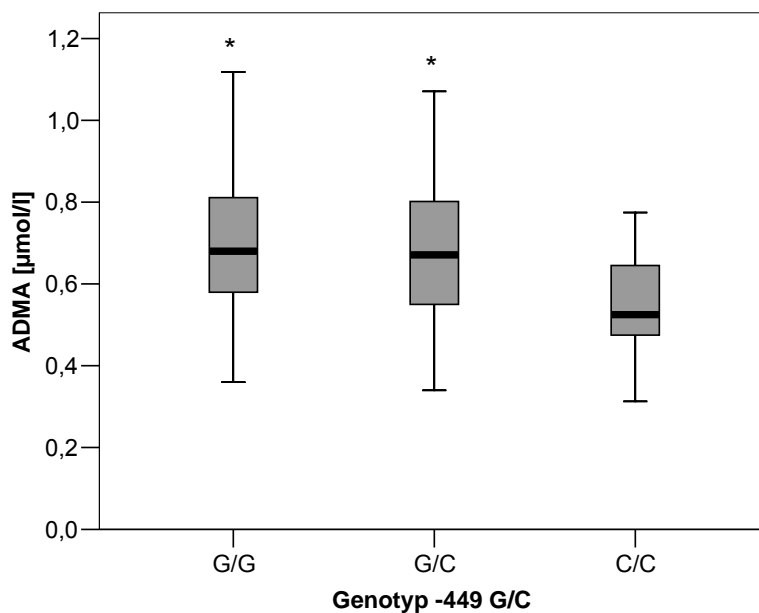


Abbildung 21: : -449 G/C-Polymorphismus und ADMA- bzw. SDMA-Plasmakonzentration. Träger des -449CC-Genotyps hatten niedrigere ADMA-Plasmakonzentrationen als Träger des -449GC- und -449GG-Genotyps (\*p=0,049). Die verschiedenen Genotypen zeigten keine Unterschiede in den SDMA-Plasmakonzentrationen

Für die SDMA- und L-Arginin-Plasmakonzentrationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit zu den DDAH2-Polymorphismen.

#### **4.3.2.2 Assoziation der -1151 C/A- und -449 G/C-Polymorphismen und der ADMA-Plasmakonzentrationen mit der Gehstrecke im 6MGT**

In Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die pulmonalen und vaskulären Charakteristika stratifiziert nach -1151 C/A- und -449 G/C-Genotypen gezeigt. Die verschiedenen Genotypen unterschieden sich nicht in Bezug auf Alter, BMI und Kreatininkonzentration im Plasma.

Tabelle 6: Pulmonale und vaskuläre Charakteristika für den -1151 C/A-Polymorphismus unter Annahme eines dominanten oder rezessiven Effekts des -1151C-Allels

Variable	-1151 C/A-Genotyp			p <sup>*</sup>	p <sup>†</sup>
	CC	CA	AA		
n	11	45	46		
6-min Gehtest [m] *	297±100	349±121	352±120	0,59	0,17
6-min Gehtest [% des Sollwertes] *	50,2±14,7	61,5±18,0	64,1±20,0	0,21	<b>0,05</b>
syst. Blutdruck [mmHg] *	111,8±16,0	118,5±18,4	123,9±19,9	0,08	0,13
diast. Blutdruck [mmHg] *	68,5±12,3	67,0±12,1	74,5±12,3	0,003	0,54
Kreatinin [µmol/L] *	71,3±28,0	64,0±23,0	60,9±23,0	0,33	0,23
Kreatinin-Clearance [mL/min/m <sup>2</sup> ] *	102,7±41,1	120,2±62,4	129,5±46,6	0,24	0,20
Alter [Jahre] *	48,0±17,4	53,2±17,7	55,6±14,5	0,30	0,22
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	25,2±6,3	25,5±5,8	27,1±5,6	0,15	0,54
L-Arginin [µmol/L] *	47,7±10,8	53,8±25,8	50,7±24,8	0,68	0,56
ADMA [µmol/L] *	0,56±0,14	0,71±0,20	0,70±0,18	0,55	<b>0,01</b>
SDMA [µmol/L] *	0,50±0,17	0,50±0,18	0,53±0,21	0,28	0,98
L-Arginin/ADMA	91,6±33,6	80,3±37,9	75,3±36,3	0,33	0,24

\* Mittelwert±SD

\* 2-seitiger deskriptiver p-Wert, T-test für dominantes Model (CC,CA vs AA)

† 2-seitiger deskriptiver p-Wert, T-test für recessives Model (CC vs CA,AA)

## Ergebnisse

Tabelle 7: Pulmonale und vaskuläre Charakteristika für den -449 G/C-Polymorphismus unter Annahme eines dominanten oder rezessiven Effekts des -449G-Allels

Variable	-449 G/C-Genotyp			p <sup>*</sup>	p <sup>†</sup>
	GG	GC	CC		
n	48	45	11		
6-min Gehtest [m]*	354±119	337±115	310±104	0,35	0,33
6-min Gehtest [% des Sollwertes] *	64,8±19,8	60,6±17,8	51,7±15,6	0,08	0,12
syst. Blutdruck [mmHg] *	124,4±20,2	117,5±17,5	110,9±16,4	0,09	0,27
diast. Blutdruck [mmHg] *	74,8±12,8	66,0±11,0	67,6±12,5	0,47	<b>&lt;0,001</b>
Kreatinin [µmol/L] *	62,5±22,8	62,0±21,0	71,5±28,0	0,21	0,76
Kreatinin-Clearance [mL/min/m <sup>2</sup> ] *	126,1±48,7	119,9±61,4	105,4±40,4	0,31	0,40
Alter [Jahre] *	56,0±14,5	53,6±18,4	45,6±15,6	0,08	0,23
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	26,9±5,7	25,7±5,9	25,6±6,3	0,70	0,29
L-Arginin [µmol/L] *	50,6±24,3	52,2±26,1	44,1±11,5	0,35	1,00
ADMA [µmol/L] *	0,70±0,18	0,70±0,19	0,55±0,14	0,014	0,50
SDMA [µmol/L] *	0,53±0,21	0,48±0,18	0,46±0,13	0,42	0,16
L-Arginin/ADMA	75,7±36,3	77,9±36,9	85,4±35,1	0,46	0,61

\* Mittelwert±SD

\* 2-seitiger deskriptiver p-Wert, T-test für dominantes Model (GG,GC vs CC)

† 2-seitiger deskriptiver p-Wert, T-test für rezessives Model (GG vs GC,CC)

Zur Bestimmung des kardiovaskulären Phänotyps wurden das Vorliegen der Diagnose Hypertonie, der systolische und diastolische Blutdruck sowie der 6-min-Gehtest (6MGT) in die Berechnungen einbezogen. Bei kardiologischen Erkrankungen hilft der 6MGT, die Leistungsfähigkeit von Patienten mit Herzinsuffizienz bei täglichen Belastungen zu beschreiben. Da der 6MGT gut mit der Ergometrie und der Spiroergometrie korreliert, spielt dieser Test eine wichtige Rolle zur Beurteilung des Schweregrades einer Herzerkrankung.

Die Gehstrecke wurde in dieser Studie als vom individuellen Patienten zurückgelegte Gehstrecke in % der berechneten, altersüblichen Gehstrecke angegeben. Eine Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der zurückgelegten Gehstrecke in % und den ADMA-Plasmakonzentrationen ( $p=0,011$ ) sowie den SDMA-Plasmakonzentrationen ( $p=0,026$ ). Teilt man die ADMA-Plasmakonzentrationen in Quartile ein, wird deutlich, dass Patienten mit ADMA-Plasmakonzentrationen aus den unteren Quartilen einen höheren prozentualen Anteil der theoretischen Gehstrecke zurücklegten (Abbildung 22).

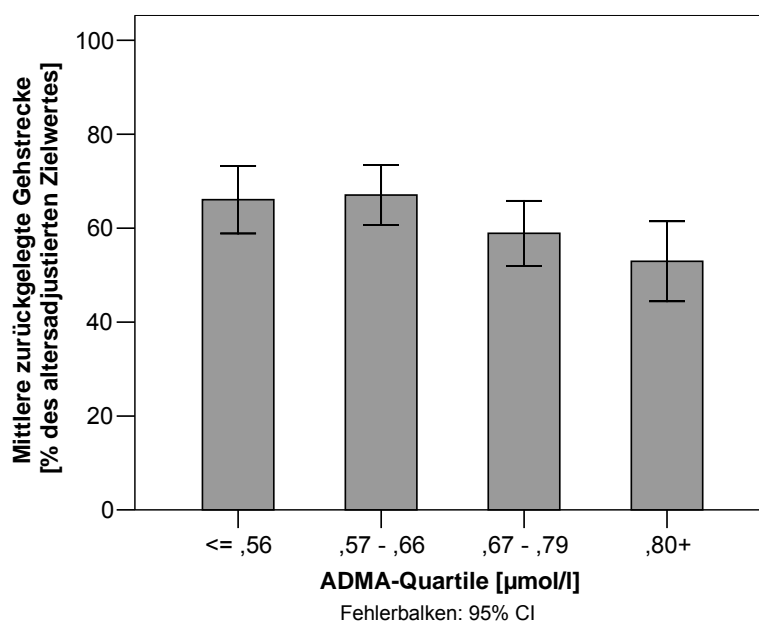


Abbildung 22: Zusammenhang zwischen ADMA-Quartilen und der zurückgelegten Gehstrecke in % der altersüblichen berechneten Gehstrecke ( $p=0,034$ )

Unter der Annahme eines rezessiven Effektes des -1151C-Allels, war eine signifikante Korrelation zwischen der zurückgelegten Gehstrecke und dem -1151A-Allel nachzuweisen. Träger eines heterozygoten oder homozygoten -1151A-Allels erreichten

einen höheren Prozentanteil der altersüblichen berechneten Gehstrecke als Träger eines homozygoten -1151C-Allels (Tabelle 6).

Für den -449 G/C-Polymorphismus ergaben weder die Annahme eines dominanten Effekts des -449G-Allels noch die Annahme eines rezessiven Effekts des -449G-Allels eine signifikante Veränderung in der zurückgelegten Gehstrecke (Tabelle 7).

#### **4.3.2.3 Assoziation der -1151 C/A- und -449 G/C-Polymorphismen mit dem arteriellen Blutdruck**

Patienten mit dem häufigeren -1151AA-Genotyp hatten einen mittleren diastolischen Blutdruck von 74,5 mmHg und unterschieden sich damit signifikant von den Patienten mit dem -1151CA-Genotyp, die einen niedrigeren diastolischen Blutdruck von 67,0 mmHg ( $p=0,011$ ) aufwiesen. Dieser Zusammenhang zwischen dem -1151A-Allel und einem höheren diastolischen Blutdruck wurde unter Annahme eines rezessiven Effekt des -1151A-Allels noch deutlicher ( $p=0,003$ ) (Tabelle 6). Für den systolischen Blutdruck ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 23).

Für den -449 G/C-Polymorphismus zeigten Patienten mit dem häufigeren -449GG-Genotyp den im Mittel signifikant höheren diastolischen Blutdruck von 74,8 ( $\pm 12,8$ ) mmHg im Vergleich zu Patienten mit dem heterozygoten -449GC-Genotyp die einen mittleren diastolischen Blutdruck von 66,0 ( $\pm 11,0$ ) mmHg ( $p=0,002$ ) aufwiesen. Dieser Zusammenhang zwischen dem -449G-Allel und höheren diastolischen Blutdruckwerten wurde unter Annahme eines rezessiven Effekts des -449G-Allels noch deutlicher ( $p<0,001$ ). Bei diesem Polymorphismus zeigte auch der systolische Blutdruck im Trend ( $p=0,016$ ) einen signifikanten Zusammenhang. (Abbildung 23).

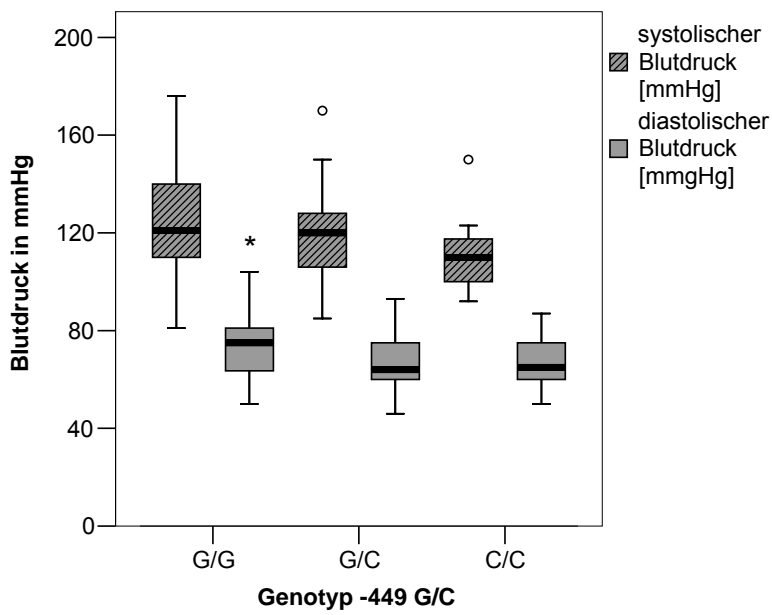
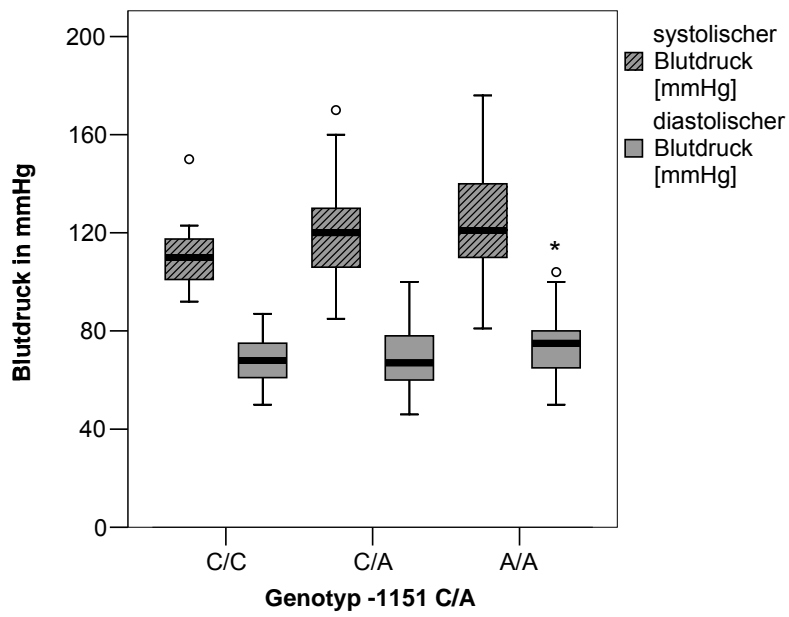


Abbildung 23: Assoziation der -1151 C/A- und -449 G/C-Polymorphismen mit dem systolischen und diastolischen Blutdruck. \* $p < 0,05$



#### 4.3.2.4 Kombiniertes Effekt des -1151A- und -449G-Allels auf den arteriellen Blutdruck

Die DDAH2-Polymorphismen -1151 C/A und -449 G/C befinden sich im Kopplungsungleichgewicht. Haplotypenanalysen identifizierten im Kopplungsungleichgewicht drei Haplotypen H1 [CG], H2 [CC] und H3 [AG] von denen der Haplotyp H3, d.h. das Auftreten des homozygoten -1151A- und des homozygoten -449G-Allels, mit 46,5% der Häufigste war. Für H3 konnte ein Zusammenhang mit dem arteriellen Blutdruck gezeigt werden. Träger dieses Haplotyps zeigten den im Mittel höheren, arteriellen Blutdruck von 123,9/ 74,6 mmHg im Vergleich zu den übrigen Genotypen mit einem mittleren, arteriellen Blutdruck von 116,5/ 66,9 mmHg ( $p(\text{DB})=0,039$ ,  $p(\text{SB})=0,001$ ).

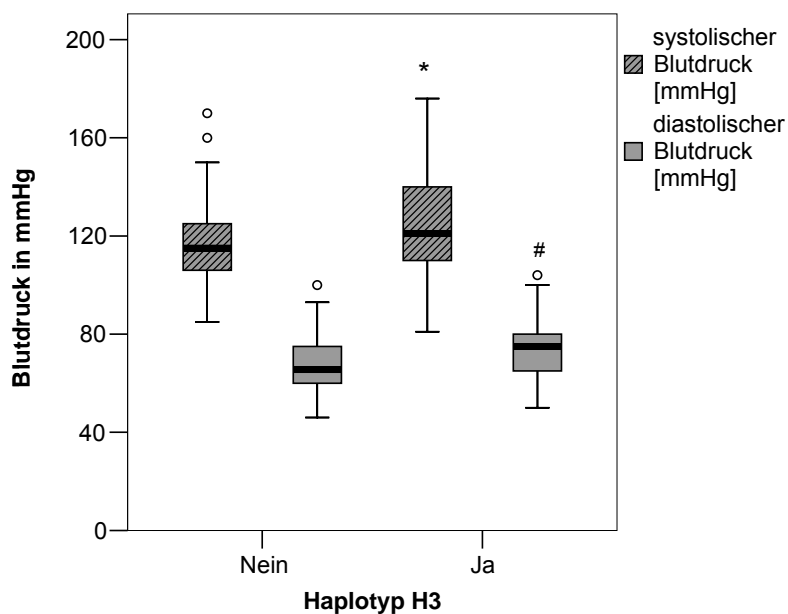


Abbildung 24: Einfluss des Haplotyps H3 auf den arteriellen Blutdruck; \* $p=0,039$ ; # $p=0,001$

### 4.3.3 MONICA Studie

Die demographischen und klinischen Charakteristika der 783 Studienteilnehmer sind in Tabelle 8 dargestellt. 366 der Teilnehmer (46,7%) zeigten eine Hypertonie. In Abbildung 25 ist ein exemplarischer *Allelic-Discrimination-Plot* aus dieser Studie für den -449 G/C-Polymorphismus dargestellt. In dieser Studie wurden als Qualitätskontrollen auf jeder 384-well-Platte 13 Proben doppelt aufgetragen zusammen mit vier Nullkontrollen. Es zeigte sich, dass die drei möglichen Allelkombinationen sehr gut voneinander differenziert wurden, d.h. eine eindeutige Zuordnung des individuellen Genotyps möglich ist.

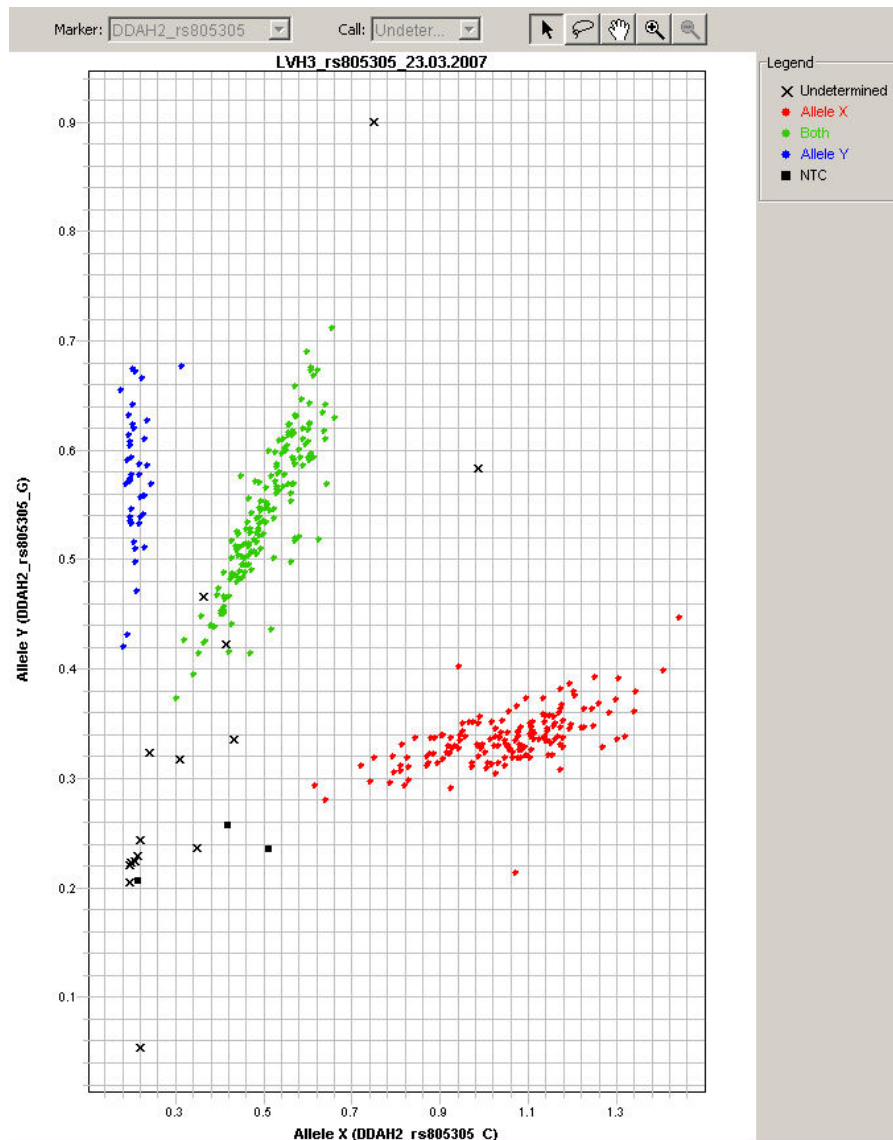


Abbildung 25: Exemplarischer Allelic-Discrimination-Plot aus der MONICA-Studie für den -449 G/C-Polymorphismus; Allel X (rote Punkte): GG; Allel Y (blaue Punkte):CC; Allel XY (grüne Punkte): GC; Ausgewertet durch SDS 2.2 Auto-Caller-Funktion 95% CI

Tabelle 8: Demographische und klinische Charakteristika 783 Teilnehmer der MONICA/KORA Studie (Augsburg)

Variable	
n	783
Männer, n (%)	417 (53,3)
Frauen, n (%)	366 (46,7)
Alter [Jahre] *	52,3±13,4
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	26,9±4,3
Hypertonie, n (%)	366 (46,7)
systolischer Blutdruck [mmHg] *	135,5±20,4
diastolischer Blutdruck [mmHg] *	81,0±11,5
Kreatinin [mg/dL] *	0,76±0,18
ADMA [µmol/L] *	0,33±0,14
SDMA [µmol/L] *	0,31±0,12
L-Arginin [µmol/L] *	85,0±26,4

\* Mittelwert±SD

Bei 348 Teilnehmern (44,4%) wurde der -1151AA-Genotyp, bei 333 Teilnehmern (42,5%) der -1151CA-Genotyp und bei 102 Teilnehmern (13,0%) der -1151CC-Genotyp gefunden. Der -449GG-, -449GC- und -449CC-Genotyp wurde bei 350 (44,7%), 347 (44,3%) und 86 Teilnehmern (11,1%) gefunden.

In dieser Studie wichen die Genotyphäufigkeiten nicht von den erwarteten im Hardy-Weinberg-Equilibrium ab und entsprachen den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten aus dem Hap Map-Projekt (Abbildung 26). Für den -1414 G/A-Polymorphismus ergab eine Korrelationsanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den -1415 G/A-Genotypen und Plasmakonzentrationen oder anderen klinischen Charakteristika.

## Ergebnisse

		-1415 G/A			-1151 C/A			-449 G/C		
Studie	n	rs2272592			rs805304			rs805305		
		GG	GA	AA	CC	CA	AA	GG	GC	CC
MONICA/KORA	783	0,653	0,312	0,035	0,130	0,425	0,348	0,447	0,443	0,110
HapMap	120	0,500	0,417	0,083	0,083	0,467	0,450	0,450	0,467	0,083

Abbildung 26: Genotypverteilung der DDAH2-Promoterpolymorphismen in der MONICA/KORA-Studie im Vergleich zu den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten des Hap Map-Projektes; die Verteilung zeigt keine Abweichung vom HWE:  $p(-1415\text{ G/A})=0,80$ ,  $p(-1151\text{ C/A})=0,25$ ,  $p(-449\text{ G/C})=0,80$ .

Die Verteilung der Genotypen in verschiedenen Subgruppen der Studie sowie demographische und klinische Charakteristika der verschiedenen -1151 C/A- und -449 G/C-Genotypen sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 dargestellt. Die Patienten mit den verschiedenen DDAH2-Genotypen unterschieden sich nicht in Bezug auf Alter, BMI und Kreatininkonzentration.

Tabelle 9: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -1151 C/A-Genotypen

	-1151 C/A-Genotyp			
	CC	CA	AA	p
n (%)	102 (13,0)	333 (42,5)	348 (44,4)	-
Alter [Jahre] *	52,9±12,7	52,2±13,1	52,4±13,7	0,90
Männer, n (%)	48 (47,1)	166 (49,8)	162 (46,6)	0,68
Kreatinin [mg/dL] *	0,74±0,15	0,77±0,17	0,76±0,19	0,33
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	26,9±4,1	26,9±4,4	27±4,3	0,96

\* Mittelwert±SD

## Ergebnisse

Tabelle 10: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -449 G/C-Genotypen

	-449 G/C- Genotyp			p
	GG	CG	CC	
n (%)	350 (44,7)	347 (44,3)	86 (11,1)	-
Alter [Jahre] *	52,3±13,7	52,0±13,1	53,9±12,9	0,52
Männer, n (%)	161 (46,0)	174 (50,1)	41 (47,7)	0,55
Kreatinin [mg/dL] *	0,76±0,19	0,77±0,17	0,75±0,16	0,62
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	26,9±4,4	26,9±4,3	27,0±4,2	0,90

\* Mittelwert±SD

### 4.3.3.1 Assoziation der -1151 C/A- und -449 G/C-Polymorphismen mit der ADMA-Plasmakonzentration und dem arteriellen Blutdruck

Die Annahme dominanter oder rezessiver Effekte der einzelnen DDAH2-Allele zeigte weder für den -1151 C/A- noch für den -449 G/C-Polymorphismus einen signifikanten Zusammenhang zwischen verschiedenen Genotypen und Unterschieden in den ADMA-Plasmakonzentrationen. Gleiches zeigte sich bei der Betrachtung des Blutdruckes.

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen dem -1151 C/A-Polymorphismus und ADMA-Plasmakonzentrationen und systolischem/diastolischem Blutdruck unter Annahme eines dominanten/rezessiven Effekts des -1151A-Allels

	-1151 C/A-Genotyp			Erbgang	
	CC	CA	AA	A rezessiv	A dominant
n (%)	102 (13,0)	333 (42,5)	348 (44,4)	p	p
ADMA [µmol/L] *	0,61 ±0,14	0,64 ±0,15	0,64 ±0,14	0,87	0,16
SBP [mmHg] *	138,6 ±24,1	133,7 ±20,2	136,3 ±19,4	0,33	0,10
DBP [mmHg] *	82,0 ±13,6	81,1 ±11,0	80,7 ±11,5	0,46	0,34

\* Mittelwert±SD

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen dem -449 G/C-Polymorphismus und ADMA-Plasmakonzentrationen und systolischem/diastolischem Blutdruck unter Annahme eines dominanten/rezessiven Effekts des -449G-Allels

	-449 G/C-Genotyp			Erbgang	
	GG	CG	CC	G dominant	G rezessiv
n (%)	350 (44,7)	347 (44,3)	86 (11,1)	p	p
ADMA [ $\mu\text{mol/L}$ ] *	0,64 $\pm$ 0,13	0,64 $\pm$ 0,15	0,62 $\pm$ 0,14	0,50	0,73
SBP [mmHg] *	136,2 $\pm$ 19,5	134,0 $\pm$ 20,1	139,2 $\pm$ 24,7	0,08	0,42
DBP [mmHg] *	80,7 $\pm$ 11,5	81,1 $\pm$ 11,2	82,1 $\pm$ 13,1	0,36	0,44

\* Mittelwert $\pm$ SD

Für die L-Arginin- und SDMA-Plasmakonzentrationen konnten weder für den -1151 C/A- noch für den -449 G/C-Polymorphismus Unterschiede gezeigt werden.

#### 4.3.3.2 Zusammenhang zwischen den -1151 C/A und -449 G/C-Polymorphismen und der Prävalenz einer Hypertonie

Sowohl für die drei Allele des -1151 C/A- als auch für diejenigen des -449 G/C-Genotyps konnten signifikante Unterschiede in der Prävalenz einer Hypertonie nachgewiesen werden. Für den -1151 C/A-Polymorphismus ergaben sich Prävalenzen von 41,2%, 42,6% und 53,2% für den -1151CC-, -1151CA- und -1151AA-Genotyp ( $p=0,009$ ) (Abbildung 27). Bei Annahme eines rezessiven Effekts des -1151A-Allels zeigten Träger des -1151A-Allels im Vergleich zu Trägern des -1151C-Allels (Tabelle 13) ein Quotenverhältnis (Odds ratio; korrigiert für Alter, Geschlecht und BMI) von 1,70 (95%CI: 1,22-2,36,  $p=0,002$ ).

## Ergebnisse

Tabelle 13: Odds-Berechnungen für die -1151 C/A-Genotypen unter Annahme eines rezessiven oder dominanten Effekts des -1151A-Allels

	-1151 C/A-Genotyp			
	Nicht-adjustiertes Model		Adjustiertes* Model	
	Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p
A Dominantes Model†	1,30 (0,85-1,98)	0,228	1,47 (0,91-2,38)	0,11
A Rezessives Model‡	1,50 (1,13-1,99)	0,005	1,70 (1,22-2,36)	0,002

Für den -449 G/C-Polymorphismus ergaben sich Prävalenzen von 52,6%, 42,7% und 39,5% für den -449GG-, -449GC- und -449CC-Genotyp ( $p=0,004$ ) (Abbildung 28). Das Quotenverhältnis unter Annahme eines rezessiven Effekts des -449G-Allels lag für Träger des -449G-Allels im Vergleich zu Trägern des -449C-Allels bei 1,80 (Tabelle 14) (95%CI: 1,29-2.49,  $p<0,001$ ).

\* Adjustiert für Alter, BMI und Geschlecht

† Dominantes Model: -1151CC-Genotyp = Referenz

‡ Rezessives Model: -1151CA und -1151AA = Referenz



## Ergebnisse

---

Tabelle 14: Odds-Berechnungen für die -449 G/C-Genotypen unter Annahme eines rezessiven oder dominanten Effekts des -449G-Allels

---

	-449 G/C-Genotyp			
	Nicht-adjustiertes Model		Adjustiertes* Model	
	Odds ratio (95%CI)	p	Odds ratio (95%CI)	p
G Dominantes Model <sup>†</sup>	1.39 (0.88-2.20)	0.157	1.75 (1.04-2.93)	0.04
G Rezessives Model <sup>‡</sup>	1.52 (1.15-2.03)	0.003	1.80 (1.29-2.49)	<0.001

---

---

\* Adjustiert für Alter, BMI und Geschlecht

† Dominantes Model: -449CC-Genotyp = Referenz

‡ Rezessives Model: -449GC- und -449GG- Genotyp = Referenz

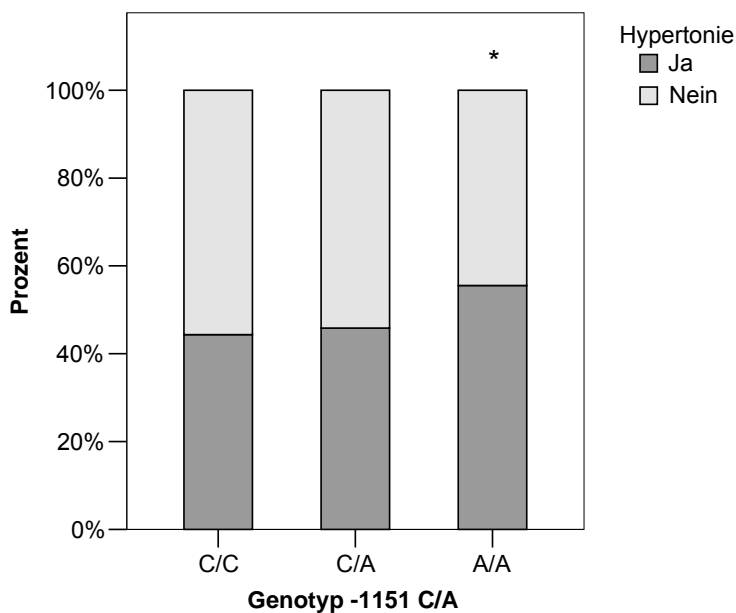


Abbildung 27: Prävalenz der Hypertonie in den -1151 C/A Genotypen; \*p=0,009

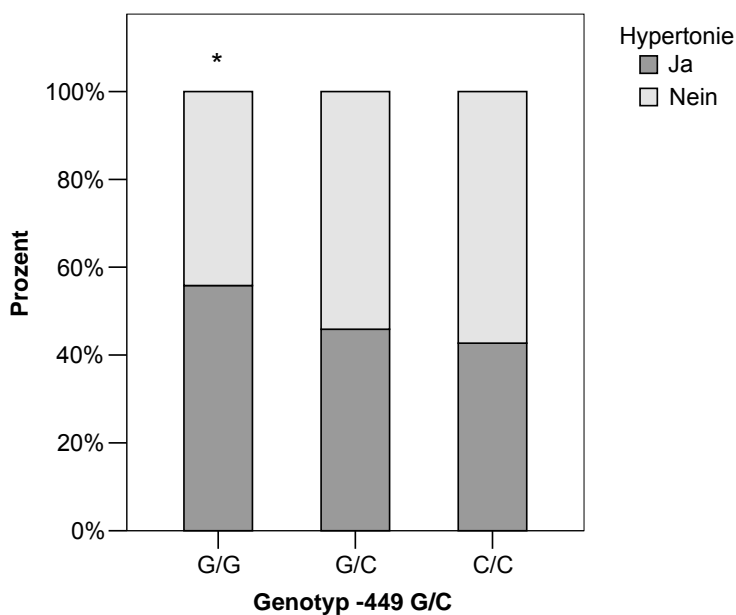


Abbildung 28: Prävalenz der Hypertonie in den -449 G/C Genotypen; \*p=0,004

#### 4.3.3.3 Kombiniertes Effekt des -1151A- und -449G-Allels

Die DDAH2-Polymorphismen -1151 A/C und -449 G/C befanden sich im Kopplungsungleichgewicht. Haplotypanalysen identifizierten auch in dieser Studie die drei bereits oben beschriebenen Haplotypen (siehe 4.3.2.4). In 343 Teilnehmern der Studie wurde der Haplotyp H3 gefunden. Abbildung 29 zeigt den Einfluss des Haplotyps H3 auf die Prävalenz einer Hypertonie. Der Haplotyp H3 geht einher mit einer höheren Prävalenz einer Hypertonie, als die übrigen Genotypen (52,5% vs 42,3%,  $p=0,005$ ). Das Risiko (korrigiert für Alter, Geschlecht und BMI) dieser Teilnehmer an einer Hypertonie zu erkranken, erhöhte sich im Vergleich zu den übrigen Genotypen um ca. 74% [Odds ratio: 1.74 (95%CI: 1.26-2.42,  $p<0.001$ )].

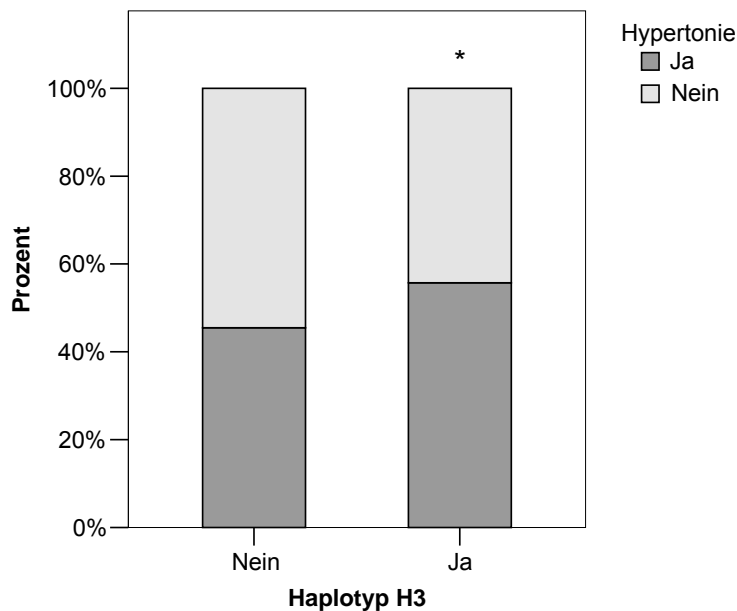


Abbildung 29: Einfluss des Haplotyps H3 auf die Prävalenz einer Hypertonie; \* $p=0,005$

#### 4.3.4 Baldus-Studie

Die demographischen und klinischen Charakteristika der 608 Patienten aus der Baldus-Studie sind in Tabelle 15 dargestellt. Insgesamt wurden 410 Männer (67,4%) und 198 Frauen (32,6%) in die Studie eingeschlossen. Bei 368 Patienten (60,5%) lag ein Hypertonie und bei 295 eine Koronare Herzkrankheit (KHK) (48,5%) vor.

Tabelle 15: Demographische und klinische Ausgangscharakteristika der 608 Patienten aus der Baldus-Studie

n	608
Alter [Jahre] *	60±14
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	26,0±4,3
Männer, n (%)	410 (67,4)
Frauen, n (%)	198 (32,6)
Hypertonie, n (%)	368 (60,5)
KHK, n (%)	295 (48,5)
ADMA [µmol/L] *	0,67±0,19
SDMA [µmol/L] *	0,70±0,32
L-Arginin [µmol/L] *	80,6±29,9

\* Mittelwert±SD

Abbildung 30 zeigt exemplarisch einen *Allelic-Discrimination-Plot* aus der Baldus-Studie für den -1415 G/A-Polymorphismus. Als Qualitätskontrollen wurden je 384-well-Platte fünf Proben doppelt aufgetragen zusammen mit vier Nullkontrollen. Es zeigte sich, dass eine eindeutige Zuordnung des individuellen Genotyps möglich ist.

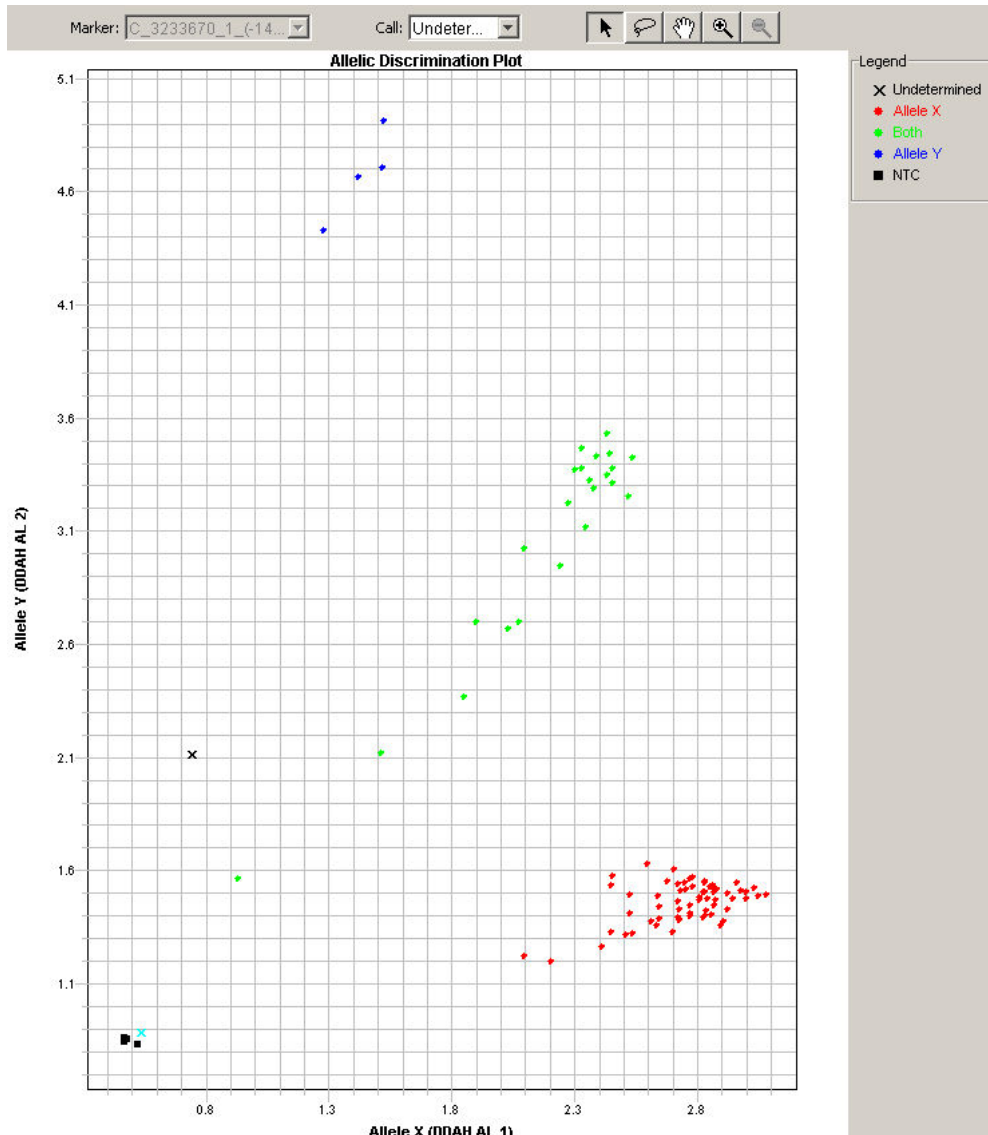


Abbildung 30: Exemplarischer Allelic-Discrimination-Plot aus der Baldus-Studie für den -1415 G/A-Polymorphismus. Allel x (rote Punkte): GG; Allel Y (blaue Punkte): AA; Allel XY (grüne Punkte): GA; Ausgewertet SDS 2.2 Auto-Caller-Funktion 95% CI

Die Verteilung der einzelnen DDAH2-Genotypen wich in dieser Studie nicht von der erwarteten Verteilung im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab und entsprach weitestgehend den im Hap Map-Projekt veröffentlichten Verteilungen (Abbildung 31).

## Ergebnisse

		-1415 G/A			-1151 C/A			-449 G/C		
Studie	n	rs2272592			rs805304			rs805305		
		GG	GA	AA	CC	CA	AA	GG	CG	CC
Rudolph	608	0,670	0,298	0,032	0,132	0,476	0,393	0,385	0,494	0,121
HapMap	120	0,500	0,417	0,083	0,083	0,467	0,450	0,450	0,467	0,083

Abbildung 31: Genotypverteilung der DDAH2-Promoterpolymorphismen in der Baldus-Studie im Vergleich zu den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten des Hap Map-Projektes; die Verteilung zeigt keine Abweichung vom HWE:  $p(-1415\text{ G/A})=0,42$ ,  $p(-1151\text{ C/A})=0,51$ ,  $p(-449\text{ G/C})=0,28$ .

Die demographischen und klinischen Charakteristika und die Verteilung einzelner Studiensubgruppen innerhalb der verschiedenen DDAH2-Genotypen sind in den Tabelle 16 und Tabelle 17 gezeigt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen DDAH2-Genotypen in Bezug auf Alter, BMI, Kreatinin-Serumkonzentration und Kreatinin-Clearance gezeigt werden.

Tabelle 16: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -1415 G/A-Genotypen und Genotypenverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation

-1415 G/A-Genotyp				
Variable	GG	GA	AA	p
n (%)	398 (67,0)	177 (29,8)	19 (3,2)	
Alter [Jahre] *	60,4±14,0	53,2±17,7	55,6±14,5	0,41
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	26,1±4,5	25,5±5,8	27,1±5,6	0,85
Männer, n (%)	272 (67,8)	115 (28,7)	14 (3,5)	0,61
Frauen, n (%)	126 (65,3)	62 (32,1)	5 (2,6)	0,61
Kreatinin [mg/dL] *	1,1±0,6	1,1±0,8	0,97±0,29	0,67
L-Arginin [µmol/L] *	81,5±30,4	80,9±29,6	72,1±25,1	0,41
ADMA [µmol/L] *	0,67±0,19	0,66±0,19	0,64±0,21	0,69
SDMA [µmol/L] *	0,70±0,36	0,71±0,27	0,60±0,23	0,41
Hypertonie, n (%)	250 (69,1)	105 (29,0)	7 (1,9)	0,07
Diabetes, n (%)	77 (71,3)	28 (25,9)	3 (2,8)	0,90
KHK, n (%)	194 (66,7)	91 (31,3)	6 (2,0)	0,26
Myokardinfarkt, n (%)	96 (65,8)	47 (32,2)	3 (2,0)	0,63
Tod, kardiovaskulär, n (%)	17 (56,7)	13 (43,3)	-	0,12

\* Mittelwert±SD

Tabelle 17: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -1151 C/A-Genotypen und Genotypenverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation

Variable	-1151 C/A-Genotyp			p
	CC	CA	AA	
n (%)	73 (13,2)	264 (47,6)	218 (39,2)	
Alter [Jahre] *	58,0±14,7	61,7±14,2	60,8±13,7	0,15
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	26,3±4,5	26,1±4,5	25,7±4,0	0,44
Männer, n (%)	53 (14,1)	174 (46,4)	148 (39,5)	0,55
Frauen, n (%)	20 (11,1)	90 (50,0)	70 (38,9)	0,55
Kreatinin [mg/dL] *	0,99±0,39	1,1±0,62	1,1±0,72	0,61
L-Arginin [µmol/L] *	77,6±28,2	81,6±29,9	84,5±31,3	0,23
ADMA [µmol/L] *	0,65±0,17	0,68±0,21	0,67±0,17	0,58
SDMA [µmol/L] *	0,65±0,22	0,73±0,40	0,69±0,26	0,13
Hypertonie, n (%)	46 (13,5)	174 (51,0)	121 (35,5)	0,06
Diabetes, n (%)	14 (13,6)	51 (49,5)	38 (36,9)	0,53
KHK, n (%)	37 (13,3)	134 (48,2)	107 (38,5)	0,93
Myokardinfarkt, n (%)	19 (13,9)	66 (48,2)	52 (38,0)	0,89
Tod, kardiovaskulär, n (%)	4 (13,8)	11 (37,9)	14 (48,3)	0,33

\* Mittelwert±SD

In dieser Studie waren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen DDAH2-Genotypen in Bezug auf die ADMA-, SDMA-, und L-Arginin-Plasmakonzentrationen nachzuweisen. Zusätzlich unterschieden sich die verschiedenen DDAH2-Genotypen nicht in Bezug auf Alter, BMI und die Serum-Kreatininkonzentration.

Die Annahme dominanter oder rezessiver Erbgänge ergab ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den verschiedenen DDAH2-Genotypen und den ADMA-, SDMA- und L-Argininplasmakonzentrationen.

Tabelle 18: Demographische und klinische Charakteristika stratifiziert nach -449 G/C-Genotypen und Genotypenverteilung innerhalb verschiedener Subgruppen der Baldus-Studienpopulation

Variable	-449 G/C-Genotyp			p
	GG	GC	CC	
n (%)	181 (38,5)	232 (49,49)	57 (12,1)	
Alter [Jahre] *	60,8±14,0	61,4±14,7	57,1±14,1	0,13
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	25,4±3,6	26,1±4,4	26,8±4,8	0,08
Männer, n (%)	123 (68)	144 (62,1)	43 (75,4)	0,13
Frauen, n (%)	58 (32)	88 (37,9)	14 (24,6)	0,13
Kreatinin [mg/dL] *	1,03±0,42	1,04±0,59	1,04±0,39	0,99
L-Arginin [µmol/L] *	83,7±31,3	82,3±29,8	79,4±29,2	0,65
ADMA [µmol/L] *	0,66±0,17	0,68±0,21	0,66±0,17	0,78
SDMA [µmol/L] *	0,69±0,28	0,71±0,38	0,66±0,21	0,51
Hypertonie, n (%)	101 (34,7)	152 (52,2)	38 (13,1)	0,10
Diabetes, n (%)	31 (36,5)	43 (50,6)	11 (12,9)	0,44
KHK, n (%)	80 (35,4)	116 (51,3)	30 (13,3)	0,39
Myokardinfarkt, n (%)	36 (32,7)	59 (53,6)	15 (13,6)	0,44
Tod, kardiovaskulär, n (%)	9 (47,4)	8 (42,1)	2 (10,5)	0,47

\* Mittelwert±SD

#### 4.3.4.1 Zusammenhang zwischen den DDAH2-Promoterpolymorphismen und der Prävalenz einer Hypertonie

Die unterschiedlichen DDAH2-Genotypen korrelierten signifikant mit der Prävalenz einer Hypertonie.

Unter Annahme eines dominanten Effekts des -1415G-Allels zeigten Träger dieses Allels eine signifikant höhere Prävalenz der Hypertonie als Träger des -1415A-Allels ( $p=0,029$ ) (Abbildung 32). Die Annahme eines rezessiven Effekts des -1415G-Allels ergab keine Unterschiede in der Prävalenz einer Hypertonie zwischen beiden Allelen.

Für den -1151 C/A-Polymorphismus ergab sich, ebenfalls unter Annahme eines dominanten Effektes des -1151C-Allels, dass Träger dieses Allels im Vergleich zu Trägern des -1151A-Allels eine signifikant höhere Prävalenz für Hypertonie zeigten ( $p=0,021$ ) (Abbildung 33). Dieser Unterschied in der Prävalenz der Hypertonie blieb bei Annahme eines rezessiven Effekts des -1151C-Allels bestehen.



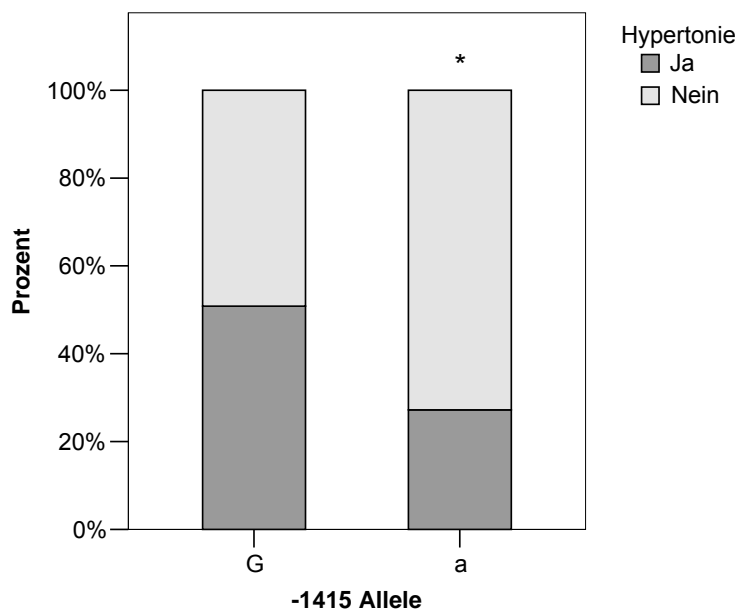


Abbildung 32: Zusammenhang zwischen -1415 G/A-Allelen und der Prävalenz der Hypertonie unter Annahme eines dominanten Effekt des -1415G-Allels. \*p=0,029

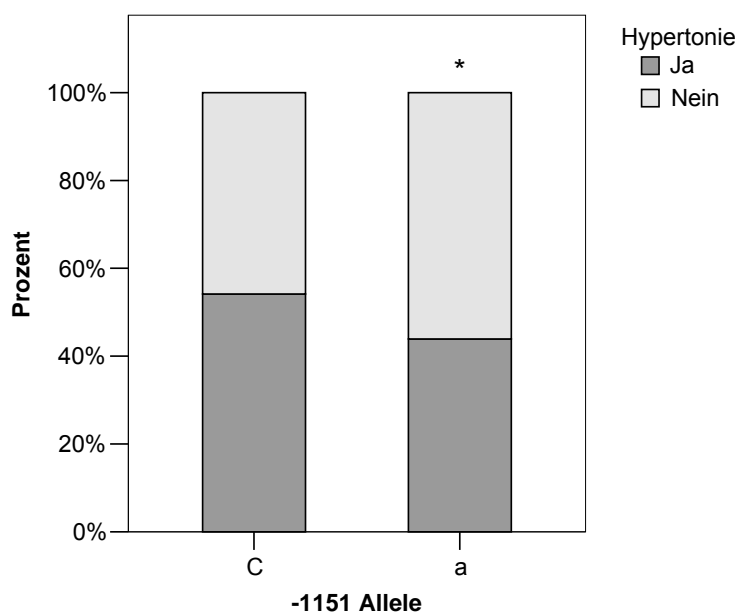


Abbildung 33: Zusammenhang zwischen -1151 C/A-Allelen und der Prävalenz der Hypertonie unter der Annahme eines dominanten Effekt des -1151C-Allels. \*p=0,021

Bei dem -449 G/C-Polymorphismus zeigten Träger des -449C-Allels unter Annahme eines dominanten Effekts dieses Allels ebenfalls eine höhere Prävalenz einer

Hypertonie als Träger des -449G-Allels (Abbildung 34). Die Annahme eines rezessiven Effekts des -449C-Allels ergab hier wiederum keine Unterschiede in der Prävalenz einer Hypertonie.

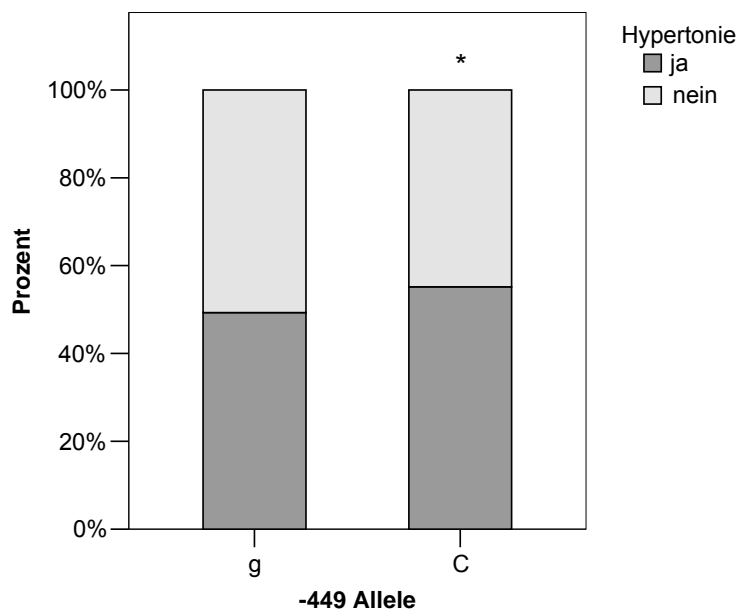


Abbildung 34: Zusammenhang zwischen -449 G/C-Allelen und der Prävalenz der Hypertonie unter der Annahme eines dominanten Effekts des -449C-Allels. \*p=0,031

Eine Subgruppenanalyse zeigte, dass die Zusammenhänge zwischen den -1151 C/A- (Abbildung 35) und -449 G/C-Allelen (Abbildung 36) und dem häufigeren Vorkommen einer Hypertonie vor allem auf die Subgruppe der Patienten mit Koronarer Herzkrankheit zurückzuführen war, während die Subgruppenanalyse für den -1415 G/A-Polymorphismus keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Patienten mit und ohne KHK ergab. Unter Annahme eines dominanten Effektes des -1151C-Allels ist ein Zusammenhang zwischen dem -1151A-Allel und einer niedrigeren Prävalenz einer Hypertonie zu sehen. Unter Annahme eines dominanten Effektes des -449C-Allels ist ein Zusammenhang zwischen dem -449C-Allel und einer erhöhten Prävalenz einer Hypertonie zu sehen.

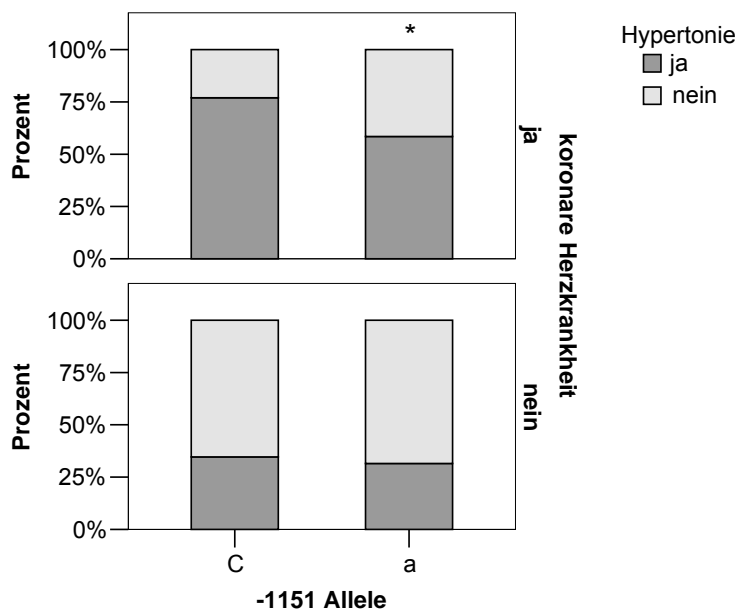


Abbildung 35: Subgruppenanalyse für Patienten mit und ohne KHK; Zusammenhang zwischen -1151 C/A-Allelen und Hypertonie; \*p=0,003

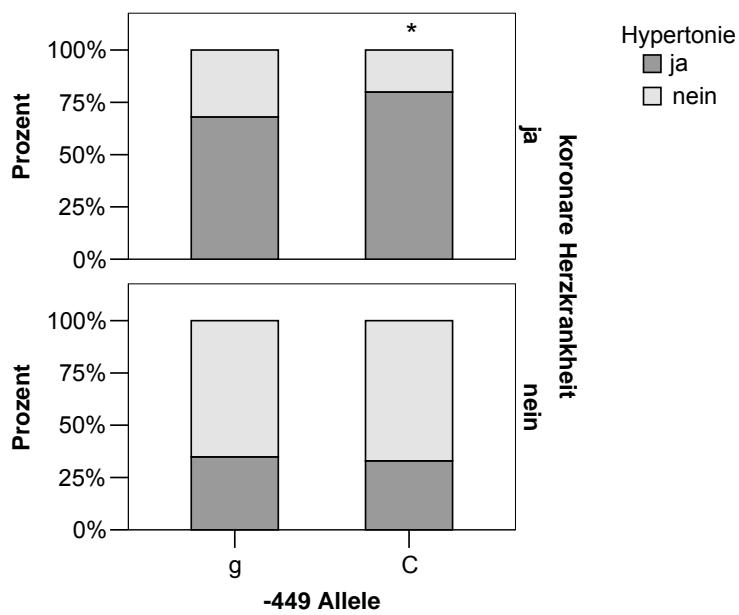


Abbildung 36: Subgruppenanalyse für Patienten mit und ohne KHK; Zusammenhang zwischen -449 G/C-Allelen und Hypertonie; \*p=0,017

#### 4.3.4.2 Kombiniertes Effekt des -1151A- und -449G-Allels auf die Prävalenz einer Hypertonie

Die DDAH2-Polymorphismen -1151 A/C und -449 G/C befanden sich im Kopplungsungleichgewicht. Haplotypenanalysen identifizierten auch in dieser Studie die drei bereits oben genannten Haplotypen. In dieser Studie ist der H3 der mit 186 Patienten am häufigsten vorkommende Haplotyp. Einen direkten Zusammenhang zwischen der Prävalenz einer Hypertonie und dem Haplotyp H3 konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden (Abbildung 37).

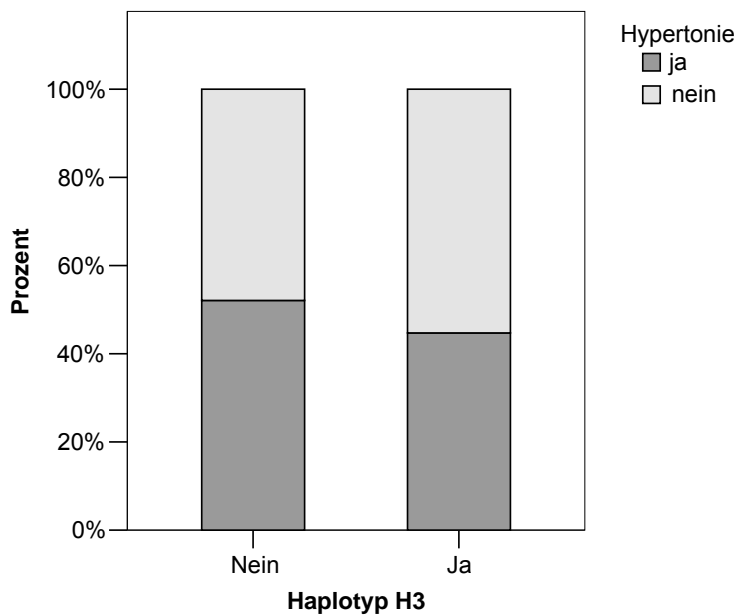


Abbildung 37: Zusammenhang zwischen dem Haplotypen H3 und der Prävalenz der Hypertonie. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden ( $p=0,107$ )

### **4.3.5 Zusammenfassung der klinischen Studien**

#### **4.3.5.1 DDAH1 Thr87Met-Polymorphismus**

Der Thr87Met-Polymorphismus zeigte in der Fall-Kontroll-Studie einen Einfluss auf das SDMA/ADMA-Verhältnis. Das Verhältnis von SDMA zu ADMA war in den Patienten, die den Polymorphismus heterozygot trugen größer.

#### **4.3.5.2 DDAH2 -1415 G/A-Polymorphismus**

Dieser Polymorphismus zeigte in keiner der drei Studien einen Zusammenhang mit den L-Arginin-, SDMA- und ADMA-Plasmakonzentrationen. In der Baldus-Studie konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem -1415G-Allel und der Prävalenz einer Hypertonie gezeigt werden. Unter Annahme eines dominanten Effekts des -1415G-Allels hatten ca. 50% der Träger des -1414G-Allels eine Hypertonie im Vergleich zu ca. 27% der Träger des homozygoten -1415A-Allels.

#### **4.3.5.3 DDAH2 -1151 C/A-Polymorphismus**

In der iP4-Studie konnte ein Zusammenhang zwischen dem häufiger vorkommenden -1151A-Allel und erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen gezeigt werden. Ebenfalls zeigten in dieser Studie Träger des -1151A-Allels einen signifikant höheren diastolischen Blutdruck und wiesen eine signifikant längere Gehstrecke im 6-Minuten-Gehtest auf. In der MONICA-Studie konnte für eben dieses Allel eine erhöhte Prävalenz der Hypertonie gezeigt werden. In der Baldus-Studie zeigten Träger des -1151A-Allels jedoch eine niedrigere Prävalenz der Hypertonie.

Multivariate Analysen des Zusammenhangs zwischen DDAH2-Genotypen und der Wahrscheinlichkeit an Hypertonie zu erkranken, zeigten in der MONICA-Studie für Träger des -1151A-Allels ein 1,7-mal höheres Risiko als für Träger des -1151C-Allels.

#### **4.3.5.4 DDAH2 -449 G/C-Polymorphismus**

In der iP4-Studie konnte ein Zusammenhang zwischen dem häufiger vorkommenden -449G-Allel und höheren ADMA-Plasmakonzentrationen gezeigt werden. Träger des -449G-Allels wiesen in der gleichen Studie einen signifikant höheren diastolischen Blutdruck im Vergleich zu Trägern des -449C-Allels auf. In der MONICA-Studie konnte für das -449G-Allel ebenfalls eine höhere Prävalenz der Hypertonie gezeigt werden.

Jedoch zeigten in der Baldus-Studie Träger des -449G-Allels eine niedrigere Prävalenz der Hypertonie.

Multivariate Analysen des Zusammenhangs zwischen DDAH2-Genotyp und der Wahrscheinlichkeit an Hypertonie zu erkranken, zeigten in der MONICA-Studie für Träger des -449G-Allels ein 1,8-mal höheres Risiko als für Träger des -449C-Allels.

#### **4.3.5.5 Haplotypen**

Insgesamt wurden in allen drei Studien drei mögliche, gemeinsame Haplotypen für die Polymorphismen -1151 C/A und -449 G/C identifiziert, von denen aber nur der Haplotyp H3 Effekte zeigte. In der iP4-Studie hatten Patienten, die den Haplotyp H3 trugen im Vergleich zu den übrigen Genotypen einen signifikant höheren arteriellen Blutdruck. In der MONICA-Studie war der Haplotyp H3 mit einer höheren Prävalenz einer Hypertonie verbunden.

## 4.4 eNOS-Polymorphismen in klinischen Studien

### 4.4.1 Atorvastatin-Studie

Die demographischen und klinischen Ausgangscharakteristika der Teilnehmer sind in Tabelle 19 dargestellt. Die Teilnehmer unterschieden sich nicht in Bezug auf Alter, BMI, Kreatininkonzentration und Gesamtcholesterinkonzentration. Die Einteilung in die Gruppen Atorvastatin und Placebo erfolgte zufällig. Die Studie war auf einen Zeitraum von 6 Wochen festgelegt. Am Ende dieser sechs Wochen wurden erneut die eNOS-Expression und die NO-Synthese in vivo bestimmt. Die Teilnehmer in der Atorvastatin-Gruppe erhielten über sechs Wochen täglich 40 mg Atorvastatin. Der Glu298Asp-Polymorphismus wurde zu Beginn der Studie bestimmt. Die Verteilung der Glu298Asp-Genotypen innerhalb der Gruppen weicht nicht vom HWE ab und entspricht weitestgehend den von dem Hap Map-Projekt veröffentlichten Verteilungen (Abbildung 38). Bei einem Patienten in der Placebo-Gruppe konnte der Genotyp nicht bestimmt werden.

		Atorvastatin-Gruppe (n=12)			Placebo-Gruppe (n=11)		
Studie	n						
		GG	GT	TT	GG	GT	TT
ATV	23	0,667	0,250	0,083	0,364	0,545	0,091
HapMap	120	0,400	0,517	0,083	0,400	0,517	0,083

Abbildung 38: Genotypverteilung des Glu298Asp-Polymorphismus in der Atorvastatin-Studie im Vergleich zu den veröffentlichten Genotyphäufigkeiten des Hap Map-Projektes; die Verteilung zeigt keine Abweichung vom HWE:  $p(\text{Atorvastatin})=0,46$ ,  $p(\text{Placebo})=0,55$ .

Tabelle 19: Die demographischen und klinischen Ausgangscharakteristika der 24 Teilnehmer zu Beginn der Atorvastatin-Studie

	Atorvastatin	Placebo	p
Patienten, n	12	12	
Männer, n (%)	6 (50)	6 (50)	
Alter [Jahren] *	58,9±7,3	58,3±5,0	0,82
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] *	24,2±4,2	25,3±1,8	0,41
Kreatinin [μmol/L] *	51,3±39,2	56,5±45,6	0,77
Gesamtcholesterin [mg/dL] *	319,8±60,8	283,6±29,9	0,08
L-Arginin [μmol/L] *	70,0±14,5	66,6±14,9	0,57
ADMA [μmol/L] *	0,58±0,06	0,63±0,06	0,08

\* Mittelwert±SD

Unter Annahme eines dominanten Effekts des 298Asp-Allels konnte am Tag 1 ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten relativen eNOS-Expression in den Blutplättchen und dem 298Asp-Allel gezeigt werden. Ein Unterschied in der Ausscheidung von <sup>15</sup>N-Nitrat über 24 Stunden konnte nicht gezeigt werden (Abbildung 39).



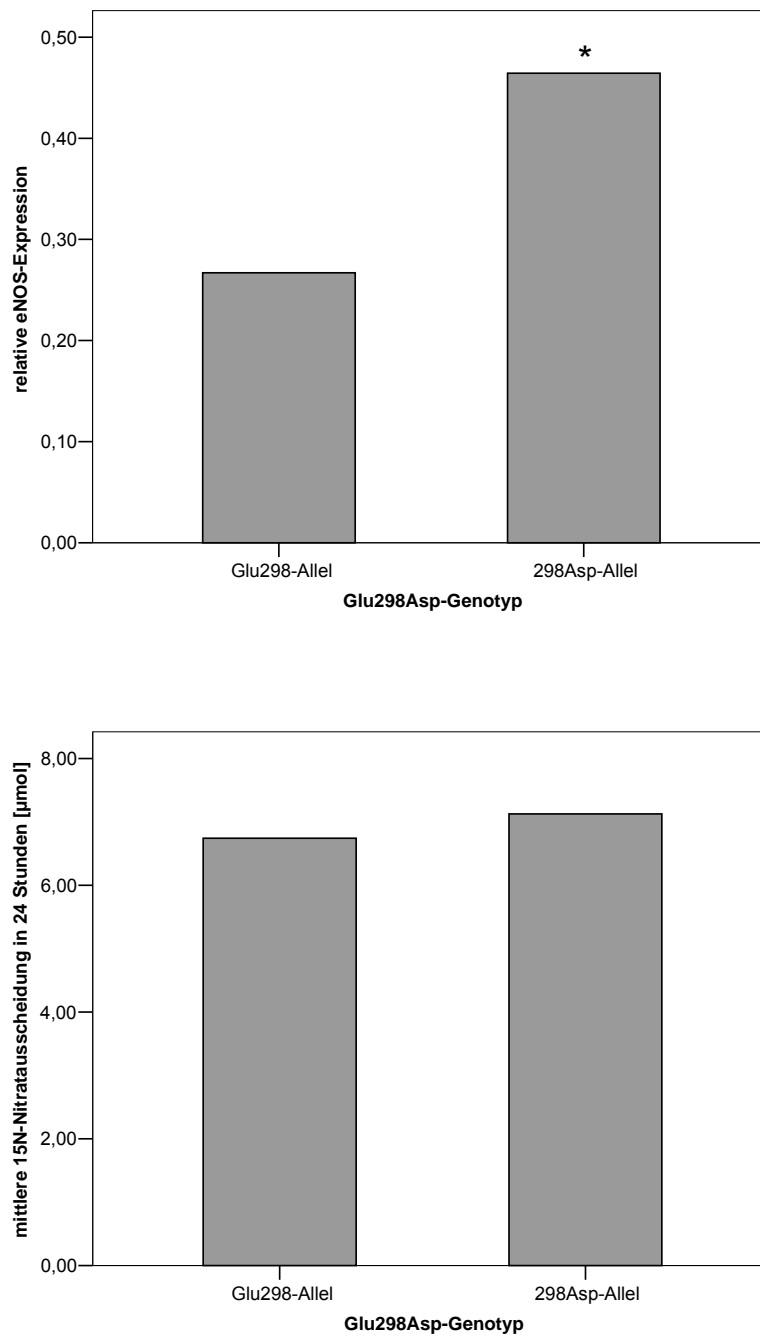


Abbildung 39: eNOS-Expression in den Blutplättchen und <sup>15</sup>N-Nitrat-Ausscheidung über 24 Stunden in allen Patienten an Tag 1 stratifiziert nach Glu298Asp-Genotypen; \*p<0,05

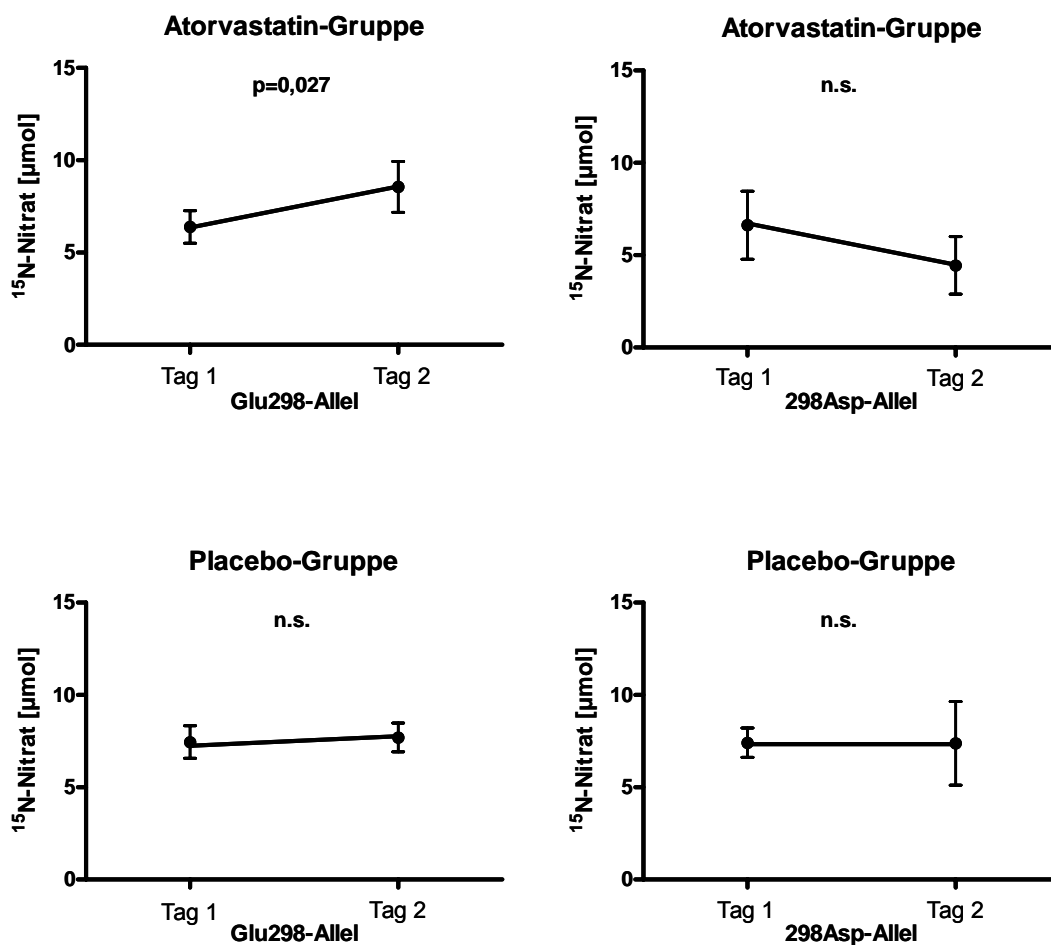


Abbildung 40: 24 Stunden <sup>15</sup>N-Nitrat-Ausscheidung vor und nach der Behandlung mit Atorvastatin bzw. Placebo stratifiziert nach eNOS Glu298Asp-Genotypen; Tag 1: Ausgangswert; Tag 2: Wert nach 6 Wochen Behandlung mit Atorvastatin bzw. Placebo

Unter Annahme eines dominanten Effekts des 298Asp-Allels hatte eine sechswöchige Behandlung mit Atorvastatin bzw. Placebo für beide Glu298Asp-Allele keinen signifikanten Einfluss auf die eNOS-Expression in vivo.

Die Ausscheidung von <sup>15</sup>N-Nitrat über 24 Stunden war an Tag 2 in der Atorvastatin-Gruppe unter Annahme eines dominanten Effekts des 298Asp-Allels bei Trägern des Glu298-Allels im Vergleich signifikant erhöht (Abbildung 40). In der Placebo-Gruppe war kein Unterschied in der <sup>15</sup>N-Nitrat-Ausscheidung zu erkennen.

## 5 Diskussion

### 5.1 DDAH-Knock-Out-Mäuse

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, mit der Generierung von Knock-out-Vektoren einen Grundstock für die gezielte Ausschaltung des DDAH1- und DDAH2-Gens im Tiermodell zu legen. Komplementär dazu sollten menschliche Varianten des DDAH-Gens identifiziert und klinisch charakterisiert werden.

#### 5.1.1 Der DDAH1-Knock-Out

Bei dem DDAH1-Gen handelt es sich um ein sehr großes Gen von 130 kb. Eine Elimination aller Exons mittels homologer Rekombination ist daher nicht möglich. Es musste entschieden werden, welche Exons für die Funktionsfähigkeit des Enzyms am wichtigsten sind, um diese dann später im Genom durch eine Neomycin-Kassette zu ersetzen. Recherchen in den Datenbanken (NCBI, Ensembl) ergaben nur für das Exon 2 eine ca. 99%ige Evidenz für die Funktion eines Exons. Für die anderen Exons lagen die Evidenzen deutlich unter 50%. Wir entschieden uns daher primär für das Exon 2 und schlossen auf Grund der Nähe zu Exon 2 die Exons 3 und 4 mit ein, obwohl der Translationsstart im Exon 1 liegt.

Transgene Mäuse, die die humane Isoform der DDAH1 überexprimieren zeigen eine erhöhte DDAH-Aktivität, erniedrigte ADMA-Plasmakonzentrationen und eine erhöhte NOS-Aktivität [28]. Tanaka und Kollegen [55] transplantierten transgenen DDAH1-Mäusen Herzen von B6(C)-H2<sup>bm12</sup>/KhEg-Mäusen und konnten postoperativ nach 30 Tagen eine verminderte TNF- $\alpha$ -Produktion, eine verminderte kardiale B- und T-Zell-Infiltration und eine erhöhte Schlagkraft der transplantierten Herzen im Vergleich zum Wildtyp feststellen. *Graft Coronary Artery Disease* (GCAD) ist die häufigste Todesursache bei Patienten nach einer Herztransplantation. Bei Mäusen konnte eine DDAH1-Überexpression eine GCAD nach einer Herztransplantation abmildern. Die Mäuse zeigten perioperativ eine erhöhte NO-Bildung im Herzgewebe und reduzierte ADMA-Plasmakonzentrationen.

Im Februar 2007 präsentierte die Arbeitsgruppe um James Leiper aus London eine heterozygote DDAH1-Knock-out-Maus [56]. Leiper und Kollegen führten den Knock-out durch Elimination des Exons 1, und somit des Translationsstartes herbei. Bereits heterozygote Mäuse zeigten eine erhöhte ADMA-Plasmakonzentration, einen erhöhten Druck im rechten Ventrikel und eine verminderte Relaxation der Aortensegmente im Organbad nach Gabe von Acetylcholin, was auf eine endotheliale Dysfunktion schließen lässt. Die Verpaarung von heterozygoten DDAH1-Knock-out-Mäusen ergab nur weitere heterozygote und Wildtyp-Tiere im Verhältnis von 2:1, was auf eine embryonale Letalität des homozygoten Knock-outs schließen lässt.

Die von Leiper und Kollegen veröffentlichten Daten und die Daten der transgenen DDAH1-Mäuse bestätigen die initialen Hypothesen dieser Arbeit und zeigen erneut die wichtige Funktion der DDAH im gesamten NO-Stoffwechsel und den damit verbundenen Einfluss auf die endothelialen Funktionen. Auf Grund dieser Daten wurde entschieden, den Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Generierung der DDAH2-Knock-out-Mauslinie zu verlegen.

### **5.1.2 Der DDAH2-Knock-Out**

Das Konstrukt für einen konditionalen DDAH2-Knock-out wurde bereits parallel zum DDAH1-Targeting-Konstrukt kloniert. Da die DDAH1-Knock-out-Maus bereits embryonale Letalität vermuten lässt, wählten wir das Prinzip des konditionalen Knock-outs für die DDAH2-Knock-out-Mauslinie. Der Vektor integriert homolog und das Enzym kann, auf Grund der loxP-Sequenzen, heterozygot/homozygot bzw. gewebe-spezifisch, durch Verpaarung mit einer Cre-exprimierenden Maus ausgeschaltet werden.

### **5.1.3 Ausblick**

Diese Arbeit umfasst die Schritte bis zur Verpaarung heterozygoter, konditionaler Mäuse mit Cre-exprimierenden Mäusen, um einen heterozygoten DDAH2-Knock-out zu erhalten. Des Weiteren sind in den heterozygoten DDAH2-Knock-out-Mäusen nichtinvasive Blutdruckmessungen mittels einer Schwanzmanschette und die Bestimmung der NO-Synthese in vivo geplant. Expressionsanalysen mittels RT-PCR und Western-Blot-Analyse werden in vitro in den verschiedenen Organen wie Leber, Herz und Niere durchgeführt. Zusätzlich werden die ADMA-, SDMA, und NMMA-Plasmakonzentrationen, die DDAH-Aktivität und die Endothelfunktion in vitro bestimmt.

Trotz der Daten aus London wird das Projekt zur Generierung der DDAH1-Knock-out-Mauslinie fortgesetzt werden. Die Generierung von Knock-out-Modellen des gleichen Gens durch verschiedene Arbeitsgruppen ist nicht von Nachteil. Unterschiede der Knock-out-Verfahren und Unterschiede im genetischen Hintergrund der Mausstämmen können helfen, vermeintliche Knock-out-Effekte von eigentlichen Epiphänomenen zu unterscheiden. Es wäre denkbar, dass durch die Verwendung anderer Vektoren oder anderer Mausstämmen - trotz der Daten aus London - doch lebensfähige homozygote DDAH1-Knock-out-Tiere generiert werden könnten. Als Beispiel sind hier die KCC2-defiziente Mäuse zu nennen. Bei KCC2 handelt es sich um einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{Cl}^-/\text{K}^+$ -Transporter in den neuronalen Synapsen, der bei der Entstehung einer Epilepsie eine wichtige Rolle spielt. Hübner und Kollegen [57] generierten 2001 eine KCC2-defiziente Maus, die homozygot nicht überlebensfähig war. 2002 generierten Woo und Kollegen [58] mit einem anderen Vektor und mit einer anderen Klonierungsstrategie ebenfalls eine KCC2-defiziente Maus, die bis 14 Tage nach der Geburt überlebte. Die Maus von Woo und Kollegen exprimierte noch ca. 5% des KCC2-Proteins, was für ein 2-wöchiges Überleben der homozygoten Mäuse ausreichte.

Weiterhin spricht für die Generierung beider Mauslinien, dass beide Mauslinien durch Verwendung von Mäusen aus der gleichen Zucht mit identischem Hintergrund auf einen gemeinsamen Hintergrund zurückgekreuzt werden können. Die Haltung und Zucht der Mauslinien findet ebenfalls unter identischen Bedingungen statt und die Experimente an den Mauslinien finden unter den gleichen Bedingungen in einem Labor statt. Zusammengefasst wird dieses Vorgehen wesentlich die Vergleichbarkeit und damit die Wertigkeit der an den beiden Mauslinien erhobenen Daten verbessern.

Als langfristiges Ziel ist die Generierung eines totalen DDAH-Knock-outs geplant. Trotz der unterschiedlichen Geweberverteilung der DDAH-Isoformen wäre es denkbar, dass bei Fehlen einer Isoform die zweite Isoform in ihrer Expression und/oder Aktivität angeregt wird, um das Fehlen der ersten Isoform teilweise auszugleichen. Dieses Phänomen lässt sich bei eNOS-defizienten Mäusen zeigen. In eNOS-Knock-out-Mäusen konnten Huang und Kollegen [59] die Expression der neuronalen Form – nNOS – im Endothel feststellen.

Für die Generierung eines totalen DDAH-Knock-outs sollen die DDAH1- und die DDAH2-Knock-out-Mauslinien miteinander verpaart werden. Für diesen Schritt ist ebenfalls der gleiche genetische Hintergrund der Mauslinien und die Haltung und Zucht der Mauslinien unter gleichen Bedingungen von großem Vorteil.

## 5.2 DDAH-Polymorphismen in klinischen Studien

Zu Beginn dieser Arbeit war die Bedeutung der beiden DDAH Isoformen - DDAH1 und DDAH2 - für den Abbau von ADMA weitestgehend unbekannt. Die unterschiedliche Gewebeverteilung, die chromosomale Lokalisation und Co-Lokalisation mit anderen den NO-Stoffwechsel regulierenden Enzymen ließ eine Vermutung auf die eventuelle Funktion der DDAH Subtypen zu. Die Co-Lokalisation der DDAH2 mit der endothelialen Isoform der NOS (eNOS) lässt auf eine regulatorische Funktion - eventuell über den Abbau von ADMA - der DDAH2 in Bezug auf die NO-Synthese schließen [22]. Die ADMA-Metabolisierung findet hauptsächlich in Geweben der Niere und Leber statt in denen die Expression der DDAH1 Isoform dominiert, was bedeuten würde, dass ADMA hauptsächlich durch DDAH1 abgebaut wird [60]. Diese Hypothese konnten Wang und Kollegen in Experimenten mit siRNA bestätigen [30]. Auch die, bei der Hypercholesterinämie beobachtete endotheliale Dysfunktion in Tierversuchen, ist mit erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen verbunden, die auf eine verminderte unspezifische DDAH-Aktivität zurückzuführen sind [61].

Das bedeutet, dass Polymorphismen, die die Aktivität oder die Expression der DDAH beeinflussen könnten, ebenfalls mit Störungen der Endothelfunktion oder mit Erkrankungen, die aus einer endothelialen Dysfunktion entstehen, im Zusammenhang stehen können. Ryan und Kollegen [62] konnten bei 236 Patienten, die einem chirurgischen Eingriff am Herzen unterzogen wurden, einen Zusammenhang zwischen dem DDAH2-Promoterpolymorphismus -449 G/C und dem postoperativen Bedarf an Vasopressoren zeigen.

In 132 finnischen Frauen, die während der Schwangerschaft an Präeklampsie erkrankten, konnten Akbar und Kollegen einen Zusammenhang zwischen vier gemeinsamen Haplotypen der DDAH1 und der Prävalenz einer Präeklampsie zeigen [32, 63]. In beiden Studienkollektiven konnte jedoch aufgrund fehlender Daten zur ADMA-Plasmakonzentration der Patienten der Einfluss der Polymorphismen auf die ADMA-Plasmakonzentrationen nicht geklärt werden.

In 47 an Sepsis erkrankten Patienten zeigten O'Dwyer und Kollegen das erste Mal den Einfluss eines DDAH2-Polymorphismus auf die ADMA-Plasmakonzentrationen. Untersucht wurde der DDAH2-Promoterpolymorphismus -449 G/C. Unter Annahme eines dominanten Effekts des -449G-Allels zeigten Patienten, die dieses Allel trugen im Vergleich zu Trägern des -449C-Allels, im Mittel höhere ADMA-Plasmakonzentrationen

[33]. Zur Klärung der Zusammenhänge zwischen den verschiedenen DDAH-Genotypen und ADMA-Plasmakonzentrationen mit klinischen Ereignissen der Patienten konnte keine Aussage getroffen werden.

Um Aussagen über einen genetischen Marker im Bezug auf sein Potenzial als Risikofaktor treffen zu können, sind große Studienpopulationen mit genügender statistischer Aussagekraft notwendig. Als Beispiel ist hier die Arbeit von Mayer und Kollegen zu nennen [64], die in 1397 Patienten der 3. Erhebung der MONICA Augsburg-Studie 1994/1995 [49, 50] einen Zusammenhang zwischen dem T8590C Polymorphismus im CYP4A11-Gen und der Prävalenz einer Hypertonie zeigten. Träger des homozygoten 8590C-Allels zeigten im Vergleich zu Trägern des 8590T-Allels ein 3,31-fach höheres Risiko an einer Hypertonie zu erkranken.

In dieser Arbeit wurde in drei klinischen Studien mit insgesamt 1498 Patienten die Zusammenhänge zwischen verschiedenen DDAH-Genotypen, ADMA-Plasmakonzentrationen und klinischen Ereignissen untersucht. Es wurden hierbei sowohl besonders kranke Patienten, als auch gemischte Kollektive und ein Querschnitt der Normalbevölkerung untersucht.

Erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen stehen im Zusammenhang mit einer nachteiligen pulmonalen Hämodynamik [65] und mit einer erhöhten Mortalität in Patienten mit pulmonaler Hypertonie [66].

In 107 Patienten mit pulmonaler Hypertonie konnte erstmals der Einfluss der DDAH2-Polymorphismen -1151 C/A und -449 G/C auf die ADMA-Plasmakonzentrationen und den diastolischen Blutdruck der Patienten gezeigt werden. Das -1151A-Allel steht im Vergleich zum -1151C-Allel im Zusammenhang mit signifikant höheren ADMA-Plasmakonzentrationen und einem signifikant erhöhten diastolischen Blutdruck. Für das -449G-Allel ließ sich ebenfalls ein Zusammenhang mit signifikant erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen und einem signifikant erhöhten diastolischen Blutdruck zeigen. Dies lässt in beiden Fällen auf eine durch den SNP verminderte DDAH-Aktivität vermuten, welche verantwortlich für die erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen sein kann.

Experimente an Ratten, in denen durch chronische Hypoxie eine pulmonale Hypertonie induziert wurde, zeigten bereits eine verminderte DDAH-Aktivität in Verbindung mit erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen [67]. In neugeborenen Ferkeln zeigten Arrigoni und Kollegen [68] während der ersten Tage nach der Geburt eine Zunahme der DDAH2-Expression und der DDAH-Aktivität mit einem Aktivitätsmaximum am

Tag 1 nach der Geburt. Die Ferkel, bei denen eine pulmonale Hypertonie induziert wurde, zeigten eine verminderte DDAH2-Expression und DDAH-Aktivität. Diese tierexperimentellen Daten und die Daten aus der iP4-Studie zeigen, dass die DDAH nicht nur eine regulatorische Funktion in der Lungenentwicklung hat, sondern auch ein wichtiges Schlüsselenzym für den pulmonalen NO-Stoffwechsel ist.

Der 6-Minuten-Gehtest (6MGT) erfasst die Belastbarkeit von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen und Herzinsuffizienz. Der Test eignet sich zur Beschreibung des Krankheitsverlaufs und der Erfolge therapeutischer Maßnahmen sowie ergänzend zur globalen Risikoabschätzung vor chirurgischen Eingriffen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sich erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen negativ auf die Belastbarkeit der Patienten im 6MGT auswirkten. Einen positiven Einfluss auf die Belastbarkeit der Patienten zeigte das -1151A-Allel des -1151 C/A-Polymorphismus, was jedoch im Widerspruch zu den mit dem -1151A-Allel verbundenen erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen steht. Dieses macht die oben erläuterte Problematik - das Potenzial eines genetischen Markers als Risikofaktor abschätzen zu können - noch deutlicher. Der Rückschluss von einem Polymorphismus über die ADMA-Plasmakonzentrationen auf die Belastbarkeit eines Patienten, scheint in diesem Fall nicht möglich.

Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen dem arteriellen diastolischen Blutdruck der Patienten und den DDAH2-Polymorphismen gezeigt werden. Patienten mit dem -1151A-Allel des -1151 C/A-Polymorphismus zeigten einen höheren arteriellen, diastolischen Blutdruck als Patienten mit dem -1151C-Allel. Das gleiche konnte für das -449G-Allel des -449 G/C-Polymorphismus gezeigt werden. Eine Korrelation mit der Diagnose Hypertonie, welche die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen den DDAH2-Polymorphismen und kardiovaskulären Erkrankungen unterstützen würde, erreichte im Rahmen der iP4-Studie keine Signifikanz. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die verhältnismäßig kleine Studienpopulation von 107 Patienten sein.

In der weitaus größeren Studienpopulation der 3. Erhebung der MONICA/KORA Augsburg-Studie mit 783 Teilnehmern konnte erstmals einen Zusammenhang zwischen den DDAH2-Polymorphismen -1151 C/A und -449 G/C und der Prävalenz einer Hypertonie und einem erhöhten Risiko an Hypertonie zu erkranken gezeigt werden. Jedoch zeigten beiden Polymorphismen keinen Zusammenhang mit den ADMA-Plasmakonzentrationen und dem arteriellen Blutdruck der Teilnehmer. Die



bereits erläuterten verschiedenen Gewebeverteilungen der DDAH-Isoformen und die möglichen verschiedenen physiologischen Rollen - DDAH2 als lokal aktives, regulatorisches Enzym der Endothelfunktion [30] und des Blutdruckes und DDAH1 als Regulator der ADMA-Plasmakonzentration [56] - könnten dieses Paradoxon erklären. Dennoch ist es möglich, dass in vivo unter klinischen Bedingungen das Zusammenspiel mehrerer Faktoren – das Fehlen einer Alternative im Bezug auf die ADMA-Metabolisierung und/oder die erhöhte entzündungsbedingte Expression von DDAH2 – zu einem Wechsel der physiologischen Rolle der DDAH2 führen können.

Das Fehlen eines direkten Zusammenhangs zwischen den DDAH2-Polymorphismen und dem arteriellen Blutdruck der Patienten kann am ehesten auf eine antihypertensive Therapie der Patienten zurückzuführen sein. Durch eine Antihypertensive Therapie ist es nicht möglich, eine direkte Korrelation zwischen den DDAH2-Polymorphismen und dem arteriellen Blutdruck herzustellen. Das Vorhandensein einer direkten Korrelation zwischen den DDAH2-Polymorphismen und der Diagnose Hypertonie ist im Vergleich zu dem arteriellen Blutdruck – trotz möglicher anderer Faktoren, die eine Hypertonie beeinflussen können - ein Indiz für die stärkere Aussagekraft der Diagnose Hypertonie. Einen Zusammenhang zwischen DDAH2-Polymorphismen und der Prävalenz einer Hypertonie konnte ebenfalls in den 608 Patienten der Baldus-Studie gezeigt werden. Im Gegensatz zu der MONICA Studie konnte hier für die -1151A- und -449G-Allele eine niedrigere Prävalenz einer Hypertonie gezeigt werden. In dieser Studie scheinen die entsprechenden Allele, einen eher protektiven Effekt zu haben. Ein wichtiger Unterschied der Baldus-Studie im Vergleich zu der iP4- und MONICA-Studie ist die hohe Anteil (48,5%) der Patienten mit einer Koronaren Herzkrankheit (KHK). Eine Subgruppenanalyse ergab in diesem Fall, dass das Ergebnis der Prävalenz einer Hypertonie auf die Patienten mit einer KHK zurückzuführen ist. Bei den Patienten ohne eine KHK deutete sich der gleiche Effekt wie in der MONICA-Studie an, erreichte aber in dieser Studie keine statistische Signifikanz. Da es sich bei einer KHK um eine multifaktorielle kardiovaskuläre Erkrankung handelt, ist ein möglicher Effekt der SNPs auf den Blutdruck vor dem Hintergrund anderer Faktoren, welche die DDAH-Aktivität beeinflussen, wahrscheinlich gar nicht zu erkennen.

Akbar und Kollegen [32] konnten bereits für Polymorphismen im DDAH1-Gen zeigen, dass die untersuchten Polymorphismen alleine keinen signifikanten Zusammenhang mit einer Präeklampsie zeigten. Unter Annahme einer gemeinsamen Vererbung, d.h. durch das Vorliegen von Haplotypen, ergab sich jedoch ein erhöhtes

Präeklampsierisiko. Möglich wäre auch eine Verstärkung des Effektes durch das Vorhandensein eines Haplotyps.

Betrachtet man die Lokalisation der drei DDAH2-Polymorphismen auf dem Gen, so liegen der -1151 C/A- und der -449 G/C-Polymorphismus am dichtesten am Translationsstart in Exon 2. Die Nähe zum Translationsstart, der geringe Abstand zueinander und die Tatsache, dass in den klinischen Studien der -1415C/A-Polymorphismus keine wesentlichen Effekte zeigte, waren die Gründe nur den -1151 C/A und den -449 G/C-Polymorphismus in die Haplotypanalysen mit einzubeziehen.

In der MONICA-Studie war das -1151A- und das -449G-Allel bereits mit einem erhöhten Risiko an einer Hypertonie zu erkranken verbunden (Odds ratio 1,70 bzw. 1,80). Der gleiche Zusammenhang zeigte sich für den Haplotyp H3 (-1151AA- und -449GG-Genotyp) mit einem um ca. 75% erhöhten Risiko einen Hypertonus zu haben. Eine Verstärkung des Effekts durch den Haplotyp war nicht zu erkennen. In der iP4-Studie konnte ein Zusammenhang zwischen dem Haplotyp und dem arteriellen Blutdruck gezeigt werden. Träger des Haplotyps H3 hatten im Vergleich zu den restlichen Genotypen einen höheren diastolischen und systolischen Blutdruck. Doch auch in dieser Studie war keine wesentliche Verstärkung des Effektes zu erkennen. In beiden Studien treten kombinierte Effekte der Allele auf, sind aber im Vergleich zu den Einzeleffekten nicht stärker ausgeprägt.

In der DDAH1-Polymorphismus-Studie konnte eine Veränderung des SDMA/ADMA-Verhältnisses im Zusammenhang mit dem DDAH1 Thr87Met-Polymorphismus gezeigt werden. Der Polymorphismus befindet sich im kodierenden Bereich des Gens und hat einen Aminosäureaustausch zur Folge. Dies könnte zu einer Erhöhung bzw. zu einer Verminderung der DDAH1-Aktivität führen, aus der erniedrigte/erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen resultieren könnten. In einer finnischen Studie mit 132 Frauen, die an Präeklampsie erkrankten, konnte ein direkter Zusammenhang zwischen DDAH1-Haplotypen und einem erhöhten Risiko für eine Präeklampsie festgestellt werden [32]. Die Ergebnisse aus dieser finnischen Studie sind Indizien für eine wichtige Funktion der DDAH1 in Bezug auf den NO-Stoffwechsel. In der DDAH1-Polymorphismus-Studie zeigten Träger des heterozygoten Allels ein höheres SDMA/ADMA-Verhältnis, was auf eine erhöhte DDAH1-Aktivität hindeuten könnte. Diese Ergebnisse sind ebenfalls ein Indiz für einen möglichen Zusammenhang, müssten in Studien mit größerer statistischer Aussagekraft noch genauer untersucht werden.

### 5.2.1 Ausblick

Trotz der deutlichen Effekte der DDAH2-Polymorphismen auf den Blutdruck oder eine Hypertonie bleibt zu bedenken, dass eine einzige genetische Variation nur einen kleinen Anteil am komplexen Phänotyp einer Erkrankung ausmacht und eventuell auch populationsspezifisch sein kann.

Projekte, wie das internationale Hap Map-Projekt, tragen erheblich zu der Auffindung von verschiedenen Allelvarianten und möglichen Haplotypen und deren populationsspezifische Verteilung im menschlichen Genom bei. Die Daten können dann von anderen Forschern genutzt werden, um eine eventuelle Verbindung zwischen einer bestimmten Allelvariante und dem Risiko für eine Erkrankung herzustellen. Auch die so genannten *high-throughput-screening*-Techniken, die es zurzeit ermöglichen in einer einzigen DNA-Probe bis zu 1 Mio. SNPs zu detektieren, werden in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen und das Aufdecken von krankheitsspezifischen Genen beschleunigen.

## 5.3 eNOS-Polymorphismus

Neben anderen kardiovaskulären Risikofaktoren führt eine Hypercholesterinämie zu einer endothelialen Dysfunktion, die auf eine gestörte Synthese und/oder Aktivität der NO-Synthese durch die eNOS zurückzuführen ist. Statine führen zu einer Verbesserung der endothelabhängigen, NO-vermittelten Vasodilatation [69]. In vitro führen Statine an kultivierten Endothelzellen zu einer Hochregulation der Genexpression der endothelialen NO-Synthese. Diese Hochregulation der eNOS lässt sich aus dem Wirkmechanismus der Statine erklären: Nebenprodukte der Cholesterinbiosynthese – Farnesylpyrophosphat oder Geranylpyrophosphat – sind an der Aktivierung/Inaktivierung von Rho-Proteinen beteiligt, die u.a. die Genexpression der eNOS beeinflussen. Eine Hemmung der Cholesterinbiosynthese und somit auch die Hemmung der Bildung von Zwischenprodukten führt dann zu einer Hochregulation der Expression der eNOS [70].

In einer Metaanalyse von 53 klinischen Studien mit insgesamt 40.413 Patienten konnten Pereira und Kollegen [71] einen Zusammenhang zwischen dem 298Asp-Allel und einer erhöhten Prävalenz einer Hypertonie bei Patienten mit Hypercholesterinämie zeigen.

In der Atorvastatin-Studie konnte zu Beginn der Studie in vivo kein Zusammenhang zwischen dem Glu298Asp-Polymorphismus und der NO-Synthese, in Form der <sup>15</sup>N-Nitrat-Ausscheidung, gezeigt werden. Nach Behandlung über sechs Wochen mit Atorvastatin zeigte die NO-Synthese in vivo für Träger des Glu298-Allels einen signifikanten Anstieg. Die Verminderung der NO-Synthese durch das 298Asp-Allel erreichte in dieser Studie keine Signifikanz. In der Placebo-Gruppe konnte in vivo kein Anstieg der NO-Synthese gezeigt werden. In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass der positive Effekt des Atorvastatins auf die NO-Synthese durch das Vorliegen des Glu298-Allels unterstützt wird. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Metaanalyse von Pereira und Kollegen [71] wäre eine mögliche Aufhebung des positiven Effekts des Atorvastatin durch das 298Asp-Allel denkbar. Doch um diese Effekte genauer zu untersuchen, sind größere Studienpopulationen mit einer größeren statistischen Aussagekraft nötig.

## 6 Zusammenfassung

Asymmetrisches-Dimethyl-Arginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der NO-Synthase. Beim Menschen ist eine erhöhte ADMA-Plasmakonzentration unter anderem mit einer endothelialen Dysfunktion, mit Hypertonus und mit einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert. Die ADMA-Plasmakonzentration in vivo wird wesentlich durch die Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) bestimmt, die beim Menschen in zwei Isoformen - DDAH1 und DDAH2 - vorkommt. Bisher fehlen geeignete Human- und Tiermodelle wie Polymorphismen und Knock-out-Mäuse, um die DDAH als mögliches Ziel für pharmakologische Interventionen untersuchen zu können.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb der Grundbaustein für die Generierung von DDAH1- und DDAH2-Knock-out-Mauslinien gelegt. Für die DDAH1 wurde ein klassischer Knock-out-Vektor kloniert und die erforderlichen Genotypisierungsmethoden etabliert. Auf Basis eines konditionalen DDAH2-Targetingvektors, wurden erfolgreich konditionale DDAH2-Mäuse (F1-Generation) generiert, welche für die Verpaarung mit Cre-exprimierenden Mäusen bereit stehen. Auch für diese Mauslinie wurden parallel die erforderlichen Genotypisierungsmethoden etabliert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden genetische Polymorphismen der eNOS und der DDAH1 bzw. DDAH2, die die Enzym-Expression und/oder Aktivität beeinflussen könnten identifiziert und in klinischen Studien untersucht. Für die rs805304 (-1151 C/A), rs805305 (-449 G/C) Polymorphismen der DDAH2 konnte bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie dabei erstmals ein Zusammenhang mit dem Blutdruck gezeigt werden. In zwei weiteren Studien konnte für diese beiden Polymorphismen erstmals ein Zusammenhang mit einer erhöhten Prävalenz der Hypertonie gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden somit die Grundlagen für die nähere Charakterisierung der DDAH Isoformen im Tiermodell gelegt und mögliche humane Modelle eines gestörten ADMA-Metabolismus identifiziert.

## 7 Summary

Asymmetrical dimethyl arginine (ADMA) is known as an endogenous inhibitor of the NO synthase. In humans elevated ADMA levels are associated with endothelial dysfunction, hypertension, and increased mortality. In vivo ADMA levels are regulated by dimethylarginine dimethylamino hydrolase (DDAH) activity, an enzyme which in humans occurs in two isoforms (DDAH1 and DDAH2). So far appropriate human and animal models for dysregulation of ADMA metabolism like polymorphisms or knock-out mice to determine the pharmacological relevance of DDAH are missing.

In the first part of this work the crucial steps in the generation of DDAH1- and DDAH2-knock-out- mouse lines are presented. For DDAH1 a classical targeting vector and genotyping methods were generated. For DDAH2-knock-out mice a targeting vector for a conditional knock-out and corresponding genotyping methods were generated. The DDAH2 knock-out mouse line was successfully generated up to the F1 generation and mated to cre-expressing mice.

In the second part of this work genetic polymorphisms of eNOS and DDAH, which could effect enzyme activity were identified and studied in clinical settings.

For the first time a correlation between two DDAH2 polymorphisms rs805304 (-1151 G/A) and rs805305 (-449 G/C) and blood pressure in patients with pulmonary hypertension could be shown. In two further studies an association between these two polymorphisms and an increased prevalence of hypertension was identified.

In summary this work provided the basic foundation to characterise DDAH isoforms in animal models and further identified possible human models of a defective ADMA metabolism.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

6MGT	6-Minuten-Gehtest
ADMA	Asymmetrisches-Dimethyl-Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumine
CAT	Cationic-Aminoacid-Transporter
CF6	Coupling factor 6
DBP	Diastolic Blood Pressure
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylamino-Hydrolase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DT	Diphtherie Toxin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endothelialeNO-Synthase
FCS	Fötale Kälberserum
G418	Genitacin
GCAD	Graft Coronary Artery Disease
Glu	Glutaminsäure
HWE	Hardy Weinberg Equilibrium
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LD	Linkage Disequilibrium
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
L-NMMA	Monomethylarginin
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MMC	Mitomycin C
MRV	mesenteric resistance vessels
Neo	Neomycin
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Nitric Oxide; Stickstoffmonoxid
NOS	Nitric Oxide Synthase; NO-Synthase

## Abkürzungsverzeichnis

---

PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PRMT	Protein-Arginin-Methyl-Transferase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
SBP	Systolic Blood Pressure
SD	Standardabweichung
SDMA	Symmetrisches-Dimethyl-Arginin
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	short interference RNA
SNP	single nucleotide polymorphism



## 9 Literatur

1. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329(27):2002-12.
2. Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999;43(3):542-8.
3. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98(18):1842-7.
4. Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation* 1997;96(2):379-82.
5. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999;99(9):1141-6.
6. 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(8793):572-5.
7. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003;4(4):33-40.
8. Krause CD, Yang ZH, Kim YS, Lee JH, Cook JR, Pestka S. Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2007;113(1):50-87.
9. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004;134(10 Suppl):2842S-2847S; discussion 2853S.
10. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(8):1455-9.

11. Calver A, Collier J, Leone A, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens* 1993;7(2):193-4.
12. Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997;95(8):2068-74.
13. Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003;4(4):23-8.
14. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358(9299):2113-7.
15. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106(8):987-92.
16. Böger RH, Bode-Böger SM. Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost* 2000;26(5):539-45.
17. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S19-25.
18. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003;24(21):1912-9.
19. Krempl TK, Maas R, Sydow K, Meinertz T, Böger RH, Kahler J. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. *Eur Heart J* 2005;26(18):1846-51.
20. Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, et al. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 2003;22(1):23-30.
21. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(6):1023-30.

22. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999;343 Pt 1:209-14.
23. Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000;68(1):101-5.
24. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S73-81.
25. Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, et al. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 2003;92(2):226-33.
26. Tanaka M, Osanai T, Murakami R, Sasaki S, Tomita H, Maeda N, et al. Effect of vasoconstrictor coupling factor 6 on gene expression profile in human vascular endothelial cells: enhanced release of asymmetric dimethylarginine. *J Hypertens* 2006;24(3):489-97.
27. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003;108(24):3042-7.
28. Jacobi J, Sydow K, von Degenfeld G, Zhang Y, Dayoub H, Wang B, et al. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation* 2005;111(11):1431-8.
29. Valkonen V, Laakso J, Pirkanen M, Laaksonen R, Salonen J, Tuomainen T. Nucleic acid molecule encoding a variant DDAH1 protein and uses thereof. *Patent WO03089638; Posted 2003-10-30* 2003.
30. Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M, et al. Isoform-Specific Regulation by NG-NG-Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase of Rat Serum Asymmetric Dimethylarginine and Vascular Endothelium-Derived Relaxing Factor/NO. *Circ Res* 2007.
31. Jones LC, Tran CT, Leiper JM, Hingorani AD, Vallance P. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(3):836-43.

32. Akbar F, Heinonen S, Pirskanen M, Uimari P, Tuomainen TP, Salonen JT. Haplotypic association of DDAH1 with susceptibility to pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2005;11(1):73-7.
33. 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.
34. Bode-Böger SM, Böger RH, Galland A, Frölich JC. Differential inhibition of human platelet aggregation and thromboxane A2 formation by L-arginine in vivo and in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998;357(2):143-50.
35. Theilmeyer G, Chan JR, Zalpour C, Anderson B, Wang BY, Wolf A, et al. Adhesiveness of mononuclear cells in hypercholesterolemic humans is normalized by dietary L-arginine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(12):3557-64.
36. Tsao PS, Cooke JP. Endothelial alterations in hypercholesterolemia: more than simply vasodilator dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32 Suppl 3:S48-53.
37. von der Leyen HE, Dzau VJ. Therapeutic potential of nitric oxide synthase gene manipulation. *Circulation* 2001;103(22):2760-5.
38. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004;109(11):1359-65.
39. Testa A, Spoto B, Tripepi G, Mallamaci F, Malatino L, Fatuzzo P, et al. The GLU298ASP variant of nitric oxide synthase interacts with asymmetric dimethyl arginine in determining cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *J Hypertens* 2005;23(10):1825-30.
40. Serrano NC, Casas JP, Diaz LA, Paez C, Mesa CM, Cifuentes R, et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension* 2004;44(5):702-7.
41. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166(4):557-80.
42. Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 1981;114(1):193-7.

43. 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.
44. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
45. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000;26(2):99-109.
46. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual; Third Edition. 2003.
47. Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006.
48. Noiri E, Satoh H, Taguchi J, Brodsky SV, Nakao A, Ogawa Y, et al. Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. *Hypertension* 2002;40(4):535-40.
49. Schunkert H, Hengstenberg C, Holmer SR, Broeckel U, Luchner A, Muscholl MW, et al. Lack of association between a polymorphism of the aldosterone synthase gene and left ventricular structure. *Circulation* 1999;99(17):2255-60.
50. Muscholl MW, Hense HW, Brockel U, Doring A, Riegger GA, Schunkert H. Changes in left ventricular structure and function in patients with white coat hypertension: cross sectional survey. *Bmj* 1998;317(7158):565-70.
51. Maas R, Schwedhelm E, Kahl L, Li H, Benndorf R, Lüneburg N, et al. Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2008;54(2):292-300.
52. Tsikas D, Böger RH, Bode-Böger SM, Gutzki FM, Frölich JC. Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their <sup>15</sup>N-labelled analogs. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;661(2):185-91.

53. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(18):8424-8.
54. Schwedhelm E, Tan-Andresen J, Maas R, Riederer U, Schulze F, Böger RH. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric dimethylarginine in human plasma. *Clin Chem* 2005;51(7):1268-71.
55. Tanaka M, Sydow K, Gunawan F, Jacobi J, Tsao PS, Robbins RC, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. *Circulation* 2005;112(11):1549-56.
56. Leiper J, Nandi M, Torondel B, Murray-Rust J, Malaki M, O'Hara B, et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* 2007;13(2):198-203.
57. Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 2001;30(2):515-24.
58. Woo NS, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, Mount DB, et al. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus* 2002;12(2):258-68.
59. Huang A, Sun D, Shesely EG, Levee EM, Koller A, Kaley G. Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(2):H429-36.
60. Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MP, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clin Nutr* 2003;22(1):17-22.
61. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99(24):3092-5.
62. Ryan R, Thornton J, Duggan E, McGovern E, O'Dwyer MJ, Ryan AW, et al. Gene polymorphism and requirement for vasopressor infusion after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2006;82(3):895-901.

63. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32(3):521-6.
64. Mayer B, Lieb W, Gotz A, Konig IR, Aherrahrou Z, Thiemig A, et al. Association of the T8590C polymorphism of CYP4A11 with hypertension in the MONICA Augsburg echocardiographic substudy. *Hypertension* 2005;46(4):766-71.
65. Cracowski JL, Yaici A, Sitbon O, Reynaud-Gaubert M, Renversez JC, Pison C, et al. [Biomarkers as prognostic factors in pulmonary arterial hypertension. Rationale and study design]. *Rev Mal Respir* 2004;21(6 Pt 1):1137-43.
66. Kielstein JT, Bode-Böger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, et al. Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(7):1414-8.
67. Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, et al. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003;108(12):1493-8.
68. Arrighi FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM. Metabolism of asymmetric dimethylarginines is regulated in the lung developmentally and with pulmonary hypertension induced by hypobaric hypoxia. *Circulation* 2003;107(8):1195-201.
69. Perticone F, Ceravolo R, Maio R, Cloro C, Candigliota M, Scozzafava A, et al. Effects of atorvastatin and vitamin C on endothelial function of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 2000;152(2):511-8.
70. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97(12):1129-35.
71. Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BM, Baum L, Yamada Y, Oliveira PS, et al. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J Hypertens* 2007;25(9):1763-74.

## 10 Lebenslauf

Name	Nicole Lüneburg
Geburtstag	10. Oktober 1978
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Ausbildung

1986- 1988	Grundschule Humboldtstrasse, Hamburg
1988- 1990	Grundschule Kerschensteiner Strasse, Hamburg
1990- 1998	Friedrich-Ebert-Gymnasium, Hamburg
1995- 1999	Ausbildung zur Chemisch- Technischen- Assistentin Berufsfachschule Hamburg
1999- 2004	Studium der Pharmazie in Hamburg
2004	Approbation zur Apothekerin
seit Jan. 2005	Promotion am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf; Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie; Klinische Pharmakologie
seit Okt. 2006	Graduiertenstudiengang Molekularbiologie, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg

### Praktika und Auslandsaufenthalte

Apr.1999 – Juli 1999	Au-pair-Aufenthalt in den USA
Nov.2003 - Mai 2004	Brunnen-Apotheke, Hamburg
Mai- Nov. 2004	Universität Bremen, Arzneimittelanwendungsforschung

### Berufstätigkeit

Feb. 2005 – Sept. 2006	Sonnen Apotheke, Bleckede
Jan. 2007- März 2007	Brunnen Apotheke, Hamburg



## 11 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Originalarbeiten

Maas R, Schwedhelm E, Kahl L, Li H, Benndorf R, Lüneburg N, et al. Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia. Clin Chem 2008;54(2):292-300.

und Kongressbeiträgen veröffentlicht:

Lüneburg N, Maas R, Schwedhelm E, Schneider L, Li H, Benndorf R, Förstermann U, Böger R. Impact of eNOS polymorphisms on eNOS expression in platelets and in vivo nitric oxide synthesis in patients with hypercholesterolemia. 2<sup>nd</sup> joint French-German NO Meeting. Hamburg, 5-7 Oktober 2006

Nicole Lüneburg, Renke Maas, Wolfgang Lieb, Jan Stritzke, Edzard Schwedhelm, Christa Meisinger, Jeanette Erdmann, Joachim Weil, Rainer H Böger, Heribert Schunkert. Polymorphisms in the promoter region of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of Hypertension. Fifth International Conference Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. Bregenz 24-28 August 2008

## 12 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Molekularbiologische Untersuchung der DDAH-Defizienz

in der Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R.H. Böger ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Nicole Lüneburg

## 13 Danksagung

Herrn Prof. Dr. T. Eschenhagen danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie diese Arbeit anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R.H. Böger für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Überlassung des Themas und für die umfassende Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Korth möchte ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die Vertretung dieser Arbeit gegenüber dem Department Chemie danken.

Des Weiteren möchte ich besonders Herrn PD Dr. R. Maas für die ständige Bereitschaft kritisch und helfend die verschiedenen Aspekte dieser Arbeit zu diskutieren und für die Motivation diese Arbeit voranzubringen danken.

Für die Unterstützung im Labor möchte ich Dr. Olaf Friese, PD Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer, Dr. Edzard Schwedhelm, Anna Steenpass, Sarah Homann, Yvonne Deutschmann, Mariola Kastner, Cornelia Wörmann, Arezoo Eslami und Mirja Reichel danken.

Allen hier nicht namentlich genannten Mitgliedern des Instituts, vor allem dem Probandenraum, möchte ich für den kollegialen Zusammenhalt, das hervorragende Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft danken.

Besonders danke ich meinen Eltern und Jörg dafür, dass sie mich jederzeit uneingeschränkt unterstützt haben.

