Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie,
Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie
der Universität Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

Entwicklung und Validierung eines Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)-Aktivitätsassays in Gewebehomogenat

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Department Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jing Tan-Andresen

Hamburg 2008

Genehmigt vom Department Chemie
der Falkultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
Auf Antrag von Herrn Prof. Dr. M. Korth
Weiterer Gutachter der Disseration: Prof. Dr. R. H. Böger

Tag der Disputation: 14.11.2008

1 Einleitung 1

1.1 NO, von Endothellzellen freigesetzter vasoprotektiver Faktor 1

1.2 NO-Synthase 2

1.2.1 Struktur und Funktion 2

1.2.2 N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin (ADMA), ein Inhibitor der NOS 3

1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung des ADMA 5

1.2.4 Entstehung von ADMA mittels Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT) 8

1.2.5 Freisetzung des ADMA mittels Proteolyse der methylierten Proteine 10

1.3 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) 10

1.3.1 Entdeckung des DDAH-Enzyms 10

1.3.2 Verteilung der DDAH-Isoformen 12

1.3.3 Regulation der DDAH-Aktivität 12

1.3.4 DDAH als Regulator des L-Arginin-NO-Weges 13

1.3.5 Bestimmung der DDAH-Aktivität 13

1.4 Arginase 14

1.4.1 Funktion der Arginase 14

1.4.2 Aktivitätsmessung der Arginase 16

1.5 Analytik von ADMA 16

2 Zielsetzung 20

3 Methoden 21

3.1 Synthese von N^G,N^G-[3,3,4,4,5,5-$^2H_6$]-Dimethyl-L-Arginin ([$^2H_6$]-ADMA) und N^G,N^G-[1,1,1,1´,1´,1´- $^2H_6$-Dimethylamino-1,2,3,4,5-$^{13}C_5$]- L-Arginin ([$^2H_6$$^{13}C_5$]-ADMA) .. 21

3.2 Quantifizierung von [$^2H_6$]-ADMA und [$^2H_6$$^{13}C_5$]-ADMA mit Hilfe der HPLC 22

3.3 Quantifizierung von Arginin, [$^{15}N_2$]-Arginin, ADMA, SDMA, [$^2H_6$]-ADMA und [$^2H_6$$^{13}C_5$]-ADMA mit Hilfe der LC-MS/MS 24

3.4 Verwendung der LC-MS/MS-Methode zur Messung der ADMA-, SDMA- und Arginin-Konzentration im Rahmen einer klinischen Studie 25

3.5 Quantifizierung von Arginin, [$^{15}N_2$]-Arginin, ADMA, SDMA, [$^{2}H_6$]-ADMA und [$^{2}H_6{}^{13}C_5$]-ADMA in hohem Durchlauf mit Hilfe der LC-MS/MS 26

3.6 Bestimmung der Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) in Gewebehomogenat 26

3.7 Arginase-Aktivitätsmessung 27

3.8 Bestimmung der Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) in menschlichem Vollblutlysat 28

3.9 Proteinbestimmung nach Bradford 28

3.10 Proteinbestimmung nach Lowry 29

3.11 Statistik 29

4 Ergebnisse 31

4.1 Entwicklung einer auf der Liquidchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-basierenten Methode zur Analyse des N^G,N^G-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) 31

4.1.1 Synthese, Charakterisierung und Quantifizierung des internen Standards N^G,N^G-[$^{2}H_6$]-Dimethyl-L-Arginin ([$^{2}H_6$]-ADMA) 31

4.1.2 Die Analyse der MS/MS-Spektren der Analyten 34

4.1.3 Validierung der LC-MS/MS-Methode zur Analyse des N^G,N^G-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in menschlichem Plasma 41

4.2 DDAH-Aktivitätsassay in Gewebehomogenat 48

4.2.1 Synthese, Charakterisierung und Quantifizierung des internen Standards N^G,N^G-[$^{5}C_{13}{}^{2}H_6$]-Dimethyl-L-Arginin ([$^{5}C_{13}{}^{2}H_6$]-ADMA) 48

4.2.2 LC-MS/MS-basierente Methode zur Analyse des N^G,N^G-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in hohem Durchsatz 49

4.2.3 Linearität des LC-MS/MS- Systems 50

4.2.4 Ermittlung einer optimalen Inkubationszeit 51

4.2.5 Ermittlung einer optimalen Proteinkonzentration 52

4.2.6 Ermittlung der optimalen Konzentration von [$^{2}H_6$]-ADMA 53

4.2.7 Einfluss von Proteaseinhibitoren 54
4.2.8 DDAH-Aktivität in Mausnierenhomogenat 58
4.2.9 DDAH-Aktivität in Mausleberhomogenat 59
4.2.10 Validierung des DDAH-Aktivitätsassays 60
4.2.11 Praktische Anwendung des DDAH-Aktivitätsassays 61
4.3 DDAH-Aktivitätsmessung in Vollblutlysat 62
4.4 Arginase-Aktivitätsmessung in Gewebehomogenaten 65
5 Diskussion 67
5.1 Bestimmung von L-Arginin, SDMA und ADMA mittels LC-MS/MS 67
5.2 Applikation der LC-MS/MS-Methode im 96-Wellsystem 73
5.3 Die Bestimmung der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)-Aktivität mittels der stabiler Isotopen-Technik im Vergleich zu herkömmlichem Verfahren 75
5.4 Bestimmung der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)-Aktivität mittels stabiler Isotopen -Technik in menschlichem Vollblutlysat 78
5.5 Bestimmung der Arginase-Aktivität mit stabiler Isotopen-Technik 80
6 Zusammenfassung 82
7 Summary 83
8 Abkürzungsverzeichnis 84
9 Literaturverzeichnis 87
10 Anhang 110
10.1 Material 110
10.1.1 Chemikalien 110
10.1.2 Puffer 113
10.1.3 Lösung 113
10.1.4 Tiere 114
10.1.5 Plasmaproben 114
10.1.6 Für LC-MS/MS verwendete Gase 114

10.1.7 Verbrauchsmaterial 114

10.1.8 Laborgeräte 116

11 Lebenslauf 117

12 Publikationen 118

13 Erklärung 120

14 Danksagung 121

Abbildung 1-1 Elektronentransfer innerhalb der NO-Synthase 3

Abbildung 1-2 Strukturformeln der L-Arginin und dessen Analoga 4

Abbildung 1-3 Entstehung von ADMA, L-NMMA und SDMA mittels PRMTs 9

Abbildung 1-4 Metabolisierung von ADMA zu L-Citrullin und Dimethylamin bzw. von L-NMMA zu L-Citrullin und Monomethylamin durch das DDAH-Enzym 11

Abbildung 1-5 Enzyme mit Arginin als Substrat 15

Abbildung 3-1 HPLC-Chromatogramm des Lösungsmittels (Wasser) 23

Abbildung 3-2 HPLC-Chromatogramm des synthetisierten [$^{2}H_{6}$]-ADMA mit Homoarginin als internem Standard 23

Abbildung 3-3 HPLC-Chromatogramm des synthetisierten [$^{2}H_{6}{}^{13}C_{5}$]-ADMA mit Homoarginin als internem Standard 24

Abbildung 4-1 Synthese des [$^{2}H_{6}$]-ADMA unter Anwendung eines Kupfer-L-[$^{2}H_{6}$]-Ornithin-Komplexes und Bromcyan-aktivierter Agarose 32

Abbildung 4-2 ESI+ Massenspektren der ADMA-Butylester (Oben) und [$^{2}H_{6}$]-ADMA-Butylester (Unten) 33

Abbildung 4-3 ESI positive MS/MS-Spektren von Butylester der L-Arginin (Oben) und L-[$^{2}H_{7}$]-Arginin (Unten), die Elternionen als Ausgangsionen für die Kollision werden mit $[M+H]^{+}$ bezeichnet: NL= Neutralteilchenverlust 36

Abbildung 4-4 ESI positive MS/MS-Spektren von Butylester der L-[$^{15}N_{2}$]-Arginin (Oben) und SDMA (Unten), die Elternionen als Ausgangsionen für die Kollision werden mit $[M+H]^{+}$ bezeichnet. NL= Neutralteilchenverlust 37

Abbildung 4-5 ESI positive MS/MS-Spektren von Butylester der ADMA (Oben) und [3,3,4,4,5,5-$^{2}H_{6}$]-ADMA (Unten), die Elternionen als Ausgangsionen für die Kollision werden mit $[M+H]^{+}$ bezeichnet. NL= Neutralteilchenverlust 38

Abbildung 4-6 ESI positive MS/MS-Spektren von Butylester des [1,1,1,1´,1´,1´-$^{2}H_{6}$]-[Dimethylamino-1,2,3,4,5-$^{13}C_{5}$]-Arginin([$^{2}H_{6}$]-[$^{13}C_{5}$]-ADMA). Die Mutterionen als Ausgangsionen für die Kollision werden mit $[M+H]^{+}$ bezeichnet. NL= Neutralteilchenverlust 39

Abbildung 4-7 Etablierte Mechanismen für die Entstehung der charakteristischen Tochterionen m/z 70 für Arginin-Butylester(A), m/z 214 für ADMA-Butylester(B obern), m/z 228 für

SDMA-Butylester(B untern). Alle Mutterionen entstanden durch ESI+ und gelangen über Kollision mit Argon Gas zu Tochterionen 40

Abbildung 4-8 Standardkurven von Arginin, ADMA und SDMA mit MS/MS &MS in Wasser. Zugegeben waren 5 µl interner Standard mit [$^2H_6$]-ADMA (2µmol/l)& [$^2H_7$]-Arginin (50µmol/l) (Mittelwert±SD, n=5)..... 43

Abbildung 4-9 LC-MS/MS-Chromatogramm von menschlichem Plasma, die Peaks von oben bis unten sind in der Reihenfolge L- Arginin, [$^2H_7$]-L-Arginin (interner Standard), ADMA, SDMA und [$^2H_6$]-ADMA (interner Standard). Zu 50µl menschlichem Plasma wurde 5µl interner Standard, welcher 50µmol/l L- [$^2H_7$]-Arginin und 2µmol/l [$^2H_6$]-ADMA enthielt, zugegeben. Alle Verbindungen wurden durch ihre spezifischen Mutterionen und Tochterionen selektiert. Scanfrequenz war 1 Sekunde, ESI+ (Elektronspray-Ionisation), MRM („*multiple-reaction monitoring*“)..... 44

Abbildung 4-10 ESI+ Massenspektren der ADMA-Butylester (Unten) und [$^5C_{13}{}^2H_6$]-ADMA-Butylester (Oben) 49

Abbildung 4-11 LC-MS/MS-Chromatogramm von Nierenhomogenat von Mäusen, die Peaks von oben bis unten sind in der Reihenfolge L- Arginin, [$^2H_7$]-L-Arginin (interner Standard), ADMA, SDMA, [$^2H_6$]-ADMA (10 µM) und [$^{13}C_5{}^2H_6$]-ADMA (interner Standard). Zu 100 µl internem Standard, welcher 5 µmol/l L- [$^2H_7$]-Arginin und 1µmol/l [$^{13}C_5{}^2H_6$]-ADMA enthielt, wurden 20 µl Nierenhomogenat, zugegeben. Alle Verbindungen wurden durch ihre spezifische Mutterionen und Tochterionen selektiert. Scanfrequenz war 0,97 Sekunde, ESI+ (Elektronspray-Ionisation), MRM („*multiple-reaction monitoring*“)..... 50

Abbildung 4-12 Standardkurve [$^2H_6$]-ADMA/[$^{13}C_5{}^2H_6$]-ADMA mit LC-MS/MS im Wasser (Mittelwert±SD, n=3)..... 51

Abbildung 4-13 Abbau [$^2H_6$]-ADMA in % der Ausgangskonzentration unter Inkubation mit L-Citrullin und L-Arginin nach 10 und 60 Minuten (Mittelwert±SEM), n=8, *P<0,05 vs Kontrolle..... 52

Abbildung 4-14 Abbau [$^2H_6$]-ADMA (20 und 60 µM) in % der Ausgangskonzentration von 0,3-20 g/l Proteinkonzentrationen im Leberhomogenat von Mäusen , Mittelwerte ± SEM (n=4) 53

Abbildung 4-15 Abbau ADMA in % der Ausgangskonzentration von 1-300 µM [$^2H_6$]-ADMA nach einer Stunde im Mausnierenhomogenat unter Inkubation mit 100µM L-NMMA (Mittelwert±SEM, n=4) *p<0,05..... 54

Abbildung 4-16 Prozentuelle Änderung der Konzentration von endogen SDMA in Anwesenheit und Abwesenheit eines Proteaseinhibitor-Cocktails (PIK) nach 1-60 Minuten (Mittelwert±SD, n=3) 55

Abbildung 4-17 Prozentuelle Änderung der Konzentration von endogen ADMA in Anwesenheit und Abwesenheit eines Proteaseinhibotor-Cocktails(PIK) nach 1-60 Minuten. (Mittelwert±SD, n=4) 55

Abbildung 4-18 Prozentuelle Änderung der Konzentration von endogen L-Arginin in Anwesenheit und Abwesenheit eines Proteaseinhibotor-Cocktails(PIK) nach 0-60 Minuten (Mittelwert±SD, n=6) 56

Abbildung 4-19 Prozentuelle Konzentration von exogen [$^2H_6$]-ADMA in Anwesenheit und Abwesenheit eines Proteaseinhibitor-Cocktails (PIK) nach 0, 10, 30 und 60 Minuten (Mittelwert±SD, n=6) 56

Abbildung 4-20 Abbau [$^2H_6$]-ADMA (3µM) in % der Ausgangskonzentration in An- und Abwesenheit des DDAH Substrates L-NMMA (500µM) nach 0-60 Minuten (Mittelwert±SD, n=6), * =P<0,001 vs Kontrolle 57

Abbildung 4-21 % Neubildung von ADMA in An- und Abwesenheit des DDAH Substrates 500µM L-NMMA (zur kompetitven Enzymhemmung), Mittelwert±SD, n=6, * =P<0,001 vs Kontrolle 58

Abbildung 4-22 Abbau von [$^2H_6$]ADMA pro Minute in An- und Abwesenheit von unmarkiertem ADMA zum Nachweis einer kompetitiven Enzymhemmung, Mittelwert±SEM, n=6, *P<0.05 vs Kontrolle, KT=Kontrolle 59

Abbildung 4-23 Abbau von [$^2H_6$]ADMA pro Minute im Leberhomogenat in An- und Abwesenheit von Citrullin und L-Arginin (Mittelwert±SEM, n=6 oder 5), *P<0.05 vs Kontrolle 60

Abbildung 4-24 10 µM [$^2H_6$]-ADMA in 5-fach verdünnten Mausgeweben wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Veränderung der [$^2H_6$]-ADMA-Konzentration wurde proteinbezogen auf nmol/g Protein/min berechnet. 62

Abbildung 4-25 Endogenes ADMA in Vollblutblysat unter Inkubation mit und ohne Proteaseinhibitor-Cocktail (1:20 Verdünnung) nach 4 Stunden (Mittelwert ± SEM, n=8) 63

Abbildung 4-26 Endogenes SDMA in Vollblutblysat unter Inkubation mit und ohne Proteaseinhibitor-Cocktail (1:20 Verdünnung) nach 4 Stunden (Mittelwert ± SEM, n=8) 63

Abbildung 4-27 Prozentueller Abbau von 20µM [$^{2}H_6$]-ADMA in Vollblutlysat nach 0,5, 1 und 4 Stunden (Mittelwert ± SEM, n=8) 64

Abbildung 4-28 [$^{15}N_2$]-Arginin nach 0, 20 und 60 Minuten in Mausnierenhomogenat (Mittelwert±SEM, n=6) 66

Abbildung 4-29 50µM [$^{15}N_2$]-Arginin in Mausleberhomogenat (1:6 m/m Verdünnung in PBS) nach 3, 20, 60 Minuten 66

Abbildung 4-30 50µM [$^{15}N_2$]-Arginin in Mausleberhomogenat (1:400 m/m Verdünnung in PBS) nach 0 und 30 Minuten. (Mittelwert±SEM, n=17) 67

Abbildung 5-1 Infusionssystem nach HPLC-Säule, mobile Phase und Plasmaextrakt wurden in das HPLC-System injiziert. ADMA, SDMA oder Arginin wurden kontinuierlich durch Infusion hinter der Säule zugemischt. Die Mischung wurde gemeinsam in das Massenspektrometer (MS)-Gerät eluiert. 73

Abbildung 5-2 LC-MS/MS Analyse der kontinuierlichen Infusion von L-Arginin-, ADMA- und SDMA-Butylester nach Injektion von 10µl bearbeitetem Plasmas zeigte Ionensuppression. (m/z 259>214 für ADMA-Butylester, m/z 259>228 für SDMA-Butylester, 231>70 für Arginin-Butylester) Nach E. Schwelhelm et al. 2007 74

Tabelle 3-1 Übergänge der Butylester aller Verbindungen über Kollision mit Argon Gas 25

Tabelle 4-1 Mutterionen und Tochterionen der verschiedenen Butylester von Arginin und dessen methylierten Derivaten 35

Tabelle 4-2 Validierung der LC-MS/MS-Methode für die quantitative Bestimmung von L-Arginin, ADMA und SDMA in menschlichem Plasma. 45

Tabelle 4-3 Plasma ADMA, Arginin, SDMA Werte aus 24 gesunden Probanden..... 47

Tabelle 4-4 Validierung von DDAH-Aktivitätsassay in Manusnieren-Homogenat 60

Tabelle 4-5 Validierung der DDAH-Aktivitätsassay in Mausleber-Homogenat 61

Tabelle 5-1 Publizierte Mittelwerte der Konzentration von ADMA in Plasma oder Serum in gesunden Probanden..... 68

1 Einleitung

1.1 NO, von Endothellzellen freigesetzter vasoprotektiver Faktor

Der Pharmakologe Furchgott wies im Jahr 1980 nach, dass der Neurotransmitter Acetylcholin nur dann eine Erweiterung der Blutgefäße auslöste, wenn das Endothel gesund war. Er folgerte, dass die Endothelzellen einen Stoff produzieren, der eine Entspannung der Muskelzellen in den Gefäßen bewirkte. Diesen Stoff nannte er nach seiner Herkunft EDRF, „endothelium-derived relaxing factor“. 1986 wiesen Furchgott und Ignarro nach, dass es sich dabei um Stickstoffmonoxid (NO) handelte (Furchgott 1995).

In den Endothelzellen der Gefäße wird NO durch Abspaltung von der Aminosäure L-Arginin mittels eines Enzyms (NO-Synthase) gebildet (Förstermann et al. 1994). Auslösende Reize sind körpereigene Substanzen, wie z.B. Acetylcholin, Noradrenalin oder auch Scherkräfte des Blutes. Die "Lebensdauer" von NO ist im Körper relativ kurz. Innerhalb von wenigen Sekunden reagiert es mit Sauerstoff-Molekülen zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-). Wegen der Kurzlebigkeit wird NO immer unmittelbar an seinem Wirkort gebildet.

Im Gefäßsystem ist NO an zahlreichen regulatorischen Vorgängen beteiligt (Moncada et al. 1993). NO ist in erster Linie ein potenter Vasodilatator, zudem wirkt NO als endogener Thrombozyten-Aggregationshemmer (Radomski et al. 1987). Es hemmt auch die Monozytenadhäsion am Endothel und die Proliferation glatter Gefäßmuskulatur (Garg et al. 1989). Ferner reduziert NO freie Sauerstoffradikale und hemmt die LDL-Oxidation.

Im Nervensystem dient NO als Transmitter. Während es im zentralen Nervensystem an Gedächtnisfunktionen beteiligt ist, reguliert NO in der Peripherie die gastrointestinalen, respiratorischen und urogenitalen Funktionen (Moncada et al. 1993).

In Makrophagen wird NO gebildet, das aufgrund seiner starken „Reaktionsfreudigkeit“ in der Lage ist, Bakterien zu zerstören. Angeregt von Bakterienbestandteilen (z.B. Lipopolysacchariden) produzieren Makrophagen NO in hohen Konzentrationen, so dass lebenswichtige eisenhaltige Enzyme in Zielzellen blockiert werden (Tamir et al. 1996). Ferner ist NO in der Pathogenese des septischen Schocks involviert (Moncada et al. 1993).

Die Wirkung des NO im Gefäßsystem beruht im Wesentlichen auf der Aktivierung der löslichen Guanylcyclase und nachfolgender Bildung von cGMPs als sekundärem Botenstoff in den Zielzellen (Ignarro et al. 1982).

1.2 NO-Synthase

1.2.1 Struktur und Funktion

NO-Synthase (NOS) katalysiert die Oxidation von Arginin zu NO und L-Citrullin, mit der Beteiligung von NADPH und O_2. NOS besteht aus einer N-terminalen Oxygenase-Domäne mit Bindungsstellen für Häm, Tetrahydrobiopterin (BH4), L-Arginin und einer C-terminalen Reduktase-Domäne mit Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH (s. Abbildung 1-1). Zwischen den beiden Domänen liegt die Calmodulin-Bindungsstelle (Andrew et al. 1999). Drei Isoformen von NO-Synthasen wurden entdeckt (Andrew et al. 1999). Die endotheliale NOS (eNOS) wird konstitutiv in vaskulären Endothelzellen exprimiert (Wendy K et al. 2001), während die neuronale NOS (nNOS) konstitutiv im Nervensystem aber auch in Gefäßmuskelzellen exprimiert wird (Papapetropoulos et al. 1999). Die induzierbare NOS (iNOS) liegt nicht konstitutiv vor, ist aber in verschiedenen Zellen und Geweben durch bakterielle Endotoxine und Zytokine induzierbar (Papapetropoulos et al. 1999). Da die iNOS an Calmodulin gebunden vorliegt, ist sie von Ca^{2+}-Konzentration unabhängig (Pollock et al. 1993). eNOS und nNOS werden durch erhöhte Ca^{2+}-Konzentration und den daraus resultierenden Ca^{2+}/Calmodulin-Komplex aktiviert (Andrew et al. 1999). Der Vorgang läuft wie folgt ab: Die NOS hydroxyliert den Guanidino-Stickstoff von Arginin, um ein an das Enzym gebundene Zwischenprodukt N-Hydroxy-L-Arginin (NOHA) herzustellen. NOHA wird dann weiter zu NO und L-Citrullin oxidiert. Die NO-Synthasen von Säugetieren haben ähnliche Strukturen, sie sind Homodimere, Häm-Gruppe enthaltende Flavoproteine. Das Flavin überträgt das von NADPH ausgegangene Elektron zur Häm-Gruppe. Das ermöglicht der Häm-Gruppe, ein Sauerstoffmolekül in der NO-Synthese zu binden und zu aktivieren. BH_4 fungiert als ein Kofaktor, welche in Nachbarschaft zur Häm-Gruppe in NOS gebunden wird (Crane B et al. 2000). BH_4 agiert wie ein struktureller Bestandteil der NOS und übernimmt die Redox-Funktion (Wei et al. 2003). Die Elektronenübertragung der NOS wird vom Calciumbindungsprotein (Calmodulin) reguliert.

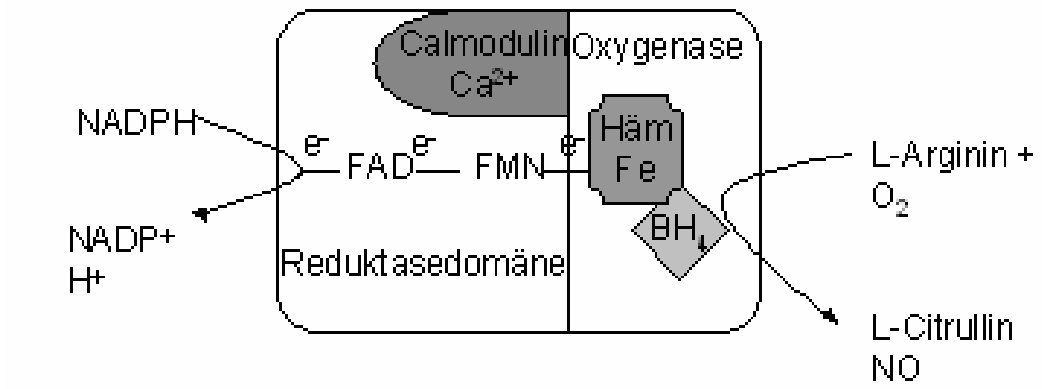


Abbildung 1-1 Elektronentransfer innerhalb der NO-Synthase

Unter normalen Bedingungen ist NO vasoprotektiv. Wenn der NOS-Signalweg dysreguliert ist, kann die NOS sogar zur vaskulären Pathophysiologie beitragen. NOS kann selber Superoxidanionen bilden. NOS überträgt Elektronen auf den Sauerstoff und erzeugt dabei Superoxidanionen, wenn die Verfügbarkeit des NOS-Substrates L-Arginin oder des BH_4 herabsetzt ist (Pou et al. 1992, Stroes et al. 1997, Xia et al. 1998, Pritchard et al. 1995, Vasquez-Vivar et al. 1998).

Mäuse, die defizient für alle 3 Isoformen der NOS sind (Tripel-Knockout), zeigen einen ausgeprägten vaskulären Phänotyp, der durch frühzeitige Arteriosklerose und Myokardinfarkte gekennzeichnet ist (Nakata et al. 2008).

1.2.2 N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin (ADMA), ein Inhibitor der NOS

Zu endogenen NOS-Inhibitoren zählen N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) und N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA). Beide Substanzen können konzentrationsabhängig L-Arginin von seiner Bindungsstelle an NOS verdrängen (Vallance et al.. 1992). Bei ADMA handelt es sich um eine Aminosäure, bei der im Vergleich zu L-Arginin der Stickstoff der Guanidinogruppe zweifach methyliert wurde. Es entsteht dabei zwar kein Asymmetriezentrum, in der medizinischen Fachliteratur wird aber trotzdem traditionell der Begriff **a**symmetrisches **Di****m**ethyl-L-**A**rginin (ADMA) verwendet. Das Strukturisomer von ADMA, das an den beiden unterschiedlichen Stickstoffatomen der Guanidinogruppe mit Methylgruppe substituiert wurde,

wurde in diesem Zusammenhang meist als **s**ymmetrisches **Dim**ethyl-L-**A**rginin (SDMA) bezeichnet (Abbildung 1-2).

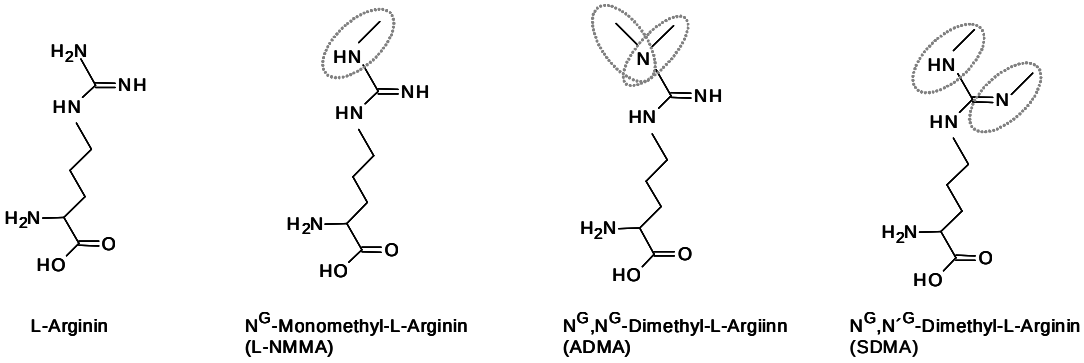


Abbildung 1-2 Strukturformeln der L-Arginin und dessen Analoga

ADMA entsteht grundsätzlich in allen Zellen. Mittels des Enzyms Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) wird ADMA entweder intrazellulär zu L-Citrullin und Dimethylamin metabolisiert oder aus den Zellen ins Plasma mittels kationischer Aminosäuretransporter „*cationic amino acid transporter*“ (CAT) exportiert. CAT ist verantwortlich für die Aufnahme und den Export des ADMA aus den Zellen (Teerlink et al. 2005). ADMA wird vermutlich überwiegend in Nieren und Leber mittels DDAH metabolisiert, teilweise aber auch direkt über die Nieren ausgeschieden. (Teerlink et al. 2005). Daten aus experimentellen Studien weisen darauf hin, dass ADMA die vaskuläre NO-Produktion in physiologischer und pathophysiologischer Konzentration hemmt. (Vallance et al. 1992, Faraci et al. 1995). Die halbmaximale Hemmung (IC_{50}) von ADMA an der NO-Synthese beträgt in zerebellaren Homogenaten von Ratten 1,8 µM (Faraci et al. 1995). Die IC_{50}-Werte von L-NMMA liegen für alle Isoformen der NOS zwischen 2-5 µM (Vallance et al. 1992).

ADMA ist ein effektiver Inhibitor der NOS (Vallance et al. 1992), SDMA ist kein Inibitor für NOS (Ogawa et al. 1989). Inhibition der NOS-Aktivität mittels L-NMMA und ADMA wird durch Zugabe von Arginin aufgehoben. Die ADMA-Konzentration im Blut von gesunden Menschen liegt zwischen 0,3-1,0 µM (Tabelle 3-1), aber bei vielen Krankheiten wurde über erhöhte ADMA-Konzentrationen berichtet (Böger et al. 1998, 2000, 2003, Achan et al. 2003, Zoccali et al. 2001, Lin et al.2002).

1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung des ADMA

1.2.3.1 ADMA als mögliche Ursache der Endotheldysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion ist allgemein definiert als Einschränkung bzw. Verlust der endothelvermittelten physiologischen Vasodilatation. Die Endotheldysfunktion ist ein prognostischer Marker für das Risiko zukünftiger kardiovaskulären Ereignisse und den Tod (Schächigner et al. 2000, Heitzer et al. 2001). Tierexperimentelle Studien zeigen, dass die Hemmung der NO-Synthese mittels synthetischer NOS-Inhibitoren wie N^{G-}Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) die Entstehung arteriosklerotischer Plaques beschleunigt, wobei die Gabe von L-Arginin diesem entgegen wirkt (Cayatte et al. 1994, Candipan et al. 1996, Böger et al. 1995, Böger et al. 1997). Dies spricht für einen kompetitiven Mechanismus aufgrund reduzierter Aktivität des NO-Synthese-Signalweges.

Die endogenen NOS-Inhibitoren ADMA und N-Monomethylarginin (L-NMMA) beeinträchtigen die NO-Synthese bedeutsam. Weil die ADMA-Konzentration in Plasma 5-10-fach höher als L-NMMA vorliegt (Vallance et al. 1992), haben sich viele Studien auf ADMA konzentriert.

ADMA wurde von Vallance und Kollegen 1992 erst als endogener Inhibitor der NOS bei Patienten mit Niereninsuffizienz beschrieben (Vallance et al. 1992). Chronische Niereninsuffizienz ist mit einer vorzeitigen Arteriosklerose und mit einem deutlich erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert.

Es wurde über erhöhte ADMA-Konzentrationen im Zusammenhang mit Arteriosklerose, Risikofaktoren wie Alter, Hypertonie, Diabetes, Insulinresistenz, Hypercholesterolämie, Hypertriglyceridämie und Hyperhomocysteinämie in zahlreichen Veröffentlichungen berichtet (Böger et al. 1998, 2000, 2003, Achan et al. 2003, Zoccali et al. 2001, Lin et al.2002).

Hinweise für einen kausalen Zusammenhang zwischen erhöhten ADMA-Werten und Störungen der Endothelfunktion ergaben sich aus Probandenstudien, bei denen die Infusion von ADMA unter anderem zu einer Störung der Endothelfunktion und zu einem Anstieg des Blutdrucks führten (Vallance et al.1992, Kielstein et al.2005).

Könnte eine erhöhte ADMA-Konzentration die Synthese des vasoprotektiven NO einschränken und so für eine Beschleunigung der Arteriosklerose verantwortlich sein?

Ein Beweis dafür, dass eine erhöhte ADMA-Konzentration im Plasma im Zusammenhang mit der Hemmung der NO-Synthese steht, zeigt auch folgende Studie.

Bei Patienten mit Hypercholesterolämie korrelierten erhöhte ADMA-Werte umgekehrt mit der endothelabhängigen Vasodilatation beim Unterarm. Eine intravenöse Infusion von L-Arginin stellte die Endothelfunktion wieder her und erhöhte die NO-Produktion, welche durch Nitrat-Exkretion bestätigt wurde (Böger et al. 1998).

1.2.3.2 ADMA beeinflusst die vaskuläre Struktur

Erhöhte ADMA-Werte stehen im Zusammenhang mit einer reduzierten NO-Synthese und könnten als eine Verbindung zur Progression von vaskulären Krankheiten bei vielen bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren fungieren.

ADMA kann mittels Hemmung der endothialen NOS-Aktivität sowohl die vaskuläre Struktur als auch die vaskuläre Reaktivität reduzieren. Verletzte und mit Endothelzellen wiederbeschichtete Blutgefäße wiesen eine erhöhte intrazelluläre ADMA-Konzentration und eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation auf (Weidinger 1990, Masuda et al. 1999). In einer klinischen Studie erhielten Patienten, bei denen im Rahmen einer koronaren Angioplastie Stents platziert wurden, eine intramurale Abgabe von L-Arginin oder Placebo. Ein intravaskulärer Ultraschall nach 6 Monaten zeigte eine 36 %ige Reduktion des neointimalen Volumens bei den mit L-Arginin behandelten Patienten (Suzuki et al. 2002).

Wenn Endothelzellen mit einer pathophysiologisch relevanten Konzentration von ADMA versetzt wurden, konnte eine reduzierte NO-Synthese, eine erhöhte Superoxidproduktion und Monocytenadhäsion an Endothelzellen beobachtet werden (Böger et al. 2000).

ADMA scheint auch die Interaktion zwischen Endothel und Monozyten zu fördern. Mononukleare Zellen von Personen mit Hypercholesterolämie erwiesen sich als hyperadhäsiv, dieses Phänomen korrelierte positiv mit der ADMA-Konzentration im Plasma. Durch Gabe von L-Arginin konnte die Adhäsionsneigung abgemildert werden (Chan et al. 2000). Ähnlicherweise waren Blutplättchen von Menschen und Tieren mit Hypercholesterolamie hyperreaktiv, was durch Zugabe von L-Arginin aufgehoben werden konnte (Tsao et al. 1994, Wolf et al. 1997). Diese Befunde passen zu der vorherigen Beobachtung, dass bei Tieren und Menschen mit Hypercholesterolämie eine Zugabe von L-Arginin die NO-Synthese wiederherstellt und die Interaktion zwischen Endothel und Monozyten reduziert wurde (Tsao et al. 1994, Adams 1997).

Die Intima-Media-Dicke der A. carotis dient als ein Ersatzmarker für die Progression der Arteriosklerose. ADMA-Spiegel korrelierten mit der Intima-Media-Dicke in einer Studie von 116 klinisch gesunden Menschen ohne sichtbare Anzeichen von koronarer oder peripherer

Arterienkrankheit (Miyazaki et al. 1999). In dieser Studie waren ADMA-Werte positiv mit dem Alter, dem Mittelwert des arteriellen Drucks und der Glukose-Toleranz korreliert. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch bei einer Gruppe von 90 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gemacht werden (Zoccali et al. 2002). ADMA war bei diesen Patienten hoch signifikant mit der Intima-Media-Dicke der A. Carotis korreliert. Zusätzlich stellten ADMA und C-reaktives Protein als unabhängige Risikomarker für die Progression von Intimaläsion bei Patienten mit anfangs normaler Intima-Media-Dicke dar. In ähnlicher Weise korrelierte die Intima-Dicke in Arterien des Uterus mit ADMA-Konzentration im Plasma (Beppu et al. 2002).

Insgesamt steht die ADMA-Konzentration im Plasma als ein Faktor, der die vaskuläre Struktur nachteilig beeinflusst, im Zusammenhang mit kardiovaskulären Komplikationen sowie Schlaganfall, kongestiver Herzinsuffizienz oder peripherer Arterienkrankheit (Yoo et al. 2001, Usui et al. 1998, Böger et al. 1998). Bei peripheren Arterienkrankheiten korrelierte sich ADMA-Konzentration im Plasma positiv mit dem Schweregrad der Krankheit (Böger et al. 1997, Schulze et al 2006).

1.2.3.3 ADMA als kardiovaskulärer Risikomarker

In einer prospektiven Studie an 225 Hämodialyse-Patienten mit einer durchschnittlichen Nachbeobachtungsphase von 33,4 Monaten waren ADMA und Alter die stärksten prädiktiven Risikomarker von kardiovaskulären Ereignissen und Gesamtsterblichkeit. Im Vergleich zum niedrigsten ADMA Quartil hatten Patienten mit einer ADMA-Konzentration im höchsten Quartil ein 3-fach erhöhtes Sterberisiko (Zoccali et al. 2001).

In einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie von 150 Nichtrauchern in Finnland hatten die Probanden mit Plasma-ADMA-Werten im obersten Quartil ein 3.9-fach erhöhtes Risiko für akute koronare Ereignisse als die Probanden in den anderen Quartilen (Valkonen et al. 2001). In einer anderen prospektiven Studie haben Lu et al. die Bedeutung von ADMA-Konzentrationen bei Patienten mit stabiler Anginapectoris nach Koronarinterventionen untersucht. 153 Patienten wurden 16 Monate lang beobachtet, 51 große kardiovaskuläre Fälle ereigneten sich während der Nachbeobachtungsphase. In einer multifaktoriellen Cox´-Regressionsanalyse stellte ein steigender ADMA-Wert einen unabhängigen Risikomarker für Herzinfarkt dar (Lu et al. 2003).

In einer Multizenter-Fall-Kontroll-Studie mit 816 Patienten mit koronaren Arterienkrankheiten und Kontrollen, haben unsere Arbeitsgruppe ADMA als aussagekräftigsten Marker identifiziert, um zwischen Fall und Kontrolle zu unterscheiden (Böger et al. 2004).

Nijveldt et al. haben ADMA als den stärksten prediktiven Marker der Todesrate von Patienten auf Intensivstationen identifiziert. Eine 17-fache höhere Mortalität lag bei Patienten mit ADMA-Konzentrationen im höchsten Quartil im Vergleich zu Patienten im niedrigsten Quartil vor (Nijveldt et al. 2003).

Schnabel et al. haben eine Studie mit 1874 Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) veröffentlicht. Patienten mit ADMA-Konzentrationen im Plasma im höchsten Quartil hatten im Vergleich zu Patienten im niedrigsten Quartil ein 2,48-fach höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und Tod. Insgesamt war ADMA der stärkste prediktive Risikomarker. Diese Studien deuten darauf hin, dass ADMA als ein neuer kardiovaskulärer Risikomarker angesehen werden kann.

1.2.4 Entstehung von ADMA mittels Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT)

Eine Methylierung von L-Arginin in basischen Myelinproteinen, Hitzeschockproteinen und nukleolären Proteinen mittels Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT) ist seit einigen Jahren bekannt (Paik et al. 1968). Proteinmethylierung wurde als analoges Phänomen zur Proteinphosphorylierung in der Regulierung von Proteinfunktion angedeutet (Clarke 1993). Die Methylierung von Proteinen ist allgemein ein einseitiger Prozess und methyliertes Arginin bleibt als Bestandteil der Proteine, bis es mittels Proteolyse freigesetzt wird (Kakimoto et al. 1970). Die Proteinmethylierung ist ein hoch regulierter Prozess. Pawlak et al. demonstrierten die embryonale Letalität von der PRMT-1-Knockout Mäusen, dies zeigt die Wichtigkeit von PRMT1 im frühen Entwicklungsstadium der Mäusen (Pawlak et al. 2000). Heutzutage geht man von mindestens 7 PRMT-Genen aus. Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Subtypen der PRMT, Typ I-PRMT und Typ II-PRMT. Beide Typen der PRMT verwenden S-Adenosylmethionin als Methylspender. Als Folge der Übertragung der Methylgruppe bleibt S-Adenosylhomocystein übrig (Abbildung 1-3). Typ II-PRMT katalysieren die Entstehung von L-NMMA und SDMA, während Typ I-PRMT die Entstehung von ADMA und L-NMMA katalysieren. PRMT 1-4 sind Typ I- und PRMT 5 und 7 sind Typ II-Enzyme. PRMT 1,2,4,6 befinden sich überwiegend im Zellkern, während die PRMT 3 und 5 überwiegend in Zytosol vorhanden sind. Die interzellulären Lokalisationen von PRMT-Isoformen werden je nach der Lokalisation der Substratproteine und als Antwort auf extrazelluläre Anreize reguliert (Lin et al. 1996). Viele nukleare Proteine wurden als Substrate für Typ I-PRMT identifiziert. Sie enthalten vermehrte Methylarginin. Zum Beispiel enthalten nukleare Proteinfibrillen etwa 4 % ADMA und „*heterogeneous ribonucleoprotein particles*“ (hnRNPs)-Komplex etwa 1 % ADMA.

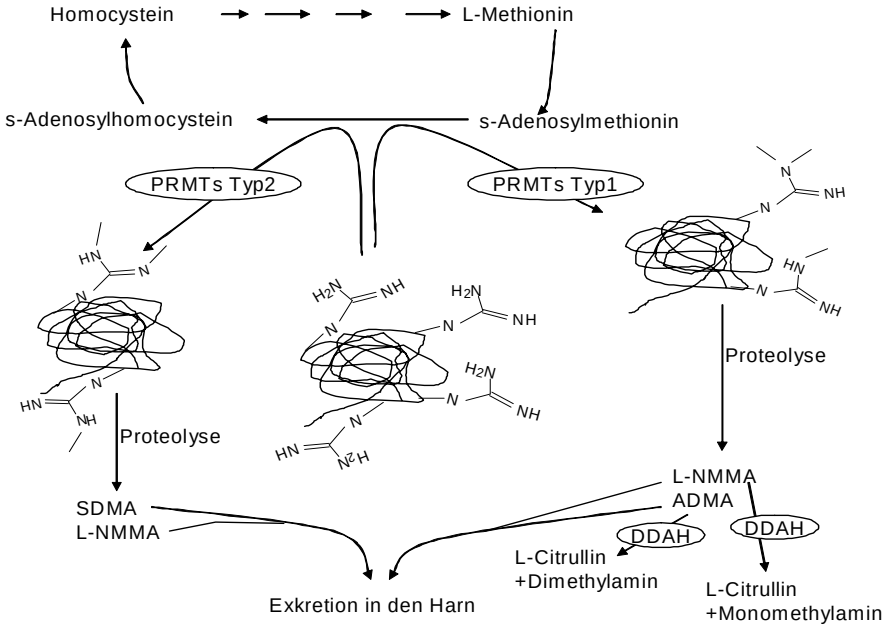


Abbildung 1-3 Entstehung von ADMA, L-NMMA und SDMA mittels PRMTs

1.2.4.1 Reversibilität der Protein-Arginin-Methylierung

Die Protein-Arginin-Methylierung wurde generell als irreversiblen Prozess bezeichnet, weil die demethylierenden Enzyme in eukaryotischen Zellen schwer fassbar sind. Zwei Forschungsgruppen haben über die hydrolytische Spaltung von monomethyliertem Arginin (Deiminierung) in Histonprotein berichtet (Wang et al. 2004, Cuthbert et al. 2004). Monomethylarginin ist ein Zwischenprodukt der ADMA-Synthese, daher beeinträchtigt die Deiminierung die ADMA-Synthese. Streng genommen ist diese Aktion keine Umkehr der Arginin-Methylierung, weil dessen Produkt L-Citrullin statt L-Arginin ist.

Möglichweise handelt es sich bei der Arginin-Methylierung um sehr dauerhafte Modifikation, die nur unter speziellen Umständen durch Abspaltung des methylierten Guanidino-Stickstoffs entfernt werden kann.

1.2.5 Freisetzung des ADMA mittels Proteolyse der methylierten Proteine

ADMA wird bei der Proteolyse von methylierten Proteinen ins Zytoplasma freigesetzt. Proteolyse führt zum vollständigen Abbau von Proteinen zu freien Aminosäuren, die wiederum für die neue Proteinsynthese zur Verfügung stehen. Aminosäuren, die posttranslational modifiziert wurden, können nicht für die Proteinsynthese wieder verwendet werden und werden entweder ausgeschieden oder metabolisiert. Der Proteinumsatz im Körper wurde auf 300 g pro Tag geschätzt (Achan et al. 2003). Die einzelnen Proteine werden in unterschiedlichem Maße abgebaut, die Halbwertszeit beträgt wenige Minuten bis mehrere Jahre (Glickman et al. 2002).

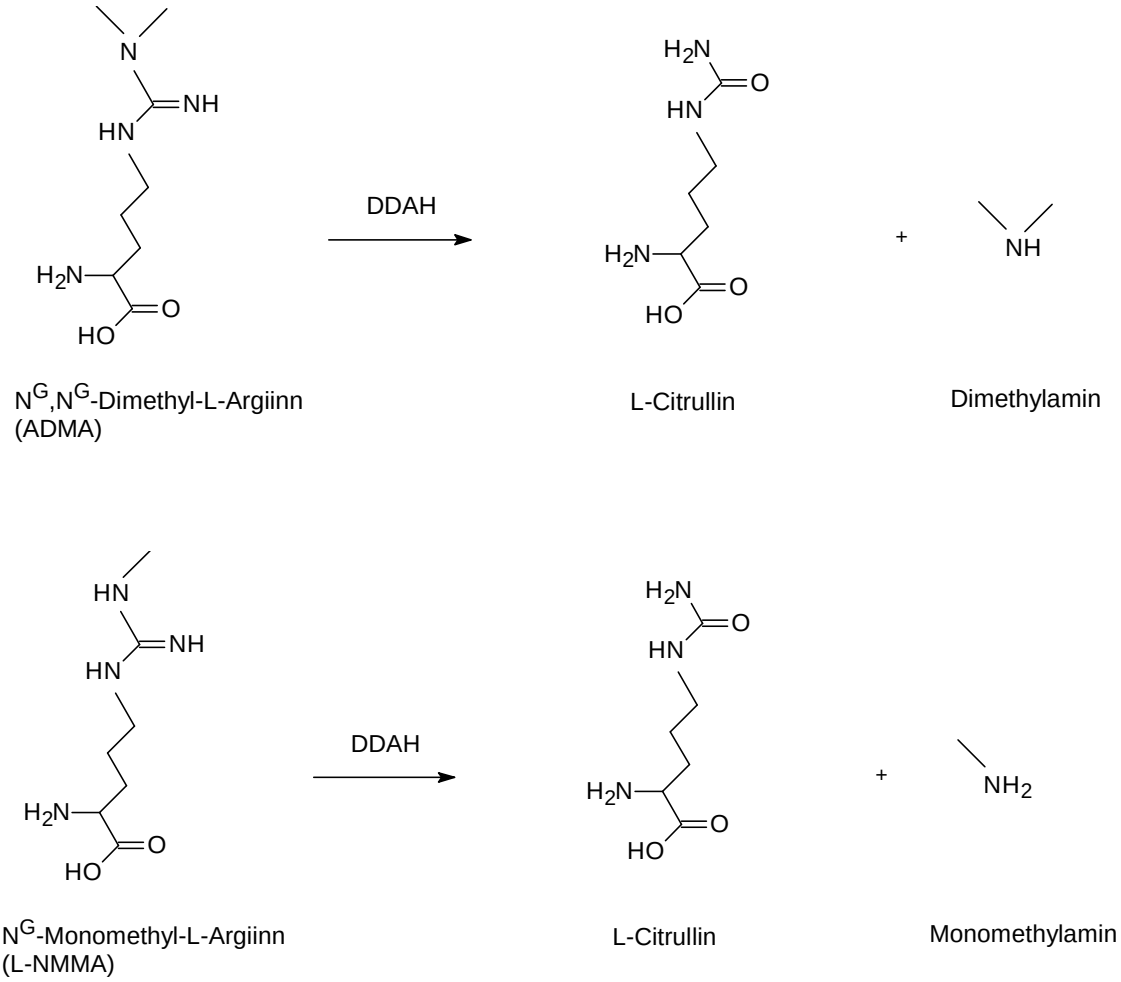
1.3 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)

1.3.1 Entdeckung des DDAH-Enzyms

Es wurde lange angenommen, dass ADMA, L-NMMA und SDMA im Körper keinen weiteren metabolischen Weg durchlaufen und nur renal ausgeschieden werden. Man hat postuliert, dass diese Aminosäuren einen Index für den Abbau spezieller Proteine darstellten (Carnegie et al. 1977, Low. 1979, Yudkoff et al. 1984). Erst im Jahr 1987 haben Ogawa und seine Arbeitsgruppe ein Enzym entdeckt, das ADMA und L-NMMA direkt in L-Citrullin und Dimethylamin bzw. Monomethylamin umwandelt (Abbildung 1-4). Ein Kofaktor wird für die Reaktion nicht benötigt. Im Jahr 1988 hat Ogawa das DDAH-Enzym aus Rattennieren gewonnen, gereinigt und dessen Eigenschaften untersucht. Die natürliche DDAH hat ein Molekulargewicht von etwa 33 kDa. Ogawa stellte fest, dass die Reaktion von ADMA zu L-Citrullin und Dimethylamin irreversibel ist. Knipp hat über die Zink(II)-Haltigkeit der DDAH berichtet, Zn(II) ist nicht an dem katalytischen Prozess beteiligt, es dient lediglich der Enzymstabilität in einer aktiven Form (Knipp et al. 2001). Vallance und Leiper et al. veröffentlichten, dass DDAH intrazellulär ADMA metabolisiert, während SDMA kein Substrat für dieses Enzym darstellt (Leiper et al. 1999,Tran et al. 2003). Den Grund dafür haben Murray-Rust et al. beschrieben. Die DDAH-I besitzt eine Bindungstasche im aktiven Zentrum für den nicht methylierten Stickstoff der Guanidinogruppe. SDMA passt wegen seinen Methylgruppen an den beiden Stickstoffen der Guanidinogruppe nicht sterisch bzw. elektrostatisch in die Bindungstasche (Murray-Rust et al. 2001). Einen anderen Beweis, dass ADMA einer Elimination mittels DDAH unterliegt, demonstrierten zahlreiche Studien mit Hämodialyse-Patienten. Bei diesen Patienten stiegen die SDMA-Werte höher als die ADMA-Werte, die

Variabilität des ADMA-Anstiegs lag höher als die des SDMA. Diese Beobachtung ist typisch für das Vorhandensein alternativer Eliminationswege.

Aufgrund der Beobachtung, dass die DDAH-Aktivität nicht immer mit der DDAH-Proteinexpression übereinstimmte, wurde postuliert, dass es verschiedene Isoformen des Enzyms gab. James et al. haben im Jahr 1999 die humane DDAH cDNA geklont und dabei eine zweite Isoform der DDAH identifiziert. Diese wurde als DDAH-II bezeichnet, seitdem wird die ursprünglich entdeckte Isoform der DDAH DDAH-I genannt. Die kristalline Struktur der DDAH-I wurde in 2007 veröffentlicht (Leiper et al. 2007). Humane DDAH-I und DDAH-II sind zu 62 % identisch in ihrer Aminosäuresequenz (Tran et al. 2003). Die Aminosäuresequenz der DDAH-II von Maus und Mensch sind zu 98 % gleich, bei DDAH-I sind es 95 %. Das deutet auf eine starke Konservierung des Enzyms während der Evolution hin.



N^G,N^G-Dimethyl-L-Argiinn (ADMA) — L-Citrullin — Dimethylamin

N^G-Monomethyl-L-Argiinn (L-NMMA) — L-Citrullin — Monomethylamin

Abbildung 1-4 Metabolisierung von ADMA zu L-Citrullin und Dimethylamin bzw. von L-NMMA zu L-Citrullin und Monomethylamin durch das DDAH-Enzym

1.3.2 Verteilung der DDAH-Isoformen

DDAH-I wird in Geweben mit überwiegender nNOS-Expression gefunden, z.B im Gehirn. DDAH-II befindet sich in Geweben mit eNOS-Expression wie Endothelzellen (Leiper et al. 1999). Eine Ausnahme gibt es bei Nieren, wo die DDAH- und NOS-Isoformen komplex verteilt sind (Onozato et al. 2007). Die DDAH-Expression in Nieren ist in Einklang mit der Expression verschiedener NOS-Isoformen hoch isoformspezifisch, sie ist möglicherweise an der ortsspezifischen Regulation der NO-Synthese beteiligt. Die DDAH-I ist die vorherrschende Isoform in Nieren und Leber (Nijveldt et al. 2003). Die menschliche Niere und die Leber nehmen große Menge ADMA aus der systemischen Zirkulation auf (Nijveldt et al. 2003). DDAH-I wird stark in Pankreas, Vorderhirn, Aorta und neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimiert (Kimoto et al. 1993, Tran et al. 2000). DDAH-II wird stark in vaskulären Endothelen, vaskulären Glattmuskelzellen sowie in Herz und Plazenta exprimiert. DDAH-II wird auch neben induzierbarer NOS (iNOS) in Immunzellen nachgewiesen (Tran et al. 2000). Wahrscheinlich spielt DDAH-II auch bei der Regulation der Abwehr und Immuntoleranz im Zusammenhang mit der iNOS eine Rolle.

1.3.3 Regulation der DDAH-Aktivität

Leiper und Vallance et al. haben in 2002 über eine reversible Inhibition der DDAH durch NO-Donatoren berichtet. NO kann das Cystein im Aktivzentrum von DDAH nitrosylieren (Leiper et al. 2002). Unter normalen Bedingungen wird DDAH nicht nennenswert nitrosyliert. Unter besonderen Bedingungen wie z.B wenn iNOS induziert wird, wird die DDAH möglicherweise nitrosyliert und inaktiviert.

L-Citrullin führt zu einer Produkthemmung der DDAH (MacAllister et al. 1996, Kimoto 1989). Pentafluorphenylsulfonat (Vallance et al. 2005), 2-Chloroacetamidin (Stone et al. 2005) und S-2-Amino-4 (3-Methylguanidino)-Butansäure (4124W) stellen mögliche pharmakologische Inhibitoren für die DDAH dar (Rossiter et al. 2005). In kultivierten Endothelzellen oder glatten Muskelzellen wurde beobachtet, dass viele Faktoren die Transkription und Translation des DDAH-Gens regulieren können. Bisher wurden noch keine in vivo Versuche hierzu durchgeführt. Viele der initial beschriebenen Aktivatoren sind Antioxidantien. Die Inhibitoren sind assoziiert mit oxidativem Stress. Die Thiolgruppe im katalytischen Zentrum der DDAH verleiht dieser die Sensitivität gegenüber oxidativem Stress (Knipp M 2006). Homocystein

oxidiert z.B die Thiolgruppe der DDAH, es ergibt sich so eine Disulfidbrücke, wodurch das Enzym inaktiviert wird (Stuhlinger et al. 2001). Ein Superoxiddonator oder NO-Donator hemmt die DDAH-Aktivität in vitro (Tan et al. 2007). Die Inhibition der DDAH scheint jedoch reversibel. In Anwesenheit von reduzierenden Stoffen wie Dithiothreitol (DTT) wird die Thiolgruppe von Cystein wieder freigestellt (Leiper 2002, Stuhlinger et al. 2001). DTT hat allein keinen Effekt auf DDAH.

1.3.4 DDAH als Regulator des L-Arginin-NO-Weges

Ein wichtiger Beleg dafür, dass DDAH als ein kritischer Regulator für den NOS-Signalweg fungiert, stammt aus Studien mit dem DDAH-Inhibitor 4124. Zusatz von 4124W zu isolierten vaskulären Segmenten führte zu einer Vasokonstriktion, die wiederum durch L-Arginin aufgehoben wurde (MacAllister et al. 1996). Diese Erkenntnis ist vereinbar mit der Sicht, dass ADMA andauernd im Rahmen der Proteinumsetzung produziert wird. Dementsprechend verursacht die pharmakologische Inhibition der DDAH-Aktivität die Akkumulation von ADMA, welches wiederum die NO-Synthese stört und so eine Vasokonstriktion begünstigt.

Verminderte DDAH-Aktivität ist der zentrale Mechanismus, durch den kardiovaskuläre Risikofaktoren den NOS-Signalweg stören könnten. Die verminderte DDAH-Aktivität führt zur Anreicherung von ADMA, welches wiederum die NO-Synthese blockiert.

Die Regulation der NO-Synthese durch DDAH wurde in vivo anhand der DDAH transgenen Mäusen untersucht (Dayoub et al. 2003). Bei diesen Mäusen war die DDAH-Aktivität erhöht, infolgedessen sank die Konzentration von ADMA im Plasma um bis zu 50 %. Diese Reduktion der ADMA-Konzentration im Plasma war mit einem signifikanten Anstieg der NOS-Aktivität einhergegangen, der Nitratgehalt im Plasma und Harn war bei transgenen Mäusen um das 2-fache erhöht. Die Erhöhung der NOS-Aktivität bewirkte eine Reduktion des systolischen Blutdrucks von 15 mHg. Die Untersuchungen der DDAH transgenen Mäuse lieferten den entscheidenden Hinweis über die große Bedeutung der DDAH-Aktivität und der ADMA-Konzentration im Plasma bei der Regulation der NO-Synthese.

1.3.5 Bestimmung der DDAH-Aktivität

DDAH hydrolysiert ADMA oder L-NMMA in L-Citrullin und Dimethylamin bzw. Monomethylamin. Die DDAH-Aktivitätsmessung basierte entweder auf der Messung von Substratabbau oder auf der Bestimmung der Reaktionsprodukte (Knipp et al. 2000, Lin et al. 2002).

Mann kann zwischen Assays, die auf unmarkiertem ADMA bzw. auf isotopenmarkiertem ADMA beruhen, unterscheiden.

In Geweben wurde initial [^{14}C]-ADMA oder [^{14}C]-L-NMMA eingesetzt. Mittels Anionenaustauschharz wurde das Reaktionsprodukt [^{14}C]-Citrullin gebunden. Das starke Kation, nämlich das unverbrauchte [^{14}C]-ADMA wurde ausgewaschen (MacAllister et al. 1996, Ogawa et al. 1989). Andere Untersucher setzten unmarkiertes ADMA als Substrat ein und bestimmten mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) den Abbau von ADMA oder die Entstehung von L-Citrullin (Chen et al. 2005, Ueda et al. 2003, Ito et al. 1999, Siroen et al. 2006, Nonaka et al. 2006). Das L-Citrullin als Reaktionsprodukt wurde auch mittels Bildung von Diacetylmonoxim mit Oxim photometrisch bestimmt (Knipp et al. 2000). Zu beachten ist, dass die Farbreaktion auch durch Harnstoff und proteingebundenes L-Citrullin ausgelöst wird. Außerdem kann das L-Citrullin auch aus anderen Quellen stammen wie z.B durch Ornithin-Carbamoyltransferase und NOS.

Wesentliche Nachteile der bisherigen Verfahren sind die Verwendung von unmarkiertem ADMA (unspezifisch) bzw. die Verwendung von radioaktiv markiertem ADMA (Strahlenschutz).

1.4 Arginase

1.4.1 Funktion der Arginase

Die Aminosäure Arginin wird in Säugertierzellen im Wesentlichen auf vier Wegen durch NOS, L-Arginin-Decarboxylase (ADC), Arginin:Glycin-Amidinotransferase oder Arginase (siehe Abbildung 1-5) abgebaut.

NO-Synthase :

Arginin + O_2 ⟶ Citrullin + NO

Arginase :

Arginin ⟶ Ornithin + Harnstoff

Arginin:Glycin-Amidinotransferase :

Arginin + Glycin ⟶ Ornithin + Guanidinoacetat

Arginin-Decarboxylase :

Arginin ⟶ Agmatin + CO_2

Abbildung 1-5 Enzyme mit Arginin als Substrat

Arginase katalysiert die Spaltung von Arginin in Ornithin und Harnstoff (Kossel et al 1904). Es existieren zwei Isoenzymvarianten von Arginase: Die zytosolisch gelegene Arginase (Arginase I) ist hauptsächlich in der Leber als ein Teil des Harnstoffzyklus aktiv. Die zweite Isoenzymvariante: Die mitochondrial lokalisierte Arginase (Arginase II) befindet sich in vielen extrahepatischen Geweben wie z.B in Makrophagen und Nierenzellen. Sie katalysiert die gleiche enzymatische Reaktion (Jenkison et al. 1996). In extrahepatischen Geweben, in denen kein kompletter Harnstoffzyklus vorhanden ist, wird die Arginase als Lieferant für Ornithin, eine biosynthetische Vorstufe von L-Prolin und Polyaminen, betrachtet. Polyamine sind von essenzieller Bedeutung für die Zellteilung und Differenzierung. Prolin wird im menschlichen Körper z.B. für die Bildung von Kollagen, dem Protein, aus dem Bindegewebe und Knochen bestehen, benötigt (Lehninger et al. 1993). Eine verstärkte Arginase-Aktivität kann zu einem Substrat-Mangel von Arginin führen, infolgedessen zu einer Hemmung der NO Synthese (Corraliza et al. 1995). Eine Hemmung der Arginaseaktivität hingegen verstärkt die NO-Produktion (Daghigh et al. 1994).

Bei Patienten mit Sichelzellanämie wird die Freisetzung von Arginasen aus Erythrozyten für die teilweise stark erniedrigten L-Arginin-Konzentrationen im Plasma verantwortlich gemacht (Morris et al. 2005).

Arginin:Glycin-Amidinotransferase stellt aus den Substraten Glycin und Arginin Guanidinoacetat her, das weiter zur Kreatin synthetisiert wird (Brosnan et al. 2004).

1.4.2 Aktivitätsmessung der Arginase

Die Bestimmung der Arginaseaktivität beruhte bisher im Wesentlichen auf zwei Ansätzen:

Zum einen basierte die Arginase-Aktivitätsmessung auf dem Einsatz von ^{14}C markiertem L-Arginin. Als Produkt wurde ^{14}C markierter Harnstoff von dem unverbrauchten ^{14}C markierten L-Arginin mittels Ionenaustauschharz abgetrennt und mittels Szintillationszählung quantifiziert (Ruegg et al. 1980, Cavalli et al. 1994).

Zum anderen konnten spektrophotometrisch mit alternativen Substraten der Arginase, wie 1-Nitro-3-Guanidinobenzen (NGB) die farbigen Produkte quantitativ bestimmt werden (Baggio 1999). Eine spektrophotometrische Messung von Arginaseaktivität wurde auch mittels Kopplung des entstandenen Harnstoffs mit Urease und Glutamatdehydrogenase durchgeführt, dabei wurde das beteiligte NADPH spektrophotometrisch bestimmt (Nazmi Özer 1984). Die spektrophotometrische Messung der Arginaseaktivität kann nur mit einem reinen Enzym durchgeführt werden und ist nicht sehr empfindlich. Dagegen ist ^{14}C markiertes L-Arginin auch im Gewebehomogenat einsetzbar, leider ist das Verfahren sehr zeitaufwendig. Shoufa Han et al. hatten im Jahre 2001 ein empfindlicheres spektrophotometrisches Arginase-Aktivitätsassay mit Thioarginin als Substrat entwickelt. Das Produkt reagierte weiter mit 5,5´-Dithiobis-2-Nitrobenzoat (DTNB) zu einem farbigem Produkt, das einen 10-fach höheren Extinktionskoeffizienten als das Produkt von NGB hatte.

Problem aller dieser Assays ist aber, dass eine gleichzeitige Bestimmung von ADMA (DDAH-Aktivität) und L-Arginin nicht möglich ist.

1.5 Analytik von ADMA

In dem Maße, in dem unser Verständnis über die Rolle von ADMA in der Pathogenesse von Herz-Kreislauferkrankungen im Verlauf der letzten Jahre zunahm, wird ADMA ein Ziel für pharmakotherapeutische Interventionen. Weil die Konzentration von anderen Aminosäuren im Plasma mehrfach höher als die der methylierten Aminosäuren ist, stellt die Quantifizierung der methylierten Argininanaloga im Plasma eine Herausforderung dar. Verfügbare analytische Methoden zur ADMA-Messung waren bisher die Papierchromatographie (Kakimoto et al. 1970), die Dünnschichtchromatographie (Tyihak et al. 1974), die Elektrophorese (Reporter et al. 1971) und die Ionenaustauschchromatographie (Paik et al. 1967, Kakimoto 1971, Zarkadas 1978, Lou et al. 1981). Sie sind in klinisch orientierten Laboren nicht sehr weit verbreitet und ungeeignet für einen hohen Probendurchsatz.

Traditionell wird eine Aminosäurenanalyse auch mit Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulen-Derivatisierung durchgeführt. Diese Methode eignet sich prinzipiell für die Analyse von allen in den Proben enthaltenen Aminosäuren und deren Derivate wie ADMA und SDMA (Marescau et al. 1997). Der Nachteil dieser Technik ist eine sehr lange Probenlaufzeit für die vollständige Trennung der Aminosäuren.

Eine Laufzeitverkürzung mittels Vorsäulen-Derivatisierung und anschließender HPLC-Trennung mit Umkehrphase von Argininanaloga wurde von mehreren Gruppen beschrieben. Arginin, ADMA und SDMA wurden zwar 1996 von MacAllister et al. nach HPLC-Trennung mit UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 200 nm quantifiziert, jedoch ist eine UV-Absorptionsmessung wegen fehlenden chromophoren Gruppen für Arginin, ADMA und SDMA nicht geeignet. Die meisten HPLC-Methoden bezogen sich auf Festphasenextraktion mit Kationaustauschsäulen, eine Vorsäulen-Derivatisierung und anschließender Fluoreszenzdetektion. O-Phtaldialdehyd (OPA) ist das am häufigsten angewendete Fluoreszenzreagenz. Die Fluoreszenzdetektion der OPA-Derivate wurde bei einer Exitationswellenlänge (λ^{ex}) und einer Emissionswellenlänge (λ^{em}) von 340 nm und 455 nm durchgeführt. Mit AccQ-Fluor (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamat) als Reagenz war die Fluoreszenz des Derivates bei Raumtemperatur etwa eine Woche stabil (Heresztyn et al. 2004), deshalb war es für große Probenmengen und offline-Bearbeitung geeignet.

Die Auflösung der chromatographischen Trennung von Derivaten des L-Arginins und dessen Analoga ist abhängig von vielen Faktoren wie: HPLC-Säule, Säulenofentemperatur, Elutionszeit, Laufmittelzusammensetzung und pH-Wert des Laufmittels. Zahlreiche Variationen der HPLC-Methoden wurden publiziert. (Pettersson et al. 1997, Pi et al. 2000, Böger et al. 1998b, Teerlink et al. 2002, Marra et al. 2003). Weil ADMA und SDMA strukturell sehr ähnlich sind, ist die chromatographische Trennung von beiden Argininanaloga schwer zu bewältigen. Die Trennung wird mit C18 oder mit C_6H_5 modifizierten Silica-Normalphasen-HPLC-Säulen durchgeführt. Die Laufzeit einer Probe beträgt 30-60 Minuten. Die Nachteile aller HPLC-Methoden liegen in der aufwendigen Aufreinigung und langer Analysezeit und in der unspezifischen Detektion.

Fluoreszenzdetektion für Arginin, ADMA und SDMA ist aufgrund fehlender speziellen Reagenz nicht spezifisch. Erst mit der Einführung von Massenspektrometrie wird eine höhere Selektivität gewährleistet. Der Analyt wird mittels des charakteristischen molekularen Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) selektiv detektiert. Hierbei erweist sich die mit LC und GC verbundenen Massenspektrometrie empfindlicher als die konventionellen Detektoren. Tsikas et

al. haben in 2003 die GC-MS/MS-Analytik von ADMA und Arginin im Plasma von Menschen und in der Zellkultur entwickelt. Die Plasmaproben wurden über Ultrafiltration gereinigt und zur Trocknung abgedampft. Zwei Derivatisierungsschritte wurden durchgeführt, um flüchtige Produkte für die GC-Trennung herzustellen. Nach der Derivatisierung waren Arginin und ADMA für eine GC-Trennung auf einer Optima-17 Kapillarsäule (Macherey Nagel, Deutschland) als scharfe symmetrische Peaks zu sehen. Bei den GC-MS-Chromatogrammen mit negativ chemischer Ionisierung (NICI) waren keine störenden Peaks zu sehen. Aufgrund anderer Derivatisierungsprodukte und fehlendem internen Standard von SDMA wurde SDMA nicht mit der Methode erfasst. Albsmeier et al. aus unserer Arbeitsgruppe hat in 2004 die GC-MS/MS-Methode nach Tsikas weiter verbessert, indem sie die Probenreinigung von Plasma mittels Acetonfällung durchführte und [$^2H_6$]-ADMA als internen Standard einsetzte. Gegenüber der HPLC-Methode wurde bei der GC-MS-Methode die Selektivität erhöht und die Probenlaufzeit verkürzt. Die Nachteile der GC/MS-Methode sind die hohen Kosten und aufwendige Aufbereitung der Proben.

Im Vergleich zur GC-MS sind LC-MS/MS-Methoden häufig kostengünstiger und stellen weniger Ansprüche an die Aufarbeitung der Proben, daher waren viele Untersucher bestrebt, eine adäquate LC-MS/MS-Methode zu entwickeln. Vishwanathan et al. haben in 2000 die erste LC-MS/MS-Methode für Arginin und dessen methylierte Metabolite beschrieben. Nach Proteinfällung mit Acetonitril und Abdampfung des Lösungsmittels wurden die Aminosäuren auf einer Silica-Säule isokratisch getrennt. Die chromatographische Laufzeit betrug nach vollständiger Trennung von ADMA und SDMA 15 Minuten. Das Rauschsignal war in der Regel aber relativ groß. Die Quantifizierung erfolgte sowohl mittels ESI-MS als auch mittels ESI-MS/MS. Unpassende interne Standards für ADMA und SDMA zusammen mit Hintergrundrausch könnten die relativ niedrigen Plasmakonzentrationen erklären, die mit dieser Methode beschrieben wurden.

Huang et al. haben in 2003 und 2004 das L-Arginin und dessen methylierte Metabolite mittels Umkehrphase C18-Säule sowohl im Urin als auch im Plasma gemessen. Als einziger Schritt der Probenaufarbeitung wurde eine Proteinfällung mit 5-Sulfosalicysäure durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit APCI-MS in dem selektiven Ionenüberwachungsmodus (SIM). Martens-Lobenhoffer et al. haben 2003 die Proben nach Proteinfällung von Plasma und Verdünnung von Urinproben mit einem OPA-Reagenz derivatisiert und mit ESI-MS detektiert. ADMA und SDMA als OPA-Derivate konnten mit LC-MS nicht unterschieden werden, deshalb wurden sie zuvor mit Laufmittelgradient über 27 min chromatographisch getrennt.

Kirchherr et al. haben in 2005 eine LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von ADMA und SDMA im Humanplasma mit lediglich 6 min Laufzeit entwickelt. ADMA und SDMA werden auf einer porösen Karbon-Graphit-HPLC-Säule (Hypercarb, Thermo Electron) getrennt. Die Nachteile dieser Methode sind offensichtlich, erstens wurden ADMA und SDMA nicht mittels MS/MS sondern nur chromatographisch abhängig der Retentionszeit getrennt, zweitens war der Leucinpeak (interner Standard) sehr deformiert, drittens verursachte die Matrix eine ausgeprägte Ionensuppression.

Alle bisherigen LC/MS-Methoden unterscheiden sich in ihrem Reagenz zur Proteinfällung, in der Trennsäule und im Laufmittel. Außer Martens-Lobenhoffer et al. 2003 haben andere Untersucher keine Derivatisierungsschritte vorgenommen. Die Probenaufbereitung ist infolgedessen zu GC/MS-Methoden deutlich vereinfacht. Die Nachteile aller oben genannten LC/MS-Methoden liegen in der langen Probenlaufzeit aufgrund der nötigen chromatographischen Trennung von ADMA und SDMA, im starken Hintergrundrauschen, in den ungeeigneten internen Standards und in dem hohen Detektionslimit (LOQ = 0,2 µM für ADMA und SDMA bei Lan-Fang Huang et al. 2004).

2 Zielsetzung

N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) ist eine endogen gebildete Aminosäure, die alle drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase inhibiert. ADMA kumuliert in verschiedenen Krankheitsstadien von chronischer Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit. Der enzymatische Abbau des ADMA überwiegt dessen renale Elimination. Das Enzym, das für den Abbau von ADMA verantwortlich ist, ist die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH). ADMA liegt im Plasma neben strukturell ähnlichen Substanzen wie L-Arginin und SDMA vor. Die Bestimmung ist deshalb eine analytische Herausforderung. Ziel dieser Arbeit war es einen Assay mit stabil isotopenmarkiertem Substrat zur Bestimmung der DDAH-Aktivität in Geweben zu etablieren. Vorausgesetzt dafür waren

- Synthese und Erprobung von mit stabilen Isotopen einfach bzw. mehrfach markiertem ADMA als Substrat und Standard für DDAH-Aktivitätsassays.
- Optimierung einer LC-MS/MS Methode für die zuverlässige Bestimmung von Plasma- und Gewebe- ADMA-, SDMA- und Arginin- Konzentration in einer Probe. Kriterien der Zuverlässigkeit sollten Reproduzierbarkeit, Interferenzfreiheit und Genauigkeit der entwickelten Methode sein. Bisherige analytische Methoden erfüllen jedoch nicht die geforderten Kriterien von Selektivität und Genauigkeit bzw. erreichen diese nur nach zeit- und materialaufwendiger Probenvorbereitung.
- Anwendung der LC-MS/MS-Methodik um Bildung und Abbau von ADMA und strukturelle verwandte Substanzen wie SDMA und L-Arginin parallel in einer Probe beobachten zu können.
- Validierung des DDAH-Aktivitätsassays für Gewebeproben
- Zusätzliche Bestimmung der Arginase-Aktivität in Gewebeproben

3 Methoden

3.1 Synthese von N^G,N^G-[3,3,4,4,5,5-$^2H_6$]-Dimethyl-L-Arginin ([$^2H_6$]-ADMA) und N^G,N^G-[1,1,1,1´,1´,1´- $^2H_6$-Dimethylamino-1,2,3,4,5-$^{13}C_5$]- L-Arginin ([$^2H_6$ $^{13}C_5$]-ADMA)

Die Synthese von [$^2H_6$]-ADMA wurde in Anlehnung an einer Arbeit von Pundak et al. durchgeführt (Pundak et al. 1981).

Es wurde 1 g Bromcyan-aktivierte Agarose in 100 ml Salzsäure (1 mM) suspendiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Mischung wurde filtriert. Die abfiltrierte Bromcyan-aktivierte Agarose wurde 5 Mal mit 5 ml Salzsäure (1 mM) und 5 Mal mit 5 ml Wasser gewaschen. Für die Vorbereitung eines Kupfer-Ornithin-Komplexes wurden 10 mg L-[$^2H_6$]-Ornithin·HCl in 5 ml Wasser gelöst. Eine Spatelspitze von $CuCO_3$ wurde zugegeben und 5 min stehen gelassen, bis eine leichte Blaufärbung erschien. Kaliumhydroxidlösung (10 N) wurde dazugegeben bis ein pH-Wert von 10 eingestellt war und abfiltriert. Das Filtrat des Kupfer-Ornithin-Komplexes wurde mit gewaschener Bromcyan-aktivierter Agarose vereinigt und über Nacht bei 4 °C auf den Schüttler gestellt.

Am nächsten Tag wurde diese Suspension filtriert und 1 Mal mit 5 ml 1 N Salzsäure und mehrmals mit Wasser gewaschen. Der erhaltene Cyan-Agarose-L-[$^2H_6$]-Ornithin-Komplex wurde in 6 ml Dimethylaminlösung (20 %) suspendiert. Diese Suspension wurde verschlossen für 24 Stunden bei 50 °C gerührt, während der Zeit erfolgte die Synthese des [$^2H_6$]-ADMA aus L-[$^2H_6$]-Ornithin und Dimethylamin. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Filtrat inklusive der 10 ml Waschwasser, die in mehreren Portionen zugegeben wurden, zur Trocknung eingeengt. Das synthetisierte [$^2H_6$]-ADMA wurde in 400 µl Wasser zur Herstellung einer Stammlösung aufgenommen.

Die Synthese von [$^2H_6$ $^{13}C_5$]-ADMA verlief ähnlich wie bei [$^2H_6$]-ADMA mit folgenden Modifikationen: Statt L-[$^2H_6$]-Ornithin·HCl wurde L-[$^{13}C_5$]-Ornithin·HCl für die Herstellung des Kupfer-Ornithin-Komplexes eingesetzt. Infolgedessen entstand über Nacht ein Cyan-Agarose-L-[$^{13}C_5$]-Ornithin-Komplex statt eines Cyan-Agarose-L-[$^2H_6$]-Ornithin-Komplexes. Dieser Cyan-Agarose-L-[$^{13}C_5$]-Ornithin-Komplex wurde in 6 ml einer 20%igen [$^2H_6$]-Dimethylaminlösung statt Dimethylaminlösung suspendiert. Das daraus synthetisierte [$^2H_6$ $^{13}C_5$]-ADMA wurde auch in 400 µl Wasser zur Herstellung einer Stammlösung aufgenommen.

Es ist hier zur erwähnen, dass das [$^2H_6$]-Dimethylamin gasförmig ist. Es wurde zuvor in einen Kolben, der in flüssigem Stickstoff eingebettet war, eingeleitet und so verflüssigt. Um eine 20 %ige [$^2H_6$]-Dimethylaminlösung herzustellen, musste das flüssige [$^2H_6$]-Dimethylamin in der entsprechenden Menge eiskaltem Wasser gelöst und verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Reinheits- und Identitätsprüfung von selbst synthetisierten [$^2H_6$]-ADMA und [$^2H_6{}^{13}C_5$]-ADMA erfolgte mittels HPLC und LC-MS (siehe 3.2 und 3.3).

3.2 Quantifizierung von [$^2H_6$]-ADMA und [$^2H_6{}^{13}C_5$]-ADMA mit Hilfe der HPLC

Das synthetisierte [$^2H_6$]-ADMA und [$^2H_6{}^{13}C_5$]-ADMA wurde anhand von HPLC-Chromatogrammen auf Verunreinigungen mit Arginin und SDMA untersucht. Die HPLC-Messung diente auch als eine Vorquantifizierung von [$^2H_6$]-ADMA und [$^2H_6{}^{13}C_5$]-ADMA in der Stammlösung. Ein externer Standardmix mit L-Arginin (50 µM), Homoarginin (10 µM), ADMA (1 µM) und SDMA (1 µM) wurde vorbereitet, um die Retentionszeit von allen Verbindungen zu bestimmen.

[$^2H_6$]-ADMA und [$^2H_6{}^{13}C_5$]-ADMA wurden um das 100-fache verdünnt. Im letzten Verdünnungsschritt war Homoarginin als interner Standard mit einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben worden. Die Messung der Konzentration von ADMA, SDMA und L-Arginin erfolgte mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung einer Vorsäulen-Derivatisierung mit Orthophthaldialdehyd (OPA), modifiziert nach einer HPLC-Methode von Böger et al. (Böger et al. 1998b). Eine Aufreinigung der Proben unter der Verwendung von CBA (carboxylic acid) Kartuschen war nicht erforderlich, da es sich nicht um biologische Proben handelt. Eine 100 µl Probe wurde zur HPLC-Messung in ein Autosamplergefäß überführt. Vor der Injektion einer 5 µl Probe wurde die Probe 30 Sekunden lang mit OPA-Reagenz inkubiert. Der Probeninhalt wurde isokratisch mit dem Eluenten A bei einer Flussrate von 1 ml/min auf einer Phenylsäule analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenz-Detektor bei λ^{ex}= 340 nm und λ^{em}= 453 nm

Die jeweiligen Konzentrationen von [$^2H_6$]-ADMA (Abbildung 3-2) und [$^2H_6{}^{13}C_5$]-ADMA (Abbildung 3-3) waren anhand der Peak-Höhen-Verhältnisse zum internen Standard im Standard-Mix und in der Probe berechnet. Unter der Kenntnis der entsprechenden Retentionszeit wurde auch nach Verunreinigungen von Arginin oder SDMA gesucht.

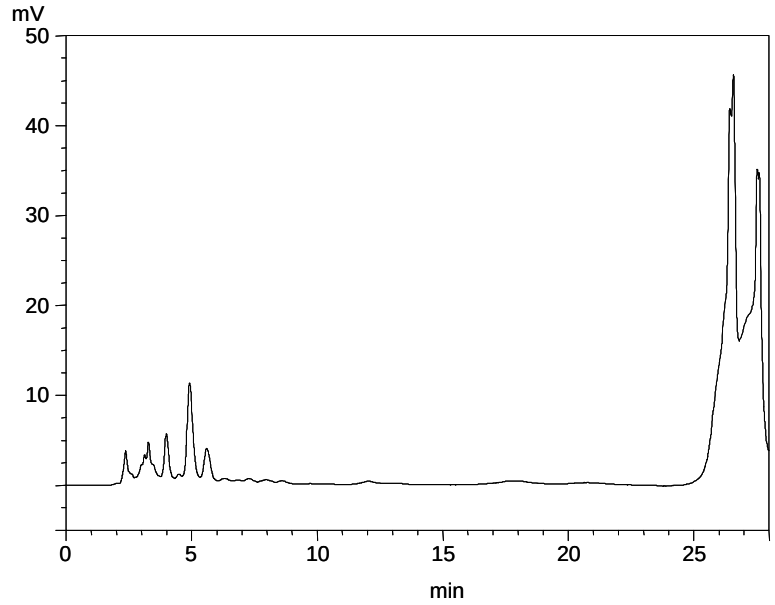


Abbildung 3-1 HPLC-Chromatogramm des Lösungsmittels (Wasser)

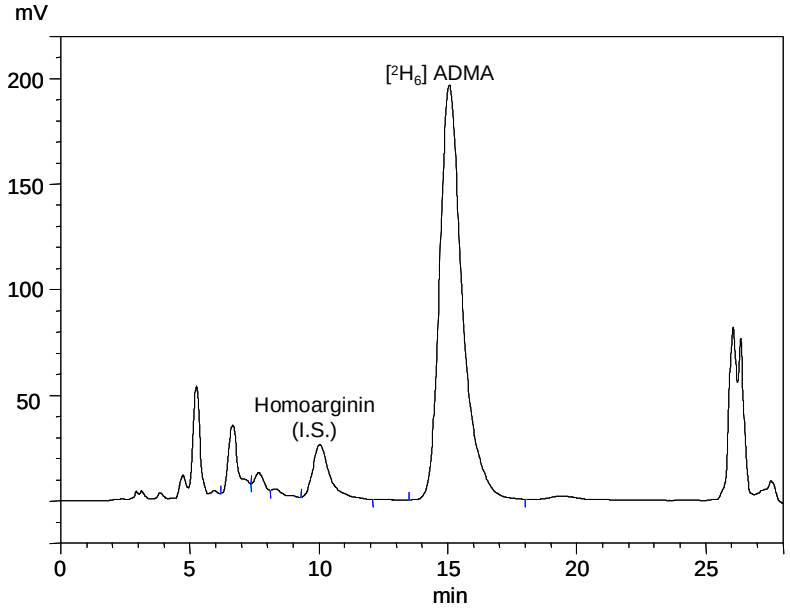


Abbildung 3-2 HPLC-Chromatogramm des synthetisierten [$^2H_6$]-ADMA mit Homoarginin als internem Standard

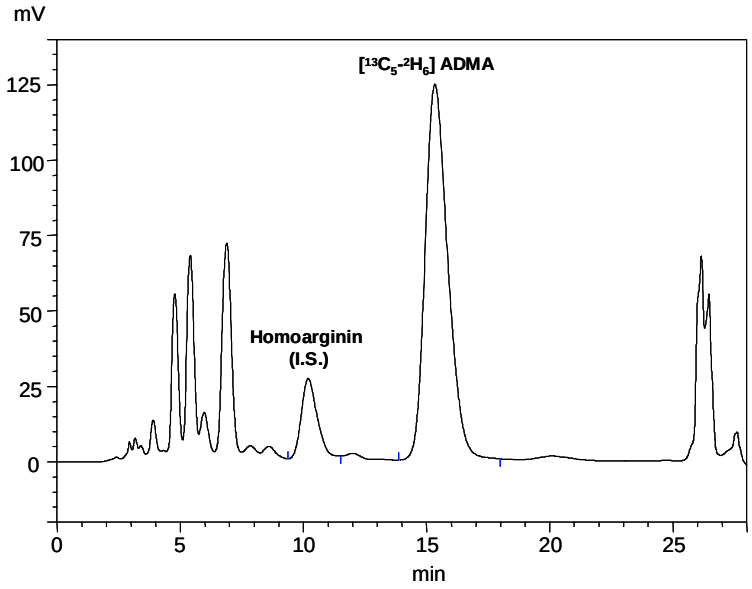


Abbildung 3-3 HPLC-Chromatogramm des synthetisierten [$^{2}H_{6}{}^{13}C_{5}$]-ADMA mit Homoarginin als internem Standard

3.3 Quantifizierung von Arginin, [$^{15}N_2$]-Arginin, ADMA, SDMA, [$^{2}H_6$]-ADMA und [$^{2}H_6{}^{13}C_5$]-ADMA mit Hilfe der LC-MS/MS

Die Analysen wurden an einem Varian 1200 Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer ausgestattet mit 2 Varian ProStar 210 HPLC-Pumpen durchgeführt. Als Trennsäule wurde C18-Ether, 3 µm Korngröße, 50 x 2.0 mm ID verwendet. Die mobile Phase A bestand aus 0,1 %iger Ameisensäure in Methanol, Mobile Phase B aus 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser. Die Chromatographie verlief bei 25 °C mit einem Fluss von 0,4 ml/min. Der Gradient lief mit 2 % A für 0,5 min und stieg linear über 1,5 min auf 50 % A an. Anschließend wurde für 2 min bei 2 % A reequilibriert. Stickstoff wurde als Zerstäuber und Trocken-Gas (380 °C) mit 90 und 180 l/h verwendet.

Für die Ionisierung wurde der positive Elektrospray-Ionisation-Modus (ESI+) gewählt. Die Nadel- und Schildspannung wurden bei 5850 V und 400 V eingestellt. Das Kollisionsgas im zweiten Quadrupol war für LC-MS/MS-Messungen Argon mit einem Kollisionsdruck von 2 Pa. Die folgenden Übergänge wurden nach der Fragmentierung mit Argon beobachtet.

Tabelle 3-1 Übergänge der Butylester aller Verbindungen über Kollision mit Argon Gas

Verbindung	Übergang (m/z)	Kollisionsenergie (CE)
Arginin	231->70	-22eV
[$^{15}N_2$]-Arginin	233->70	-22eV
[$^{2}H_7$]-Arginin	238->77	-22eV
ADMA	259->214	-16eV
[$^{2}H_6$]-ADMA	265->220	-16eV
[$^{2}H_6{}^{13}C_5$]-ADMA	270->219	-16eV
SDMA	259->228	-14eV

Alle Verbindungen wurden als Butylester analysiert. [$^{2}H_6$]-ADMA fungierte als interner Standard für ADMA und SDMA. L-[$^{2}H_7$]-Arginin diente als interner Standard für L-Arginin. Für die quantitative Bestimmung von ADMA, SDMA und L-Arginin im Plasma wurden zu 50 µl Plasma 5 µl interner Standard aus einem Gemisch von L-[$^{2}H_7$]-Arginin und [$^{2}H_6$]-ADMA in einer Endkonzentration von 50 µM und 2 µM zugegeben. Unmittelbar danach wurde das Protein in einer Probe mit 100 µl Aceton gefällt und der Überstand wurde in ein Autosamplergefäß überführt. Unter Stickstoff wurde die Probe eingeengt. Nach Zugabe von 100 µl 1 mol/l Salzsäure in 1-Butanol derivatisierten die Proben 17 min bei 65 °C im Thermoblock. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff entfernt. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen. Zur Messung wurden 20 µl der Probe in die Säule injiziert.

Bei biologischen Proben, welche zuvor mit [$^{2}H_6$]-ADMA versetzt wurden, wurde statt [$^{2}H_6$]-ADMA das mit Isotopen markierte [$^{2}H_6{}^{13}C_5$]-ADMA als Bestandteil des internen Standards eingesetzt.

3.4 Verwendung der LC-MS/MS-Methode zur Messung der ADMA-, SDMA- und Arginin-Konzentration im Rahmen einer klinischen Studie

In die Studie wurden 24 gesunde Probanden eingeschlossen, an denen die Wirkung von drei verschiedenen Fast Food Menüs auf das kardiovaskuläre System beobachtet werden sollte. Die Studie wurde im dreifachen Crossover-Vergleich durchgeführt, was bedeutete, dass alle 24 Probanden jedes der drei Menüs an jeweils unterschiedlichen Untersuchungstagen einnahmen. Die Beobachter waren bis zum Abschluss der Auswertung der Daten verblindet. Für die Studie lag ein positives Votum der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg (Aktenzeichen: OB-053/04) und das schriftliche Einverständnis aller Probanden vor.

3.5 Quantifizierung von Arginin, [$^{15}N_2$]-Arginin, ADMA, SDMA, [$^{2}H_6$]-ADMA und [$^{2}H_6{}^{13}C_5$]-ADMA in hohem Durchlauf mit Hilfe der LC-MS/MS

Eine methanolische Lösung von [$^{2}H_7$]-Arginin und [$^{2}H_6$]-ADMA als interner Standard wurde zuerst hergestellt. 100 µl von dem methanolischen internen Standard wurden auf eine 96-Well 0,2 mm Mikrofilterplatte von der Firma Millipore, die zuvor auf eine 96-Well Polypropylenplatte gestellt wurde, pipettiert. Eine 20 µl biologische Probe wurde dem internen Standard zupipettiert. Die Proteine wurden gefällt, indem die beiden Platten unter Verschluss auf einem Plattenschüttler für 5 min geschüttelt wurden. Danach wurde die Probe durch Zentrifugation der Mikrofilterplatte bei 4 °C mit 2000rpm von Proteinen befreit. Das Filtrat wurde in der darunterliegenden Polypropylenplatte aufgefangen und bei 85 °C für 30 min getrocknet. Dann wurde der Rückstand mit 100 µl 1M HCl in Butanol unter Verschluss bei 65 °C für 15 min derivatisiert. Das Reaktionsgemisch wurde bei 85 °C zur Trocknung erhitzt. Die Polypropylenplatten mit den zur Trocknung eingeengten Butylestern der Analyten wurden bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Messung wurden die Proben in einem 100 µl Acetonitril:wässriges 0,1 % Ammoniumformiat (60:40 v/v)-Gemisch, (pH4 eingestellt mit Ameisensäure), aufgenommen. Ein 10 µl Aliquot wurde in das LC-MS/MS-Gerät injiziert.

Die Butylester der Proben wurden isokratisch mit Acetonitril:wässriges 0,1 % Ammoniumformiat, (60:40 v/v), bei einer Flussrate von 0,2 ml/min eluiert.

Die Analyse wurde mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer Varian 1200 ausgestattet mit 2 Varian ProStar 210 HPLC-Pumpen durchgeführt. Zur Probenaufgabe wurde ein Autosampler von CTC Analytics verwendet, zur chromatographischen Trennung eine Chirobiotic Microbore-Vorsäule der Dimension T 20 mm x 1,0, gefüllt mit Teikoplatnin kovalent gebunden an sphärischer Silica (5µm). Stickstoff diente als Verneblungs- und Trockengas (380 ºC) mit einem Fluss von 90 und 180l/h. Nadel- und Schild-Spannung wurden bei 5600 und 400v gehalten. In einem „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) Modus nach Fragmentierung mit Argongas (2 Pa) wurden die Ionen detektiert (siehe Tabelle 3-1).

3.6 Bestimmung der Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) in Gewebehomogenat

Die Mausniere und -leber sind Organe mit bekannt starker Expression von DDAH (I und II), deshalb wurde die DDAH-Aktivität von Mausnieren und -lebern untersucht.

Als Vorversuch zur Untersuchung von endogener Bildung von ADMA und L-Arginin wurde gefrorenes Gewebe (10-100 mg) auf Eis 1:4 oder 1:8 (m/m) mit PBS Puffer homogenisiert, daraus resultierte eine Protein-Konzentration von 5-30 g/l. Für die Untersuchung des Einflusses eines Proteaseinhibitor-Mixes wurde diese im Endeffekt um das 20-fache im Gewebehomogenat verdünnt. Ein Aliquot von 100 µl wurde in einer 96-Well Platte oder in einem Eppi für 60 min bei 37 °C mit [$^2H_6$]-ADMA (1-100 µM) inkubiert. Für die Bestimmung von ADMA, L-Arginin und SDMA bei unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 10 µl bzw 20 µl von dem Reaktionseinsatz abgenommen und zum 100 µl methanolischen internen Standard pipettiert. Infolgedessen wurde die Reaktion gestoppt. Der methanolische interne Standard enthielt [$^2H_6{}^{13}C_5$]-ADMA (1 µM) und [$^2H_7$]-Arginin (50 µM). Basierend auf den Vorversuchen mit verschiedenen Inkubationszeiten und [$^2H_6$]-ADMA-Konzentrationen wurden die optimalen experimentellen Bedingungen festgelegt. Es wurde nur 20 mg gefrorenes Gewebe aus einem einzelnen Organ für die DDAH-Aktivitätsmessung benötigt. Homogenisiert wurde in PBS Puffer (pH 6,5) mit Proteaseinhibitor-Mix, (um die Beeinflussung durch endogen Neubildung von ADMA zu verhindern). Das Homogenat wurde 5 min bei 4 °C und 12000 g abzentrifugiert. Für den eigentlichen DDAH-Aktivitätsassay wurde 50 µl Aliquot von dem Überstand mit 50 µl PBS Puffer, welcher 20 µM [$^2H_6$]-ADMA enthielt, für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Endverdünnung für Mausnieren- und -leber-Homogenat erreichte 1:6 und 1:3 (m/m). Zum Stoppen der Reaktion wurden 100 µl kalter methanolischer interner Standard gegeben. Die enzymatische Aktivität wurde aus der anfänglichen [$^2H_6$]-ADMA-Konzentration abzüglich der [$^2H_6$]-ADMA-Konzentration nach 60 min Inkubation und durch 60 min Inkubationszeit dividiert, berechnet. Die Konzentration wurde auf Protein bezogen angegeben. Die Proteinkonzentration von Proben wurde nach Bradford bestimmt (siehe Kapitel 3.9).

3.7 Arginase-Aktivitätsmessung

Arginase-Aktivitätsmessung in Nierenhomogenat von Mäusen erfolgte simultan mit DDAH-Aktivitätsmessung (siehe Kapitel 3.6). Weil die Arginaseaktivität in einer Mausleber sehr hoch ist, wurde homogenisiertes Lebergewebe einer Maus stark verdünnt eingesetzt. Ein Stück der Mausleber (5-10 mg) wurde um das 1:100 mit PBS (pH=6,5) in einer Eppendorf-Tube (1,5 ml) auf Eis verdünnt. Mit einem Tissuelyser wurde es 3 Mal 1 min homogenisiert, zwischendurch wurde die Eppendorf-Tube auf Eis abgekühlt. Das Homogenat wurde mit 12000 rpm für 15 min

bei 4 °C abzentrifugiert. Als Reaktionseinsatz wurden 25 µl Überstand mit 50 µl [$^{15}N_2$]-Arginin (200 µM) und 25 µl PBS pH 6.5 vermischt. Der Reaktionseinsatz wurde bei 37 °C im Thermoschüttler belassen. Zum Zeitpunkt Null und nach 30 min wurden von dem Reaktionseinsatz 20 µl Lösung abgenommen, in den 100 µl methanolischen internen Standard, welcher 50 µM [$^{2}H_7$]-Arginin enthielt, pipettiert. Der methanolische interne Standard wurde zuvor in eine 96-Well-Mikrofilterplatte (0,2 mm) der Firma Millipore, die über eine 96-Well Polypropylenplatte gestellt wurde, pipettiert. Die Platten wurden für die LC-MS/MS-Messung unmittelbar weiter bearbeitet (siehe Kapitel 3.5).

3.8 Bestimmung der Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) in menschlichem Vollblutlysat

Vollblut in EDTA wurde nach Abnahme bei -80 °C aufbewahrt. Das Vollblut wurde durch 3 Gefrier-Auftau-Zyklen mit 1 min Gefrieren in flüssigem Stickstoff und 5 min Tauen bei 37 °C lysiert. Das Lysat wurde 15 min mit 12000 g bei 4 °C zentrifugiert. Zum 1 ml Überstand wurden 3,75 µl [$^{2}H_6$]-ADMA-Stammlösung (4 mM) gegeben, um eine 15 µM Endkonzentration zu erreichen. Dieser Reaktionseinsatz wurde auf mehrere Eppendorf-Tuben zur mehrfachen Bestimmung verteilt. Die Eppendorf-Tuben wurden bei 37 °C geschüttelt. Aus jeder Eppendorf-Tube wurden zum Zeitpunkt 0 Stunde und 4 Stunde 20 µl Lysat abgenommen und in 100 µl methanolischen internen Standard ([$^{2}H_6{}^{13}C_5$]-ADMA 1 µM), der sich in einer Eppendorf-Tube befindet, pipettiert, gevortext und 2,5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine 96-Well-Mikrofilterplatte (0,2 mm) der Firma Millipore, die über eine 96-Well-Polypropylenplatte gestellt wurde, überführt. Die Platten wurden danach für die LC-MS/MS-Messung weiter derivatisiert (siehe Kapitel 3.5). Die Proteinkonzentration von Proben wurde nach Lowry bestimmt (siehe Kapitel 3.10).

3.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Proteinbestimmung von Zelllysaten und Gewebehomogenaten erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Der im Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bildet in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch den

nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert, das Absorptionsspektrum verschiebt sich auf ein Absorptionsmaximum bei 595 nm, das als Ausmaß der Proteinkonzentration mit Photometer gemessen wird. Zur Kalibrierung wurde Plasma y-Globulin (Bio-Rad Protein Standard I) verwendet.

3,58, 7,15, 10,73 und 14,3 µg Proteinstandardlösungen als Standardreihe wurden mit Aqua bidest bis auf 0,8 ml ergänzt. Die Proben wurden verdünnt oder unverdünnt mit Aqua bidest bis auf 0,8 ml ergänzt. Nach 15 min Inkubationszeit unter Zusatz von 200 µl Bradford-Reagenz wurde die Extinktion der Standardreihe bzw. der Proben bei der Wellenlange von 595 nm bestimmt.

3.10 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei Reaktionen. Der erste Schritt beruht auf der Biuretreaktion, nämlich auf der Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Im zweiten Schritt reduziert dieser biuretähnliche Komplex das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren). Die resultierende intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung benutzt. 10 µl einer Proteinlösung (Vollblutlysat) wurden mit 1M Natriumhydroxidlösung in Küvette auf 200 µl aufgefüllt. Dazu wurde 1ml Lowry-Reagenz in jede Küvette zupipettiert. Dieser Ansatz wurde 10 min stehen gelassen. Nach Zugabe von 100 µl Folinreagenz wurde der Ansatz 30 min im Dunkeln inkubiert und dann im Smart Spec^{TM}3000 (Bio-Rad) die Extinktion bei der Wellenlänge von 750 nm gegen einen Blindwert (gleicher Ansatz ohne Proteinlösung) gemessen. Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte anhand einer Eichkurve, die durch entsprechende Messungen mit 10, 20, 30 und 40 µl einer Eichlösung (Rinderserumalbumin, 1 mg/ml) erhalten wurde.

3.11 Statistik

Die Verteilung der Daten wurde mittels Kolgomorov-Smirnov-Test analysiert. Normalverteilte stetige Daten wurden mittels t-Test und ANOVA verglichen. T-Test wurde zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen, ANOVA zur Bestimmung signifikanter Unterschiede unter mehreren Gruppen eingesetzt. Im Falle nicht gegebener Normalverteilung ersetzte der U-Test von Mann und Whitney den t-Test nach Student. Ein Wert von $P<0,05$

wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Variationskoeffizienten wurden als VK=(Standardabweichung/Mittelwert der Proben)*100 berechnet. Programme: Prism und SPSS 15.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung einer auf der Liquidchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-basierenten Methode zur Analyse des N^G,N^G-Dimethyl-L-Arginins (ADMA)

Vorraussetzung für die Analytik mit Hilfe der LC-MS/MS war die Verfügbarkeit eines isotopenmarkierten internen Standards, dessen Synthese unter Kapitel 3.1 beschrieben wurde und auf dessen Charakterisierung im Folgenden unter Kapitel 4.1.1 eingegangen wurde.

4.1.1 Synthese, Charakterisierung und Quantifizierung des internen Standards N^G,N^G-[$^2H_6$]-Dimethyl-L-Arginin ([$^2H_6$]-ADMA)

Die Quantifizierung von ADMA mittels LC-MS/MS erforderte einen isotopenmarkierten ADMA-Standard. Kommerziell war ein isotopenmarkiertes ADMA nicht zu erwerben. So erfolgte die Synthese des N^G, N^G-[$^2H_6$]-Dimethyl-L-Arginins ([$^2H_6$]-ADMA) in Anlehnung der Methode von Pundak und Wilchek.

Die Synthese des [$^2H_6$]-ADMA erfolgte ausgehend von L-[$^2H_6$]-Ornithin, Bromcyan-aktivierter Agarose und Dimethylamin. Anstelle der Agarose könnten andere unlösliche Polysaccharide, wie Cellulose oder Dextran, die mit Bromcyanid unter Bildung eines Cyanesters (ROC≡N) aktiviert wurden, zum Einsatz kommen. Diese Gruppe konnte unter milden Bedingungen mit primärem Amin, in diesem Fall nämlich mit dem Kupfer-L-[$^2H_6$]-Ornithin-Komplex durch nukleophile Addition substituierten Pseudoharnstoff (ROC(=NH)NR1R2) bzw. N-substituierten Isoharnstoff bilden. Der Einsatz eines Kupferkomplexes verhinderte die Reaktion der Cyan-Agarose mit der α-Aminogruppe des L-[$^2H_6$]-Ornithins. Das Dimethylamin reagierte schließlich in saurem Milieu in Form einer nukleophilen Substitution mit dem Isoharnstoff zur entsprechend substituierten Guanidinogruppe (Abbildung 4-1).

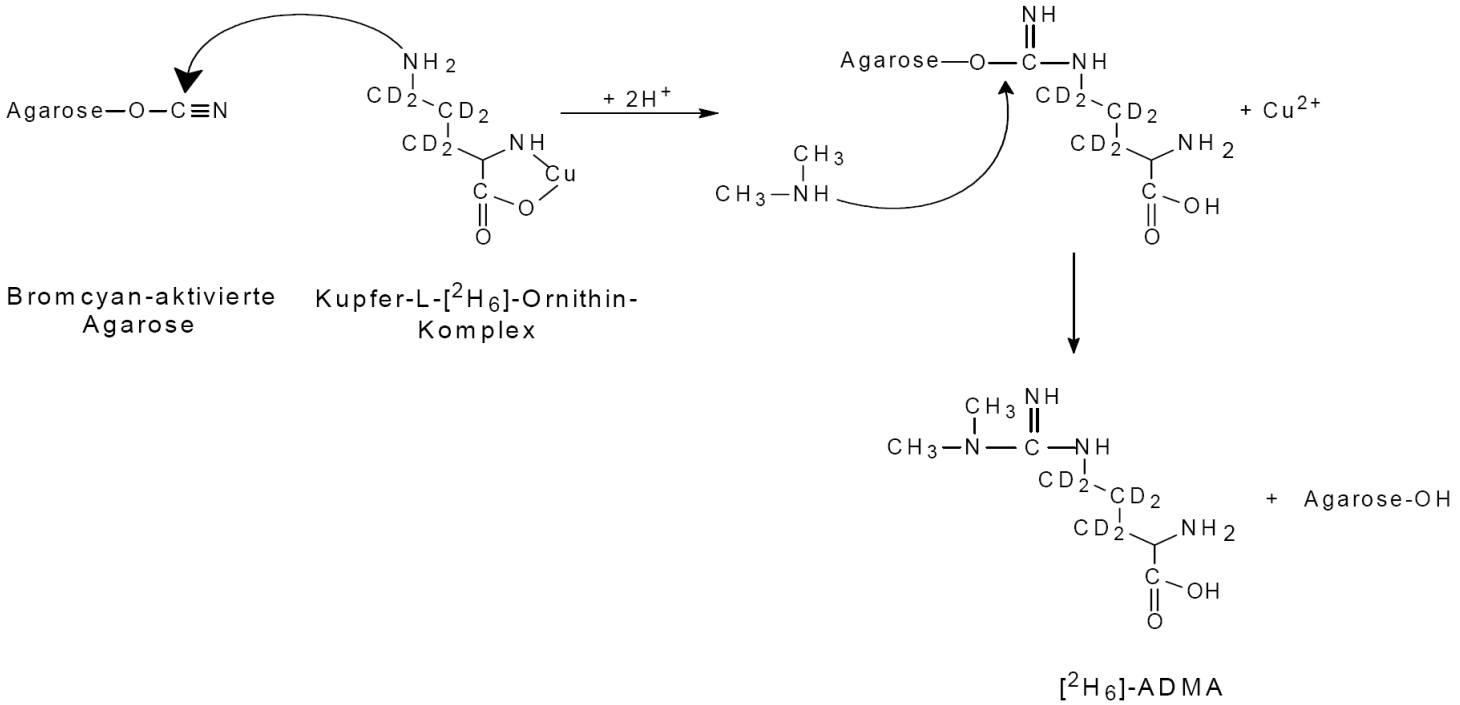


Abbildung 4-1 Synthese des [$^2H_6$]-ADMA unter Anwendung eines Kupfer-L-[$^2H_6$]-Ornithin-Komplexes und Bromcyan-aktivierter Agarose

Die absolute Ausbeute der Synthese lag bei 0,5-1%. Die Isotopenreinheit wurde mittels LC-MS-Scan Programm untersucht. In LC-MS-Spektren des wässrigen [$^2H_6$]-ADMA-Butylesters (m/z 265) war keine Spur von ADMA-Butylester (m/z 259) zu sehen (Abbildung 4-2). Anhand der Angabe des Herstellers über die Isotopenreinheit von der Ausgangssubstanz der Synthese errechneten wir die Isotopenreinheit von [$^2H_6$]-ADMA mit 99%.

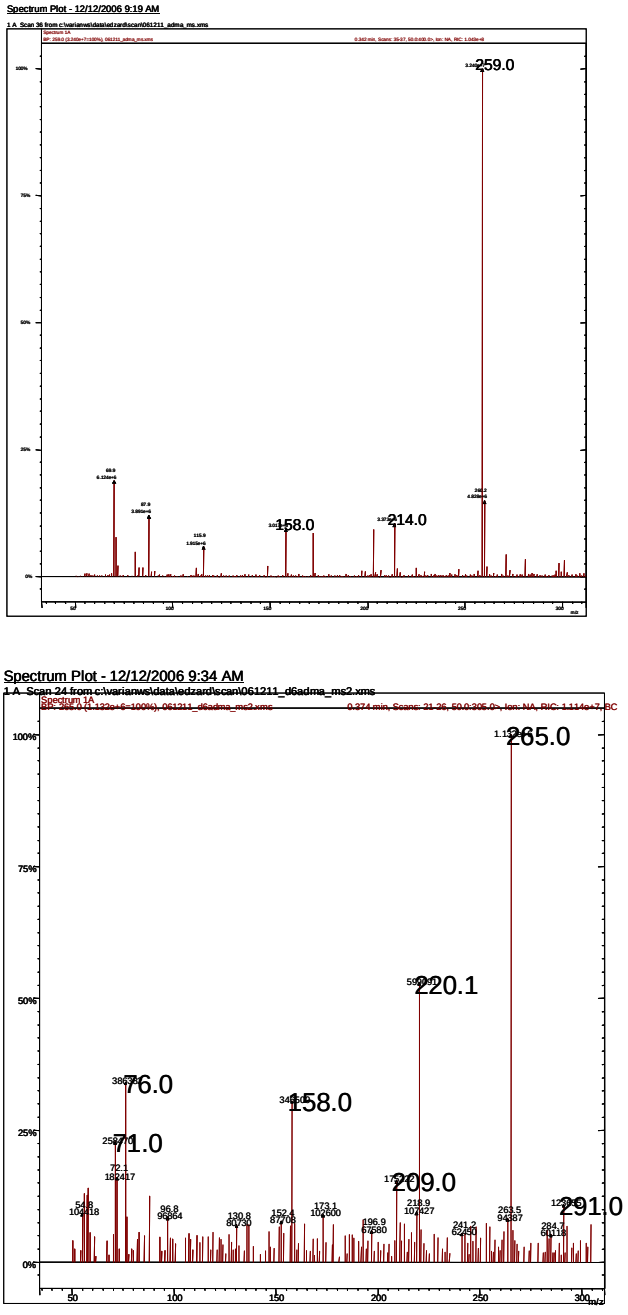


Abbildung 4-2 ESI+ Massenspektren der ADMA-Butylester (Oben) und [$^2H_6$]-ADMA-Butylester (Unten)

4.1.2 Die Analyse der MS/MS-Spektren der Analyten

Die Tochterspektren (LC-MS/MS) von ADMA, [$^{2}H_6$]-ADMA [$^{13}C5^{2}H_6$]-ADMA Arginin, [$^{15}N_2$]-Arginin, [$^{2}H_7$]-Arginin (Butylester-Derivate) unter ESI+ Bedingungen sind in Abbildung 4-3, -4, -5, -6 gegeben. Arginin zeigte Neutralteilchenverlust (NL) von 161. Weil die doppelte Isotopenmarkierung des [$^{15}N_2$]-Arginins an der Guanidino-Gruppe lag, ging sie als NL von 163 während der Fragmentierung verloren (Abbildung 4-4). Im Gegensatz dazu blieb der isotopenmarkierte Wasserstoff von [$^{2}H_7$]-Arginin auf der Hauptkette erhalten, folglich entstanden Produktionen um 7 Da mehr als die von L-Arginin. Die Produktionen m/z 70 für Arginin bzw m/z 77 für [$^{2}H_7$]-Arginin entsprachen einer Bildung des Pyrrolinium-Ions (Abbildung 4-7 A). Die dazwischenlegenden Komplexe (Abbildung 4-7 A) mit m/z 172 entsprechen einem Zyklisierungsprodukt des Butylesters. Nach Verlust der Butylgruppe entstand Fragmentionen m/z 116 von Arginin, die weiter durch Verlust von Kohlenstoffmonoxid und Wasser zu m/z 70 gelangten. Das Zyklisierungsprodukt als Pyrrolinium-Ionen hat auch Vishwanathan in Jahr 2000 in seiner Veröffentlichung zur Bestimmung von Arginin und dessen Analoga in menschlichem Plasma mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode beschrieben.

Zwar haben ADMA- und SDMA-Butylester gleiche Mutterionen m/z 259 und ähnliche Fragmentierungsmuster, dennochist ein Unterschied bei den Tochterionen des Mutterions zu sehen. Bei ADMA-Butylester m/z 259 führt NL 45 Da von Dimethylamin zu spezifischen Tochterionen m/z 214 (Abbildung 4-5). Das gleiche gilt auch für [$^{2}H_6$]-ADMA-Butylester. Die Erhöhung des m/z-Verhältnisses für [$^{2}H_6$]-ADMA-Butylester-Tochterionen um 6 Da mit 220 trägt den schweren Isotopen Rechnung (Abbildung 4-5). Weil die zwei Methylgruppen von [$^{13}C_5{}^{2}H_6$]-ADMA-Butylester an Guanidinostickstoffatom 6 fach mit Deuterium markiert sind, erhöhte der NL mit 51 um 6 Da gegenüber ADMA (Abbildung 4-6). Dieser Befund ist auch ein Beweis dafür, dass der Verlust von Dimetylamin aus der methylierten Guanidinogruppe stammte. SDMA-Butylester bei m/z 259 erwies NL von 31 Da, was einen Verlust von Monomethylamin bedeutete (Abbildung 4-4). Es ist wichtig zu erwähnen, dass der NL von 31 Da nicht beim ADMA-Butylester oder beim [$^{2}H_6$]-ADMA-Butylester beobachtet wurde. Ein Verlust von Dimethylamin mit NL von 45 Da war bei SDMA nicht der Fall. Somit mussten ADMA und SDMA trotz gleicher Mutterionen nicht chromatographisch aufgetrennt werden, sondern konnten mittels ihrer spezifischen Fragment-Ionen selektiv detektiert werden.

Tabelle 4-1 Mutterionen und Tochterionen der verschiedenen Butylester von Arginin und dessen methylierten Derivaten

Analyt	Elternionen $[M+H]^+$	CE (eV)	Tochterionen
L-Arginin	231	-22	70
L-[$^2H_7$]-Arginin	238	-22	77
L-[$^{15}N_2$]-Arginin	233	-22	70
ADMA	259	-16	214
[$^2H_6$]-ADMA	265	-16	220
[$^2H_6$]-[$^{13}C_5$]-ADMA	270	-16	219
SDMA	259	-14	228

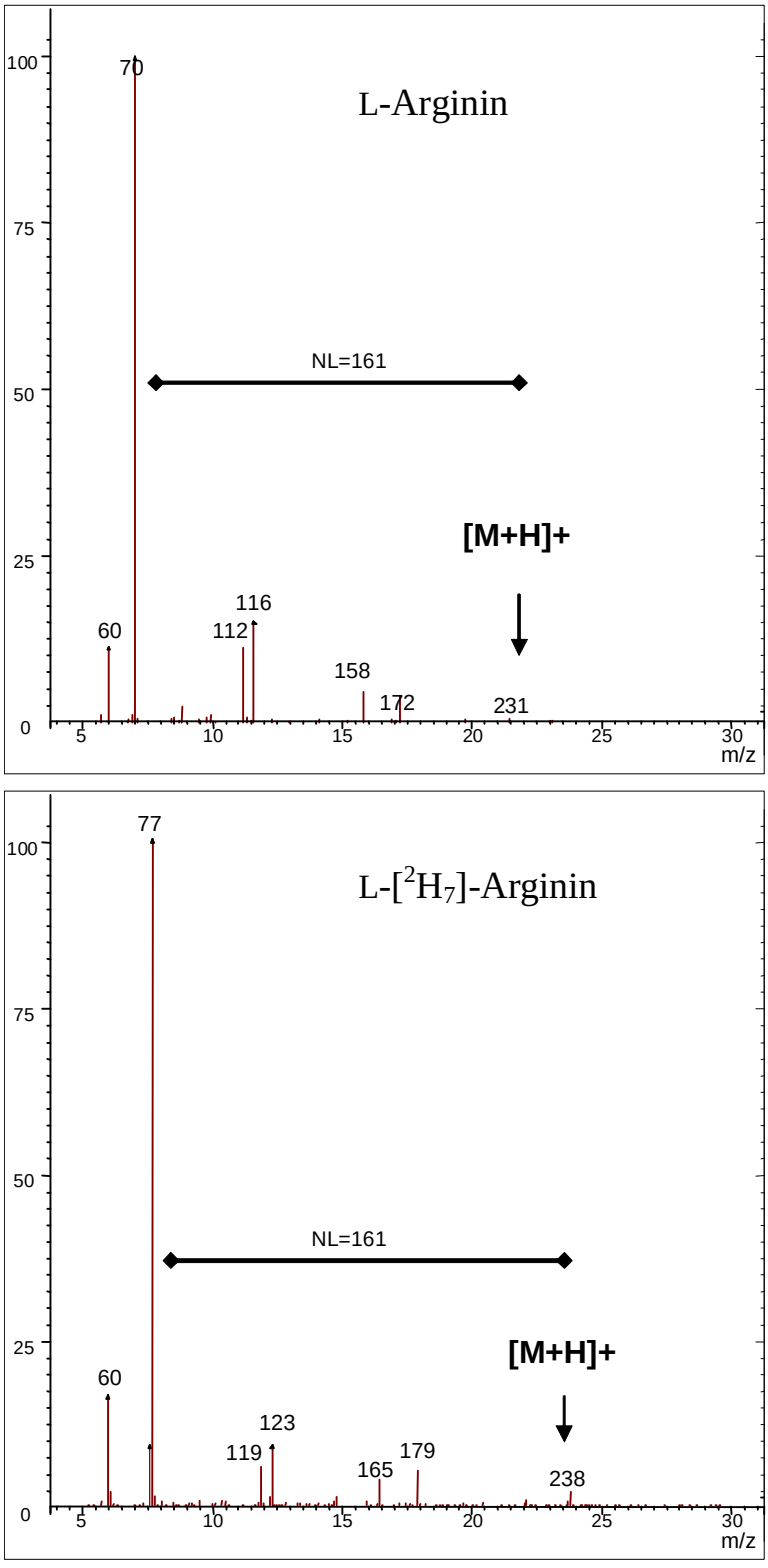


Abbildung 4-3 ESI positive MS/MS-Spektren von Butylester der L-Arginin (Oben) und L-[$^2H_7$]-Arginin (Unten), die Elternionen als Ausgangsionen für die Kollision werden mit $[M+H]^+$ bezeichnet: NL= Neutralteilchenverlust

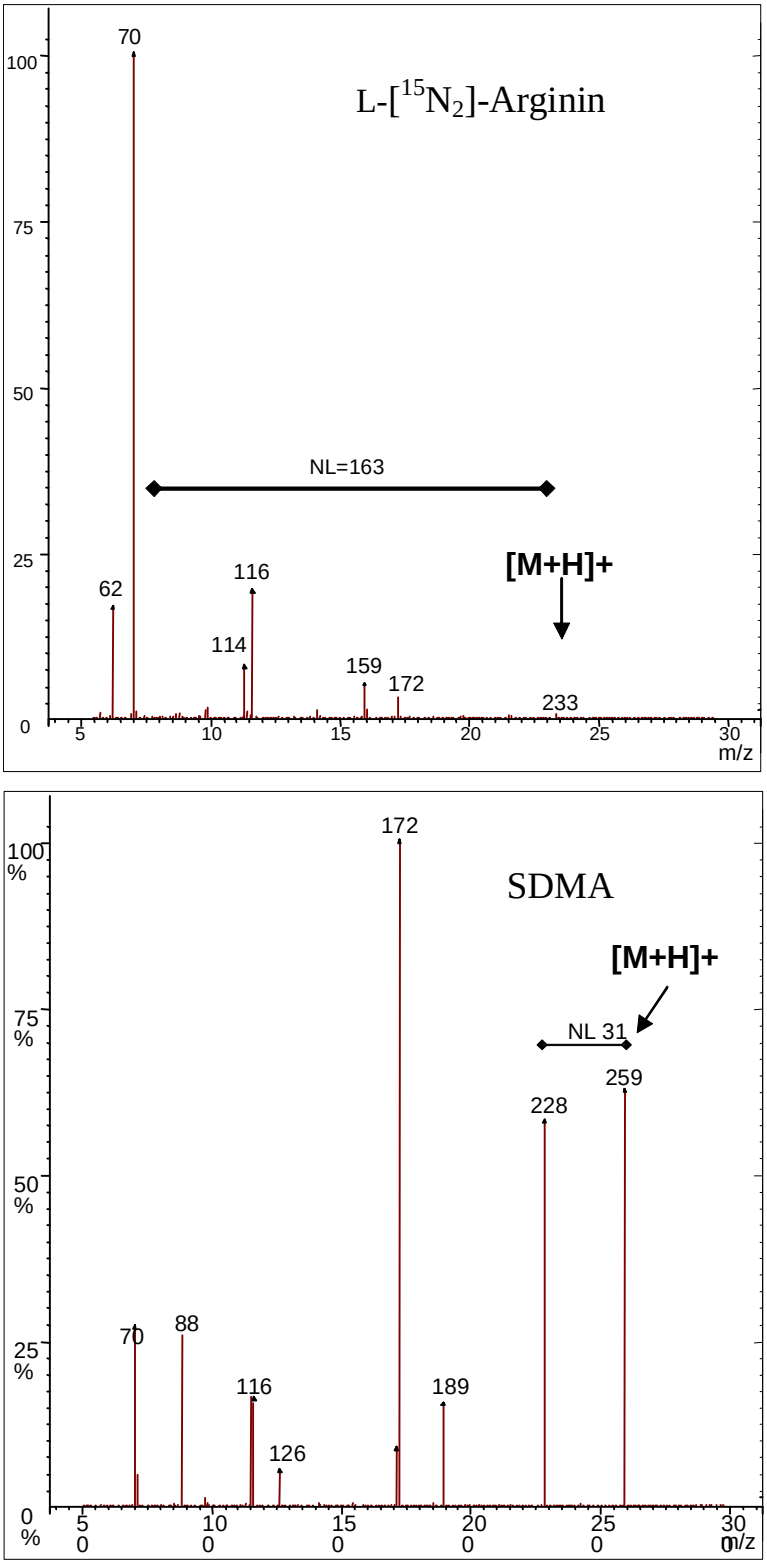


Abbildung 4-4 ESI positive MS/MS-Spektren von Butylester der L-[$^{15}N_2$]-Arginin (Oben) und SDMA (Unten), die Elternionen als Ausgangsionen für die Kollision werden mit $[M+H]^+$ bezeichnet. NL= Neutralteilchenverlust

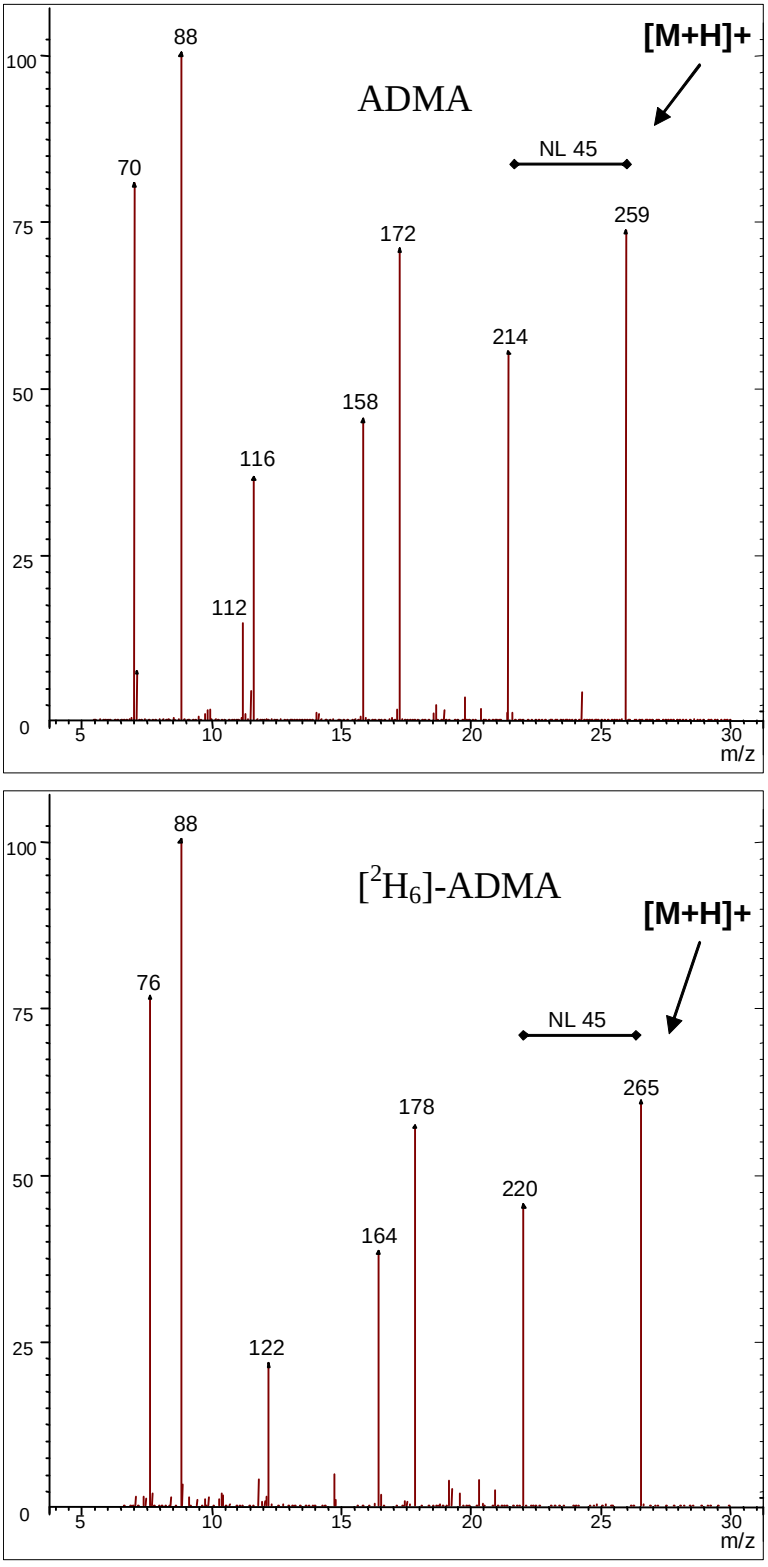


Abbildung 4-5 ESI positive MS/MS-Spektren von Butylester der ADMA (Oben) und [3,3,4,4,5,5-$^{2}H_6$]-ADMA (Unten), die Elternionen als Ausgangsionen für die Kollision werden mit $[M+H]^+$ bezeichnet. NL= Neutralteilchenverlust

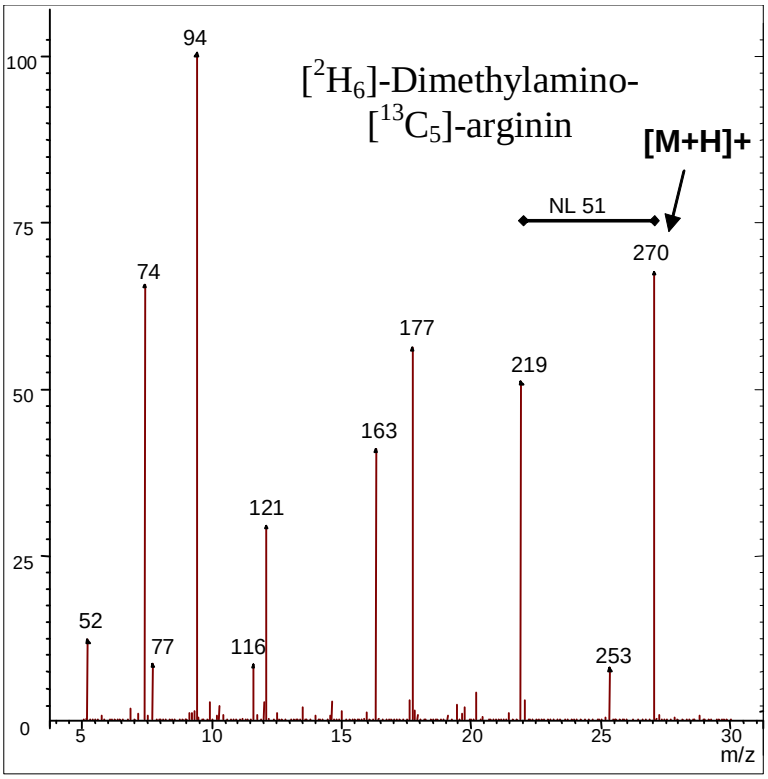


Abbildung 4-6 ESI positive MS/MS-Spektren von Butylester des [1,1,1,1´,1´,1´-$^{2}H_6$]-[Dimethylamino-1,2,3,4,5-$^{13}C_5$]-Arginin([$^{2}H_6$]-[$^{13}C_5$]-ADMA). Die Mutterionen als Ausgangsionen für die Kollision werden mit $[M+H]^+$ bezeichnet. NL= Neutralteilchenverlust

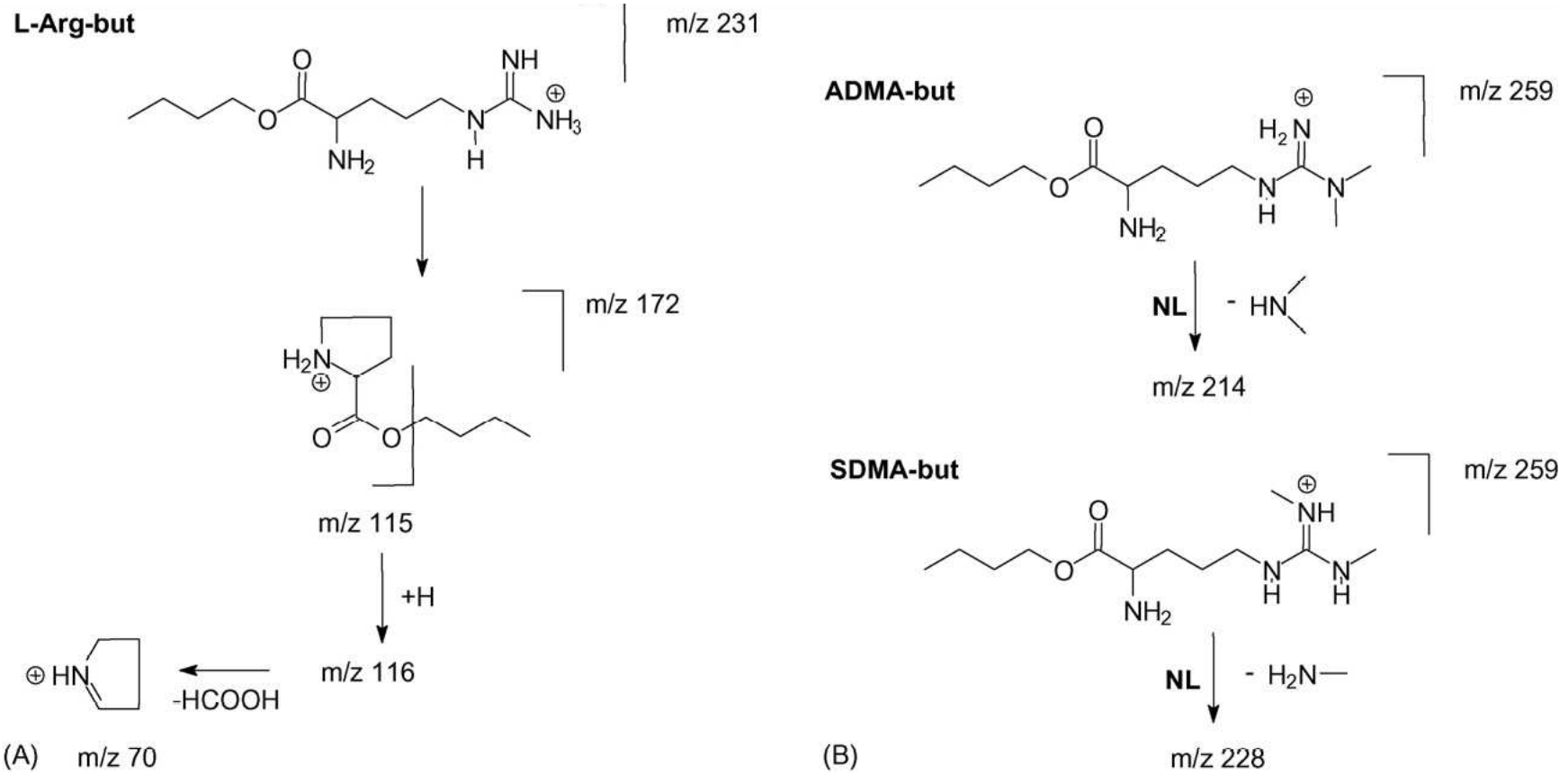


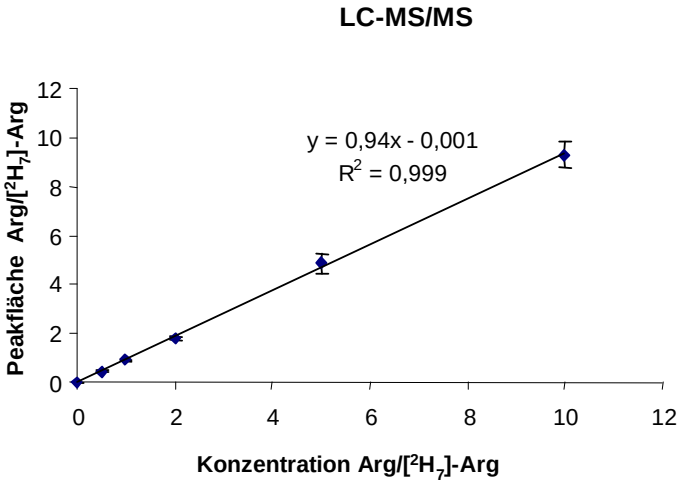
Abbildung 4-7 Etablierte Mechanismen für die Entstehung der charakteristischen Tochterionen m/z 70 für Arginin-Butylester(A), m/z 214 für ADMA-Butylester(B obern), m/z 228 für SDMA-Butylester(B untern). Alle Mutterionen entstanden durch ESI+ und gelangen über Kollision mit Argon Gas zu Tochterionen

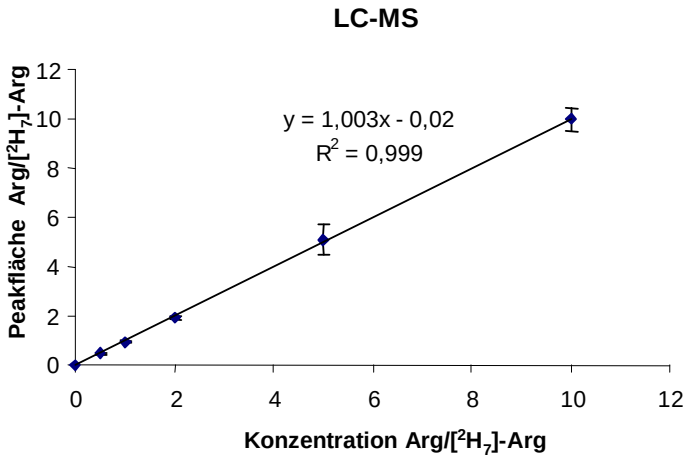
4.1.3 Validierung der LC-MS/MS-Methode zur Analyse des N^G,N^G-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in menschlichem Plasma

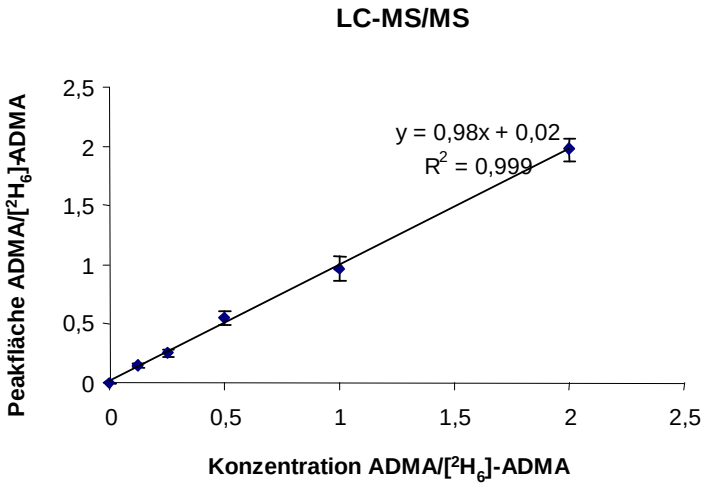
Die Eignung von [$^2H_7$]-Arginin und [$^2H_6$]-ADMA als internem Standard in der LC-MS/MS-Analytik wurde mit Verdünnungsreihen überprüft. Dazu wurde eine Kalibrierung für L-Arginin, ADMA und SDMA in wässriger Lösung durchgeführt. Arginin wurde in 6 verschiedenen Konzentrationen von 0, 25, 50, 100, 250, und 500 µmol/l eingesetzt, ADMA und SDMA wurden in Konzentrationen von 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 µmol/l in fünffacher Ausführungen eingesetzt. Die Kalibrierlösungen wurden jeweils mit 5 µl internem Standard-Mix von 50 µmol/l [$^2H_7$]-Arginin und 2 µmol/l [$^2H_6$]-ADMA zu Butylester umgesetzt. Die lineare Regression des Peakflächenverhältnisses zwischen m/z 70 und m/z 77 und dem Verhältnis des Analyten zum internen Standard ergab die Regressionsgleichung Y=0,94x -0,001 (r^2 = 0,999) für L-Arginin mit LC-MS/MS-Methode, Y=0,98x + 0,02 (r^2 = 0,999) für ADMA (m/z 214 und m/z 220); Y=2,05x + 0,01 (r^2 = 0,999) für SDMA (m/z 228 und m/z 220).

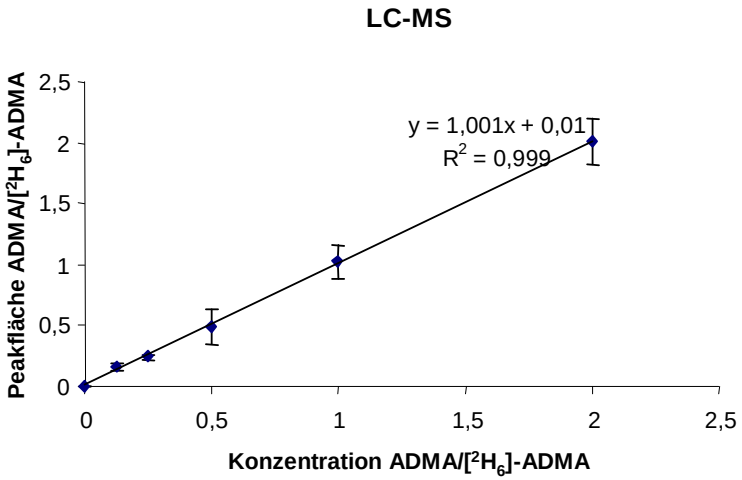
Unter LC-MS Bedingung waren die Regressionskurven folgende Y=1,003x -0,02 (r^2 = 0,999) für L-Arginin (m/z 228 und m/z 220), Y=1,001x + 0,01 (r^2 = 0,999) für ADMA (m/z 259 und m/z 265); Y=1,02x + 0,03 (r^2 = 0,998) für SDMA (m/z 259 und m/z 265).

Nur unter MS-Bedingungen wurde eine Steigung von 1 errechnet. Die Unterschiede in der Steigung zwischen MS-Methode und MS/MS-Methode beruhten auf dem unterschiedlichen Maß von Fragmentierung der internen Standards und Analyten. Es war deutlich bei SDMA zu beobachten, dass dessen Fragment-Ion etwa doppelt so intensiv war wie das des internen Standards. Deshalb wurde zwar bei der MS-Methode die Steigung 1, aber bei der MS/MS-Methode die Steigung 2,05 beobachtet. Die Fragmentierung der isotopenmarkierten und unmarkierten Verbindungen war auch ein wenig unterschiedlich, zu erkennen an der Steigung < 1 bei der Kalibierkurve für Arginin und ADMA bei der MS/MS-Methode. Ohne Fragmentierung mit MS-Methode betrug die Steigung ≈1 bei beiden Verbindungen. Die Kalibierkurven in Wasser mit MS und MS/MS (Tandem-MS) sind in Abbildung 4-8 nebeneinander graphisch dargestellt.


LC-MS/MS
y = 0,94x - 0,001
R2 = 0,999
Peakfläche Arg/[2H7]-Arg
Konzentration Arg/[2H7]-Arg
0
2
4
6
8
10
12


LC-MS
y = 1,003x - 0,02
R2 = 0,999
Peakfläche Arg/[2H7]-Arg
Konzentration Arg/[2H7]-Arg
0
2
4
6
8
10
12


LC-MS/MS
y = 0,98x + 0,02
R2 = 0,999
Peakfläche ADMA/[2H6]-ADMA
Konzentration ADMA/[2H6]-ADMA
0
0,5
1
1,5
2
2,5


LC-MS
y = 1,001x + 0,01
R2 = 0,999
Peakfläche ADMA/[2H6]-ADMA
Konzentration ADMA/[2H6]-ADMA
0
0,5
1
1,5
2
2,5

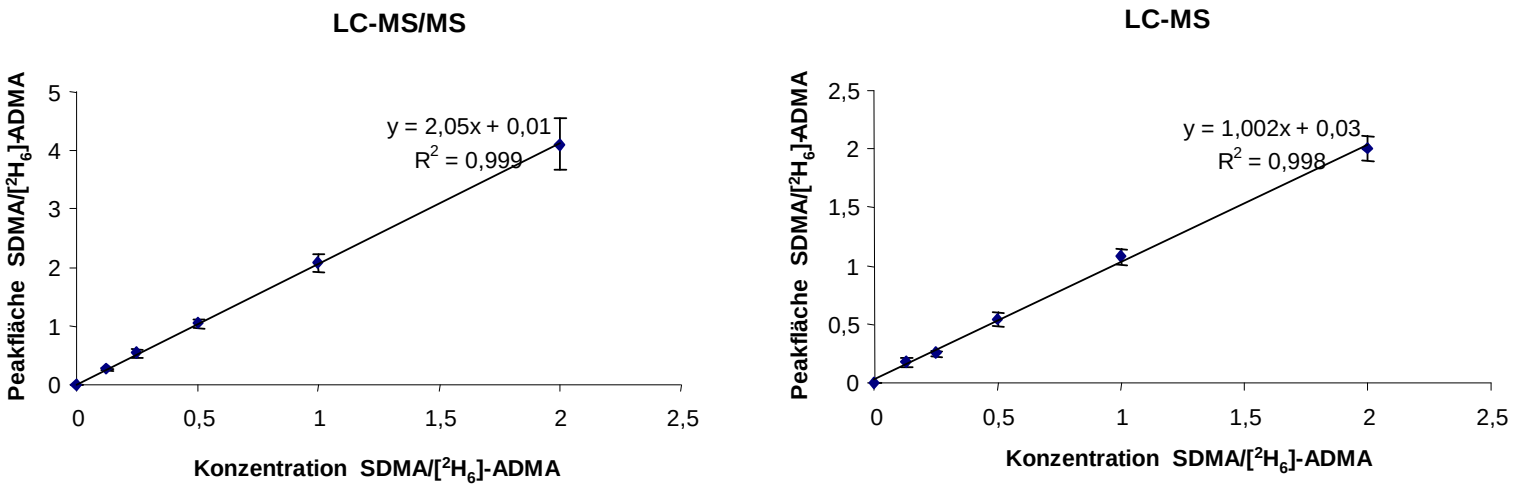


Abbildung 4-8 Standardkurven von Arginin, ADMA und SDMA mit MS/MS &MS in Wasser. Zugegeben waren 5 µl interner Standard mit [$^2H_6$]-ADMA (2µmol/l)& [$^2H_7$]-Arginin (50µmol/l) (Mittelwert±SD, n=5)

Die LC-MS/MS-Methode wurde weiter in menschlichem Plasma validiert. In fünffacher Ausführung wurden verschiedene Konzentrationen von L-Arginin in 0, 0,5, 1, 25, 50, 100 und 250 µmol/l, ADMA und SDMA in 0, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, und 4 µmol/l in menschliches Plasma zugegeben. Nach Zugabe von 5 µL internem Standard-Mix von 50 µmol/l [$^2H_7$]-Arginin und 2 µmol/l [$^2H_6$]-ADMA wurde das Plasma wie in Kapitel 3.4 beschrieben weiter bearbeitet. Ein typisches Chromatogramm einer Plasmaprobe ist in Abbildung 4-9 dargestellt.

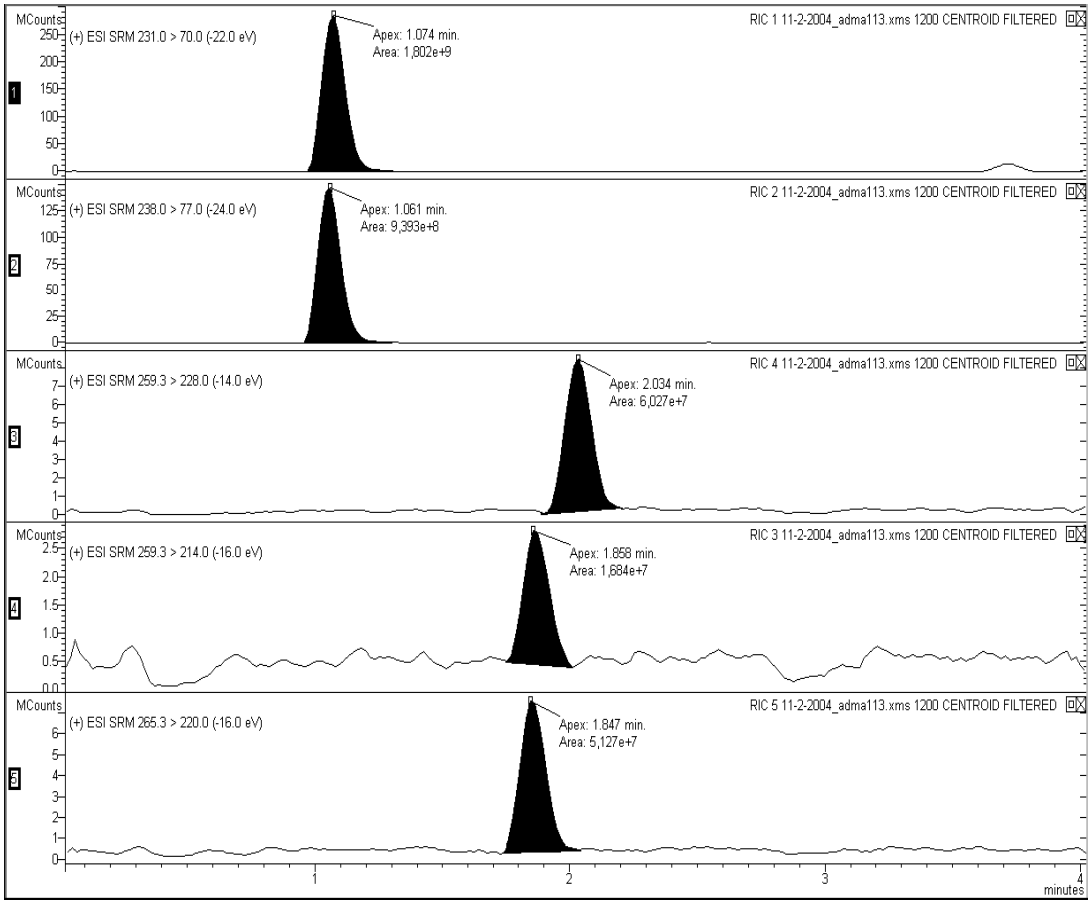


Abbildung 4-9 LC-MS/MS-Chromatogramm von menschlichem Plasma, die Peaks von oben bis unten sind in der Reihenfolge L- Arginin, [$^2H_7$]-L-Arginin (interner Standard), ADMA, SDMA und [$^2H_6$]-ADMA (interner Standard). Zu 50µl menschlichem Plasma wurde 5µl interner Standard, welcher 50µmol/l L- [$^2H_7$]-Arginin und 2µmol/l [$^2H_6$]-ADMA enthielt, zugegeben. Alle Verbindungen wurden durch ihre spezifischen Mutterionen und Tochterionen selektiert. Scanfrequenz war 1 Sekunde, ESI+ (Elektronspray-Ionisation), MRM („*multiple-reaction monitoring*“)

Lineare Regressionsanalysen zwischen den gefundenen (y) und den zugesetzten Konzentrationen ergaben die Gleichungen Y=1,01x + 70,3 (r^2 = 0,999) für Arginin, Y=1,00x + 0,45 (r^2 = 0,999) für ADMA und Y=1,01x + 0,42 (r^2 = 0,999) für SDMA. Die Daten der Validierung sind in Tabelle 4-2 aufgeführt.

Tabelle 4-2 Validierung der LC-MS/MS-Methode für die quantitative Bestimmung von L-Arginin, ADMA und SDMA in menschlichem Plasma.

Analyt	**Zusatz** [b] **MW(SD)** [d] µmol/l	**Messung MW(SD)** µmol/l	**Akkuratheit % MW(SD)** µmol/l	**CV %** [c]
SDMA	0	0,424 (0,024)	NA [a]	5,6
	0,05	0,479 (0,008)	109 (14,6)	1,7
	0,1	0,515 (0,013)	90,8 (11,4)	2,5
	0,5	0,924 (0,043)	100 (3,9)	4,7
	1	1,449 (0,041)	103 (3,7)	2,9
	2	2,441 (0,070)	101 (3,1)	2,9
	4	4,480 (0,109)	101 (2,4)	2,4
L-Arginin	0	69,4 (1,0)	NA [a]	1,4
	0,5	70,0 (0,6)	111 (22)	0,9
	1,0	70,4 (0,4)	97,7 (19)	0,6
	25	95,5 (1,0)	104 (5,5)	3,2
	50	122 (2,6)	105 (2,3)	2,1
	100	173 (5,5)	104 (2,5)	3,2
	250	320 (8,6)	100 (1,5)	2,7
ADMA	0	0,448 (0,007)	NA [a]	1,5
	0,05	0,496 (0,011)	96,9 (10,1)	2,3
	0,1	0,553 (0,004)	105 (3,9)	0,8
	0,5	0,949 (0,012)	100 (1,1)	1,3
	1	1,464 (0,022)	102 (1,0)	1,5
	2	2,422 (0,030)	98,7 (1,4)	1,3
	4	4,443 (0,104)	99,9 (1,2)	2,3

[a] NA, Nicht Auswertbar, zugesetzte and gemessene Konzentration waren in µmol/L (n=5),
[b] gegeben in fünffacher Aufführung
[c] CV zeigt die Präzision der Methode
[d] MW(SD) h, Mittelwert (Standardabweichung)

Die mittleren gemessenen Konzentrationen von Analyten für die verschiedenen zugesetzten Mengen an Analyten und deren Standardabweichung (SD) dienten als Berechnungsgrundlage der Präzision und der Akkuratheit der Methode. Die Akkuratheit der Messung von L-Arginin, ADMA und SDMA lag bei 97,7 %-111 %, 96,9 %-105 % und 90,8 %-109 %. Die mittlere Präzision (VK %) für ADMA, SDMA und Arginin lag bei 1,57 %, 3,24 % und 2,01 %. Die LC-MS/MS-Methode in menschlichem Plasma für den Konzentrationsbereich von 1 µmol/l bis 250 µmol/l Arginin, von 0.05 µmol/l bis 4 µmol/l ADMA und SDMA zeichnete sich durch gute Präzision und Akkuratheit aus. 1 µmol/l diente als Quantifizierungsgrenze für L-Arginin und 50 nmol/L für ADMA und SDMA. Das Detektionslimit, definierte als Signal zu Hintergrund-("Noise")-Verhältnis von 3:1 mit LC-MS/MS bei Arginin, ADMA und SDMA betrugen 45nmol/l, 3nmol/l und 2nmol/l. Die Zugabe von L-Arginin, ADMA oder SDMA in einer Probe störten sich nicht gegenseitig. Der Mittewert (SD) der Retentionszeit des Butylesters von L-Arginin, ADMA und SDMA waren 1,03 (0,04) min (VK=3,9 %; n=6) 1,84 (0,02) min (VK=1,6 %; n=6), 2,03 (0,02) min (VK=0,8 %; n=6). Unterschiede in der Retentionszeit von mit Isotopen markierten und unmarkierten Verbindungen waren nicht statistisch signifikant. Die instrumentelle Präzision und Reproduziertbarkeit der Methode wurden mit 10 Proben an einem Tag und an 10 verschiedenen Tagen bestimmt. An einem Tag lag die Präzision für L-Arginin, ADMA und SDMA bei 3,3 %, 2,6 % und 2,5 %. An 10 verschiedenen Tagen lag sie bei 4,7 %, 4,4 % und 3,9 %.

Als praktische Anwendung der Methode wurden in einer klinischen Studie, dem „Hamburg Burger Trial“ (Rudolph et. al 2008), über den Effekt verschiedener Fastfood-Mahlzeiten auf die vaskuläre Funktion und auf die kardiovaskulären Risikomarker Arginin, ADMA und SDMA von 24 Probanden (Alter 32±11 Jahre) analysiert. Für die Studie lag ein positives Votum der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg (Aktenzeichen: OB-053/04) und das schriftliche Einverständnis aller Probanden vor. Die Konzentrationen von ADMA, Arginin und SDMA im nüchternen Zustand am Morgen lagen im Mittelwert bei 0,43 ± 0,16, 79 ± 27 und 0,40 ± 0,14 µM (MW ± SD). Die Konzentration von ADMA und SDMA lagen bei 0,17-0,9 und 0,19-0,65 µM (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3 Plasma ADMA, Arginin, SDMA Werte aus 24 gesunden Probanden

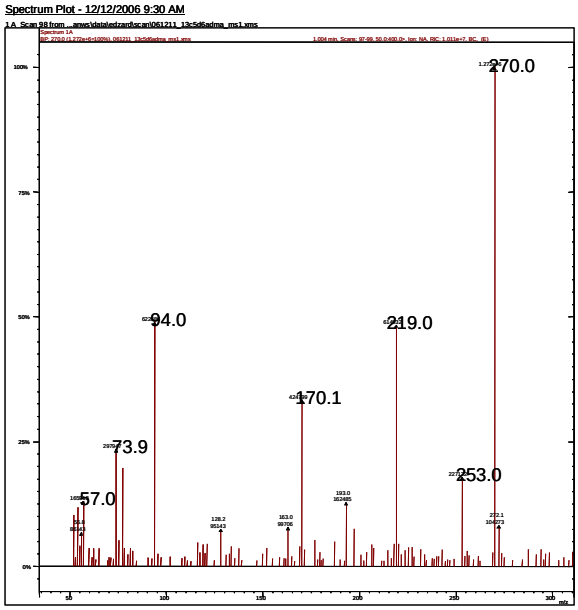
Geschlecht	**ADMA [µM]**	**Arginin [µM]**	**SDMA [µM]**
männlich	0,32	45	0,27
männlich	0,53	49	0,52
männlich	0,59	109	0,45
weiblich	0,45	79	0,28
weiblich	0,55	96	0,43
weiblich	0,9	137	0,65
weiblich	0,64	101	0,53
weiblich	0,38	52	0,3
männlich	0,31	78	0,35
männlich	0,21	36	0,19
weiblich	0,24	52	0,22
männlich	0,17	49	0,24
weiblich	0,39	97	0,36
weiblich	0,4	84	0,32
weiblich	0,38	71	0,39
männlich	0,51	95	0,57
weiblich	0,26	79	0,27
männlich	0,53	142	0,65
weiblich	0,55	98	0,51
männlich	0,39	74	0,6
weiblich	0,32	68	0,37
weiblich	0,56	82	0,49
männlich	0,32	71	0,32
weiblich	0,31	64	0,23
MW±SD	0,43±0,16	79±27	0,40±0,14

4.2 DDAH-Aktivitätsassay in Gewebehomogenat

4.2.1 Synthese, Charakterisierung und Quantifizierung des internen Standards N^G,N^G-[$^5C_{13}{}^2H_6$]-Dimethyl-L-Arginin ([$^5C_{13}{}^2H_6$]-ADMA)

Für die DDAH-Aktivitätsmessung wurde isotopenmarkiertes N^G, N^G-[$^2H_6$]-Dimethyl-L-Arginin ([$^2H_6$]-ADMA) statt normales ADMA als Substrat eingesetzt, damit das endogene ADMA die Untersuchung nicht beeinflusste. Um [$^2H_6$]-ADMA zu quantifizieren, wurde ein zweiter isotopenmarkierter ADMA-Standard hergestellt. Für die massenspektrometrische Quantifizierung sollte sich dieser zweite ADMA-Standard in der Masse deutlich von endogenem ADMA und von [$^2H_6$]-ADMA unterscheiden. Die Synthese des [$^5C_{13}{}^2H_6$]-ADMA, erfolgte ausgehend von L-[1,2,3,4,5-$^{13}C_5$]-Ornithin, Bromcyan-aktivierter Agarose und [1,1,1,1´,1´,1´-$^2H_6$]-Dimethylamin in Anlehnung der Methode von Pundak und Wilchek. Der Reaktionsmechanismus läuft wie in Kapitel 4.1.1 für die Synthese [$^2H_6$]-ADMA beschrieben ab. Insgesamt ergab sich bei der in 4.1.1 beschriebene Synthese eine Ausbeute von 0,5 bis 1%. Die Isotopenreinheit wurde mit LC-MS-Spektren untersucht.

In LC-MS-Spektren des wässrigen [$^5C_{13}{}^2H_6$]-ADMA-Butylesters (m/z 270) war keine Spur von ADMA-Butylester (m/z 259) zu sehen (Abbildung 4-10). Anhand der Angabe des Herstellers über die Isotopenreinheit von Ausgangssubstanzen der Synthese errechneten wir die Isotopenreinheit von [$^5C_{13}{}^2H_6$]-ADMA mit 99%.



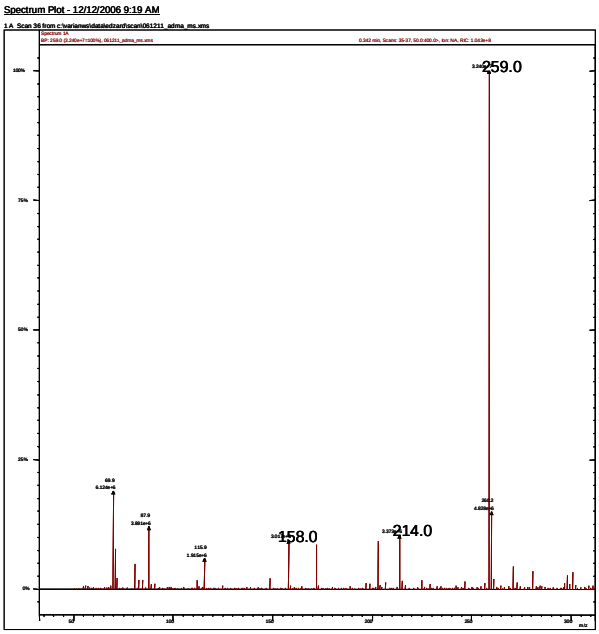


Abbildung 4-10 ESI+ Massenspektren der ADMA-Butylester (Unten) und [$^{5}C_{13}{}^{2}H_{6}$]-ADMA-Butylester (Oben)

4.2.2 LC-MS/MS-basierente Methode zur Analyse des N^{G},N^{G}-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in hohem Durchsatz

Während der Dissertation wurde die vorgestellte LC-MS/MS-Methode zur Analyse des ADMA optimiert, indem wir die 96-Wellplatten eingeführt haben. Wir haben die Methode für deren Einsatz in klinischen Studien validiert (E.Schwedhelm et al. 2006). Die 96-Wellplatten wurden für die nachfolgenden Versuche verwendet. Ein Beispielchromatogramm aus dem Nierenhomogenat von Mäusen wird unten dargestellt.

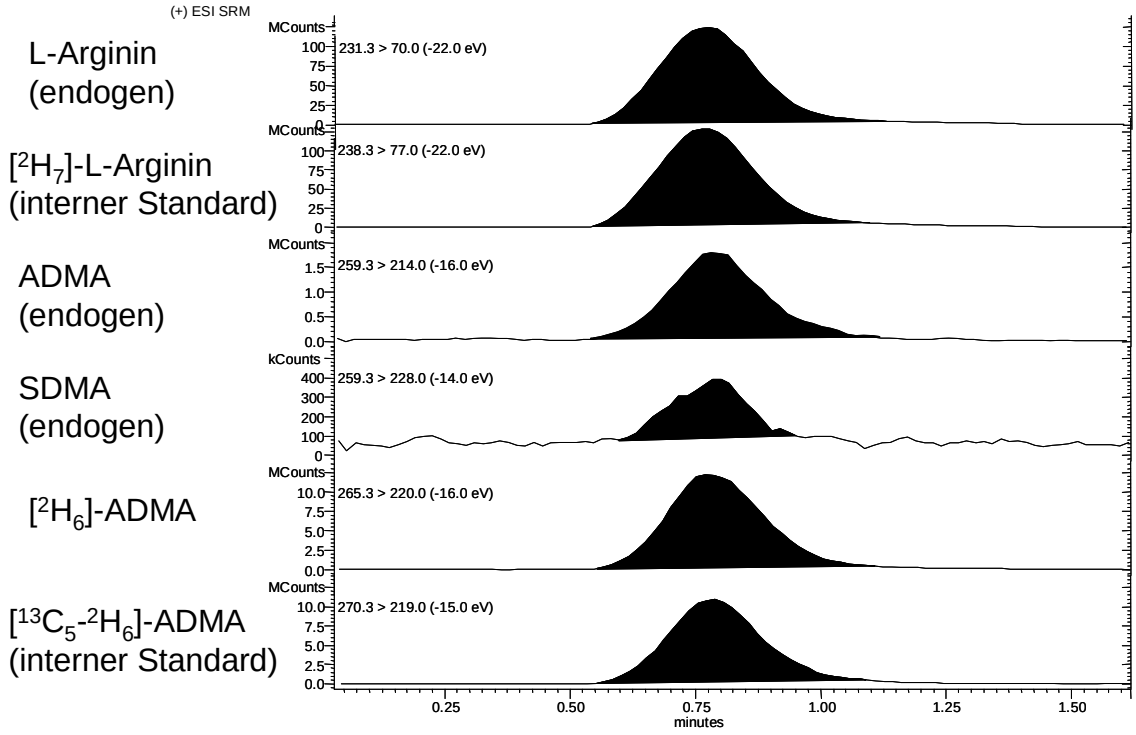


Abbildung 4-11 LC-MS/MS-Chromatogramm von Nierenhomogenat von Mäusen, die Peaks von oben bis unten sind in der Reihenfolge L- Arginin, [$^2H_7$]-L-Arginin (interner Standard), ADMA, SDMA, [$^2H_6$]-ADMA (10 µM) und [$^{13}C_5{}^2H_6$]-ADMA (interner Standard). Zu 100 µl internem Standard, welcher 5 µmol/l L- [$^2H_7$]-Arginin und 1µmol/l [$^{13}C_5{}^2H_6$]-ADMA enthielt, wurden 20 µl Nierenhomogenat, zugegeben. Alle Verbindungen wurden durch ihre spezifische Mutterionen und Tochterionen selektiert. Scanfrequenz war 0,97 Sekunde, ESI+ (Elektronspray-Ionisation), MRM („*multiple-reaction monitoring*“)

4.2.3 Linearität des LC-MS/MS- Systems

[$^2H_6$]-ADMA wurde in Konzentrationen von 0,05, 0,1, 0,5, 1, 10, und 50 µmol/l in dreifacher Ausführung eingesetzt. Der interne Standard [$^{13}C_5{}^2H_6$]-ADMA wurde jeweils von 1 µmol/l eingesetzt. Das Peakflächenverhältnis zwischen [$^2H_6$]-ADMA und [$^{13}C_5{}^2H_6$]-ADMA mittels LC-MS/MS und das Verhältnis deren Konzentration ergab die Regressionsgleichung Y=0,9505x (Abbildung 4-12). Die Kalibrierkurve von [$^2H_6$]-ADMA und internem Standard [$^{13}C_5{}^2H_6$]-ADMA im Konzentrationsbereich, in dem Versuche für den DDAH-Aktivitätsassay durchgeführt wurden, zeichnete sich durch eine gute Linearität aus.

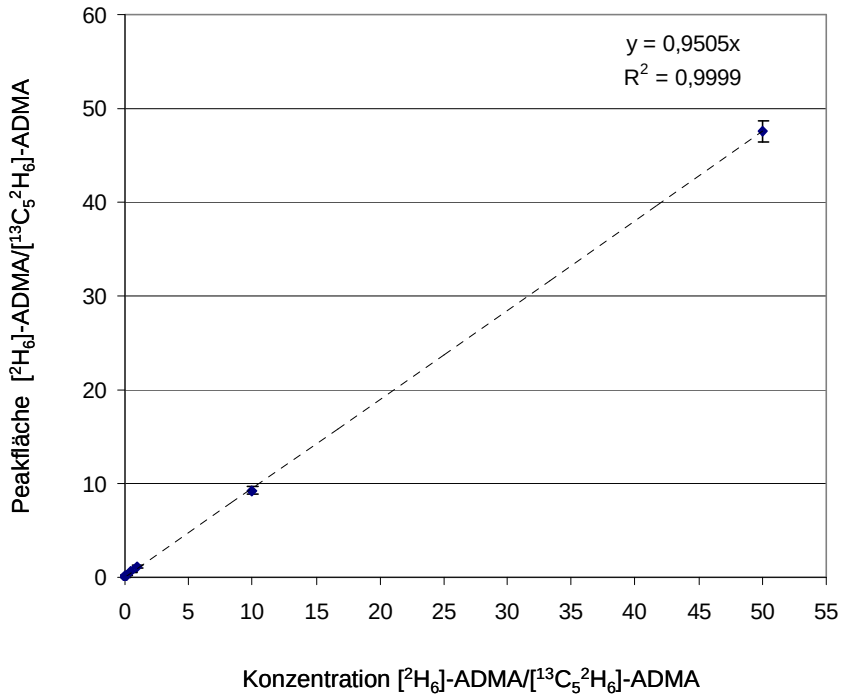


Abbildung 4-12 Standardkurve [$^2H_6$]-ADMA/[$^{13}C_5{}^2H_6$]-ADMA mit LC-MS/MS im Wasser (Mittelwert±SD, n=3)

4.2.4 Ermittlung einer optimalen Inkubationszeit

Unter gleichen Bedingungen wurde Nierenhomogenat von Mäusen (n=8) untersucht. Wie in Abbildung 4-13 gezeigt, wurde 15 µM [$^2H_6$]-ADMA nach 10 min um 26,6 ± 4,4 (Mittelwert ± SEM) Prozent abgebaut. Nach 60 min erreicht der Abbau 59,4 ± 6,4 (Mittelwert ± SEM) Prozent der ursprünglichen Konzentration.

Untersuchungen zur Hemmbarkeit:

Mit 1000 µM L-Arginin inkubiert reduzierte sich der [$^2H_6$]-ADMA-Abbau nach 10 min um etwa die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle, $p<0,05$.

Nach 60 min war [$^2H_6$]-ADMA-Abbau mit 1000 und 3000 µM Citrullin sowie mit 1000 µM L-Arginin gehemmt, die Hemmung war jedoch statistisch nicht signifikant.

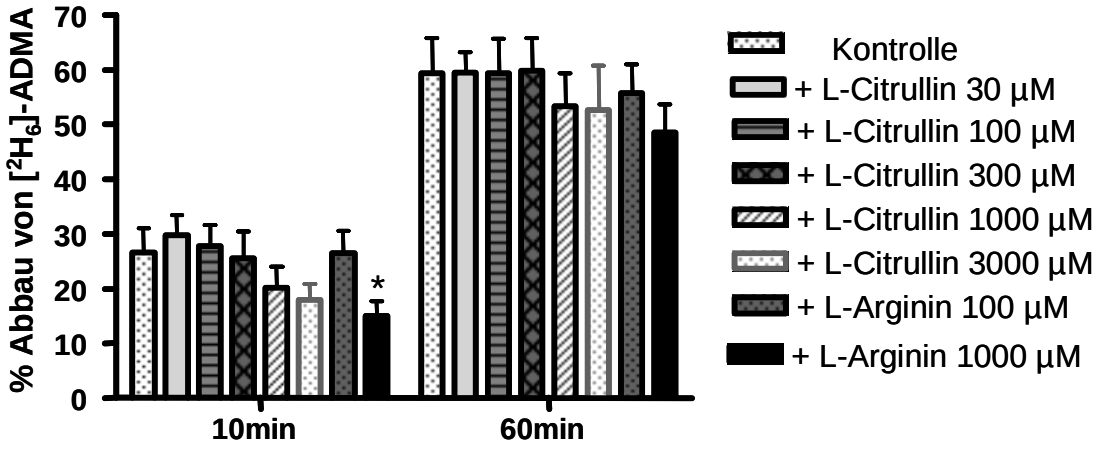


Abbildung 4-13 Abbau [$^2H_6$]-ADMA in % der Ausgangskonzentration unter Inkubation mit L-Citrullin und L-Arginin nach 10 und 60 Minuten (Mittelwert±SEM), n=8, *P<0,05 vs Kontrolle

4.2.5 Ermittlung einer optimalen Proteinkonzentration

Gewebe von 4 Mauslebern wurde jeweils mit einer 1:6 (m/m) Verdünnung homogenisiert. Der Proteingehalt des Homogenats entsprach ca. 20 g/l Protein. Diese wurden weiter zu Proteinkonzentration von 0,1,1, 3 und 10 g/l mit PBS verdünnt. Alle Verdünnungen des Homogenats waren mit 60 µM und 20 µM [$^2H_6$]-ADMA für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die prozentuelle Abnahme von [$^2H_6$]-ADMA nahm mit abnehmender Proteinkonzentration ab. Bei Proteinkonzentrationen von 20 g/l oder 10 g/l erhielt man gute reproduzierbare Ergebnisse. Von 60 µM [$^2H_6$]-ADMA wurde im Homogenat mit 20 g/l Protein nach 60 min 31,4 % ± 3,3 % (Mittelwerte ± SEM) (n=4) abgebaut, bei 10 g/l Protein wurde nach 60 min nur 19,56 % ± 2,38 % (Mittelwerte ± SEM) (n=4) von 60 µM [$^2H_6$]-ADMA abgebaut.

Eine Proteinkonzentration von 10-20 g/l wurde deshalb als optimale Proteinkonzentration eingestuft. Für eine höhere Konzentration von Proteinen stellte das Kleintier in der Regel nicht genug Gewebe zu Verfügung

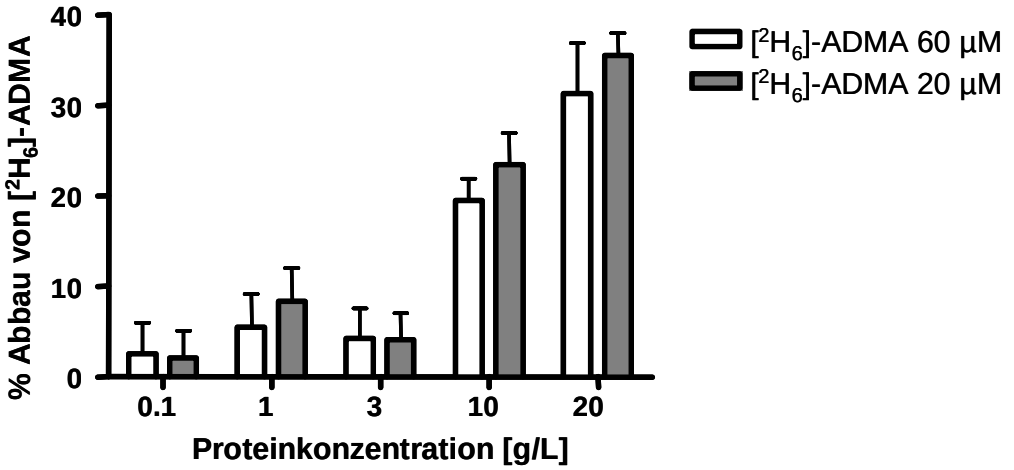


Abbildung 4-14 Abbau [$^2H_6$]-ADMA (20 und 60 µM) in % der Ausgangskonzentration von 0,3-20 g/l Proteinkonzentrationen im Leberhomogenat von Mäusen , Mittelwerte ± SEM (n=4)

4.2.6 Ermittlung der optimalen Konzentration von [$^2H_6$]-ADMA

Mausnierenhomogenat in PBS mit einer Proteinkonzentration von 20, 2 ± 0,7 µg/µL (n=4) wurde mit 1-300 µmol/L [$^2H_6$]-ADMA für 60 min mit oder ohne 100 µM L-NMMA auf dem Thermoblock bei 37 °C inkubiert. L-NMMA diente als kompetitiver Inhibitor, um festzustellen in welchem Konzentrationsbereich eine Hemmung der DDAH besonders gut darzustellen ist. Der Abbau von [$^2H_6$]-ADMA (10 µM) stieg bis maximal 43,4 ± 3,8 % (Mittelwerte ± SEM, n=4) des eingesetzten ADMA, die Hemmung der DDAH durch L-NMMA war nur bei niedrigen [$^2H_6$]-ADMA-Konzentrationen bis 30 µM sicher nachweisbar. Bei 3 µM ADMA hemmt 100 µM L-NMMA die DDAH-Aktivität signifikant ($p>0,05$). [$^2H_6$]-ADMA bei 3 µM hatte zwar einen hohen Anteil an Abbau nach 60 min, brachte aber mehr Schwankung in der Messung wegen niedriger Konzentration und kleiner DDAH-Aktivität, deshalb lag die optimale [$^2H_6$]-ADMA-Konzentration bei 10-30 µM.

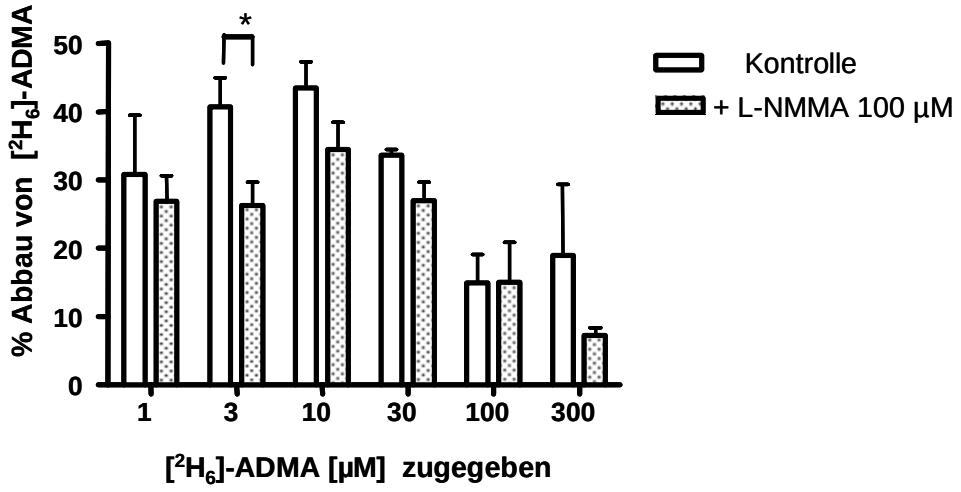


Abbildung 4-15 Abbau ADMA in % der Ausgangskonzentration von 1-300 µM [$^2H_6$]-ADMA nach einer Stunde im Mausnierenhomogenat unter Inkubation mit 100µM L-NMMA (Mittelwert±SEM, n=4) *p<0,05

4.2.7 Einfluss von Proteaseinhibitoren

Ob die endogen ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Konzentrationen in Mausnierenhomogenat 1:6 (m:m) in PBS (pH 6,3) von PIK beeinflusst wurde, wurde in einem Zeitverlauf von 60 min bei 37 °C beobachtet. Im Laufe der 60 min wurden gebundene ADMA, SDMA und L-Arginin im Protein ständig mittels natürlicher Proteolyse freigesetzt. Gleichzeitig wurde freies Arginin durch Arginasen zu Harnstoff und L-Ornithin und ADMA durch DDAH zu Dimethylamin und L-Citrullin umgesetzt. Die Freisetzung von L-Arginin und ADMA überwog deren Abbau. Die ADMA und L-Arginin-Konzentration stieg bis auf das 3,16- und 3,5-fache der Ausgangskonzentration. Für SDMA ist außer der Ausscheidung über die Niere noch kein Metabolisierungsweg bekannt, infolgedessen stieg die SDMA-Konzentration am stärksten (von 4,8 ± 0.39 bis auf 26,5 ± 11,2 nmol/g Protein), das entsprach dem 5,8-fachen der Ausgangskonzentration (Mittelwert ± SEM, n=3)(Abbildung 4-16). Zusatz von Proteaseinhibitoren verminderte die Freisetzung von SDMA, L-Arginin und ADMA um 50 %, 56 % und 61 %. Die Proteolyse wurde nicht vollständig mit PIK gehemmt. Wie in

Abbildung 4-19 gezeigt wurde, hatte der Proteaseinhibitor-Mix (PIK) keinen relevanten Einfluss auf die DDAH-Aktivität. In

Abbildung 4-19 lässt sich erkennen, dass der Kurvenverlauf von [$^2H_6$]-ADMA nach 10, 30 und 60 min Inkubation bei 37 °C mit oder ohne PIK sehr ähnlich war.

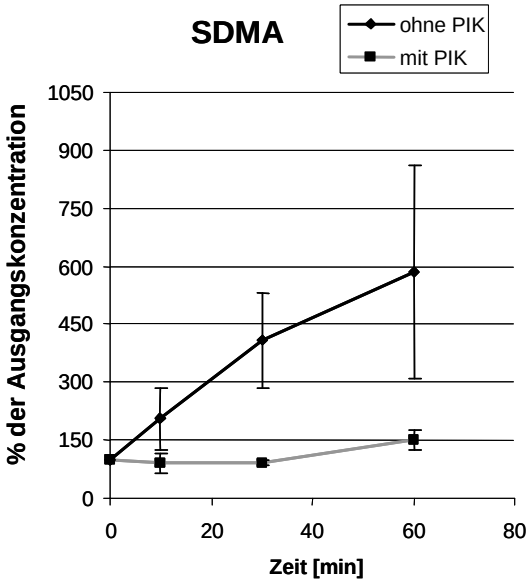


Abbildung 4-16 Prozentuelle Änderung der Konzentration von endogen SDMA in Anwesenheit und Abwesenheit eines Proteaseinhibitor-Cocktails (PIK) nach 1-60 Minuten (Mittelwert±SD, n=3)

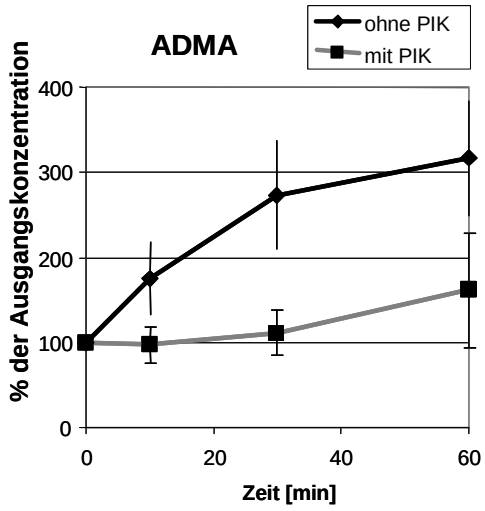


Abbildung 4-17 Prozentuelle Änderung der Konzentration von endogen ADMA in Anwesenheit und Abwesenheit eines Proteaseinhibotor-Cocktails(PIK) nach 1-60 Minuten. (Mittelwert±SD, n=4)

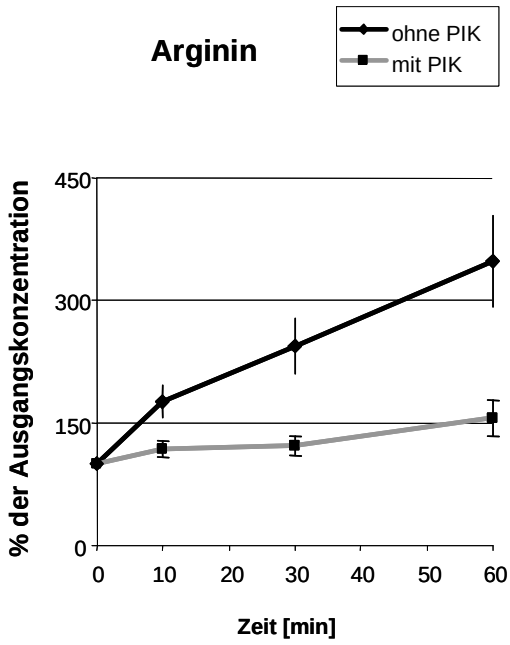


Abbildung 4-18 Prozentuelle Änderung der Konzentration von endogen L-Arginin in Anwesenheit und Abwesenheit eines Proteaseinhibotor-Cocktails(PIK) nach 0-60 Minuten (Mittelwert±SD, n=6)

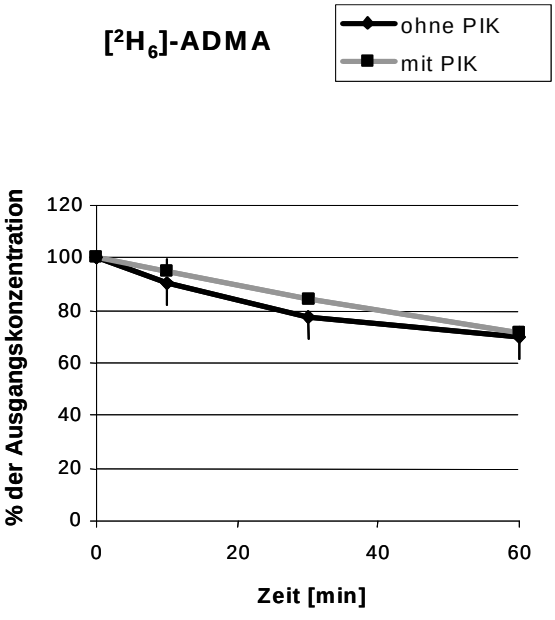


Abbildung 4-19 Prozentuelle Konzentration von exogen [$^2H_6$]-ADMA in Anwesenheit und Abwesenheit eines Proteaseinhibitor-Cocktails (PIK) nach 0, 10, 30 und 60 Minuten (Mittelwert±SD, n=6)

Welche Einflussnahme L-NMMA als kompetitiver DDAH-Substrat den Abbau von endogen ADMA bzw von exogen zugegebenem [$^2H_6$]-ADMA hatte, wurde in einem weiteren Experiment untersucht (Abbildung 4-20und Abbildung 4-21). 3 mM [$^2H_6$]-ADMA wurde in Mausnierenhomogenat mit oder ohne 500 µM L-NMMA bei 37 °C in einem Zeitverlauf von 60 min inkubiert. Der absolute Abbau von 3 µM [$^2H_6$]-ADMA nach 60 min betrug 59 ± 2,4 nmol/g Protein (Mittelwert±SEM, n=6). Parallel dazu nahm die Konzentration von endogenem ADMA um 102,4 ± 19,3 nmol /g Protein (Mittelwert ± SEM, n=6) zu. Die Zugabe von 500 µM L-NMMA reduzierte den Abbau von [$^2H_6$]-ADMA auf 29 ± 5,4 nmol/g Protein ($p<0,001$ vs. Kontrolle), während die Konzentration von endogen ADMA nun stärker anstieg (194,5 ± 21,6 nmol/g Protein). Bereits nach 30 minütiger Inkubation war die Konzentration von endogenem ADMA in Anwesenheit von 500 µM L-NMMA auf deutlich höhere Werte angestiegen als in Abwesenheit von L-NMMA (156,3 ± 21,3 nmol/g Protein vs. 76,3 ± 15,8 nmol/g Protein, Mittelwert ± SEM, n=6, $p<0,001$). In analoger Weise konnte die Zugabe von unmarkiertem ADMA zu einer Hemmung des Abbaus von [$^2H_6$]-ADMA (Abbildung 4-22) führen.

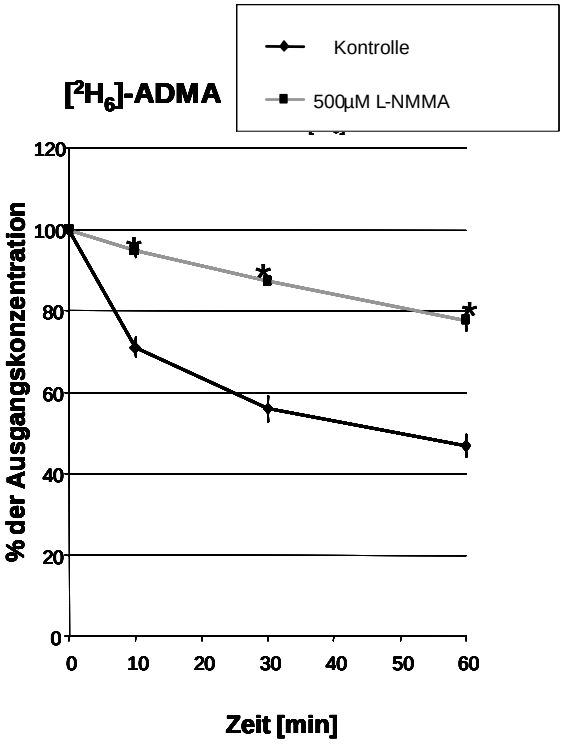


Abbildung 4-20 Abbau [$^2H_6$]-ADMA (3µM) in % der Ausgangskonzentration in An- und Abwesenheit des DDAH Substrates L-NMMA (500µM) nach 0-60 Minuten (Mittelwert±SD, n=6), * =P<0,001 vs Kontrolle

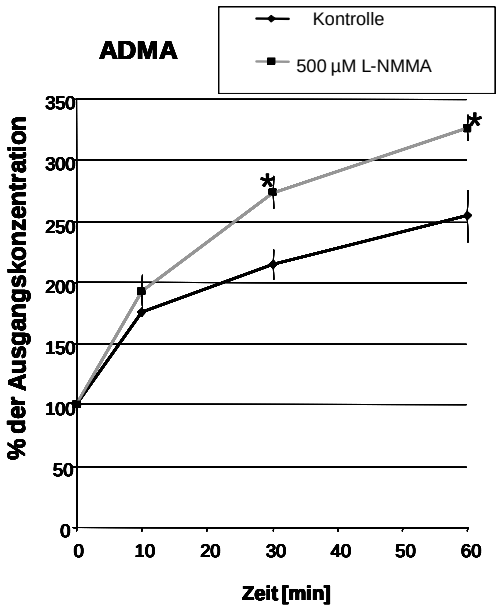
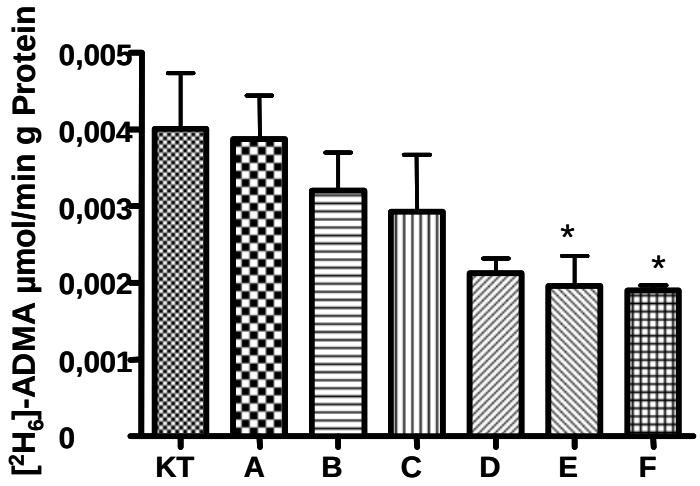


Abbildung 4-21 % Neubildung von ADMA in An- und Abwesenheit des DDAH Substrates 500µM L-NMMA (zur kompetitven Enzymhemmung), Mittelwert±SD, n=6, * =P<0,001 vs Kontrolle

4.2.8 DDAH-Aktivität in Mausnierenhomogenat

Mausnierenhomogenaten von 6 Tieren in einer Proteinkonzentration von 10-20 g/l wurden alle mit 100 µM [$^2H_6$]-ADMA für 60 min bei 37 °C mit oder ohne Proteaseinhibitor-Coctail (PIK)(1:20) Verdünnung, ADMA 100µM, 300µM, L-Monomethylarginin(L-NMMA) 100 µM, 300 µM und 1000 µM inkubiert. Mit oder ohne PIK liegt die DDAH-Aktivität mit 4,2 ± 0,3 und 3,9 ± 0,9 nmol/g Protein/min (Mittelwerte ± SD, n=6) nahe zueinander. Während der Inkubation mit L-NMMA von 100, 300 und 1000 µM war die DDAH-Aktivität auf 2,9 ± 0,7, 3,0 ± 0,18 und 2,2 ± 0,9 nmol/g Protein/min (Mittelwerte ± SEM, n=6) (Abbildung 4-22) reduziert. Diese Reduktion war numerisch zwar konzentrationsabhängig, erreichte aber aufgrund der großen Heterogenität der 6 Tiere keine statistische Signifikanz. Wegen der Konkurrenz von 300 µM und 1000 µM ADMA reduzierte die DDAH-Aktivität, die anhand der [$^2H_6$]-ADMA-Abnahme berechnet war, statistisch signifikant zur 1,7 ± 0,7 und 1,6 ± 0,5 nmol/g Protein/min (Mittelwerte ± SD, n=6).



	KT	A	B	C	D	E	F
Proteaseinhibitor	--	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
ADMA [µM]	--	--	--	--	--	300	1000
L-NMMA [µM]	--	--	100	300	1000	--	

Abbildung 4-22 Abbau von [$^2H_6$]ADMA pro Minute in An- und Abwesenheit von unmarkiertem ADMA zum Nachweis einer kompetitiven Enzymhemmung, Mittelwert±SEM, n=6, *P<0.05 vs Kontrolle, KT=Kontrolle

4.2.9 DDAH-Aktivität in Mausleberhomogenat

Mausleberhomogenat (n=5) in einer Proteinkonzentration von 20-25 g/l wurde mit 15 µmol/L [$^2H_6$]-ADMA für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die DDAH-Aktivität in Kontrollproben, welche mit [$^2H_6$]-ADMA inkubiert wurden, zeigten aus ungeklärtem Grund einen niedrigen Wert mit 3,1 ± 0,75 nmol/g Protein/min. Deshalb wurde die Wirkung jeweiliger Substanzen in verschiedener Konzentration nur unter sich verglichen. Die DDAH-Aktivität wurde konzentrationsabhängig von 100-3000 µmol/l L-Citrullin gehemmt. Wenn mit 100 µM L-Citrullin inkubiert wurde, betrug die DDAH-Aktivität 3,74 ± 0,68 nmol/g Protein/min. Unter Einfluss von 300, 1000 und 3000 µmol/l L-Citrullin wurde die DDAH-Aktivität auf 3,35 ± 0,84, 2,93 ± 0,66 und 1,50 ± 1,0 (Mittelwerte ± SD, n=5) nmol/g Protein/min reduziert. Diese entsprachen einer Reduktion der DDAH-Aktivität von 11 %, 22 % und 55 %, für die Letzte ($p<0,01$) erschien. Die Inkubation von 1000µM L-Arginin schwächt die DDAH-Aktivität im Vergleich zu 100µM L-Arginin um 33 %. Welche sich mit 4,2 ± 1,1 und 2,8 ± 0,8 µmol/g Protein/min (Mittelwerte ± SD, n=6) in DDAH-Aktivität in beiden L-Arginin-Konzentrationen äußert.

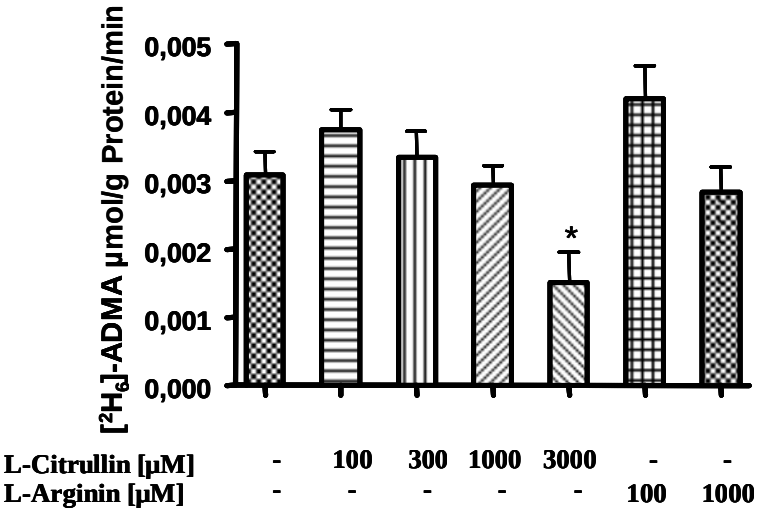


Abbildung 4-23 Abbau von [$^2H_6$]ADMA pro Minute im Leberhomogenat in An- und Abwesenheit von Citrullin und L-Arginin (Mittelwert±SEM, n=6 oder 5), *P<0.05 vs Kontrolle

4.2.10 Validierung des DDAH-Aktivitätsassays

Basierend auf den vorherigen Versuchen wurden die optimalen Bedingungen des DDAH-Aktivitätsassays für kleine Mengen gefrorener Gewebeproben etabliert. Jeweils 20 mg Mausnierengewebe mit PBS (pH 6.3) 6-facher Verdünnung reichen für eine einfache Bestimmung der DDAH-Aktivität von Mausnieren. Ausgehend von 0,384 ± 0,014 µmol/g Protein reduzierte sich [$^2H_6$]-ADMA in Mausnierenhomogenat bei 37 °C nach 60 min bis zu 0,193 ± 0,013 µmol/g Protein. In 6 separaten DDAH-Aktivitätsbestimmungen aus einer Mausnieren erhielt man einen Inter-Assay-Variationskoeffizienten von 9,42 %.

Tabelle 4-4 Validierung von DDAH-Aktivitätsassay in Manusnieren-Homogenat

Mausnieren 6-fache Verdünnung (n=6) **Konzentration des Proteins 27g/L**

[$^2H_6$]-ADMA	0 min	60min	
	µmol/g Protein	µmol/g Protein	µmol/g Protein/min
MW	0,384	0,193	0,0032
SD	0,014	0,013	0,0003
VK %	3,62	6,78	9,42

Mausleber-Homogenat zeigte unter gleichen Assaybedingungen eine niedrigere DDAH-Aktivität. In fünf unabhängigen Bestimmungen betrug der Inter-Assay-Variationskoeffizient 10,89 %.

Tabelle 4-5 Validierung der DDAH-Aktivitätsassay in Mausleber-Homogenat

Mausleber-Homogenat (n=5)

3-fache Verdünnung von Gewebe mit PBS (pH 6,5), Konzentration des Proteins 60g/L

$[^2H_6]$-ADMA	0 min	60 min	Abbau
	µmol/g Protein	µmol/g Protein	µmol/g Protein/min
MW	0,1306	0,0618	0,0106
SD	0,0071	0,0024	0,0012
VK %	5,47	3,83	10,89

4.2.11 Praktische Anwendung des DDAH-Aktivitätsassays

DDAH-I-transgene Mäuse sind das humane DDAH-I-Gen überexprimierte Mäuse. Bei diesen Tieren wird eine gesteigerte DDAH-Aktiviät erwartet.

Die DDAH-Aktivität von DDAH-I transgenen (Gewebeproben wurden freundlicherweise von Dr. Sydow Kardiologie UKE und Dr. Jabobi, Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt) und Wildtyp-Mäusen wurde in deren Lungen-, Leber-, Herzen-, Nieren-, Gehirn-Homogenaten untersucht (Abbildung 4-24). In Herz- und Muskel-Homogenat fand bei transgenen Mäusen eine signifikant höhere DDAH-Aktivität als bei Wildtypmäusen ($p<0,005$). In Herz-Homogenat betrug die DDAH-Aktivität bei transgenen Tieren das 5,3-fache im Vergleich zu Wildtypmäusen. In Skelettmuskel-Homogenat bei transgenen Mäusen betrug die DDAH-Aktivität das 2,8-fache im Vergleich mit Wildtypmäusen. In Mauslungen-Homogenat betrug die DDAH-Aktivität bei transgen Mäusen das 2,2-fache des Wildtyps.

In Leber- Nieren- und Gehirn-Homogenat unterscheiden sich die DDAH-Aktivitäten der beiden Gruppen nicht signifikant.

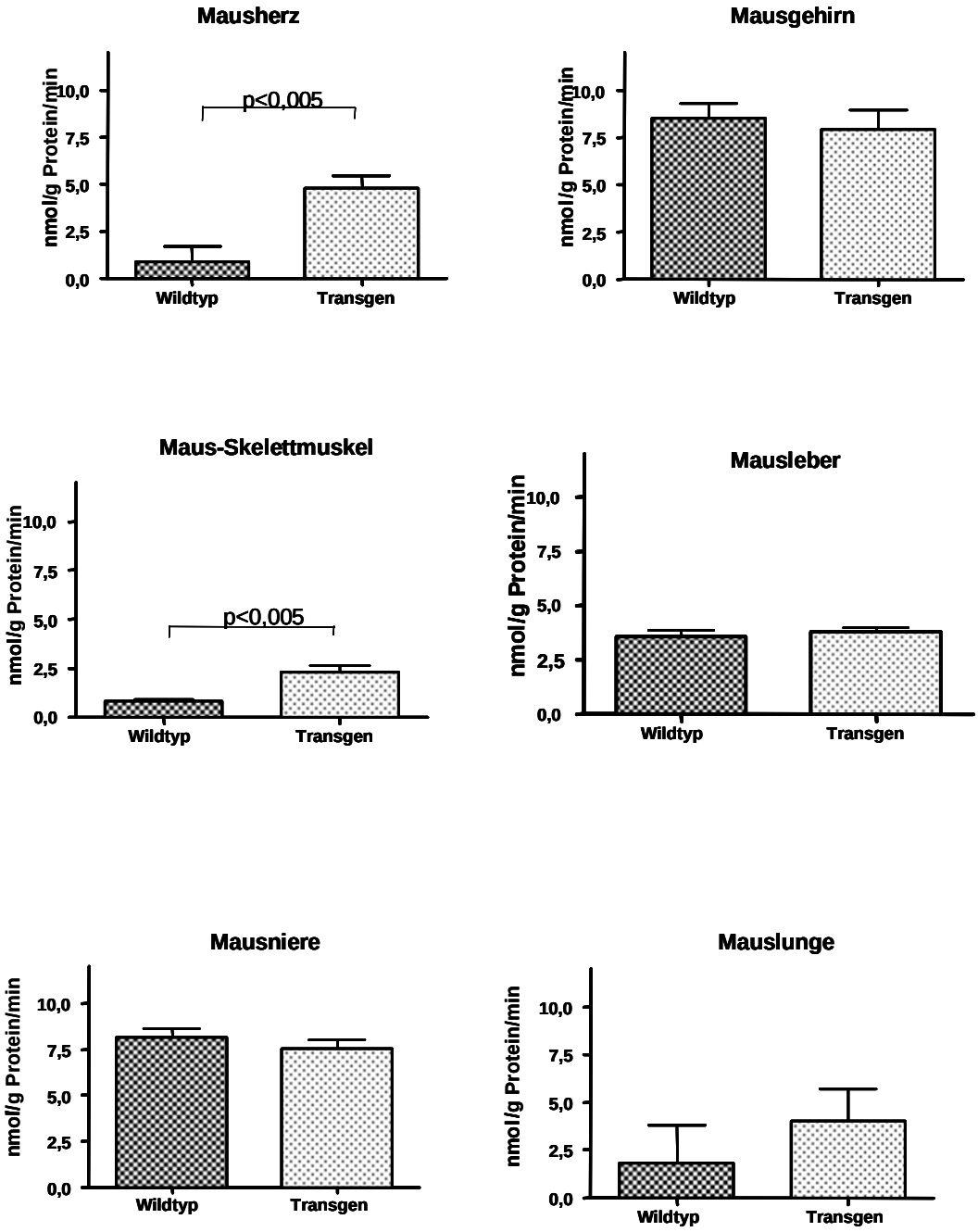


Abbildung 4-24 10 µM [$^2H_6$]-ADMA in 5-fach verdünnten Mausgeweben wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Veränderung der [$^2H_6$]-ADMA-Konzentration wurde proteinbezogen auf nmol/g Protein/min berechnet.

4.3 DDAH-Aktivitätsmessung in Vollblutlysat

ADMA und SDMA waren im Vollblutlysat in einer Ausgangskonzentration von 0,57 ± 0,04 und 0,34 ± 0,013 µmol/l (Mittelwert ± SEM, n=8) vorhanden. Dies war vergleichbar mit

normalen ADMA- und SDMA-Werten im Plasma. Während der 4 h Inkubation bei 37 °C fand eine natürliche Proteolyse statt, der ADMA-Wert stieg wie in Abbildung 4-25 gezeigt um das 3-fache. Dieser Neubildung von ADMA war durch Proteaseinhibitor hemmbar. Der Proteaseinhibitor-Cocktail (1:20 verdünnt) hatte keinen Einfluss auf SDMA-Wert im Vollblutlysat (Abbildung 4-26).

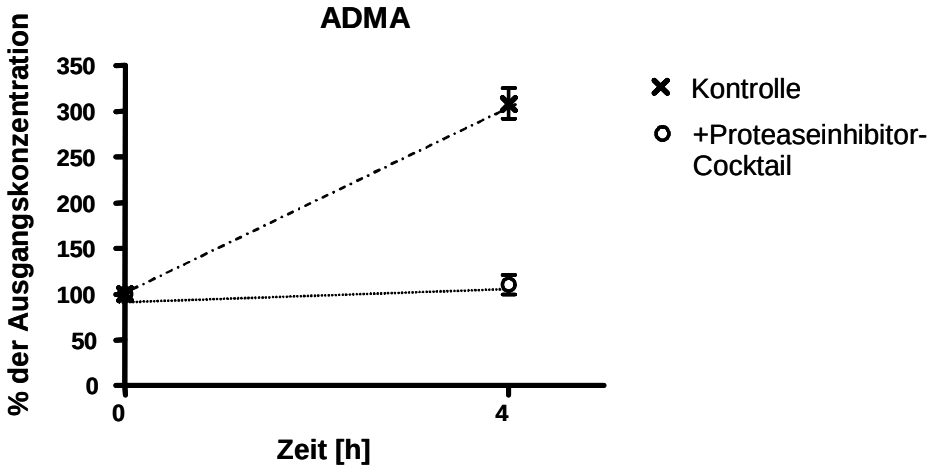


Abbildung 4-25 Endogenes ADMA in Vollblutblysat unter Inkubation mit und ohne Proteaseinhibitor-Cocktail (1:20 Verdünnung) nach 4 Stunden (Mittelwert ± SEM, n=8)

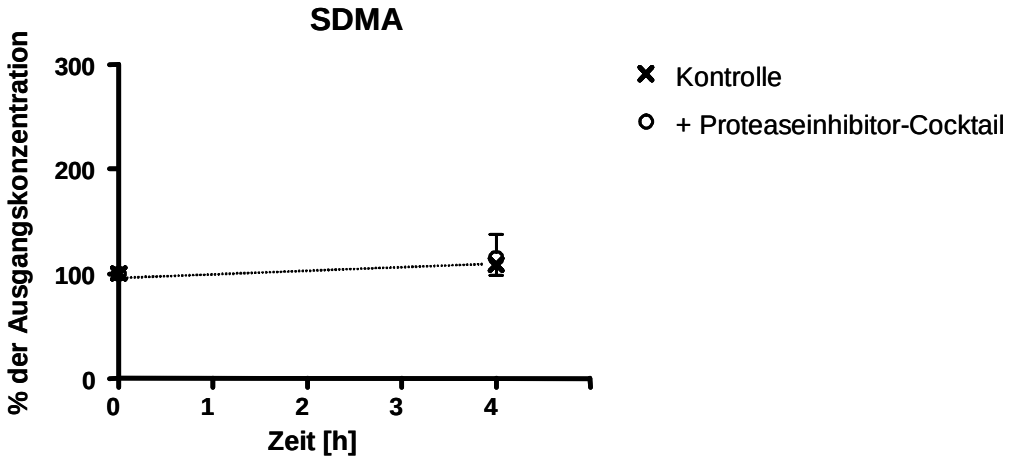


Abbildung 4-26 Endogenes SDMA in Vollblutblysat unter Inkubation mit und ohne Proteaseinhibitor-Cocktail (1:20 Verdünnung) nach 4 Stunden (Mittelwert ± SEM, n=8)

In einem Zeitverlauf von 4 Stunden wurde Vollblutlysat mit 20 µM [$^2H_6$]-ADMA inkubiert. Nach 0,5, 1 und 4 Stunden wurde [$^2H_6$]-ADMA um 8,5 %, 15 % und 32 % abgebaut (Abbildung 4-27).

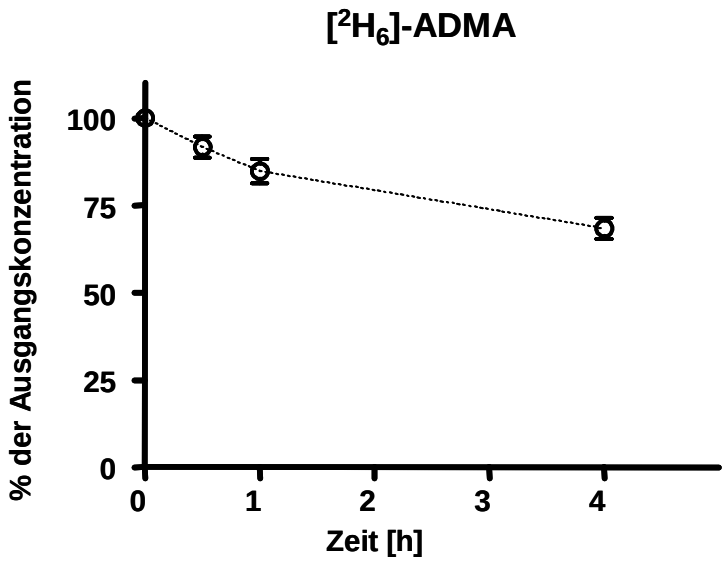


Abbildung 4-27 Prozentueller Abbau von 20µM [$^2H_6$]-ADMA in Vollblutlysat nach 0,5, 1 und 4 Stunden (Mittelwert ± SEM, n=8)

4.4 Arginase-Aktivitätsmessung in Gewebehomogenaten

In einem ergänzenden Experiment sollte geklärt werden, ob es prinzipiell möglich ist, parallel zur DDAH-Aktivität auch die Arginaseaktivität in Geweben zu bestimmen. Dies ist besonders für Leber und Nieren mit ihren bekannt hohen Arginaseaktivitäten von Bedeutung. Arginase ist das letzte Enzym im Harnstoffzyklus. Arginase katalysiert den Umbau von L-Arginin mit einem Wassermolekül zu L-Ornithin und Harnstoff (Abbildung 1-5). Da L-Arginin wie ADMA endogen vorkommt, wurde ebenfalls exogen isotopenmarkiertes L-Arginin eingesetzt. Eine simultane Bestimmung von DDAH- und Arginase-Aktivität in einem Versuchsgefäß ließ sich mit Mausleber-Homogenat nicht durchführen. Wie in Abbildung 4-29 dargestellt zeigt Arginase unter der für die DDAH-Assays verwendeten 1:3 Verdünnung des Mauslebergewebes eine solch starke Aktivität, dass 50 µM [$^{15}N_2$]-Arginin innerhalb von 3 min vollständig abgebaut wurde. Deshalb musste für die Arginaseaktivitätsbestimmung stärkere Verdünnungen des Mauslebergewebes eingesetzt werden (Abbildung 4-30). In einem 1:00 mit PBS verdünntem Mauslebergewebe betrug die Arginaseaktivität 1,88 ± 0,075 µmol/g Protein/min (Mittelwert±SEM, n=17)

Bei einer simultanen Bestimmung von DDAH und Arginase-Aktivität mit Mausnieren-Homogenat in einem Versuchsgefäß mit 50µM [$^{15}N_2$]-Arginin ergab sich eine Arginaseaktivität von 7,88 ± 1,21 nmol/g Protein/min (Mittelwert ± SEM, n=6). Der Interassay-Variationskoeffezient von 6 Experimenten betrug 15,5 % (Abbildung 4-28).

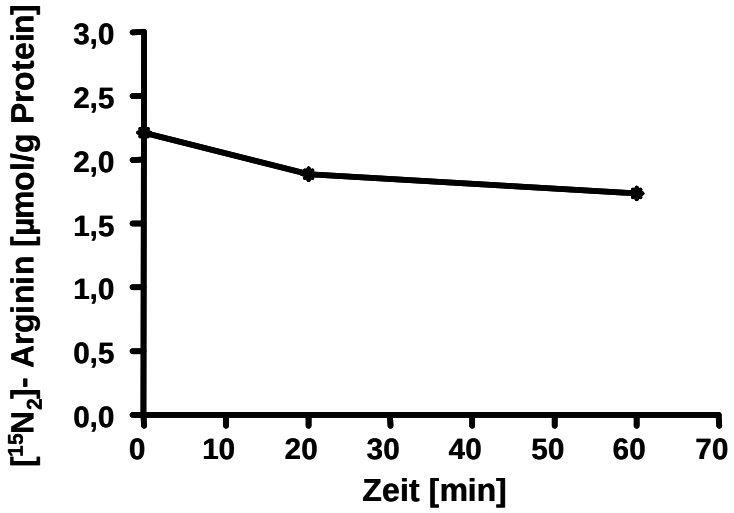


Abbildung 4-28 [$^{15}N_2$]-Arginin nach 0, 20 und 60 Minuten in Mausnierenhomogenat (Mittelwert±SEM, n=6)

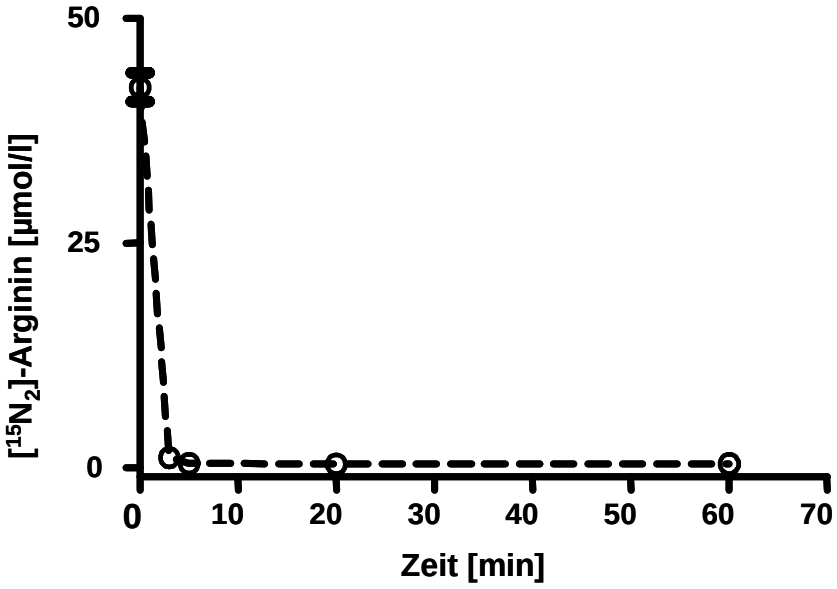


Abbildung 4-29 50µM [$^{15}N_2$]-Arginin in Mausleberhomogenat (1:6 m/m Verdünnung in PBS) nach 3, 20, 60 Minuten

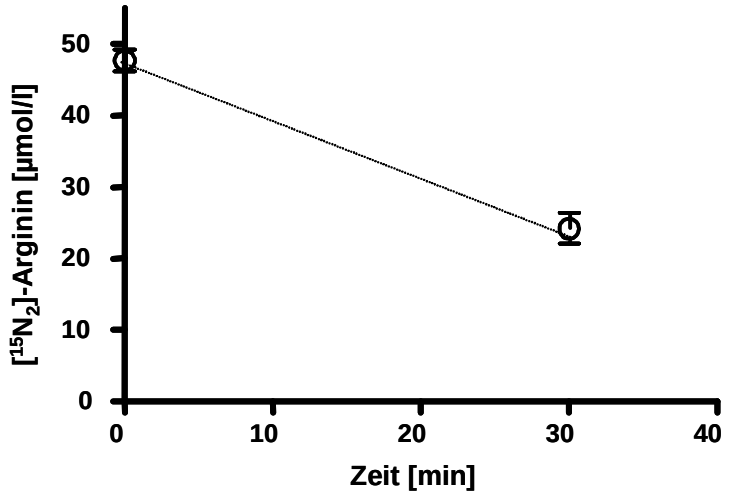


Abbildung 4-30 50µM [$^{15}N_2$]-Arginin in Mausleberhomogenat (1:400 m/m Verdünnung in PBS) nach 0 und 30 Minuten. (Mittelwert±SEM, n=17)

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Assay etabliert, der es erlaubt, die DDAH-Aktivität in verschiedenen Gewebehomogenaten zu bestimmen.

Zunächst wurde eine analytische Methode zur Bestimmung von ADMA, SDMA und Arginin etabliert. (Kapitel 4.1) und zur Quantifizierung in klinischen Studien (Kapitel 4.1.3) eingesetzt. Im Folgenden wurde diese Methode für den Einsatz im 96-Well-Format modifiziert (Kapitel 0). Mit dieser Methode wurde ein DDAH-Aktivitätsassay für Nieren- und Lebergewebe von Mäusen entwickelt (Kapitel 4.2) und validiert. Exemplarisch wurde mit dem Assay die DDAH-Aktivität bei wildtyp und bei DDAH-I-transgen-Mäusen verglichen (Kapitel 4.2.11). Die DDAH-Aktivität wurde schließlich in menschlichem Vollblut untersucht. (Kapitel 4.3)

5.1 Bestimmung von L-Arginin, SDMA und ADMA mittels LC-MS/MS

Es wurden bisher diverse Methoden zur Bestimmung von ADMA in biologischen Proben publiziert. Ein Vergleich der ADMA-Plasmakonzentrationen von gesunden Probanden, die mit diesen Methoden ermittelt wurden, zeigt, dass hier noch deutliche analytische Unsicherheiten bestehen (Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1 Publizierte Mittelwerte der Konzentration von ADMA in Plasma oder Serum in gesunden Probanden

Methode	ADMA (µM)	S.D.	N	Alter (Jahre)	Autoren
HPLC/UV	1,15	0,13.	6	22-48	Vallance et al. 1992
HPLC/UV	0,36	0,09	9	24 ± 4	MacAllister et al. 1996
HPLC/FL/AccQ	0,36	0,08	7	N.A	Anderstam et al. 1997
HPLC/FL/AccQ	0,44	0,08	12	N.A	Heresztyn et al. 2004
HPLC/FL/OPA	0,58	0,02[b]	10	40 ± 6	Pettersson et al. 1997
HPLC/FL/OPA	1,03	0,09[b]	31	45 ± 14	Böger et al. 1998
HPLC/FL/OPA	1,01	0,05[b]	37	68 ± 7	Kielstein et al. 1999
HPLC/FL/OPA	0,51	0,01[b]	116	52 ± 11	Mivazaki et al. 1999
HPLC/FL/OPA	1,1	0,7	11	41 ± 9	Surdacki et al. 1999
HPLC/FL/OPA	0,3	0,05	7	25-35	Pi et al. 2000
HPLC/FL/OPA	0,69	0,04[b]	18	54 ± 8	Abbasi et al. 2001
HPLC/FL/OPA	0,73	0,06[b]	22	47 ± 8	Fleck et al. 2001
HPLC/FL/OPA	0,93	0,32	35	73 ± 9	Yoo et al. 2001
HPLC/FL/OPA	0,42	0,06	53	20-40	Teerlink et al. 2002
HPLC/FL/OPA	0,43	0,12	47	35 ± 4	Päivä et al. 2002
HPLC/FL/OPA	2,38	0,11[b]	12	69 ± 7	Kielstein et al. 2003
HPLC/FL/OPA	0,76	0,11	35	~48	Zhang et al. 2004
HPLC/FL/OPA	1,57	0,85	48	55 ± 7	Bae et al. 2005
HPLC/FL/OPA	4.02	44	20	22 ± 2	Cakir et al. 2005
HPLC/FL/OPA	0,40	0,09	8	45 ± 6	Perticone et al. 2005
HPLC/FL/OPA	0.50	0,06	726	64 ± 7	Teerlink 2005
HPLC/FL/NDA	0.38-1.3[a]	N.A	50	48 ± 5	Marra et al. 2003
CE/LIF	0,34	0,02[b]	5	N.A	Caussé et al. 2000

GC-MS	0,60	0,76	10	30 ± 6	Albsmeier et al. 2004
GC-MS-MS	0,39	0,06	12	35 ± 2	Tsikas et al.2003
LC-MS	0,48	0,07	40	15-35	Huang et al. 2004
LC-MS-MS	0,12	0,05	20	N.A	Vishwanathan et al. 2000
LC-MS-MS	1,34	0,05[b]	25	47 ± 10	Selley 2004
LC-MS-MS	0,46	N.A.	42	43	Kirchherr et al. 2005
LC-MS	0,37	0,06	14	22-32	Martens-Lobenhoffer et al. 2006
ELISA	0,65	0,13	10	N.A.	Schultze et al. 2004
ELISA	0,69	0,2	500	41 ± 14	Schultze et al. 2005
ELISA	0,59	0,23	40	63 ± 8	Krempl et al. 2005
ELISA	0,82	0,29	31	31 ± 10	Široká et al.2005

N.A.= nicht auswertbar; FL= Fluoreszenz-Detektion; AccQ = AccQ-Fluor-Derivatisierung; LIF= Laser induzierte Fluoreszenz; OPA= Ortho-Phthaldiadehyd-Derivatisierung; NDA= Naphthalen-2,3-Dicarboxaldehyd-Derivatisierung

[a] Kein Mittelwert

[b] S.E.M.

Ein Teil der Unsicherheit der Messung von Arginin und ADMA beruht auf der Tatsache, dass in vielen Methoden unspezifische Derivatisierungsreagenzien, die mit allen endogenen primären Aminen reagieren, mit anschließender Fluoreszenzdetektion mit beschränkter Selektivität eingesetzt wurden. Eine andere Quelle für Messfehler war bisher, dass keine analytfreie Matrix für die Kalibrierung verfügbar war. Die Kalibrierung erfolgte durch Zugabe von Plasmaproben zur Kalibrierlösung und es resultierte eine Kurve, die nicht durch den Nullpunkt ging, sondern den leeren Plasmawert zeigt. D.h, die wahre Konzentration von unbekannten Proben liegt im niedrigen Kalibrierbereich, wo die statistische Variation am meisten zum Vorschein tritt. Wenn die Kalibrierung in Wasser durchgeführt wurde, wurde der Matrixeffekt nicht berücksichtigt, welche zu einer nicht kontrollierbaren Ungenauigkeit geführt haben könnte. Das Problem des Matrixeffekts kann durch isotopenmarkierte interne Standards und massenspektrometrische Detektion deutlich reduziert werden. In diesem Fall kann die Kalibriergerade aus Wasser statt

aus biologischer Flüssigkeit bestehen, weil die Matrix im gleichen Maß den Analyten und den internen Standard beeinflusst.

In bisherigen LC-MS/MS-Methoden wurden keine isotopenmarkierte interne Standards für die Messung von L-Arginin und dessen Analogen eingesetzt. Vishwanathan hat bei seiner LC-MS/MS-Methode in 2000 lediglich L-[$^{13}C_6$]-Arginin als internen Standard für sämtliche Verbindungen wie ADMA, SDMA MMA und Arginin eingesetzt. (K.Vishwanathan et al. 2000). Huang et al. in 2004 sowie Martens Lobenhoffer in 2003 haben L-Homoarginin als internen Standard für L-NMMA, ADMA und SDMA und Arginin Messung angewendet. Martens Lobenhoffer hat das Problem mit dem internen Standard erkannt und den Vorteil des isotopenmarkierten internen Standards bzw. den Nachteil des nicht markierten internen Standards dargestellt. (Martens-Lobenhoffer et al. 2004). Er hat unter anderem gezeigt, dass die Kalibriergeraden von Arginin und ADMA mit dem jeweiligen isotopenmarkierten internen Standard in Wasser oder in Plasma parallel zueinander verlaufen. Der konstante Abstand der beiden parallelen Geraden repräsentiert nur den endogenen Gehalt des Analyten im Plasma. Das ist der Beweis für den kompensierten Matrixeffekt beim Einsatz eines isotopenmarkierten internen Standards.

Aber wenn Homoarginin als interner Standard eingesetzt wurde, resultierten aus gepoolten Plasma und Wasser zueinander laufenden Kalibriergeraden. Der Grund dafür ist der Matrixeffekt, der im unterschiedlichen Maß auf den Analyten und internen Standard auswirkte. Daher erschien eine Kalibriergerade in Wasser auch in den aktuellen Untersuchungen als Validierungsmethode wenig geeignet.

Weil der Matrixeffekt in verschiedenen Plasmen unterschiedlich ist, müsste eigentlich für das Plasma jedes einzelnen Patienten eine Kalibriergerade erstellt werden, was in der Praxis nicht möglich ist. Somit wurden die Genauigkeit und Präzision von bisherigen LC-MS/MS-Methoden ohne isotopenmarkierten internen Standard in Frage gestellt.

Flüssigchromatographie (LC) kombiniert mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) gilt als erste Wahl für die quantitative Bestimmung von Medikamenten und deren Metaboliten in biologischen Proben.

Es wird angenommen, dass die MS/MS-Detektion hoch selektiv ist, somit können Störeffekte durch endogene Verunreinigungen vermieden werden. In der Praxis wird die Selektivität der LC-MS/MS aber durch Ionensuppression, die von der Probenmatrix und der Interferenz von Metaboliten verursacht wird, beeinträchtigt. Die miteluierten Matrixkomponenten können die Ionenintensität der Analyten schwächen oder auch stärken. Das Ausmaß der Ionensuppression für einen Analyten und einen internen Standard kann in verschiedenem Milieu oder aus

verschiedenen Subjekten mannigfaltig sein. Das Matrixeffekt-Phänomen war ursprünglich von Kebarle in Jahr 2000 beschrieben, der zeigte, dass die Elektrospray-Antwort von bestimmten organischen Basen wegen des Anstiegs der anderen organischen Basen geschwächt wurde. Der Mechanismus und Ursprung des Matrixeffekts sind bis jetzt nicht ganz verstanden. Vermutlich entsteht er aus Konkurrenz zwischen Analyten und miteluierten unentdeckten Matrix-Komponenten, die mit aus der HPLC-MS/MS-Interface entstandenen primären Ionen reagieren. Abhängig der Umgebung, bei welcher der Ionisierungsprozess und der Evaporationprozess der Ionen stattgefunden haben, kann diese Konkurrenz effektiv die Effizienz der Entstehung der gewünschten Analytionen schwächen oder stärken. Diese Reduktion, oder der Anstieg der Analytionen-Intensität aufgrund von Matrixeffekten beeinflusst die Reproduzierbarkeit und Richtigkeit des Assays. Leider haben fast alle veröffentlichten HPLC-MS/MS-Methoden das Thema Matrixeffekt nicht angesprochen, obwohl die Elimination von Matrixeffekten kritisch für die Etablierung einer zuverlässigen Messung ist. Es ist üblich, dass die Validierung einer Standardkurve aus demselben Plasma oder aus gepooltem Plasma durchgeführt wird, welche später für die Messung der Analyten in großer Kollektion von Patienten den Einwand findet. Gepoolte Plasmen beinhalten verschiedene endogene Verbindungen, die mit Analyten eluieren und die Ionisierungseffizienz von Analyten erhöhen und erniedrigen. Daher ist es zuverlässiger nach der Elimination von Matrix Plasma von verschiedenen Subjekten in die Kalibiergrade einzubeziehen.

Das Problem des Matrixeffekts beschränkt sich nicht nur auf bioanalytische Methoden mit LC-MS. Es kann auch in anderen konventionellen bioanalytischen Methoden wie HPLC/FLU, HPLC/UV oder HPLC/EC-Detektion eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu konventionellen Methoden wird bei der HPLC-MS/MS-Detektion der Extraktionsvorgang vereinfacht, die Retention und die Auftrennung von Analyten zu endogenen Verbindungen werden verkürzt. Daher ist der Matrixeffekt in Verbindung mit LC-MS/MS-Methoden manifester als bei weniger selektiven konventionellen Methoden.

Matuszewki hat in 2003 die Validierung der Analyt/IS aus 5 verschiedenen Plasmen durchgeführt. Er hat variable Steigungen aus 5 verschiedenen Plasmen beobachtet, obwohl einheitliche Steigungen aus 5 demselben Plasmen erhalten wurden. Das weist darauf hin, dass die Ursache der Variabilität nicht aus Systemfehler sondern aus dem Matrixeffekt stammte. Die Validierungsmethoden mit nur einem Plasma oder Plasmapool erscheinen insgesamt nicht zuverlässig.

Mit isotopenmarkierten internen Standards (IS) kann das Problem des Matrixeffekts umgegangen werden. Weil der Matrixeffekt die relative Ionisierungseffizienz von Analyten und

deren stabilen isotopenmarkierten IS gleich beeinflusst. Solange für einen Analyten ein stabiler isotopenmarkierter interner Standard vorliegt, muss der Matrixeffekt nicht berücksichtigt werden. Bei unserer validierten LC-MS/MS-Methode haben wir für L-Arginin als internen Standard ein stabiles isotopenmarkiertes L-[$^2H_7$]-Arginin und für ADMA ein stabiles isotopenmarkiertes [$^2H_6$]-ADMA eingesetzt. In dem Fall wird der Matrixeffekt nicht mehr als Störfaktor betrachtet. Für SDMA war zwar kein isotopenmarkierter interner Standard verfügbar, deshalb wurde der Matrixeffekt während der Validierung geprüft. Die Ionensuppression, berechnet als Peakfläche mit oder ohne Matrix, war kleiner als 10 %.

Mit der in dieser Dissertation weiterentwickelten LC-MS/MS-Methode beträgt die Probenlaufzeit plus Reequilibrierung nur noch 4 min, die chromatographische Trennung von allen Analyten erfolgte innerhalb von 2 min. Der zeitsparende Effekt im Vergleich zu anderen LC-MS/MS-Methoden, die eine Probenlaufzeit von mehr als 20 min erforderten, ist enorm. Die Reduktion von Analysezeit ist teilweise dem spezifischen Fragmentmuster von ADMA- und SDMA-Butylester zu verdanken. ADMA- und SDMA-Butylester haben zwar ähnliche MS-Spektren, aber die spezifischen Fragmentionen von ADMA- und SDMA-Butylester waren mit m/z 214 und 218 voneinander zu unterscheiden. Im Gegensatz zu anderen LC-MS/MS-Methoden werden SDMA und ADMA zum ersten Mal statt chromatographisch spektrometrisch getrennt.

Die Probenaufarbeitung beinhaltet nur eine einmalige Proteinfällung mit Aceton und Derivatisierung mit 1N Salzsäure in Butanol. Im Vergleich zu GC-MS-Methoden ist die Probenaufarbeitung deutlich vereinfacht. Die von Tsikas et al. und Albsmeier et al. entwickelten GC-MS-Methoden benötigen einen deutlich größeren Zeit und Materialaufwand. Dazu gehören eine Proteinfällung von Plasmaproben mit Aceton, zwei Derivatisierungsschritte mit Methanol und PFPA über jeweils eine Stunde, Aufnahme der Proben in Toluol und Phosphatpuffer, Überführung eines Teils der Toluol-Phase in ein Autosampler-Gefäß.

Im Rahmen der Validierung der aktuellen LC-MS/MS-Methode mit Einsatz von isotopenmarkierten IS zeigte sich eine große Akkuratheit und Präzision, hinzu kamen eine höhere Empfindlichkeit, Interferenzfreiheit, eine Verringerung des Zeit- und Materialaufwands für die Probenaufarbeitung, eine kurze Probenlaufzeit und die spektrometrische Trennung von ADMA und SDMA. Diese Methode scheint somit allen bisher beschriebenen LC-MS/MS-Methoden für die Messung von L-Arginin und dessen Analoga überlegen.

5.2 Applikation der LC-MS/MS-Methode im 96-Wellsystem

Die vorgestellte LC-MS/MS-Methode wurde weiter optimiert. Mit der verbesserten LC-MS/MS-Methode können so 96 Proben auf einmal bearbeitet werden und dadurch im Vergleich zur vorherigen Methode deutlich Laborarbeit gespart werden. Außerdem benötigt man bei der optimierten Methode nur 20 µl Plasma (statt 50 µL) für die Probenaufarbeitung. Eine neue mit Teicoplanin, einem Glykopeptidantibiotikum, gebundene Silica-Säule erlaubt eine Probenlaufzeit plus Equilibrierung von nur 1.6 min. Das Glykopeptidantibiotikum Teicoplanin ist ein großes hydrophiles Molekül, das mit anderen Verbindungen interagiert.

Der Matrixeffekt wurde bei der Validierung der LC-MS/MS-Methode berücksichtigt. Der Matrixeffekt wurde über ein Spritze-Pumpe-System mit "Postcolumn Infusion" geprüft (Abbildung 5-1). ADMA, Arginin und SDMA wurden bei einem Spritze-Pumpe-System kontinuierlich hinter der analytischen Säule mittels Infusion ins LC-MS-Gerät gegeben. Es resultierte ein konstantes Signal, Als eine 10 µl Plasmaprobe ins HPLC-System injizierte wurde, Lief die Probe noch über die Säule und ein ES-Interface und erzeugte eine Signalveränderung. Diese Signalveränderung wurde durch die Matrix und die darin koeluierten Substanzen verursacht (Abbildung 5-2).

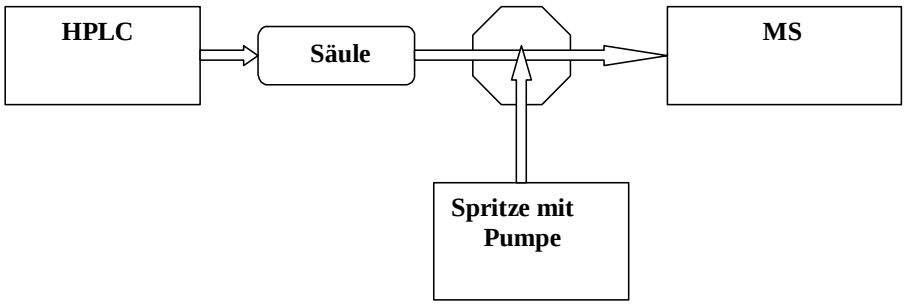


Abbildung 5-1 Infusionssystem nach HPLC-Säule, mobile Phase und Plasmaextrakt wurden in das HPLC-System injiziert. ADMA, SDMA oder Arginin wurden kontinuierlich durch Infusion hinter der Säule zugemischt. Die Mischung wurde gemeinsam in das Massenspektrometer (MS)-Gerät eluiert.

Die Matrix des Plasmas unterdrückte das Signal auf dem Chromatogramm in den ersten 20 s über 90 % in 5 Experimenten. Nach 45 s war das Signal wieder komplett zur Ausgangsintensität abgeflacht (Abbildung 5-2). Die Ionensuppression durch die Matrix erreichte ein Maximum bis

15 s und verschwand vollständig schon nach 45 s. Die Peaks von ADMA-, SDMA- und Arginin-Butylester in menschlichem Plasma erschienen in einem normalen Chromatogramm erst bei 0,83-0,84 min. Das Phänomen legte nahe, dass der Matrixeffekt keinen Einfluss auf die Peaks von ADMA-, SDMA- und Arginin-Butylester in normalen Probenläufen hatte.

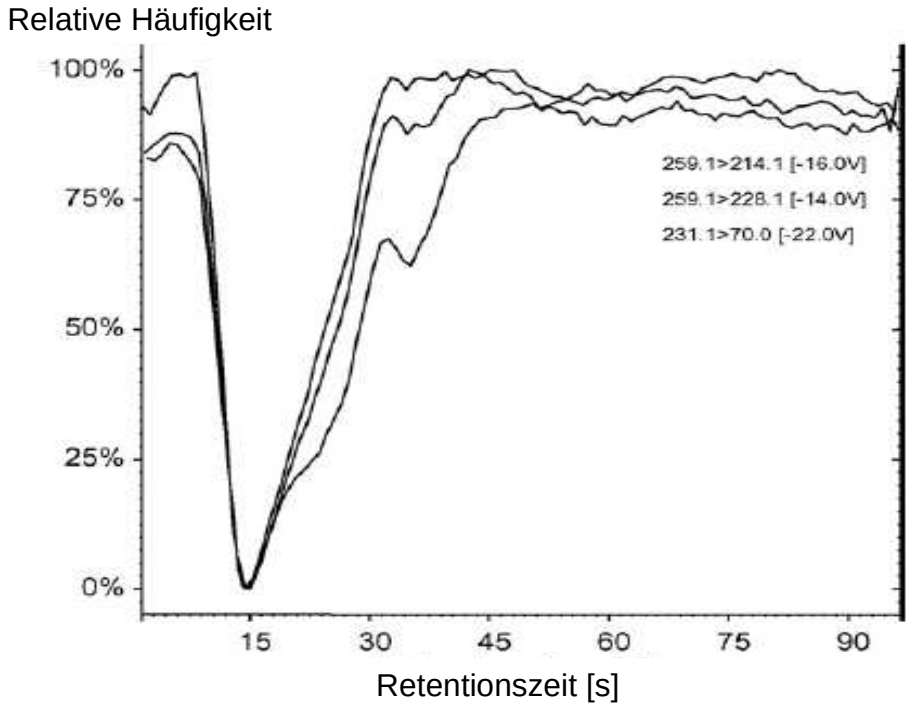


Abbildung 5-2 LC-MS/MS Analyse der kontinuierlichen Infusion von L-Arginin-, ADMA- und SDMA-Butylester nach Injektion von 10µl bearbeitetem Plasmas zeigte Ionensuppression. (m/z 259>214 für ADMA-Butylester, m/z 259>228 für SDMA-Butylester, 231>70 für Arginin-Butylester) Nach E. Schwelhelm et al. 2007

Die Derivatisierung von Arginin, ADMA und SDMA zu deren Butylester und die durch die anschließende Kollision induzierte Dissoziation führten zu spezifischen Fragment-Ionen von Arginin, ADMA und SDMA. Die MS/MS-Fragmente der Butylester erlaubten die simultane Bestimmung von ADMA, SDMA und L-Arginin in Plasma und Gewebehomogenaten ohne chromatographische Trennung. Trotzdem kann man auf die Chromatographie nicht ganz verzichten. Der Infusionsversuch (Abbildung 5-2) zeigte eine starke Ionensuppression auf der Chromatographie von Plasmamatrix nach 15 s. Die Matrix soll vor der Probenmessung eliminiert werden. Die Elimination der Matrix kann mittels SPE und flüssigkeitschromatographischer Trennung durchgeführt werden. Die Chromatographie auf

einer Umkehrphasen-C18-Säule wird üblicherweise für die Trennung von Arginin und dessen Analoga von polarer oder unpolarer Matrix eingesetzt. Der Vorteil der Teikoplanin-Säule gegenüber der Umkehrphase-Säule liegt in deren Fähigkeit, polare Aminosäuren in einem organischen Laufmittel wie 60 % Acetonitril zu binden. Auf der Teicoplanin-Säule verursachten die Matrixkomponenten eine Ionensuppression nur innerhalb von 45 s, ADMA-, Arginin- und SDMA-Butylester erscheinen aber erst nach 45 s im Chromatogramm. Nach Ablauf einer Probe kann die nächste Probe ohne weitere Reinigung und Reequilibrierung der Teicoplanin-Säule injiziert werden. Im Gegensatz zu anderen LC-MS-Methoden (Schwedhelm et al. 2005, Martens-Lobenhoffer et al. 2003 und 2006, Kirchherr et al. 2005), reduziert sich die Probenlaufzeit der neuen LC-MS/MS-Methode um bis zu 1,6 min und die vollständige Chromatographie um bis zu 1 min. Das 96-Well-Plattensystem besteht aus einer 96-Well-Filterplatte einer Porengröße von 0,2 µM und daruntergestellter 96-Well-Polypropylenplatte. Die Reduktion des Probenvolumens auf 20 µl ist besonders geeignet für die Untersuchung von Plasma kleiner Tiere oder von Homogenaten der Kleintierorgane, Plasma oder Gewebehomogenat werden nur einmal auf die 96-Well-Filterplatte pipettiert, dadurch wird der Verlust von Probenmaterial bei der Überführung der Proben in neue Gefäße vermieden.

Zusammengefasst zeichnet sich die neue LC-MS/MS-Methode mit 96-Wellplatten durch eine verkürzte Probenlaufzeit, eine reduzierte Probenmenge, und eine reduzierte Probenaufbereitung gegenüber der bisher von uns verwendeten LC-MS/MS-Methode aus. Das neue 96-Well-Plattensystem ist vergleichbar mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit für ADMA (Schulze et al. 2004). Die LC-MS/MS-Methode mit 96-Well-Plattensystem kann aber simultan ADMA, SDMA und Arginin bestimmen, während der ELISA sich nur auf ADMA-Bestimmung beschränkt.

5.3 Die Bestimmung der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)-Aktivität mittels der stabiler Isotopen-Technik im Vergleich zu herkömmlichem Verfahren

Der einfachste Assay für DDAH-Aktivitätsmessung basiert auf unmarkiertem ADMA als Substrat und misst die verbleibenden ADMA-Konzentration nach einer vorgegebenen Inkubationszeit (Billecke et al. 2006, Nonaka et al. 2006). Dies wäre ideal bei der Untersuchung von gereinigtem DDAH-Enzym. Ein solches Ergebnis anhand von unmarkiertem ADMA in vivo und in Geweben und in der Zellkultur ist sehr schwer zu interpretieren, da die ADMA-

Konzentration an jedem Zeitpunkt ein Gleichgewicht der Proteinmethylierung, anschließender Freisetzung von ADMA mittels Proteolyse, der Hydrolyse des ADMA mittels DDAH, dem zellulären Transport und der Ausscheidung von ADMA darstellt. Diese Beschränkung kann partiell dann durch einen großen Überschuss an ADMA, ausgiebige Verdünnung der Proben (Reduzierung des Proteingehalts und der verminderte Entstehung von endogenem ADMA) umgegangen werden. DDAH ist ein sehr aktives Enzym und scheint keine Kofaktoren zu benötigen (Ogawa 1989,Achan et al. 2003). Wenn die Verdünnung nicht möglich ist, kann als Alternative der Proteaseinhibitor-Cocktail zugegeben werden, welcher die DDAH-Aktivität nicht signifikant beeinflusst. Ein Nachteil ist aber, dass das Lösungsmittel für Proteaseinhibitoren, Dimethylsulfoxid (DMSO), ein Zellgift darstellt. Daher ist Einsatz von Proteaseinhibitor-Cocktail nicht geeignet für die Versuche in vivo, in der Zellkultur und in Organstudien.

Eine höhere Konzentration von ADMA kann mit dem L-Arginin-Transport mittels Y+ Transporter interagieren und so das Zellwachstum und die L-Arginin abhängige Physiologie beeinflussen (Closs et al. 1997).

Die alternative Messung des L-Citrullins, das beim Abbau von ADMA gebildet wird, ist ebenfalls von eingeschränkter Aussagekraft. Viele alternative Signalwege tragen der Entstehung von L-Citrullin bei. In Geweben mit sehr hoher Arginase-Aktivität, zum Beispiel wie Leber oder Vollblut, wird endogenes L-Arginin schnell zum L-Ornithin metabolisiert, das wiederum zum L-Citrullin umgewandelt wurde. Außerdem können L-Citrullin und L-Arginin aufgrund der Strukturähnlichkeit die DDAH-Aktivität hemmen (Ogawa et al. 1989). Der aktuelle auf stabilen Isotopen basierte DDAH-Aktivitätsassay erlaubt hier eine zuverlässige und reproduzierbare Bestimmung der DDAH-Aktivität in kleinen Gewebeproben. Außerdem können endogenes ADMA, SDMA, L-Arginin, exogenes isotopenmarkiertes ADMA und L-Arginin in einer Probe bestimmt werden, und so die Entstehung von endogene Substanzen und der Abbau exogener Substanzen gleichzeitig überwacht werden. Dies war bisher nicht möglich.

Dank der Isotopen-Technik können Einschränkungen vieler bisher verwendeter Methoden zur DDAH-Aktivitätsmessung überwunden werden. Mit der Isotopen-Technik wird das Problem weitgehend umgegangen, weil isotopenmarkiertes ADMA nicht endogen vorkommt.

In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von freiem ADMA aufgrund natürlicher Proteolyse in vitro zum größten Teil durch Proteolysehemmung blockiert werden kann. Das gleiche gilt auch für SDMA. Die mittels der Isotopen-Technik errechnete DDAH-Enzymaktivität wird nicht durch Proteolysehemmung beeinflusst. Die Entstehung von endogenem ADMA wird mittels kompetitiver Hemmung des DDAH von L-NMMA erhöht.

Besonders in Gewebeproben und in vivo, wo die ADMA-Konzentration in Plasma und Gewebe ein Gleichgewicht von dessen Entstehung und Metabolismus darstellt, könnte diese Beobachtung praktische Anwendung bei der Erforschung von Arzneimitteleffekten auf die DDAH oder auf Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT) finden.

Wenn die zugegebene ADMA-Konzentration in einem DDAH-Aktivitätsassay unter der IC50 der NOS-Enzyms oder induzierten NOS-Aktivität ist, wird in manchen Geweben (wie in vaskulären, neuronalen oder inflamatorischen Geweben) nicht nur NO sondern auch L-Citrullin produziert. In beiden Fällen könnte das stabile isotopenmarkierte Arginin für die L-Arginin Metabolismus eingesetzt werden, um den relativen Beitrag dieser Signalwege besser einzuschätzen (Maas et al. 2007).

Außer dem Einsatz von ummarkiertem ADMA wurde zur Bestimmung der DDAH-Aktivität auch [^{14}C]-ADMA oder [^{14}C]-L-NMMA eingesetzt. Das starke ADMA- Kation wurde dann mit Anionaustauschharz von L-Citrullin getrennt. Die Ausbeute von L-[^{14}C]-Citrullin als Reaktionsprodukt repräsentierte quantitativ die Stoffmenge an [^{14}C]-ADMA oder L-[^{14}C]-NMMA, die mittels DDAH metabolisiert wurde (Ogawa et al. 1989,MacAllister et al. 1996). Diese Methode galt als „goldener Standard“. Leider wurde bei dieser Methode endogen entstandenes ADMA nicht detektiert. Endogen entstandenes ADMA kann kompetitiv den Abbau von [^{14}C]-ADMA über die DDAH hemmen. Medikamente, die die Proteolyse oder Proteinmethylierung hemmen, können die endogene Entstehung von ADMA reduzieren, folglich wird die DDAH-Aktivitätshemmung reduziert. Mit [^{14}C]-ADMA oder L-[^{14}C]-NMMA-Messung kann man endogenes ADMA nicht in Betracht ziehen, daher könnte man zu der falschen Hypothese kommen, dass das Medikament direkt die DDAH-Aktivität erhöht, obwohl es sich nur um einen Nebeneffekt des veränderten endogenen ADMA handelt

Bei in vivo Studien an Menschen oder großen Tieren, wo der Einsatz von Proteaseinhibitoren nicht geeignet ist und stabil isotopenmarkiertes ADMA zu kostenspielig wird, kann die Bestimmung von ADMA, SDMA und Arginin eine grobe Einschätzung des Ausmaßes von endogener Entstehung von ADMA und L-Arginin geben. SDMA wird während der Proteolyse freigesetzt, es scheint aber nicht aktiv metabolisiert werden zu können. Die Anreicherung des SDMAs kann daher helfen, in einem Versuch das Ausmaß der Proteolyse abzuschätzen.

Eine weitere Möglichkeit der DDAH-Aktivitätsmessung berührt auf der Entstehung von Dimethylamin (DMA), das während der Metabolisierung von ADMA mittels DDAH neben Citrullin entsteht (Tsikas et al. 2007). Leider ist ADMA nicht die einzige Quelle von DMA. In vivo ist die Nahrung eine zusätzliche Quelle von DMA. ADMA und DMA müssen bisher auch

getrennt bestimmt werden, weil für die Messung beider Stoffe verschiedene Aufarbeitungsschritte erfordertlich sind.

5.4 Bestimmung der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)-Aktivität mittels stabiler Isotopen -Technik in menschlichem Vollblutlysat

Die Lokalisation und die Mechanismen von ADMA-Bildung und -Elimination wurden bis jetzt nicht vollständig beschrieben. Auch die Blutzellen könnten einen Ort der ADMA-Bildung wie auch des ADMA-Abbaus darstellen.

Die Darstellung des Signalwegs von ADMA in Vollblut ex vivo ist von Interesse wegen der Nachbarschaft von Blut zu Endothelzellen und darunter liegenden glatten Muskelzellen. Vollblut ist ein ideales Milieu für die Kontrolle von NO-NOS Systemen.

Die DDAH wurde in vielen Organen von Nageltieren und Menschen gefunden wie z.B. in Nieren, Leber, Lungen, Herz, Pankreas, Gehirn und Endothelzellen von Arterien (Kimoto et al. 1995). Kang et al. 2001 war der erste, der detailliert über die DDAH-Aktivität in humanen Vollblutlysaten berichtete.

In Anbetracht der Tatsache, dass das Blut alle Gewebe kontinuierlich durchströmt, wäre es zweifellos eine geeignete Komponente für ADMA- und L-NMMA-Abbau. Für Studien, die untersuchen in wie weit eine verminderte DDAH-Aktivität zur Erhöhung von ADMA- und L-NMMA-Konzentration im Plasma beitragen, würden eigentlich Biopsien aus Leber, Nieren, Herz, Lunge oder Gehirn benötigt. Das Blut ist leicht zugängig und böte eine ideale Möglichkeit für die DDAH-Aktivitätsmessung.

Bis jetzt gibt es nur wenig Daten zu DDAH-Aktivität im Blut (Kang et al. 2001). Die Daten von Kang et al. basieren auf der Methode von Prescott and Jones´s photometrischer Messung von L-Citrullin. Wobei die Harnstoffgruppe des L-Citrullins mit Diacetylmonooxim zu einer farbigen Verbindung derivatisiert. Diese Methode ist zwar geeignet für reines DDAH-Enzym, nicht aber für Gewebe oder Blut. In Geweben und Blut existieren Stoffe, die die Farbeentwicklung erhöhen oder mindern. Es ist besonders zu beachten, dass die Farbeentwicklung nicht spezifisch für L-Citrullin ist, sondern auch für Harnstoff (Gornall et al. 1941). In Nierengeweben ist der Harnstoff für mehr als 92 % des basalen Signals verantwortlich, infolgedessen kann die DDAH abhängige Farbentwicklung leicht in Hintergrund verschwinden (Tain et al. 2007). Erythrocyten enthalten nennenswerte Mengen an Arginase, die Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin hydrolysiert (Lin et al. 2005). Der dadurch entstandene Harnstoff reagiert auch mit der

Farbreagenz und verfälscht zusätzlich das Ergebnis. Dies könnte erklären, warum Kang ES keinen linearen Anstieg von L-Citrullin bei photometrischen Messungen erhalten hatten, obwohl das Enzym gesättigt war. Der schnelle Anstieg der Absorption in den ersten Minuten stammte vermutlich nicht aus L-Citrullin, sondern aus dem Harnstoff, der mittels Arginase entstanden war.

Unser Ziel war und ist eine zuverlässige DDAH-Aktivitätsmessung im Vollblut für die klinischen Studien zu entwickeln, um einen Zusammenhang zwischen erhöhter DDAH-Aktivität und erhöhter ADMA-Konzentration im Plasma festzustellen. Nach erfolgreichem Einsatz der LC-MS/MS-Methode mit Isotopen-Technik zur Messung der DDAH-Aktivität in Mausgewebe-Homogenat haben wir diese Methode für die DDAH-Aktivitätsmessung in menschlichem Vollblut erweitert.

Wir haben beispielhaft den Abbau von exogenem [^{2}H6]-ADMA und die Bildung von endogenem ADMA in Vollblutlysat verfolgt. Nach 4 Stunden bei 37 °C Inkubation ist in menschlichem Vollblutlysat endogenes ADMA bis um das 3-fache der ursprünglichen Konzentration gestiegen, trotz Proteaseinhibitor-Cocktail total blockiert wurde. Das deutet darauf hin, dass die Proteolyse für den Anstieg des freien ADMAs in unserem Versuch verantwortlich sei. Endogenes SDMA war nach 4 Stunden bei 37 °C mit oder ohne Proteaseinhibitor-Cocktail konstant geblieben, was auf eine geringe Menge an inkorporiertes SDMA in menschlichem Vollblut hindeutet. Im Rattenblut beträgt ADMA-Konzentration 0,94 µM, freie SDMA-Konzentration 0,27 µM. Das totale ADMA entspricht der Summe von Protein inkorporiertem und freiem ADMA in Rattenblut beträgt 43 µM, das totale SDMA 6,88 µM (Scott et al. 2006). Al Banchaabouchi et al. haben ein ähnliches Verhältnis von freiem Dimetylarginin und von in Protein inkorporiertem ADMA in Rattennieren gefunden. Das Verhältnis zwischen ADMA- und SDMA-Konzentration in Rattennieren ist auch ähnlich wie im Vollblut von Ratten. Die freien ADMA- und SDMA-Konzentration in menschlichem Plasma sind vergleichbar mit denen von Ratten. Es gibt leider noch keine Daten über in Protein inkorporiertes ADMA in menschlichem Blut. Wenn es mit denen von Rattenblut übereinstimmen würde, würde das bedeuten, dass die Blutzellen ein großes Potential haben, freies ADMA abzugeben. In unserem Experiment hat sich freies ADMA in Vollblutlysat nach 4 Stunden aufgrund der Proteolyse verdreifacht. In dieser Geschwindigkeit ohne PRMT-Aktivität wäre der Speicher von Proteininkorperiertem ADMA in kurzer Zeit erschöpft. Wir würden in physiologischem Milieu ein Gleichgewicht unter der Methylierung proteingebundener Argininreste, dem Proteinabbau, der ADMA-Metabolisierung durch DDAH und der renalen ADMA-Ausscheidung erwarten. Unsere experimentellen Bedingungen weichen von diesen

Verhältnissen ab, beweisen aber immerhin, dass erhöhte ADMA-Werte aus dem Protein inkorporierten ADMA stammen können.

Scott et al. 2006 haben bei Ratten eine viel stärkere DDAH-Aktivität im Erythrozytenlysat als im Vollblutlysat gefunden. Ihre Erklärung ist, dass wahrscheinlich undefinierte DDAH-Inhibitoren im Plasma oder in Leukozyten dafür verantwortlich sind. In unserem Experiment wurde ein signifikanter Abbau von [^{2}H6]-ADMA im Vollblutlysat im Laufe von 4 Stunden beobachtet, aber keine Unterschiede in der DDAH-Aktiviät zwischen menschlichem Blutkuchenlysat und Vollblutlysat. Das Plasma hatte in unserem Experiment keine hemmende Wirkung auf die DDAH-Aktivität gezeigt. Um zu zeigen, dass im Erythrocytenlysat des menschlichen Blutes tatsächlich eine stärkere DDAH-Aktivität vorherrscht, werden weitere Experimente benötigt.

Unser Versuch hat gezeigt, dass DDAH und proteolytische Enzyme in Vollblutsystemen in der Lage sind, ADMA-Werte im Plasma klinisch relevant zu erhöhen und zu erniedrigen. Das Vollblut mit etwa 5 kg bei einer 70 kg Person zirkuliert im Körper und hat direkten Kontakt zu Endothelzellen und zur endothelialen NOS. Die DDAH-Enzymkapazität im Vollblut könnte ADMA und infolgedessen die endotheliale NOS-Funktion mit beeinflussen.

Die DDAH-Aktivitätsmessung bedarf weiterer Validierung und Entwicklung, so dass die DDAH-Aktivitätsmessung empfindlicher wird und in klinischen Studien eingesetzt werden kann.

5.5 Bestimmung der Arginase-Aktivität mit stabiler Isotopen-Technik

In Säugertierzellen ist L-Arginin Substrat zahlreicher Stoffwechselwege (Harnstoffzyklus, Proteinsynthese, NO-Synthese, Decarboxylierung und Transaminierung) (DeDeyn et al. 1992, Wu et al. 1998, Ignarro et al. 1995). Unter diesen Stoffwechselwegen spielen die Synthese von NO und der Harnstoffzyklus die wichtigsten Rollen im Metabolismus von L-Arginin. Im Rahmen des DDAH-Aktivitätsassays haben wir die Arginase-Aktivität im Mausnieren-Homogenat simultan mitbestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass der Verbrauch des L-[$^{15}N_2$]-Arginins für die NO-Synthase vernachlässigbar ist.

Bis jetzt basiert die Arginase-Aktivitätsmessung entweder auf der Methode mit ^{14}C- markiertem L-Arginin als Substrat und die Messung des ^{14}C-markiertem Harnstoffproduktes, was sehr zeitaufwendig ist (Ruegg et al. 1980), oder auf spektrophotometrischem Assay, wobei das

Harnstoffprodukt mit Urease und Glutamatdehydrogenase gekoppelt wurde (Ozer 1985). Der spektrophotometrische Assay ist nicht sehr sensitiv und nur für gereinigtes Enzym geeignet.

Der hier entwickelte Arginase-Aktivitätsassay ist eine Alternative zu bisherigen Methoden und erlaubt erstmals den Metabolismus von Substrat (L-Arginin) und Inhibitor der NO-Synthese in einem Assay zu bestimmen.

Prinzipiell wäre allerdings auch bei diesem Assay eine weitere Validierung des Assays mit spezifischen Inhibitoren für die einzelnen Abbauwege des L-Arginins nötig, um festzustellen, welcher Anteil von L-Arginin unabhängig von der Arginase verbraucht wird. In den hier exemplarisch untersuchten Leberhomogenaten war die Arginaseaktivität allerdings so groß, dass eine bis zu 100-fache Verdünnung der Proben erforderlich war. Dies macht eine relevante Beeinflussung durch andere Stoffwechselwege des NO unwahrscheinlich.

6 Zusammenfassung

N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) ist ein endogen vorkommender Hemmstoff der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). ADMA entsteht bei Abbau von Proteinen, die posttranslational methylierte Argininreste enthalten. Bei verschiedenen Erkrankungen wurde eine erhöhte ADMA-Konzentration im Plasma gefunden, die wiederum mit einer ungünstigen klinischen Prognose assoziiert sind. ADMA wird durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut. Erste Untersuchungen an DDAH-überexprimierenden bzw. -defizienten Mäusen weisen auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Störungen der DDAH-Aktivität und kardiovaskulären Erkrankungen hin. Die DDAH könnte somit ein potentielles Ziel für therapeutische Interventionen bei einer erhöhten ADMA-Konzentration darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein DDAH-Aktivitätsassay für Gewebehomogenat von Mäusen etabliert. Voraussetzung dafür war eine zuverlässige analytische Methode zur Bestimmung von L-Arginin und dessen Analoga. Bisherige analytische Methoden erfüllen nicht die geforderten Kriterien von Selektivität und Genauigkeit bzw. erreichen diese nur nach zeit- und materialaufwendiger Probenvorbereitung. Eine neue LC-MS/MS-Methode für die zuverlässige Bestimmung von ADMA, Arginin, N^G-$N^{G'}$-Dimethyl-L-Arginin (SDMA) wurde entwickelt und validiert. In einem weiteren Schritt wurde die neue LC-MS/MS-Methode für den Einsatz im 96-Well System optimiert.

Der DDAH-Aktivitätsassay basiert auf dem Einsatz mit stabilem Isotopenmarkiertem ADMA. N^G, N^G-[$^2H_6$]-Dimethyl-L-Arginin ([$^2H_6$]-ADMA) und N^G, N^G-[$^5C_{13}{}^2H_6$]-Dimethyl-L-Arginin ([$^5C_{13}{}^2H_6$]-ADMA) waren kommerziell nicht verfügbar und wurden selbst synthetisiert. Durch Einsatz von [$^5C_{13}{}^2H_6$]-ADMA als internem Standard und [$^2H_6$]-ADMA als Substrat konnte nicht nur die DDAH-Aktivität in Gewebehomogenat, sondern auch die Veränderung (Bildung und Abbau) des endogenen ADMA verfolgt werden. In Modifikationen wurde mittels dieses Assays auch die DDAH-Aktivität im Vollblut bestimmt, was den Weg zu einer breiteren klinischen Anwendung ebnet.

7 Summary

N^G-N^G-dimethyl-L-arginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase (NOS). ADMA is released by protein hydrolysis, which contains posttranslational methylated arginine residues. An elevated ADMA concentration has been associated with several diseases and with an unfavourable clinical prognosis in these conditions. ADMA is metabolized by the enzyme dimethylarginine-dimethylaminohydrolase (DDAH). Early investigations in DDAH-overexpressing or -deficient mice pointed to a causal association between disturbances of DDAH activity and cardiovascular diseases. Therefore DDAH activity could represent a potential target for therapeutic intervention in conditions where the ADMA concentration is elevated.

In the present work a DDAH activity assay in tissue homogenate of mice was established. Prerequisite was a reliable analytical method for arginine and its analogues. The available analytical methods did not fulfil the criteria of selectivity and accuracy or do so only after extensive time and material consuming sample preparation. A new LC-MS/MS-method for reliable measurement of ADMA, arginine and SDMA was developed and validated. In a further step the new LC-MS/MS method was adapted to the 96-well system.

The DDAH activity assay is based on the metabolism of stable-isotope-labelled ADMA. N^G, N^G-[$^2H_6$]-dimethyl-L-arginine ([$^2H_6$]-ADMA) and N^G, N^G-[$^5C_{13}{}^2H_6$]-dimethyl-L-arginine ([$^5C_{13}{}^2H_6$]-ADMA) were not commercially available and had to be synthesised. Using deuterium labelled ADMA ([$^2H_6$]-ADMA) as substrate and the double stable-isotope-labelled ADMA ([$^5C_{13}{}^2H_6$]-ADMA) as internal standard allowed the determination not only of the DDAH activity in tissue homogenate, but also that of the metabolism of endogenous ADMA. Modifying this assay allowed the assessment of the DDAH activity in whole blood, which enables its use in a clinical setting

8 Abkürzungsverzeichnis

A.carotis	Arteria carotis
AccQ	6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate
ADMA	Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin
APCI	*atmosphar pressure chemical ionisation*
BHT	Butylhydroxytoluol
°C	Grad Celsius
^{13}C	stabiles Isotop des Kohlenstoffs
^{14}C	Radioaktives Isotop des Kohlenstoffs
CaM	Calmodulin
CAT	*cationic amino acid transporter*
CV	Variationskoeffizient
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DMA	Dimethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ESI	*elektrospay ionisation*
FAD	Flavinadenindinukleotid
Flu	Floureszenz
FL	Fluoreszenz-Detektion
FMN	Flavinadeninmononukleotid
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-MS/MS	Gaschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
h	Stunde
^{2}H	stabiles Isotop des Wasserstoffs

HPLC	*high performance liquid chromatography*
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IS	interner Standard
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tademmassenspektrometrie
LIF	Laser induzierte Fluorescenz;
LOD	*limit of detection*
LOQ	*limit of quantification*
min	Minute
mol, mmol, µmol	Mol, Millimol, Mikromol
MS	Massenspektrometrie
MW	arithmetischer Mittelwert
m/z	Masse/Ladung
n	Anzahl der Proben
N	Normalität
^{15}N	stabiles Isotop des Stickstoffs
N.A	not available
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidtriphosphat
NDA	Naphthalene-2,3-Dicarboxaldehyde
NICI	*negative-ion chemical ionization*
NL	Neutralteilchen-Verlust
nNOS	neuronale NO-Synthase
LIF	Laser induzierte Fluorescenz
L-NMMA	N^G-Monomethyl-L-Arginin
NO	Stickstoffmonoxid
NOHA	N-Hydroxy-L-Arginin

NOS	NO-Synthase
N-PLA	N^{ω}-Propyl-L-Arginin
OPA	Orthophthaldialdehyd
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H+-Konzentration
PIK	Proteaseinhibitor-Cocktail
PRMT	Protein-Arginin-N-Methyl-Transferase
rpm	Umdrehung pro Minute
RSD	Relative Standardabweichung
s	Sekunde
SD	*standard deviation* (Standardabweichung)
SDMA	Symmetrisches Dimethyl-L-Arginin
SEM	*standard error of the mean* (Standardfehler des Mittelwertes)
SIM	*selected-ion monitoring*
SPE	*solid-phase extraction*
SRM	*selected-reaction monitoring*
MRM	*multiple-reaction monitoring*
TFA	Tetrafluressigsäure
UV	Ultraviolett
vs.	Versus

9 Literaturverzeichnis

Abramovich C, Yakobson B, Chebath J, Revel M. A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. EMBO J. 1997;16(2):260-6.

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 dimethylargininedimethylaminohydrolase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(8):1455-9.

Adams MR, McCredie R, Jessup W, Robinson J, Sullivan D, Celermajer DS. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease. Atherosclerosis. 1997;129(2):261-9.

Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Boger RH.Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;809(1):59-65.

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. Cardiovasc Res 1999;43(3):521-531.

Anderstam B, Katzarski K, and Bergström J. Serum levels of NG, NG-dimethyl-L.arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. J. Am. Soc. Nephrol. 1997;8(9):1437-42.

Baggio R, Cox JD, Harper SL, Speicher DW, Christianson DW. A new chromophoric assay for arginase activity. Anal Biochem. 1999;276(2):251-3.

Bakker WJ, Blazquez-Domingo M, Kolbus A, Besooyen J, Steinlein P, Beug H, et al. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyltransferase 1. J Cell Biol. 2004;164(2):175-84.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37. Review.

Beppu M, Obayashi S, Aso T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in endothelial cells, endothelin-1 within the vessel wall, and intimal hyperplasia in perimenopausal human uterine arteries. J Cardiovasc Pharmacol. 2002;39(2):192-200.

Billecke SS, Kitzmiller LA, Northrup JJ, Whitesall SE, Kimoto M, Hinz AV, er al. Contribution of whole blood to the control of plasma asymmetrical dimethylarginine. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291(4):H1788-96.

Bode-Böger SM, Böger RH, Kienke S et al. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. Biochem Biophys Res Commun. 1996;219(2):598-603.

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W et al. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. Circulation. 1997;95(8):2068-74.

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent

claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. J Am Coll Cardiol. 1998;32(5):1336-44.

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

Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Böhme M, Nafe R, et al. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. Circulation. 1997;96(4):1282-90.

Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. J Am Coll Cardiol. 2000;36(7):2287-95.

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.

Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. Circ Res. 2000;87(2):99-105.

Böger RH, Cooke JP, Vallance P. ADMA: an emerging cardiovascular risk factor. Vasc Med. 2005;10 Suppl 1:S1-2.

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.

Brosnan, M. E. & Brosan, J. T. Renal arginine metabolism. J. Nutr. 2004;134:2791-95.

Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996;16(1):44-50.

Cavalli RC, Burke CJ, Kawamoto S, Soprano DR, Ash DE. Mutagenesis of rat liver arginase expressed in Escherichia coli: role of conserved histidines. Biochemistry. 1994;33(35):10652-7.

Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. Arterioscler Thromb. 1994;14(5):753-9.

Chen BM, Xia LW, Zhao RQ.Determination of N(G),N(G)-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1997;692(2):467-71

Chen D, Huang SM, Stallcup MR. Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. J Biol Chem. 2000;275(52):40810-6.

Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. Science 1999;284(5423): 2174-7.

Chen SL, Loffler KA, Chen D, Stallcup MR, Muscat GE. The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. J Biol Chem. 2002;277(6):4324-33.

Clarke S.Protein methylation. Curr Opin Cell Biol. 1993;5(6):977-83. Review.

Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Forstermann U.Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y+ carrier hCAT-2B. Nitric Oxide. 1997;1(1):65-73.

Cocks TM, Angus JA.Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. Nature. 1983;305(5935):627-30.

Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ.Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. J Clin Invest. 1991;88(5):1663-71.

Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 1995;206(2):667-73.

Crane, B.r., Arvai, A. S., Ghosh, S., Getzoff, E.d., Stuehr, D. J., & Tainer, J.A. Structures of the N(omega)-hydroxy-L-arginine complex of inducible nitric oxide synthase of oxygenase dimer with active and inactive pterins. Biochemistry 2000;39:4608-4621.

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, et al., Histone deimination antagonizes arginine methylation. Cell. 2004;118(5):545-53.

Daghigh F, Fukuto JM, Ash DE. Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. Biochem Biophys Res Commun. 1994;202(1):174-80.

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.

DeDeyn P. P., Marescau B., Stalon V. und Qurshi I.A. Metabolic, Physiological and nutritional importance of arginine In: Guanidino Compounds in Biology and Medicine pp.1992;61-144.

Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zeiher AM.Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(3):656-64.

Faraci FM, Brian JE Jr, Heistad DD. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. Am J Physiol. 1995;269(5 Pt 2):H1522-7.

Fard A, Tuck CH, Donis JA et al., Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(9):2039-44.

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

Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K.Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension : modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. Circulation. 2000;101(8):856-61.

Furchgott RF, A research trail over half a century. Annu Rev Pharmacol Toxicol: 1995;35:1-27.

Gary JD, Clarke S.RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1998;61:65-131.

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest 1989;83(5):1774-7.

Ghosh SK, Paik WK, Kim S. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme. J Biol Chem. 1988;263(35):19024-33.

Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol Rev. 2002;82(2):373-428.

Gokce N, Keaney JF Jr, Frei B, Holbrook M, Olesiak M, Zachariah BJ, et al. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. Circulation. 1999;99(25):3234-40.

Gornall Ag, Hunter A. A colormetric method for the dertermination of L-citrulline. Biochem J 1941;35(5-6):650-8.

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Circulation. 2001;104(22):2673-8.

Heresztyn T, Worthley MI, Horowitz JD. Determination of l-arginine and NG, NG - and NG, NG' -dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;805(2):325-9.

Hirsch AT, Dzau VJ, Majzoub JA, Creager MA.Vasopressin-mediated forearm vasodilation in normal humans. Evidence for a vascular vasopressin V2 receptor. J Clin Invest. 1989;84(2):418-26.

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

Ignarro L. and Murad F. Nitric Oxide: Biochemistry, Moleccular Biology, and Therapeutic Impllications, Academic Press, San Diego 1995

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.

Kakimoto Y.Methylation of arginine and lysine residues of cerebral proteins. Biochim Biophys Acta. 1971;243(1):31-7.

Kakimoto Y, Akazawa S.Isolation and identification of N-G, N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. J Biol Chem. 1970;245(21):5751-8.

Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. J Mass Spectrom. 2000;35(7):804-17.

Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D.Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. Circulation. 2003;107(14):1891-5.

Kielstein JT, Bode-Boger SM, Klein G, Graf S, Haller H, Fliser D.Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. Eur J Clin Invest. 2003;33(5):370-5.

Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. Arch Biochem Biophys. 1993;300(2):657-62.

Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, Ogawa T. Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. J Biochem (Tokyo). 1995;117(2):237-8.

Kirchherr H, Kuhn-Velten WN. HPLC-tandem mass spectrometric method for rapid quantification of dimethylarginines in human plasma. Clin Chem. 2005;51(1):249-52.

Knipp M. How to control NO production in cells: N(omega),N(omega)-dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase as a novel drug target. Chembiochem. 2006;7(6):879-89.

Knipp M, Charnock JM, Garner CD, Vasak M. Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1. J Biol Chem. 2001;276(44):40449-56.

Knipp M, Vasak M. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. Anal Biochem. 2000;286(2):257-64.

Koh SS, Chen D, Lee YH, Stallcup MR. Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. J Biol Chem. 2001;276(2):1089-98.

Kossel, A.; Dakin, H.D. Uber die arginase. Z. Physiol. Chemie 1904;41:321-331.

Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. Brain Res Bull. 2004;62(6):505-15.

Huang LF, Guo FQ, Liang YZ, Li BY, Cheng BM. Simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2004;380(4):643-9.

Lee J, Bedford MT. PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. EMBO Rep 2002;3:268-73.

Lehninger, A.L; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Principles of biochemistry, 2nd ed. New York: Worth Publishers Inc. 1993

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

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.

Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(21):13527-32.

Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem. 1995;270(1):319-24.

Lin EE, Rodgers GP, Gladwin MT. Hemolytic anemia-associated pulmonary hypertension in sickle cell disease. Curr Hematol Rep. 2005;4(2):117-25. Review.

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.

Lin WJ, Gary JD, Yang MC, Clarke S, Herschman HR.The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. J Biol Chem. 1996;271(25):15034-44.

Low M. F, Human muscular dystrophy: elevation of urinary dimethylarginines. Science 1979;203:668-70.

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.

Maas R.Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylargine (ADMA).Vasc Med. 2005;10 Suppl 1:49-57. Review.

MacAllister RJ, Rambausek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E. Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. Nephrol Dial Transplant. 1996;11(12):2449-52.

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

Marescau B, Nagels G, Possemiers I, De Broe ME, Becaus I, Billiouw JM, et al. Guanidino compounds in serum and urine of nondialyzed patients with chronic renal insufficiency. Metabolism. 1997;46(9):1024-31.

Marra M, Bonfigli AR, Testa R, Testa I, Gambini A, Coppa G. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde.Anal Biochem. 2003;318(1):13-7.

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM.Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003;798(2):231-9.

Martens-Lobenhoffer J, Krug O, Bode-Boger SM.Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. J Mass Spectrom. 2004;39(11):1287-94.

Masuda H, Goto M, Tamaoki S, Azuma H.Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. Br J Pharmacol. 1999;126(1):211-8.

Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM.Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Anal Chem. 2003;75(13):3019-30.

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.

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

Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shuai K, Herschman HR, et al.Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. Cell. 2001;104(5):731-41.

Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. Circ Res. 1991;69(5):1293-300.

Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Nat Struct Biol. 2001;8(8):679-83.

Najbauer J, Johnson BA, Young AL, Aswad DW. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. J Biol Chem. 1993;268(14):10501-9.

Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K,et al. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms.Circulation. 2008;117(17):2211-23.

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.

Nijveldt RJ, Teerlink T, van Guldener C, Prins HA, van Lambalgen AA, Stehouwer CD,et al. Handling of asymmetrical dimethylarginine and symmetrical dimethylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia. Nephrol Dial Transplant. 2003;18(12):2542-50.

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.

Nonaka S, Tsunoda M, Aoyama C, Funatsu T. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine in rat plasma and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in rat kidney using a monolithic silica column. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006;843(2):170-4.

Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, et al.Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. Circ Res. 2000;87(11):999-1005.

Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF.Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. Circulation. 1998;97(25):2494-8.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of N^G,N^G-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. Biochem Biophys Res Commun. 1987;148(2):671-7.

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

Onozato ML, Tojo A, Leiper J, Fujita T, Palm F, Wilcox CS. Expression of N^G, N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase and protein arginine N-methyltransferase isoforms in diabetic rat kidney: effects of angiotensin II receptor blockers.Diabetes. 2008;57(1):172-80.

Ozer N. A new enzyme-coupled spectrophotometric method for the determination of arginase activity. Biochem Med. 1985;33(3):367-71.

Paik WK, Kim S. Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. Biochem Biophys Res Commun. 1967;29(1):14-20.

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

Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. Cardiovasc Res. 1999;43(3):509-20. Review.

Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, Roshon MJ, Ruley HE. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. Mol Cell Biol. 2000;20(13):4859-69.

Pettersson A, Uggla L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1997;692(2):257-62.

Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. J Biol Chem. 1992;267(34):24173-6.

Pritchard KA Jr, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P,et al. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. Circ Res. 1995;77(3):510-8.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. Br J Pharmacol. 1987;92(3):639-46.

Reporterer M, Corbin JL. N^G ,N^G ,-dimethylarginine in myosin during muscle development.Biochem Biophys Res Commun. 1971;43(3):644-50.

Rossiter S, Smith CL, Malaki M, Nandi M, Gill H, Leiper JM, et al. Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase. J Med Chem. 2005;48(14):4670-8.

Rüegg UT, Russell AS. A rapid and sensitive assay for arginase. Anal Biochem. 1980;102(1):206-12.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM.Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. Am J Physiol. 1986;250(5 Pt 2):H822-7.

Santa Maria J, Vallance P, Charles IG, Leiper JM. Identification of microbial dimethylarginine dimethylaminohydrolase enzymes. Mol Microbiol. 1999;33(6):1278-9

Satoko Nonaka1, Makoto Tsunoda * ,1, Chiaki Aoyama, Takashi Funatsu Determination of NG,NG-dimethyl-l-arginine in rat plasma and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in rat kidney using a monolithic silica column. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006;843(2):170-4.

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

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. Circulation. 2000;101(16):1899-906.

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study.Circ Res. 2005;97(5):e53-9.

Schulze F, Lenzen H, Hanefeld C, Bartling A, Osterziel KJ, Goudeva L, et al. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. Am Heart J. 2006;152(3):493.e1-8.

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, et al. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. Clin Chem Lab Med. 2004;42(12):1377-83.

Shoufa Han, Ronald E. Viola A Spectrophotometric Assay of Arginase. Analytical Biochemistry 2001;295:117-119.

Singel DJ, Stamler JS. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. Annu Rev Physiol. 2005;67:99-145. Review.

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

Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. J Chromatogr A. 2004;1058(1-2):61-6.

Stamler JS, Mendelsohn ME, Amarante P, Smick D, Andon N, Davies PF, et al. N-acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium.derived relaxing factor. Circ Res 1989;65:789-95.

Stone EM, Person MD, Costello NJ, Fast W. Characterization of a transient covalent adduct formed during dimethylarginine dimethylaminohydrolase catalysis. Biochemistry. 2005;44(18):7069-78.

Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. J Clin Invest. 1997;99(1):41-6.

Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP.Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation. 2001;104(21):2569-75.

Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmölzer I, Upson BM, Kapoor O, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation. 2003;108(8):933-8.

Suzuki T, Hayase M, Hibi K, Hosokawa H, Yokoya K, Fitzgerald PJ et al. Effect of local delivery of L-arginine on in-stent restenosis in humans. Am J Cardiol. 2002;89(4):363-7.

Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. Chem Res Toxicol. 1996;9(5):821-7. Review

Tan B, Jiang DJ, Huang H, Jia SJ, Jiang JL, Hu CP, et al. Taurine protects against low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction by the DDAH/ADMA pathway. Vascul Pharmacol. 2007;46(5):338-45.

Teerlink T. ADMA metabolism and clearance.Vasc Med. 2005;10 Suppl 1:S73-81. Review.

Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 2002;303(2):131-7.

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.

Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. Atheroscler Suppl. 2003;4(4):33-40. Review.

Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. Circulation. 1996;94(7):1682-9.

Tsao PS, Wang B, Buitrago R, Shyy JY, Cooke JP.Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. Circulation. 1997;96(3):934-40.

Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP.Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. Circulation. 1994;89(5):2176-82.

Tsikas D, Schubert B, Gutzki FM, Sandmann J, Frolich JC.Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography-tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003;798(1):87-99.

Tsikas D, Junker W, Frolich JC. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1998;705(1):174-6.

Tsikas D, Thum T, Becker T, Pham VV, Chobanyan K, Mitschke A, Beckmann B, Gutzki FM, Bauersachs J, Stichtenoth DO.Accurate quantification of dimethylamine (DMA) in human urine by gas chromatography-mass spectrometry as pentafluorobenzamide derivative: evaluation of the relationship between DMA and its precursor asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease. Biomed Life Sci 2007;851:229-39.

Tsikas D, Boger RH, Sandmann J, Bode-Boger SM, Frolich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. FEBS Lett. 2000;478(1-2):1-3.

Tyihak E, Ferenczi S, Hazai I, Zoltan S, Patthy A.Combined application of ion-exchange chromatographic methods for the study of "minor basic amino acids". J Chromatogr. 1974;102:257-62.

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.

Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi TIncreased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. Life Sci. 1998;62(26):2425-30.

Vallance P, Bush HD, Mok BJ, Hurtado-Guerrero R, Gill H, Rossiter S, et al. Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and arginine deiminase (ADI) by pentafluorophenyl (PFP) sulfonates. Chem Commun (Camb) 2005;44:5563–5565.

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.

Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimaki T, Laakso J, et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine.Lancet. 2001;358(9299):2127-8.

Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston Ds. Adenine nucleotides, serotonin, and endothelium.dependent relaxations to platelets. AM J Physiol 1985;248(3PT2):H389-95.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(16):9220-5.

Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Bartlett MG. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000;748(1):157-66.

Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, et al. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. Science. 2001;293(5531):853-7.

Wang J, Sim AS, Wang XL, Wilcken DE. L-arginine regulates asymmetric dimethylarginine metabolism by inhibiting dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in hepatic (HepG2) cells. Cell Mol Life Sci. 2006;63(23):2838-46.

Wang BY, Ho HK, Lin PS, Schwarzacher SP, Pollman MJ, Gibbons GH et al. Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. Circulation 1999;99(9):1236-41.

Wang, Y., J. Wysocka, et al. (2004). "Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination." Science 306(5694): 279-83.

Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G, Vane JR.Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. J Cardiovasc Pharmacol. 1989;13 Suppl 5:85-8.

Weidinger FF, McLenachan JM, Cybulsky MI, Gordon JB, Rennke HG, Hollenberg NK et al. Persistent dysfunction of regenerated endothelium after balloon angioplasty of rabbit iliac artery. Circulation. 1990;81(5):1667-79.

Wei, C. C., Crane, B. R. & Stuehr, D. J. Tetrahydrobiopterin radical enzymology. Chem. Rev. 2003;103:2365-2383.

Weis M, Kledal TN, Lin KY, Panchal SN, Gao SZ, Valantine HA, Mocarski ES, Cooke JP. Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. Circulation. 2004;109(4):500-5.

Wendy K. Alderton; ChristE. Cooper and Richard G. Knowles Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Beiochem. J. 2001;357:593-615.

Wu G and Morris S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem. J. 1998;336:1-17.

Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL.Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca2+/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. J Biol Chem. 1998;273(40):25804-8.

Yoo JH, Lee SC.Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. Atherosclerosis. 2001;158(2):425-30.

Yudkoff M, Nissim I, Pereira G, Segal S. Urinary excretion of dimethylarginines in premature infants. Biochem Med. 1984;32(2):242-51.

Zarkadas CG. A rapid chromatographic method for the determination of omega-N-methylarginines in protein and muscle tissues Can J Biochem. 1978;56(10):952-7.

Zhang Y. Molecular biology: no exception to reversibility. Nature 2004;431:637-39.

Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino LS, et al. CREED Investigators Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol. 2002;13(2):490-6.

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.

10 Anhang

10.1 Material

10.1.1 Chemikalien

Aceton	R:11-36-66-67 S:9-16-26	Merck (Darmstadt)
Acetonitril	R: 11-20/21/22-36 S:1/2-16-36/37	Merck (Darmstadt)
Acetylchloride	R: 11-14-34 S:1/2-9-16-26-45	Fluka (Seelze)
Ameisesäure	R:35 S: 23-26-45	Merck (Darmstadt)
Ammoniak	R:10-23-34-50 S:9-16-26-36/37/39-45-61	Merck (Darmstadt)
Ammonium Formiat	R: 36/37/38 S:2-26-36	Fluka (Seelze)
Aqua ad injectabilia		Boxter (Unterschließheim)
L-Arginin	R:36 S:26	Sigma (Deisenhofen)
L-[$^{15}N_2$]-Arginin Hydrochlorid (99 %)		Euriso-top (Saint-Aubin, Frankreich)
L-[2,3,3,4,4,5,5-$^{2}H_7$]-Arginin		Euriso-top (Saint-Aubin,

Hydrochlorid (98 % Isotopen Reinheit)		Frankreich)
Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) hydrochlorid		Sigma Aldrich (Deisenhofen)
Bradfordreagenz		Biorad (München)
Bromcyan-aktivierte Agarose	R: 26/27/28-32-50/53 S: 7-28-29-45-60-61	Sigma (Deisenhofen)
Butanol	R:10-22-37/38-41-67 S: 2-7/9-13-26-37/39-46	Sigma Aldrich(Deisenhofen)
Butylhydroxytoluol (BHT)		Sigma (Deisenhofen)
Citronensäure (wasserfrei)	R:36 S:26	Merck (Darmstadt)
L-Citrullin		Sigma (Deisenhofen)
[1,1,1,1´,1´,1´,-$^{2}H_{6}$]-Dimethylamin	R:11-20/21/22-24 S:16-26-27-36/37/39-45	Cambridge Isotope(MA,USA)
Essigsäure	R:10-35 S: 23-26-45	Merck (Darmstadt)
Ethanol	R:11 S:7-16	Merck (Darmstadt)
L-Homoarginin		Sigma (Deisenhofen)

Isotonische Kochsalzlösung		Boxter (Unterschließheim)
Kaliumhydroxid	R: 22-35 S: 26-36/37/39-45	Merck (Darmstadt)
Kupfercarbonat basisch	R:22-36/37/38 S:26-36	Aldrich (Deisenhofen)
ß-Mecaptoethanol	R: 24-20/22-36/37-41 S: 26-36/37/39-45	Sigma (Deisenhofen)
Methanol	R: 11-23/24/25-39/23/24/25 S: 7-16-36/37-45	Merck (Darmstadt)
Modified Lowry Protein Assay Kit		Perbio Science (Bonn)
N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA)		Sigma (Deisenhofen)
N^G,N^G–Dimethyl-L-Arginin (Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin, ADMA)		Sigma (Deisenhofen)
N^G,$N^{G'}$-Dimethyl-L-Arginin Dihydrochlorid (SDMA)		Calbiochem (Schwalbach)
L-Ornithinhydrochlorid-3,3,4,4,5,5,-$^2H_6$		Euriso-top (Saint-Aubin, Frankreich)
L-Ornithinhydrochlorid-1,2,3,4,5, - $^{13}C_5$		Euriso-top (Saint-Aubin, Frankreich)
ortho-Phthaldialdehyd (OPA)	R: 20/21/22-36/37/38 S: 26-36	Sigma (Deisenhofen)

2-Propanol	R:11 S:7-16	Merck (Darmstadt)
Protease-Inhibitor-Cocktail		Sigma (Deisenhofen)
Salzsäure	R:34-37 S: 26-36/37/39-45	Merck (Darmstadt)

10.1.2 Puffer

PBS-Puffer

(Biochrom) wird nach Herstellungsangaben in Aqua bidest gelöst

10.1.3 Lösung

HPLC-UV-Vis

Eluent A

Zitronensäure, wasserfrei 11.52 g

Aqua bidest. ad 1000 ml

mit NaOH 2 M auf pH 6.8 einstellen

Aqua bidest. ad 1200 ml

Methanol 600 ml

Eluent B

900 ml Methanol

100 ml Aqua bidest.

Ortho-Phthaldialdehyd (OPA)-Reagenz

Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) 135 mg

Methanol 2.5 ml

2-Mercaptoethanol 100 µl

0.4 M Boratpuffer ad 25 ml

LC-MS/MS

Eluent A

Ameisesäure 0.1 % in Methanol

Eluent B

Ameisesäure 0.1 % in Wasser

und

Eluent A

Ammoniumformiat 0,1 % in Wasser

Eluent B

Acetonitril

10.1.4 Tiere

C57BL6 Mäuse, sechs bis acht Wochen alt, Tierversuchshaltung UKE

Dayoub DDAH-transgene Mäuse (Dayoub et al. 2003)

10.1.5 Plasmaproben

Die Plasmaproben von Menschen stammten von freiwilligen und gesunden Probanden.

Proben von Mäusen wurden im Einklang mit den tierschutzrechtlichen Bestimmungen im Rahmen von Versuchen gewonnen.

10.1.6 Für LC-MS/MS verwendete Gase

Argon (Air Liquid Hamburg) Stickstoff (Air Liquid Hamburg)

10.1.7 Verbrauchsmaterial

Abdeckmatte	Sarstedt (Nümbrecht)
Autosamplergefäße mit Rundboden, Chromacol (HPLC)	Abimed (Langenfeld)
Bördelkappen mit geschlitztem Deckel (HPLC)	Macherey-Nagel (Düren)
Dichtscheibe G8-1.0	CS-Chromatographie (Langerwehe)

Eppendorfgefäße (0.5,1,2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Röhrchen (15, 50ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Filterpapier 3MM	Whatmann (Maidstone, UK)
Flasche G 1, klar	CS - Chromatographie (Langerwehe)
HPLC-Säule: CC 250/4 Nucleocil 100-5C_6H_5	Macherey-Nagel (Düren)
HPLC-Vorsäule: CC 8/4 Nucleocil 100-5C_6H_5	Macherey-Nagel (Düren)
Kürvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
LC-MS Chirobiotic T 20x1.0mm Teicoplanin-Silicum	Astec (Whippany NJ,USA)
LC-MS Chirobiotic T Guard 20x4 mm	Grace/Alltech Grom
LC-MS Varian Säule C18-Ether 50x2.0mm	Varian (Darmstadt)
Monovette NH4-Heparin 5.5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Multiscreen HTS 96-Wellplatte Filterplatten 0.22µM	Millipore (Molsheim, Frankreich)
S-Monovette 5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
PD-Tips 5ml	Brand (Wertheim)
pH- Papier pH 1-14	Roth (Karlsruher)
PP-Microplatte 96K	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
PP- Röhrchen (5ml)	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitze (10,100,1000µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rührspatel 120mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Schraubkappe G8 - L	CS-Chromatographie (Langerwehe)
Schraubröhre 13ml mit Verschluß	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten (1, 2, 10, 25 ml)	Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, USA)
Sterican$^{@}$- Kanülen	B. Braun (Melsungen)
Trichter	Roth (Karlsruher)

Venofix 0.8 x 20mmx30cm	B. Braun (Melsungen)

10.1.8 Laborgeräte

Analysenwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Digitalwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
HPLC (P580 Pumpe, ASI 100 Autosampler RF 2000 Fluoreszenz-Detektor)	Dionex Softron GmbH (Germering)
Kühltruhe (-20 °C, -80 °C)	Kryotec (Hamburg)
LC-MS (Varian 1200L Triple Quadrupol MS, Varian ProStar 210 Pumpe)	Varian (Darmstadt)
Magnetrührer	Heidolph (Kelheim)
Multipette plus	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Power Supply	Bio-Rad (München)
Speed-Vac RVC 2-25	Christ (Osterode)
Thermoblock Telex Bioblock 890436 F	Bioblock Sientific (Illkirch, Cedex, USA)
Thermomixer Compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Tissuelyser	Qiagen (Hilden)
Titramax 101	Heidolph(Schwabach)
Vakuumpumpe Mini-Vac E1	Peqlab (Erlangen)
Vakuumpumpe RZ 5 (4 x 10-4 mbar)	Vaccubrand (Wertheim)
Votexer	Heidolph (Keilheim)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Eschborn)
Zentrifuge Rotina 35R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

11 Lebenslauf

Name:		Jing Tan-Andresen
Geburtsdatum:		1. Dez 1973
Geburtsort:		Peking (China)
Staatsangehörigkeit:		Deutsch
Familienstand:		verheiratet
Schulbildung:	1980-1986	Grundschule in ShenYang (China)
	1986-1989	Hui-Nationalität Mittelschule der ShenYang (untere Stufe) (China)
	1989-1992	Hui-Nationalität Mittelschule der ShenYang (obere Stufe) (China)
	08/1995-01/1997	Studienkolleg für ausländische Studierende an der Uni Hamburg
Studium:	09/1992-06/1994	Pharmazeutische Hochschule ShenYang (China)
	04/1997-04/2002	Universität Hamburg Fachrichtung Pharmazie
	03/2000	1.Staatsexamen
	05/2002	2.Staatsexamen
Praktische Ausbildung:	05/2002-11/2002	Michel Apotheke, Hamburg
	11/2002-05/2003	Wala Heilmittel GmbH, Badboll
	05/2003	3.Staatsexamen
	08/2003-02/2004	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Berufstätigkeit:	07/2005-12/2006	Ratio Apotheke, Elmshorn
	02/2007-02/2008	Sonnen Apotheke Duvenstedt, Hamburg
Promotion:	03/2004-03/2008	Arbeitsgruppe Klinische Pharmakologie Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie,Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

12 Publikationen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Originalarbeiten

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.

Maas R, **Tan-Andresen J**, Schwedhelm E, Schulze F, Böger RH. A stable-isotope based technique for the determination of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) activity in mouse tissue. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007;851(1-2):220-8.

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. 2007;851(1-2):211-9.

Rudolph TK, Ruempler K, Schwedhelm E, **Tan-Andresen J**, Riederer U, Böger RH, Maas R. Acute effects of various fast-food meals on vascular function and cardiovascular disease risk markers: the Hamburg Burger Trial. Am J Clin Nutr. 2007;86(2):334-40.

und Kongressbeiträgen veröffentlicht:

E Schwedhelm, **Jing Tan-Andresen**, M Kastner, A Steenpaß, RH Böger. High-Throughput Determination of L-Arginin, SDMA and ADMA Applying 96well-Plates and LC-MS/MS.2nd joint French-German NO Meeting. Hamburg, 5-7 Oktober 2006

E.Schwedhelm, D. Atzler, **J. Tan-Andresen**, U.Riederer, R.H. Böger. Stable isotope dilution assay fort he determination of L-arginine and methylated L.arginine derivatives in human plasma by ESI LC-MS/MS.Gemeinsamer Kongress der Österreichischen Gesellschaft for Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC) und der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriummedizin (DGKL), Wien, Österreich, 19.-22.9.2007

R. Maas, T.Rudolph, K.Ruempler, E.Schwedhelm, **J.Tan-Andresen**, U.Riederer, R. Böger. Different fast food meals acuterly impair endothelial function in healthy adults: the Hamburg Burger Trail. 3rd European Meeting on Vascular Biology and Medicine, Hamburg, Germany, 28-30 September 2005

13 Erklärung

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

Entwicklung und Validierung eines Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)-Aktivitätsassays in Gewebehomogenat

in der Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und

Klinische Pharmakologie unter der 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.

Hamburg, den 10.08.08

Tan-Andresen

14 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle an Prof. Dr. T. Eschenhagen für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie durchzuführen.

Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. R.H. Böger für seine wertvolle fachliche Betreuung und permanente Diskussionsbereitschaft, für die unermüdliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. M. Korth danke ich für die Betreuung meiner Arbeit im Department Chemie der Universität Hamburg und für sein freundliches Begutachten während meiner Dissertation.

Dr. E.Schwedhelm danke ich für die Betreuung in Fragestellung der Analytik mit HPLC und LC-MS.

Dr. R. Maas danke ich für die Hilfe bei der Planung und Durchführung zahlreicher Laborversuche.

Dr. Ulrich Riederer danke ich für den Zugang zur LC-MS Einrichtung an der Pharmazeutischen Chemie an der Universität Hamburg, sodass wir unsere anfängliche Validierung einer LC-MS/MS Methode dort durchführen konnten.

Besonders danke ich den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe Mariola Kastner, Dr. Freidrich Schulze, Anna Steenpaß, aber auch allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Institutes für die aufmerksame Hilfsbereitschaft, große Unterstüzung und die schöne und interessante Zeit.

Meiner Familie danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Phasen der Promotion.