

**Interaktionen zwischen dem endogenen NO
Synthase Inhibitor asymmetrisches
Dimethylarginin (ADMA) und der leukozytären
Peroxidase Myeloperoxidase (MPO) in
mus musculus und *homo sapiens***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
aus dem Department Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Eike-Christin von Leitner
Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. T. Meinertz
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. Wolfgang Streit
Tag der Disputation: 03. April 2009

Hamburg, den 20. März 2009



J. Ganzhorn
Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker,
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind
vor einer Märchenwelt.

Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Blutgefäßsystem	3
1.1.1	Funktionen des Endothels	4
1.1.2	Endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose	6
1.2	Stickstoffmonoxid (NO)	7
1.2.1	Synthese	7
1.2.2	Wirkungen	8
1.3	Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)	9
1.3.1	Pathophysiologische Relevanz	10
1.3.2	Synthese	11
1.3.3	Transport	11
1.3.4	Degradierung	12
1.3.5	Bedeutung der DDAH im Kontext der ADMA Degradierung	12
1.4	Myeloperoxidase (MPO)	16
1.4.1	Pathophysiologische Relevanz	16
1.4.2	Synthese	17
1.4.3	Enzymatische Reaktion der MPO	18
1.5	Neutrophile Granulozyten	19
1.5.1	Margination, Adhäsion und Transmigration	19
1.5.2	Degranulierung und oxidativer <i>burst</i>	21
1.6	Ziel der Arbeit	22
2	Material	23
2.1	Allgemeine Puffer und Lösungen	23
2.2	Antikörper	25
2.3	Primer	26
2.4	Tiermodelle	26
3	Methoden	28

3.1	Versuche am Tiermodell	28
3.1.1	Haltung und Zucht.....	28
3.1.2	Behandlungen	28
3.1.2.1	Intraperitoneale Injektionen	28
3.1.2.2	Implantation von osmotischen Minipumpen.....	29
3.1.2.3	Telemetrische Messungen	29
3.1.2.4	Organentnahme	30
3.1.3	DNA Analysen.....	31
3.1.3.1	Isolierung der DNA aus dem Gewebe	31
3.1.3.2	Genotypisierung	31
3.1.4	Proteinanalysen	33
3.1.4.1	Gewebepräparation und Homogenisierung.....	33
3.1.4.2	Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration	34
3.1.4.3	SDS PAGE und Blotten auf eine Nitrozellulosemembran	35
3.1.4.4	Immunreaktionen.....	35
3.1.4.5	Stripping der Nitrozellulose Membranen.....	36
3.1.5	RNA Analysen.....	36
3.1.5.1	Isolierung der RNA aus dem Gewebe.....	36
3.1.5.2	Reverse Transkription	37
3.1.5.3	Realtime PCR	38
3.2	Versuche an HUVECS in der Zellkultur	39
3.2.1	Kultivierung von HUVECS	39
3.2.2	Immunfluoreszenz	40
3.3	Versuche mit neutrophilen Granulozyten.....	40
3.3.1	Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten.....	41
3.3.2	Inkubation der isolierten Zellen	41
3.3.3	Bestimmung der freigesetzten MPO Konzentration	42
3.3.4	Bestimmung der freigesetzten Elastase Menge.....	42
3.3.5	Bestimmung der Superoxidfreisetzung.....	43
3.3.6	Bestimmung der MPO Aktivität	43
3.3.7	Bestimmung der NOS Aktivität	44
3.3.8	Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an HUVECS	45
3.4	Bestimmung von ADMA, SDMA und DDAH Aktivität.....	45

3.5	Statistik.....	46
3.6	Legende	47
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Charakterisierung der DDAH 1 transgenen Maus.....	48
4.1.1	Expression des humanen Transgens und den murinen DDAH 1 und 2.....	49
4.1.2	Expression der eNOS und iNOS.....	52
4.1.3	ADMA und SDMA Plasma Konzentrationen.....	54
4.1.4	Modulation des NO Signalweges durch DDAH	56
4.2	Hypothese I: MPO induziert ADMA Akkumulation	58
4.2.1	Voraussetzungen.....	59
4.2.2	MPO moduliert die Genexpression.....	60
4.2.2.1	DDAH Expression.....	60
4.2.2.2	PRMT Expression.....	62
4.2.2.3	NOS Expression	64
4.2.3	MPO moduliert die Proteinexpression der NOS	66
4.2.4	MPO moduliert den NO Signalweg	67
4.2.5	MPO moduliert die DDAH 1 Aktivität.....	68
4.2.6	MPO moduliert die NOS Aktivität	70
4.2.7	MPO moduliert ADMA Plasma Konzentrationen.....	71
4.2.8	MPO moduliert physiologische Parameter	74
4.3	Hypothese II: ADMA induziert die Sezernierung von MPO.....	76
4.3.1	Voraussetzungen.....	76
4.3.1.1	Der Transporter SLC7A1 in PMN	77
4.3.1.2	ADMA in PMN	77
4.3.2	ADMA aktiviert PMN.....	78
4.3.2.1	ADMA führt zur Degranulierung von PMN.....	79
4.3.2.2	ADMA induziert Superoxidfreisetzung aus PMN.....	80
4.3.2.3	ADMA erhöht die MPO Aktivität in PMN	82
4.3.2.4	ADMA hemmt die NO Synthese in PMN	83
4.3.2.5	ADMA Infusion führt zur Akkumulation von MPO <i>in vivo</i>	84
4.3.3	ADMA führt zu Adhäsion von PMN.....	85
5	Diskussion.....	88

5.1	Hypothese 1	92
5.2	Hypothese 2	99
6	<i>Ausblick</i>	103
7	<i>Zusammenfassung</i>	105
8	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	107
9	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	110
10	<i>Literaturverzeichnis</i>	113
11	<i>Anhang</i>	128
	<i>Erklärung</i>	128
	<i>Publikationen</i>	129
	<i>Curriculum vitae</i>	130
	<i>Danksagung</i>	131

1 EINLEITUNG

Die Bezeichnung kardiovaskuläre Erkrankung dient als Sammelbegriff für alle Schäden am Herzen und an den Gefäßen, die zu 95 % durch Arteriosklerose verursacht werden. Diese systemische Erkrankung der Arterien mit ihren Folgeerkrankungen Angina Pectoris, Myokardinfarkt, Schlaganfall und Herzinsuffizienz ist seit Jahrzehnten zweifelsfrei die Haupttodesursache in den Industrienationen Europas und Nordamerikas, aber auch in den Entwicklungsländern steigt der prozentuale Anteil dieser Erkrankungen: Weltweit starben 2005 17,5 Millionen Menschen an den Folgen einer kardiovaskulären Erkrankung, davon 80 % in den sogenannten Schwellenländern. Schätzungen der World Health Organization (WHO) zufolge werden 2015 bereits über 20 Millionen Menschen an Erkrankungen des Herzens und Schlaganfällen versterben, weit mehr als an jeder anderen Krankheit.

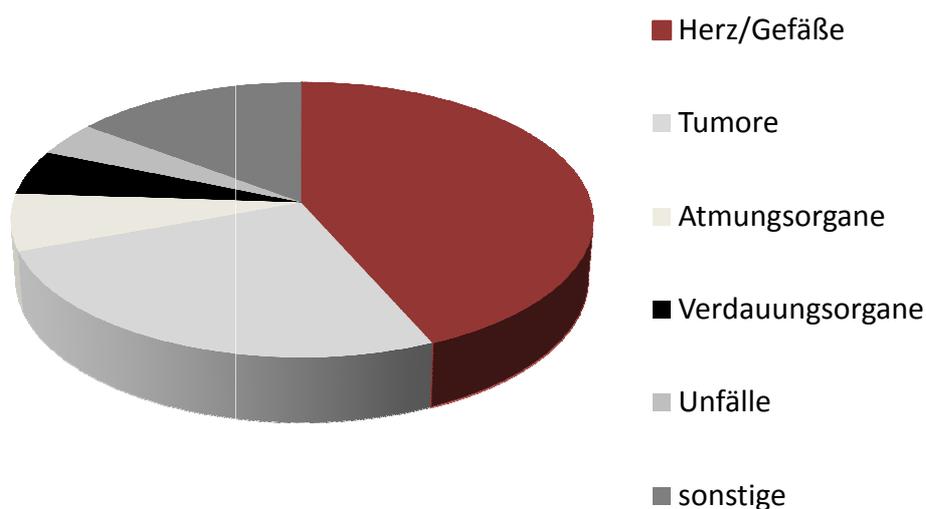


Abbildung 1: **Todesursachen in den Industrienationen 2006, Quelle der Daten WHO.** Dargestellt sind die häufigsten nachgewiesenen Todesursachen, an deren Spitze mit 43,5 % die Herz- und Gefäßerkrankungen stehen, gefolgt von Tumoren mit 26,0 %, Erkrankungen der Atmungsorgane mit 6,7 % sowie der Verdauungsorgane mit 5,3 %. Unfälle machen 4 % der Gesamtmortalität aus und auf sonstige Ursachen entfallen lediglich 14,7 %.

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen nicht nur für die betroffenen Individuen, sondern auch für die Volkswirtschaft eine große Belastung dar. Hochrechnungen zufolge wird allein China innerhalb der nächsten 10 Jahre 558 Milliarden US Dollar für die Behandlung von Herzerkrankungen, Schlaganfall und Diabetes mellitus ausgeben müssen. In niedrigeren sozioökonomischen Schichten der Industrienationen gibt es bereits heute eine wesentlich höhere Prävalenz für kardiovaskuläre Risikofaktoren, Erkrankungen und Mortalität als in der übrigen Bevölkerung. Aufgrund der sich ändernden Lebensbedingungen in den Schwellenländern wird auch hier zukünftig eine drastische Zunahme dieser Erkrankungen erwartet.

Die morphologischen Aspekte der Arteriosklerose sind bereits lange bekannt, doch erst in den letzten Jahrzehnten konnten Teile der pathophysiologischen Grundlagen dieser komplexen Erkrankung aufgedeckt werden. Ein entscheidender Schritt dabei war 1980 die Entdeckung der endothelabhängigen Vasorelaxation (Furchgott *et al*, 1980), eine Entdeckung, die 1998 mit dem Nobelpreis der Medizin ausgezeichnet wurde. Kurz danach wurde entdeckt, dass Substanzen aus den arteriosklerotischen Plaques wie Sauerstoffradikale und oxidierte Lipoproteine den damals noch unbekanntem endothelialen relaxierenden Faktor (EDRF= *Endothelium Derived Relaxing Factor*) degradieren und so dessen vasodilatierende Wirkung abschwächen. Es vergingen fast zehn Jahre bis man zeigen konnte, dass es sich bei dem EDRF um Stickstoffmonoxid (NO) handelt. In den nachfolgenden Jahren wurde bewiesen, dass die Arteriosklerose mit einer verminderten NO Produktion bzw. NO Wirkung einhergeht, sowie dass NO unter diesen Bedingungen vermehrt inaktiviert wird. Hierbei spielen endogene Inhibitoren des NO generierenden Enzyms (NO Synthase) wie das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) eine entscheidende Rolle. ADMA Plasma Konzentrationen, die in gesunden Menschen bei $1,0 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$ liegen, sind sowohl bei kardiovaskulären Risikofaktoren als auch bei unterschiedlichen Erkrankungen deutlich erhöht (Abbildung 2).

Risikofaktoren und Erkrankungen	ADMA Plasma Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen
Arterieller Hypertonus	2 fach
Diabetes mellitus Typ II	2 fach
Hypertriglyceridemie	2 fach
Hypercholesterinämie	2-3 fach
Chronische Herzinsuffizienz	2-3 fach
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	2-4 fach
Pulmonale Hypertonie	2-3 fach
Chronische Niereninsuffizienz	2-12 fach

Abbildung 2: **Klinische Bilder mit erhöhten ADMA Plasma Konzentrationen.** Bei verschiedensten Erkrankungen ist es in den letzten Jahren gelungen, eine Erhöhung der im Plasma gemessenen ADMA Werte verglichen mit den gesunden Kontrollgruppen festzustellen. ADMA ist somit als Risikomarker für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse anzusehen, neuere Studien diskutieren darüber hinaus, ob erhöhte ADMA Konzentrationen selbst einen Risikofaktor für solche Erkrankungen darstellen (Böger *et al*, 2003).

Studien am Tiermodell sowie auch am Menschen konnten zeigen, dass es bereits vor dem Auftreten eines schweren kardiovaskulären Ereignisses zu einem Anstieg von ADMA kommt. Unklar ist allerdings noch, ob die erhöhten ADMA Konzentrationen *per se* zu einer vaskulären Erkrankung führen. Diese Frage ist ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit, da es von großem medizinischen Interesse ist, die möglichen Folgen ansteigender ADMA Werte frühzeitig zu erkennen und diesen gegebenenfalls präventiv entgegenwirken zu können.

1.1 DAS BLUTGEFÄßSYSTEM

Das kardiovaskuläre System besteht aus einer komplexen Verknüpfung von Gefäßen, die dem Transport des Blutes vom Herz bis in die Peripherie des Körpers und von dort aus zurück zum Herzen dienen. Im Verlauf verzweigen sich die Arterien bis zu kleinen Kapillaren, diese werden danach wieder zu den Venen zusammengeführt. Gefäße spielen eine entscheidende Rolle bei verschiedensten Funktionen: Sie bilden in ihrer Gesamtheit die anatomische Grundlage für den Blutkreislauf und damit für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des menschlichen Körpers. Über den Blutstrom werden Atmung,

Digestion, Exkretion sowie die Kontrolle der Körpertemperatur gewährleistet, somit ist ein intaktes und funktionsfähiges Gefäßsystem die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung aller Vitalfunktionen.

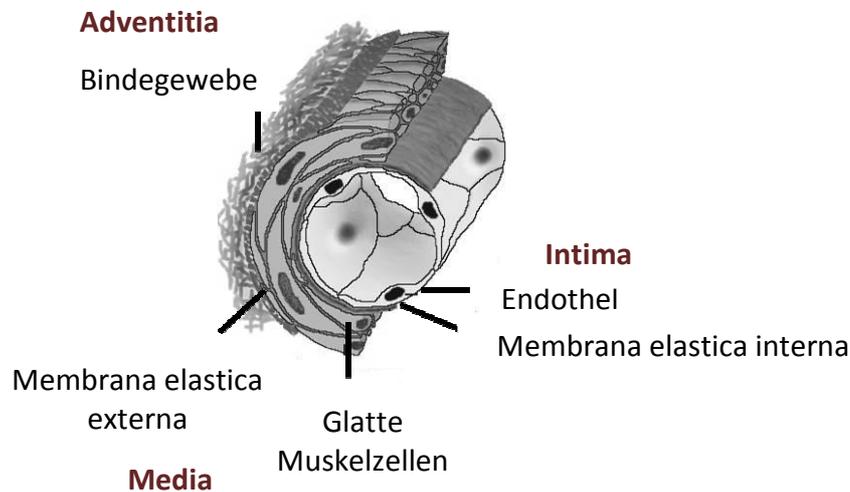


Abbildung 3: **Der Aufbau eines Gefäßes.** Unabhängig von Art und Funktion zeigt der Wandaufbau größerer Gefäße eine typische Dreischichtung in *Tunica intima* (kurz auch: Intima), *Tunica media* (Media) und *Tunica adventitia* (Adventitia).

Der Aufbau der Gefäße trägt den unterschiedlichen funktionellen Anforderungen Rechnung, auch wenn prinzipiell alle Arterien und Venen ein morphologisch ähnliches Bauschema aufweisen. Die Gefäßwand lässt sich in drei Abschnitte aufteilen: Die *Tunica adventitia*, die *Tunica media* und die *Tunica intima*. Die äußere Schicht, die Adventitia, wird von kollagenem Bindegewebe gebildet, in dem elastische Fasern verlaufen und stellt eine Verbindung mit der jeweiligen Umgebung her. Die mittlere Schicht, die Media, besteht aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern. Die innerste Schicht von Blutgefäßen besteht aus dünnen und flachen Zellen, dem Endothel. Die Endothelzellen liegen auf einer feinen Membran aus Bindegeweben, der *Membrana elastica interna*. Zusammen bilden diese beiden sehr feinen Strukturen die Intima.

1.1.1 FUNKTIONEN DES ENDOTHEL

Das Gefäßendothel ist mehr als eine physikalische Barriere, die das Blutkompartiment von den Geweben und Organen des Körpers trennt. Es ist ein multifunktionelles Organ und für eine Vielzahl von zellulären Signal- und Syntheseleistungen verantwortlich. Das Endothel

ist Quelle und Ziel von Mediatoren biologischer Reaktionen, es fungiert als Signalgeber durch die Bildung von biologisch aktiven Stoffen wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren und weiterer Hormone, die als wirksame Effektoren wirken und eine Vielzahl von Zellen beeinflussen. Das Endothel regelt auf diese Weise auch inflammatorische und immunologische Reaktionen: Verschiedene körpereigene oder mikrobielle Substanzen können es lokal aktivieren. Diese Aktivierung führt dazu, dass neutrophile Granulozyten aus dem Blut an das Endothel binden und ihrerseits aktiviert werden. Das Endothel ist gleichzeitig der Ort, an dem durch Aktivierung oder Hemmung von Gerinnungsprozessen Leckagen des Gefäßsystems durch die Auslösung der Hämostase abgedichtet oder unerwünschte Gerinnungsherde verhindert werden. Die Angiogenese, also die Sprossung neuer Gefäße aus den bereits vorhandenen, wird ebenfalls von den Endothelzellen initiiert. Das Endothel ist somit Sensor und Integrator des lokalen pathophysiologischen Milieus. Es kann jeweils Vasodilator und Vasokonstriktor bilden und das resultierende dynamische Gleichgewicht beider bestimmt dann letztlich die Gefäßfunktion.

Eine besonders wichtige Funktion des Endothels ist die Regulation des Vasotonus: Endothelzellen sind durch Metabolisierung vasoaktiver körpereigener Verbindungen und die Synthese vasoaktiver Gewebshormone an der lokalen Gefäßregulation beteiligt. Das Endothel nimmt beispielsweise Neurotransmitter wie Noradrenalin oder Serotonin auf und überführt sie in unwirksame Abbauprodukte.

Die endotheliale Synthese von vasoaktiven Verbindungen ist jedoch physiologisch wesentlich bedeutsamer als die Metabolisierung. Vasokonstriktoren wie Endothelin 1 und Angiotensin ebenso wie die Vasodilatoren Prostazyklin und Stickstoffmonoxid werden hier gebildet und ermöglichen eine Regulierung des Blutdrucks. Eine besonders große Bedeutung hat hierbei NO, das für eine Dilatation von Gefäßstrecken sorgt, die sonst nicht angemessen auf physiologische Änderungen reagieren könnten. Die mangelnde Empfindlichkeit betrifft vor allem die Bereiche der kleineren Arterien und Arteriolen, die proximal des Stromgebietes der terminalen Arteriolen liegen. Wird bei erhöhter Leistungsanforderung an den Organismus eine verstärkte Durchblutung auch in diesen weniger reagiblen Gebieten notwendig, so vermittelt hier vor allem das Stickstoffmonoxid die Gefäßerweiterung.

1.1.2 ENDOTHELIALE DYSFUNKTION UND ARTERIOSKLEROSE

Kardiovaskuläre Risikofaktoren ebenso wie manifeste kardiovaskuläre Erkrankungen und Entzündungsvorgänge können das Endothel aktivieren, was substantielle Veränderungen der endothelialen Eigenschaften zur Folge hat: Bedingt durch die Zunahme der vaskulären Sauerstoffradikalproduktion nimmt die Bioverfügbarkeit von endotheliale NO ab, weshalb dessen antiarteriosklerotischen Eigenschaften wie Hemmung der Thrombozytenaggregation und Leukozytenadhäsion eingeschränkt werden. Dieser Zustand wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und ist charakterisiert durch eine Verminderung bzw. den Verlust der endothelvermittelten Vasodilatation. Ein dysfunktionales Endothel verliert seine vasoprotektiven Eigenschaften und bildet durch die Expression und Freisetzung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen die Grundlage für eine Entstehung von Arteriosklerose: Monozyten wandern über und durch das aktivierte Endothel in die Gefäßwand ein und transformieren zu Makrophagen. Diese nehmen dort große Mengen an Lipoproteinen auf und werden so zu sogenannten Schaumzellen. Gemeinsam mit eingewanderten Lymphozyten und deponiertem Cholesterin bilden sie *fatty streaks*, subintimale Lipidablagerungen, aus denen sich im Laufe der Zeit ein Atherom entwickelt. Durch die ständige Ausschüttung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren aus den Makrophagen und Endothelzellen kommt es zur Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media in den subendothelialen Raum. Diese synthetisieren und sezernieren verschiedene Stoffe, die zur Bildung von fibrinösen Plaques führt. Als Folge der Plaquebildung kommt es zu einer Lumenverkleinerung und damit zu einer verminderten Durchblutung der abhängigen Organe mit Ausbildung der jeweiligen Endorganschäden. Die Plaque ist mit einer fibrinösen Kappe bedeckt, durch weiteres Einwirken kardiovaskulärer Risikofaktoren kommt es zu einem Aufbrechen der Plaque mit konsekutiver Thrombozytenaggregation, einem kompletten Gefäßverschluss und somit dem Vollbild eines akuten Myokardinfarkts.

1.2 STICKSTOFFMONOXID (NO)

Stickstoffmonoxid ist das kleinste endogen gebildete, bioaktive Molekül und ein einzigartiger Signaltransmitter: Es kann als Gas frei durch die Zellmembranen diffundieren und ist deshalb weder auf Transportsysteme noch extrazelluläre Rezeptoren angewiesen wie alle Botenstoffe auf Protein- oder Aminosäurebasis es sind. Aufgrund seiner Eigenschaften als freies Radikal kann NO mit verschiedensten Makromolekülen wie Proteinen und DNA oder anderen Radikalen reagieren, zu nennen sind hier vor allem Superoxid (O_2^-) und Oxyhämoglobin. Aus der hohen Reaktivität von NO resultiert dessen geringe Halbwertszeit von nur wenigen Millisekunden und eine Reichweite von etwa 100 μ M. Für eine konstante Signalwirkung ist es demnach nötig, dass ständig neues NO in unmittelbarer Umgebung des Wirkungsortes gebildet und freigesetzt wird.

1.2.1 SYNTHESE

Die Bildung von NO erfolgt durch die Enzymklasse der NO Synthasen: Sie katalysieren die Umsetzung von L-Arginin unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH zu NO und Citrullin (Palmer *et al*, 1988). Bislang sind drei Isoformen bekannt (Andrew *et al*, 1999). Die endotheliale NOS (eNOS) wird konstitutiv im Endothel und in vielen anderen Zellen exprimiert und liegt membrangebunden in spezifischen Mikrodomänen der Plasmamembran (=Caveolen) vor. Die ebenfalls konstitutiv exprimierte neuronale NOS (nNOS) ist hauptsächlich an der Signaltransmission im Gehirn und im Nervensystem beteiligt und ist wie die induzierbare NOS (iNOS) ein zytosolisches Enzym. Die iNOS Expression ist nicht konstitutiv, ihre Expression wird in Endothelzellen, glatten Muskelzellen aber hauptsächlich in Zellen des Immunsystems durch Bakterioendotoxine oder inflammatorische Zytokine induziert (Papapetropoulos *et al*, 1999). Die Hauptfunktion der iNOS ist die Produktion von großen Mengen an NO zur Infektabwehr und im Rahmen von Entzündungsprozessen (Nathan *et al*, 1991). NO Synthasen bestehen aus zwei identischen Monomeren, die in eine C-terminale Reduktase Domäne und eine N-terminale Oxygenase Domäne unterteilt werden (Andrew *et al*, 1999). Die Reduktase Domäne besitzt Bindungsstellen für je ein Molekül NADPH, FAD und FMN, die Oxygenase Domäne kann Häm, Tetrahydrobiopterin und das Substrat L-Arginin binden.

1.2.2 WIRKUNGEN

Für das kardiovaskuläre System ist die eNOS von großer Bedeutung, da diese für die Synthese des Hauptteils an NO im Endothel zuständig ist. Die eNOS wird unter physiologischen Bedingungen über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen aktiviert. Diese Erhöhung erfolgt sowohl über einen Kalzium Einstrom aus dem Extrazellularraum, als auch durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Die Öffnung der entsprechenden Ionenkanäle erfolgt über die Aktivierung membranständiger Rezeptoren durch endogene (Acetylcholin, Bradykinin, Histamin) oder exogene Mediatoren (Medikamente). Zelluläre Wirkorte von NO sind sowohl verschiedene Blutzellen (z.B. Thrombozyten und Granulozyten) als auch die Gefäßwand (glatte Muskelzellen und Endothelzellen).

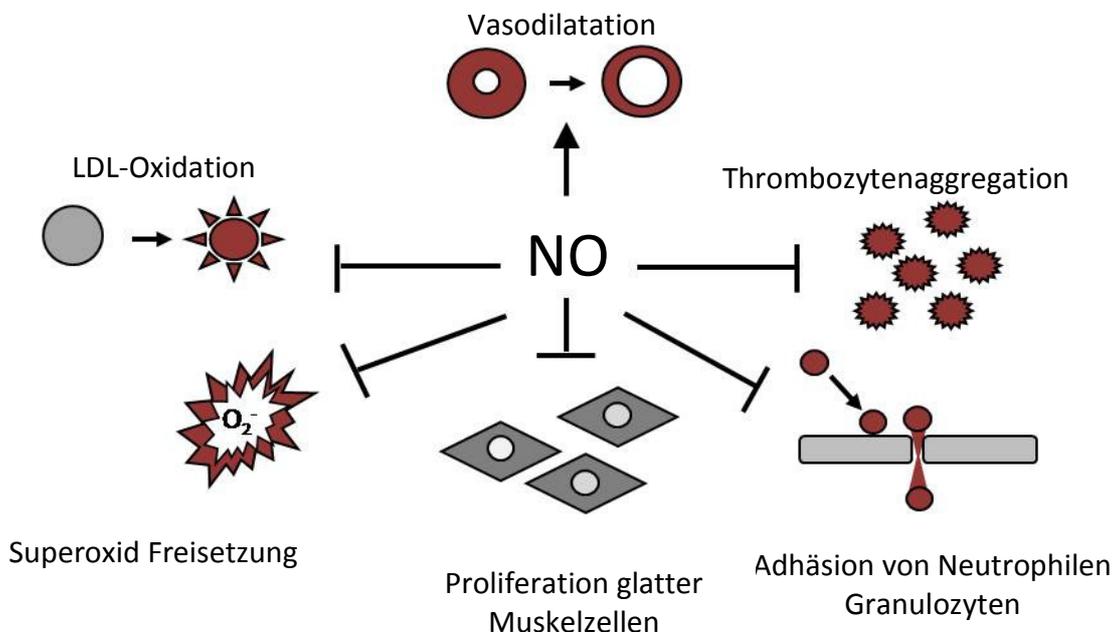


Abbildung 4: **Die Effekte von Stickstoffmonoxid im kardiovaskulären System.** NO induziert die endothelabhängige Vasodilatation und inhibiert die Thrombozytenaggregation, Leukozytenadhäsion und die Proliferation glatter Muskelzellen. NO besitzt außerdem antioxidative Eigenschaften, so trägt es zu weniger Superoxidradikalbildung und verminderter LDL Oxidation bei. Alle diese Mechanismen tragen zur Pathogenese von Arteriosklerose bei, NO wird deshalb auch als „endogenes anti arteriosklerotisches Molekül“ bezeichnet. Alle Bedingungen, die zu einer verminderten NO Bioverfügbarkeit führen, begünstigen daher eine Entstehung von Arteriosklerose (Böger *et al*, 2003).

Das gebildete NO diffundiert zu den Zielzellen und bindet dort an die freie Ligandenstelle im Häm Eisen der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Diese wird durch die Bindung aktiviert, es kommt zu einer Konformationsänderung. Daraus resultiert eine gesteigerte Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und eine intrazelluläre Abnahme des Kalziums. Der *second messenger* cGMP hat zahlreiche potenzielle Zielproteine, am wichtigsten für die NO vermittelte Vasodilatation ist jedoch eindeutig die Aktivierung der Proteinkinase 1 (cGK1) (Walter *et al*, 1988). Die aktivierte cGK1 phosphoryliert eine Vielzahl von Proteinen und führt so zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie -adhäsion und bewirkt durch Relaxation vaskulärer glatter Muskelzellen eine Vasodilatation (Abbildung 4). Ein wichtiges Effektorprotein ist das Vasodilatator stimulierte Phosphoprotein (VASP), dessen Phosphorylierungsgrad als funktioneller Marker für die Aktivität des gesamten NO:cGMP Signalwegs verwendet wird.

Neben dieser Kurzzeitregulation des Vasotonus ist eine ausreichende NO Bioverfügbarkeit wegen seiner antiproliferativen, antimigrativen und antiarteriosklerotischen Wirkung zudem entscheidend für die Gewährleistung der Langzeitvasoprotektion. Ein weiterer Mechanismus, der für eine reduzierte NO Bioverfügbarkeit und somit eine verschlechterte Endothelfunktion verantwortlich ist, ist eine endogene Hemmung der NO Synthese durch methylierte L-Arginin Analoga wie das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA).

1.3 ASYMMETRISCHES DIMETHYLARGININ (ADMA)

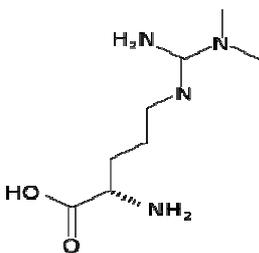


Abbildung 5:
Struktur von ADMA

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist eine endogen vorkommende Aminosäure. ADMA wurde erstmals 1970 aus humanem Urin isoliert (Kakimoto *et al*, 1970) und als physiologisches Stoffwechselprodukt eingestuft, das über die Niere ausgeschieden wird. Ein Mensch generiert täglich etwa 300 μmol ADMA, das sind ungefähr 60 mg ADMA (Achan *et al*, 2003). ADMA ist eine posttranslational modifizierte Form von L-Arginin: Es wird wie seine Stereoisomere symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) und N-Monomethylarginin (L-NMMA) in allen Körperzellen von den Protein-Arginin-N-

Methyltransferasen (PRMT), durch Methylierung der endständigen Stickstoffe der Guanidinogruppe von proteinständigen L-Argininen generiert (Paik *et al*, 1968).

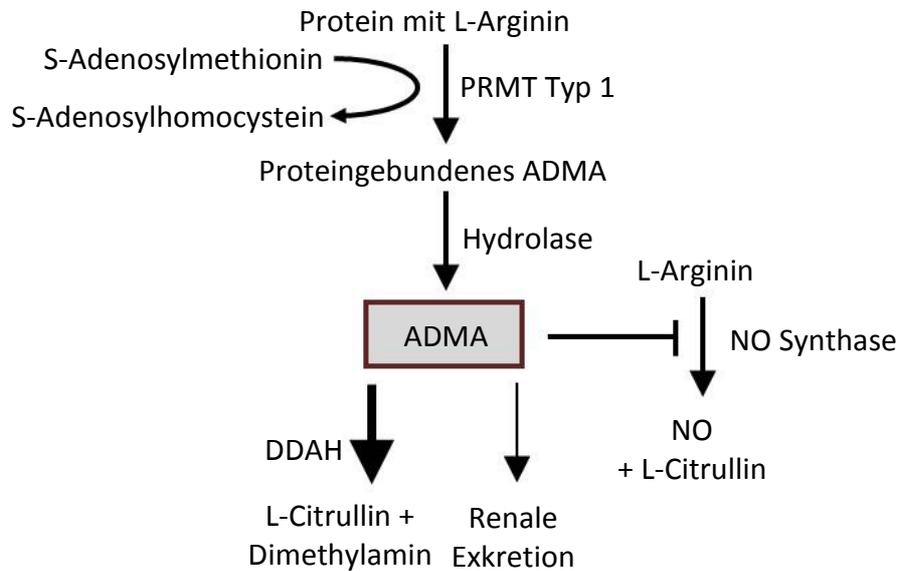


Abbildung 6: **Biosynthese, Metabolismus und Wirkung von ADMA.** Die Synthese von ADMA erfolgt durch posttranslationale Methylierung proteinständiger L-Argininreste. Dieser Schritt wird katalysiert durch das Enzym Protein-Arginin-N-Methyltransferase (PRMT). Durch anschließende Hydrolyse erfolgt die Freisetzung von freiem ADMA. Das entscheidende Enzym für den ADMA Abbau ist die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH), ein geringer Teil wird auch über die Nieren ausgeschieden. ADMA wirkt als endogener Inhibitor der NO Synthase und verhindert so die Bildung von NO aus L-Arginin.

Die Abbildung 6 zeigt zusammenfassend die im Folgenden beschriebenen Aspekte der Synthese sowie des Metabolismus des asymmetrischen Dimethylarginin.

1.3.1 PATHOPHYSIOLOGISCHE RELEVANZ

Eine direkte biologische Wirkung von ADMA konnte in mehreren experimentellen Studien und Untersuchungen am Tier und Mensch nachgewiesen werden. Bei diesen Versuchen ging es darum zu zeigen, dass durch eine Gabe von ADMA alle typischen Symptome einer verminderten NO Bioverfügbarkeit im Organismus und somit die Hauptursache einer endothelialen Dysfunktion hervorgerufen werden können. Die Gruppe um Gardiner zeigte 1993, dass eine Infusion von ADMA bei Ratten dosisabhängig eine systemische und vor allem auch eine renale Vasokonstriktion und einen starken Blutdruckanstieg zur Folge hat (Gardiner *et al*, 1993). Auch eine Gabe von ADMA zu isolierten Nieren- und Hirngefäßen führte zu einer ausgeprägten Gefäßkonstriktion (Segarra *et al*, 2001). Beim Menschen

fürte eine arterielle Infusion von ADMA zur deutlichen Verminderung der Durchblutung des Unterarms um 44 % verglichen mit dem Ausgangswert (Vallance *et al*, 1992), sowohl die Herzfrequenz als auch die kardiale Auswurfleistung sank. Der Effekt war noch bis zu 40 Minuten nach Ende der Infusion nachweisbar und konnte durch die Gabe von L-Arginin abgeschwächt werden.

1.3.2 SYNTHESE

Die Gruppe der PRMT wird in zwei Klassen unterteilt (Garyet *et al*, 1998). Beide Klassen bilden vermutlich als Zwischenstufe zu den anderen Produkten L-NMMA. Wenn jedoch eine zweite Methylierung erfolgt ist die Reaktion klassenspezifisch: Typ 1 (PRMT 1, 3, 4, 6) methyliert einen Stickstoff zweimal und führt so zur Bildung von ADMA, Typ 2 (PRMT 5) dagegen führt durch die einfache Methylierung beider endständigen Stickstoffatome zur Synthese von SDMA. Beide Klassen der PRMT methylieren bevorzugt L-Arginine, die in Arginin-Glycin reichen Sequenzen von Proteinen vorkommen (Gary *et al*, 1998). Eine Proteom Analyse konnte über 200 Proteine identifizieren, die vermutlich methylierte Arginine tragen (Boisvert *et al*, 2003). Viele dieser Proteine zeigen starke Interaktionen mit Nukleinsäuren und sind in Prozesse wie Splicen von prä mRNA, Transkription, Translation und Signaltransduktion involviert (Miranda *et al*, 2004). Alle PRMT nutzen S-Adenosylmethionin, ein Zwischenprodukt des Homocysteinestoffwechsels, als Methylgruppendedonor, das hierbei entstehende S-Adenosylhomocystein geht wieder in diesen Stoffwechselkreislauf ein. Die Freisetzung von ADMA erfolgt durch die Proteolyse der methylierten Proteine, freies ADMA wirkt im Gegensatz zur proteingebundenen Form als endogener Inhibitor der NO Synthase (NOS).

1.3.3 TRANSPORT

Kationische Aminosäuretransporter (SLC7A1-4, auch bekannt als CAT oder γ^+ System) transportieren kationische Aminosäuren wie Arginin, Lysin, Histidin und Ornithin durch erleichterte Diffusion mit trans Stimulation, bei der erhöhte intrazelluläre Substrat Konzentrationen den Aminosäure Influx stimulieren (Verrey *et al*, 2002). Auch ADMA wird über dieses System in die Zellen transportiert und konkurriert mit L-Arginin um die

Aufnahme (Verrey *et al*, 2004). In einigen Zellen kann so die NO Synthese geregelt werden, indem die Aufnahme von L-Arginin beschränkt wird. SLC7A1 wird fast ubiquitär exprimiert, wobei die Expression stark von dem Gewebe und Zelltypen abhängig ist. SLC7A1 scheint das Hauptsystem der γ^+ Transporter in den meisten Zellen, insbesondere der NO produzierenden Zelltypen zu sein und ist somit zuständig für die Substratversorgung der NO Synthasen in Endothelzellen und Makrophagen (Zharikov *et al*, 2001).

1.3.4 DEGRADIERUNG

Proteinsynthese und Proteolyse sind die anabolischen und metabolischen Spiegelbilder beim Proteinumsatz. Unter physiologischen Bedingungen stehen sie zueinander im Gleichgewicht: Die Proteolyse führt über die vollständige Degradierung der Proteine zu freien Aminosäuren, welche dann wiederverwendet werden für die *de novo* Synthese neuer Proteine. Aminosäuren, die jedoch über posttranslationale Modifizierungen verändert wurden, können nicht zu diesem Zweck wiederverwendet werden, sondern müssen entweder metabolisiert oder ausgeschieden werden. Je nach Protein variiert die Halbwertszeit im Organismus zwischen wenigen Minuten und mehreren Jahren (Glickman *et al*, 2002). Der Umsatz methylierter Proteine erfolgt sehr schnell. Im Gegensatz zu anderen posttranslationalen Modifikationen wie etwa die Phosphorylierung ist die Methylierung irreversibel. Das heißt, dass eine durch Methylierung geänderte Funktion des Proteins ausschließlich über die Degradierung und anschließende *de novo* Synthese des nicht methylierten Proteins rückgängig gemacht werden kann.

1.3.5 BEDEUTUNG DER DDAH IM KONTEXT DER ADMA DEGRADIERUNG

Bereits 1976 untersuchte die Gruppe um McDermott die Eliminierung von ADMA und seinen Stereoisomeren. Sie stellten fest, dass die renale Eliminierung von SDMA ca. dreißigfach höher ist als die von ADMA und L-NMMA. 1987 wurde dann erstmals ein Enzym beschrieben, (Ogawa *et al*, 1987) welches für den Abbau von ADMA verantwortlich gemacht wurde, die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH). Es konnte gezeigt werden (Vallance *et al*, 2002), dass es zwei Isoformen dieses Enzyms gibt, DDAH 1 und

DDAH 2, welche in Bakterien, Schafen, Mäusen, Ratten und Menschen vorkommen. Die Beobachtung, dass beide Formen der DDAH und die verschiedenen NOS Isoformen unterschiedliche Expressionen in Gefäßen und Organen aufweisen (Tojo *et al*, 2000) und dass DDAH und NOS in Zellen koexprimiert werden (Tojo *et al*, 1997), legte den Schluss nahe, dass die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) über die DDAH induzierte Änderung der ADMA Konzentration zellspezifisch reguliert wird (Leiper *et al*, 1999, Wang *et al*, 2007).

DDAH katalysiert die Metabolisierung von einem Molekül ADMA zu je einem Molekül L-Citrullin und Dimethylamin. Es gibt keine Hinweise für die Notwendigkeit spezieller Kofaktoren für diese Reaktion. Isolierte DDAH hat ihre maximale Aktivität bei einem pH Wert zwischen pH 5,2 und pH 6,5 (Ogawa *et al*, 1989) und ein Temperaturoptimum von 55°C (Ogawa *et al*, 1987). DDAH 1 enthält einen Zn(II) Komplex, der zwar nicht an der katalytischen Aktivität beteiligt ist, aber für die Stabilisierung der aktiven Form benötigt wird (Knipp *et al*, 2001). Studien zeigen, dass DDAH ADMA intrazellulär metabolisiert, während SDMA kein Substrat darstellt (Birdsey *et al*, 2000). Diese spezifische Affinität wird mit der molekularen Struktur erklärt: DDAH 1 hat eine Substratbindungsstelle, die eine kleine Pore bildet, so dass die nichtmethylierte Stickstoffseitenkette von ADMA aufgenommen werden kann (Murray-Rust *et al*, 2001). Ist das Substrat gebunden, schließt die Pore und hydrophobe Wechselwirkungen verankern ADMA im aktiven Zentrum. SDMA hingegen besitzt Methylgruppen beiden Stickstoffen und ist somit sterisch und elektrostatisch nicht in der Lage, an die DDAH zu binden. Die Eliminierung von ADMA ist also hauptsächlich abhängig von der Expression und Aktivität der DDAH, während die Eliminierung von SDMA abhängig ist von der Ausscheidungsrate der Niere (Tran *et al*, 2003).

Die Beobachtung, dass die Aktivität der DDAH nicht mit der Proteinexpression korrelierte, führte zur Entdeckung einer zweiten Isoform, der DDAH 2 (Leiper *et al*, 1999). Beide Formen der DDAH sind hauptsächlich zytoplasmatische Enzyme, wobei DDAH 1 auch in der Membran von Endothelzellen lokalisiert werden konnte (Birdsey *et al*, 2000). DDAH 1 wird in vielen Geweben exprimiert, besonders in Leber und Niere, es wurde eine Kollokalisierung mit allen Isoformen der NOS beschrieben (Tojo *et al*, 1997, Tojo *et al*, 2000).

Die menschliche Leber und Niere sind die Hauptorgane des ADMA Metabolismus, was zu einem Gradienten zwischen Blutkreislauf und diesen Organen führt (Nijveldt *et al*, 2003). Es wird deshalb postuliert, dass beide Organe als „Wächter“ des zirkulierenden ADMA fungieren. Weitere Gewebe mit starker Expression von DDAH 1 sind Pankreas, Aorta, neutrophile Granulozyten und Makrophagen (Kimoto *et al*, 1993, Tran *et al*, 2000). Im Endothel dominiert zwar die Expression der DDAH 2, allerdings ist ebenfalls die DDAH 1 hier konstitutiv vorhanden (Konishi *et al*, 2007). DDAH ist in der Lage, die Expression von einer Vielzahl von Genen durch die Veränderung der ADMA Konzentration und NO Generierung zu verändern (Smith *et al*, 2005): Die Ergebnisse eines DNA *microarray assays* zeigten bei 142 Genen eine stark veränderte Expression nach Inkubation der verwendeten Zellen mit ADMA. DDAH verstärkt desweiteren die Expression von Genen, welche für die Angiogenese benötigt werden, so auch die endotheliale Isoform der NOS (Wang *et al*, 2007) und VEGF (Smith *et al*, 2003) und vermindert die Expression von RhoA (Smith *et al*, 2005).

Es wurden verschiedene Substanzen identifiziert, die die Expression der redoxsensitiven DDAH modifizieren: Beide Isoformen werden nach Aktivierung des Angiotensin Typ 1 Rezeptors weniger exprimiert (Onozato *in press*, Tojo *et al*, 2000), die DDAH 1 Expression ist außerdem negativ reguliert durch oxLDL, TNF α sowie die NADPH Oxidase. IL 1 β hingegen führt zu erhöhter DDAH 1 Expression (Ueda *et al*, 2003).

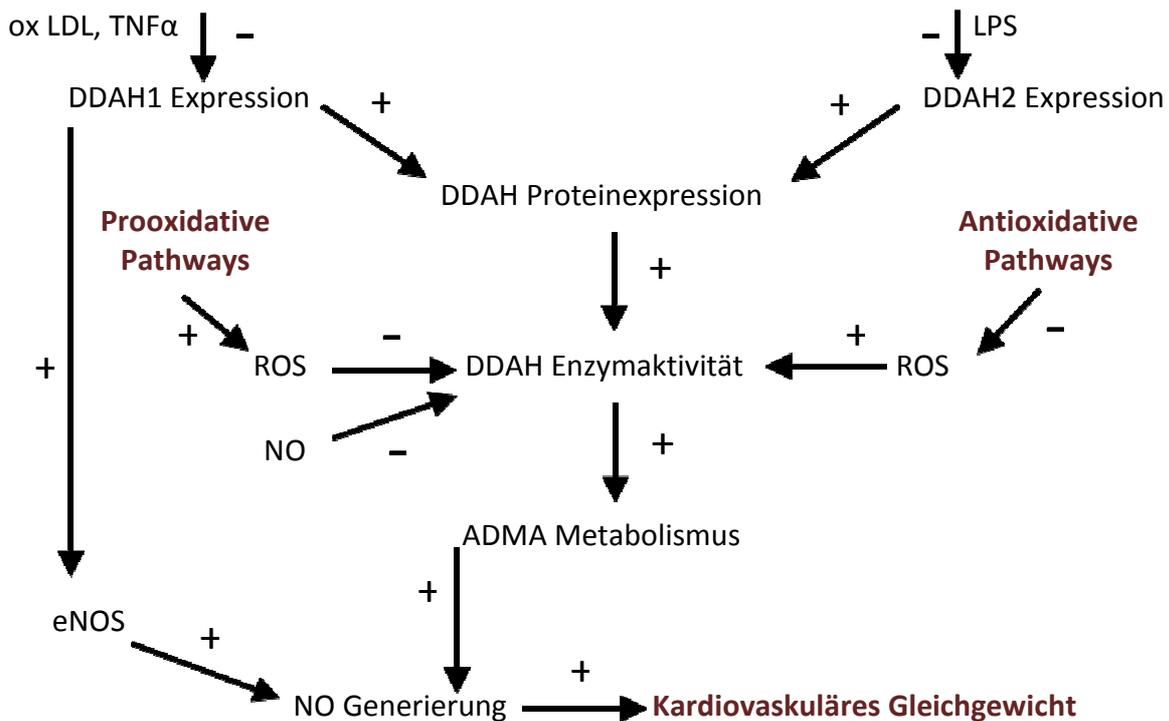


Abbildung 7: Flussdiagramm der Faktoren, die die Aktivität der DDAH beeinflussen. Substanzen wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), oxLDL und TNF α beeinflussen durch die Expressionsänderung der DDAH die ADMA Konzentrationen im Organismus. Andere Mediatoren wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und NO modulieren direkt die Aktivität der DDAH und führen so zu einer Änderung der ADMA Degradierung.

Die Aktivität der DDAH hängt nicht nur von der Menge an translatiertem Protein ab, sondern auch von dem umgebenden Milieu: Unterschiedliche Oxidantien sind in der Lage, die Aktivität zu hemmen, so auch NO, welches im Rahmen einer Sepsis in zytotoxischen Mengen freigesetzt werden kann (Leiper *et al*, 2002). NO S-nitrosyliert die Zysteine der DDAH und inaktiviert so das aktive Zentrum (Knipp *et al*, 2003, Leiper *et al*, 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass es einen Regelkreis zwischen NO Synthese und DDAH Aktivität gibt: Wird viel NO gebildet, so wird die DDAH dadurch inaktiviert, die ADMA Konzentrationen steigen und verhindern so durch die Inhibierung der NOS eine weitere überschießende NO Produktion. Viele Hemmstoffe der DDAH, wie etwa LPS (Xin *et al*, 2007) und oxLDL (Ito *et al*, 1999) gehen mit oxidativem Stress einher. Viele aktivierende Stimuli der DDAH wirken, hier sind vor allem Pravastatin, Taurin und Estradiol (Holden 2003) zu nennen. Diese Feststellungen demonstrieren, wie relevant diese Veränderungen der Redoxverhältnisse für die Aktivität der DDAH ist, über die die Menge an endogenem ADMA und folglich auch die NO Synthese reguliert wird.

Ein weiterer Mechanismus, der zu einer verminderten NO Bioverfügbarkeit führt, ist der beschleunigte Abbau von NO durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie z.B. das Superoxidanion. In Blutgefäßen ist daher eine gesteigerte Superoxidproduktion assoziiert mit einer verminderten NO vermittelten Vasorelaxation. Eine wichtige Quelle von ROS im Endothel ist neben der NADPH Oxidase und der Xanthinoxidase die leukozytäre Peroxidase Myeloperoxidase (MPO).

1.4 MYELOPEROXIDASE (MPO)

Das Enzym Myeloperoxidase wurde 1941 erstmals aus Leukozyten isoliert. Die reife Myeloperoxidase ist ein glykosyliertes, argininreiches Hämprotein. Sie besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind und ein $\alpha_2\beta_2$ Dimer bilden. Jedes Monomer besteht aus einer leichten und einer schweren Kette, die kovalent gebunden ein katalytisches Hämgerüst enthält (Fenna *et al*, 1995). Das Zentralion des Hämanteils entspricht einem dreiwertigen Eisenatom, welches die MPO zu Elektronenübertragungsreaktionen befähigt. Die Argininseitenketten verleihen dem Enzym starke kationische Eigenschaften und einen isoelektrischen Punkt über pH 10. MPO ist mit einem Anteil von 5 % am Gesamtprotein eines der am stärksten exprimierten Proteine in neutrophilen Granulozyten und verantwortlich für die Generierung zytotoxischer Spezies im Rahmen der zellulären Immunität (Schultz *et al*, 1962).

1.4.1 PATHOPHYSIOLOGISCHE RELEVANZ

Unter physiologischen Bedingungen dient die körpereigene Produktion von ROS der Pathogenabwehr. Antioxidative Mechanismen der Zelle sorgen zeitgleich dafür, dass die gebildeten ROS wieder neutralisiert werden. Ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien führt zu oxidativem Stress. Eine Vielzahl pathophysiologischer Prozesse wird mit der Entstehung von oxidativem Stress assoziiert: In zahlreichen Studien wurden kausale Zusammenhänge zwischen MPO, Entzündungsprozessen und akuten und chronischen Manifestationen kardiovaskulärer Erkrankungen festgestellt (Daugherty *et al*, 1994). In arteriosklerotischen Läsionen konnten MPO und ihre Reaktionsprodukte nachgewiesen werden. Die Gruppe um Zhang (Zhang *et al*, 2001) konnte einen starken

Anstieg der MPO Konzentrationen im Plasma von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (CAD= *coronary artery disease*) zeigen. Durch Bindung und anschließende Oxidation des LDL (*low density lipoprotein*) zu oxLDL (Carr *et al*, 2000) und vor allem auch durch ihre Rolle im NO Stoffwechsel (Eiserich *et al*, 2002) ist sie an der Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen maßgeblich beteiligt. Myeloperoxidase ist somit ein potenter pro inflammatorischer Mediator, der in einer Vielzahl von akuten wie chronischen Erkrankungen die Gefäßfunktion beeinträchtigt.

1.4.2 SYNTHESE

Die Synthese von MPO beginnt während der Myelopoese der neutrophilen Granulozyten im Stadium der Promyelomonocyten und endet mit Beginn des Myelozytenstadiums (Bos *et al*, 1978). Anschließend werden die MPO haltigen Granula auf die Tochterzellen verteilt: MPO wird am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, in dessen Zisternen auch verschiedene posttranslationale Modifikationen vorgenommen werden. Um eine enzymatisch aktive pro MPO zu erhalten, wird eine Häm Gruppe mit einem Eisen Zentralatom im ER hinzugefügt. Diese prosthetische Gruppe verleiht der MPO auch ihre typische grüne Farbe. Die Häm Gruppe nicht nur wichtig für die enzymatische Aktivität, sondern auch für die Faltung und Stabilität der MPO. Ohne diese Häm Gruppe würde die pro MPO nicht in den Golgi Apparat weitertransportiert und stattdessen durch Proteasen abgebaut werden (Nauseef *et al*, 1992). Die korrekt prozessierte pro MPO wird dann zum Golgi Apparat weitergeleitet und verlässt ihn entweder in Richtung Granula oder wird direkt in den Extrazellularraum sezerniert. In den azurophilen Granula bildet sich die reife MPO, wo sie bis zu ihrem Gebrauch gespeichert wird.

1.4.3 ENZYMATISCHE REAKTION DER MPO

Durch eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten wird die reife und aktive MPO aus den Granula freigesetzt. Aufgrund des hohen isoelektrischen Punktes hat MPO bei einem physiologischen pH Wert eine starke positive Ladung, weshalb das Enzym besonders gut an die negativ geladene Oberfläche der Bakterien binden kann. Durch diese Bindung können dann mikrobielle Proteine halogeniert und so phagozytierte Mikroorganismen abgetötet werden.



Abbildung 8: **Die Reaktion von MPO.** Das Enzym katalysiert die Oxidation von Chloridionen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid: Während des oxidativen *burst* der Granulozyten bildet MPO aus Wasserstoffperoxid und Chlorid- sowie Bromidanionen (Cl⁻, Br⁻) Chlor (Cl₂), Brom (Br₂) wie auch Bromchlorid (BrCl). Unter physiologischen Bedingungen entstehen daraus sofort Hypochlorid (HOCl) und Hypobromit (HOBr). Neben Haliden oxidiert MPO auch Nitrit (NO₂), Stickstoffmonoxid (NO), Thiocyanat (SCN⁻) und Tyrosin.

MPO bildet aus H₂O₂ in Gegenwart exogener oder endogener Halidionen Hypohalite, beispielsweise katalysiert MPO die Oxidation von Chlor durch Wasserstoffperoxid zu hypochloriger Säure (Eiserich *et al*, 1998). Diese reagiert umgehend mit einer Reihe von oxidierbaren Molekülstrukturen wie Alkohol- und Aldehydgruppen, SH Gruppen, Aminogruppen und Lipiden (Folkes *et al*, 1995). Schätzungsweise 50 % des durch einen aktivierten neutrophilen Granulozyten produzierten H₂O₂ wird über MPO zu HOCl umgesetzt (Fliss *et al*, 1988). Dementsprechend ist es verständlich, dass diese Hypohalite auch körpereigenes Gewebe zerstören können und auch zelleigene Strukturen angreifen.

Neben der Oxidation von Chloridionen katalysiert MPO auch weitere Reaktionen, die in der Lage sind, das kardiovaskuläre Gleichgewicht zu stören und so den gesamten Organismus negativ zu beeinflussen. Zu nennen ist hier vor allem die Verringerung der NO Bioverfügbarkeit durch MPO: MPO katalysiert die Oxidation von NO zu Nitrit, so dass NO seine vasoprotektiven Eigenschaften nicht mehr ausüben kann, ähnlich wie bereits unter 1.3 für ADMA beschrieben.

1.5 NEUTROPHILE GRANULOZYTEN

Neutrophile Granulozyten sind ca. 15 µm große phagozytierende Zellen mit hoher Motilität. Es handelt sich um die häufigste Form der Leukozyten, beim Erwachsenen machen sie 60 % der weißen Blutzellen aus. Spätestens sechs Stunden nach Neubildung gehen sie in die Apoptose und werden über die Leber oder Milz abgebaut, dies führt dazu, dass täglich werden mehr als 10^{11} neue Zellen produziert werden. Charakteristisch für ausgereifte Neutrophile ist der aus drei bis fünf Segmenten bestehende Kern. Neutrophile Granulozyten gehören ebenso wie Makrophagen zu den klassischen Entzündungszellen. Sie sind Teil der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr und für die Abtötung von in den Organismus eingedrungenen Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) zuständig.

1.5.1 MARGINATION, ADHÄSION UND TRANSMIGRATION

Zur Infektabwehr müssen die im Blut zirkulierenden Zellen in der Lage sein, auf Informationen des umgebenden Milieus zu reagieren und an den Ort der Infektion zu gelangen, wo sie die Pathogene aufnehmen und zerstören. Diese Extravasation von PMN tritt meist in kleinen Venolen auf, in denen die hämodynamischen Scherkräfte gering sind. Die Rekrutierung der PMN beginnt mit ihrer Aktivierung durch proinflammatorische Moleküle wie Zytokine, Komplementfaktoren oder bakterielle LPS. Um das infizierte Gewebe zu erreichen, verlassen sie in einem durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine vermittelten mehrstufigen Prozess den Blutstrom und das Gefäßsystem.

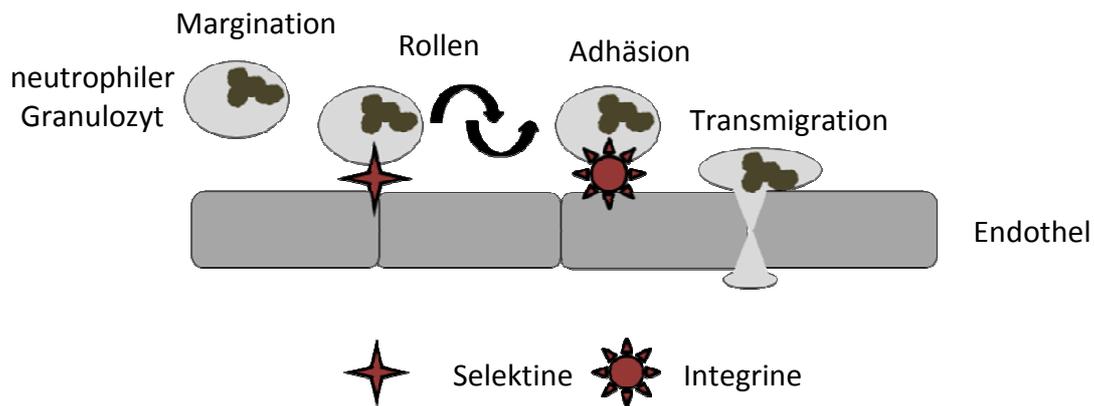


Abbildung 9: **Der Vorgang der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Infektionsherd.** Dieser Prozess lässt sich in drei Schritte unterteilen: Selektinvermitteltes Entlangrollen am Gefäßendothel, stabile Integrinvermittelte Adhäsion an das Endothel und letztlich die Durchwanderung des endothelialen Gewebes.

Werden eingedrungene Pathogene von der Immunabwehr des betroffenen Gewebes erkannt, werden Zytokine wie Interleukin 1 und $\text{TNF}\alpha$ freigesetzt. Diese Substanzen veranlassen die nahegelegenen Endothelzellen dazu, zelluläre Adhäsionsmoleküle wie P und E Selektin verstärkt auf der Gefäßwand zu exprimieren. Neutrophile Granulozyten besitzen auf ihrer Oberfläche das L Selektin als Adhäsionsmolekül und die für P und E Selektin spezifischen Liganden. Durch die entstehenden Selektin Selektin Interaktionen werden die PMN im Blutstrom verlangsamt, es kommt zu einem Rollen auf dem Endothel, indem sich die Zellen permanent transient an die Oberfläche binden und wieder lösen. Die von den Makrophagen ausgeschütteten Zytokine induzieren in den Endothelzellen und anderen Zelltypen die Produktion von Chemokinen. Diese werden von den Rezeptoren der neutrophilen Granulozyten erkannt, was dazu führt, dass die Integrine auf deren Oberfläche von einem geringen zu einem höheren Affinitätszustand wechseln. In diesem aktiven Zustand binden die Integrine fest an die Rezeptoren auf den Endothelzellen. Parallel zur Integrin Affinitätsänderung werden auf der Zelloberfläche der PMN Liganden wie dem *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM 1) und dem *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM 1) exprimiert, die an Integrine des Endothels binden. Die PMN werden so trotz Scherstress im Gefäß immobilisiert. Das Zytoskelett der neutrophilen Granulozyten wird in dieser Phase reorganisiert, die Zellen positionieren sich flach auf dem Endothel. In dieser Form bilden sie Pseudopodien aus und migrieren durch die

Lücken zwischen den Endothelzellen entlang eines Konzentrationsgradienten aus Chemokinen zum Ort der Infektion.

Aktiviert PMN spielen eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung von inflammatorischen Zuständen und sind verantwortlich für die Induzierung von Gewebsschäden durch die Freisetzung von ROS und lysosomalen Inhalten. Zytokine können die PMN Funktion modulieren. Studien konnten zeigen, dass nur wenige Stimuli wie TNF α , TNF β und GM-CSF direkt einen „oxidativen *burst*“ in humanen neutrophilen Granulozyten auslösen, während verschiedene Interleukine unter physiologischen Bedingungen keine Effekte hatten. Nur ausgewählte Zytokine sind also in der Lage, eine lang andauernde Aktivierung des oxidativen Metabolismus der PMN zu erreichen (Kapp *et al*, 1990). Die Freisetzung dieser Mediatoren stellt ein spezifisches Signal für die PMN Aktivierung in inflammatorischen Prozessen dar.

1.5.2 DEGRANULIERUNG UND OXIDATIVER *BURST*

Die Eliminierung eingedrungener Pathogene benötigt multiple Mechanismen, die von zwei zellulären Events in Gang gesetzt werden: Degranulierung und Initiierung des „oxidativen *burst*“. Das Anheften von Mikroorganismen an die Neutrophilenmembran initiiert den Prozess der Phagozytose, die Formierung des Phagosoms und verursacht die Aktivierung des „oxidativen *burst*“, der zur Bildung von Superoxidanionen, Hydroxyl Anionen und Wasserstoffperoxid führt. Diese Moleküle sind mikrobizid und ermöglichen die Eliminierung der Organismen im Phagosom: Die Pathogene werden über entsprechende Rezeptoren auf den neutrophilen Granulozyten gebunden, wodurch die Invagination in ein Phagosom induziert wird. Dieses verschmilzt dann mit den zwei Granulaformen, die sich im Zytoplasma der PMN befinden. Die Häufigsten sind spezifische Granula, die Enzyme wie Elastase und Lysozym enthalten. Aus den azurophilen Granula wird neben den typischen Bestandteilen wie saure Hydrolasen die Myeloperoxidase in das Phagosom entleert. Diese Fusion bringt MPO in direkten Kontakt mit ihren Substraten, so dass sie die Produktion von toxischen Oxidantien, Halogenierung bakterieller Proteine und letztlich den bakteriellen Tod katalysieren kann.

1.6 ZIEL DER ARBEIT

Dimethylierte Arginin Analoga erwecken seit fast zwei Jahrzehnten die Aufmerksamkeit von Grundlagenforschern wie auch Klinikern, seit Vallance *et al* 1992 einen starken Anstieg von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) und symmetrischem Dimethylarginin (SDMA) im Plasma von dialysierten Patienten feststellten. Nachfolgende Studien zeigten eine exzessive ADMA Akkumulation bei Menschen mit kardiovaskulären Risikofaktoren, selbst wenn diese Personen noch keine klinischen Anzeichen einer Arteriosklerose aufwiesen. Bisher ist es noch nicht gelungen, den exakten Pathomechanismus von ADMA im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen vollständig aufzuklären. Es ist bekannt, dass Störungen im Arginin/NO Stoffwechselweg eine reduzierte NO Bioverfügbarkeit sowie verstärkten oxidativen Stress zur Folge haben (Vallance *et al*, 2001). Zwei bekannte Mediatoren hierfür sind ADMA und die leukozytäre Myeloperoxidase. ADMA ist ein potenter endogener Inhibitor der *de novo* NO Synthese, während die Myeloperoxidase bereits gebildetes NO inaktiviert.

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob diese beiden Mechanismen ausschließlich voneinander getrennt zu sehen sind oder ob sie sich vielmehr gegenseitig beeinflussen oder sogar bedingen: Aus der Frage, ob die reduzierte NO Bioverfügbarkeit durch MPO eine verminderte NO Synthese durch ADMA durch die Inaktivierung des redoxsensitiven ADMA abbauenden Enzyms DDAH vorantreibt, resultiert die erste zu testende Hypothese:

MPO induziert eine Akkumulation von ADMA.

Denkbar ist auch, dass ADMA durch die Verringerung der NO Synthese zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und somit zu einer verstärkten Ausschüttung von MPO führt, wodurch die Zellen verstärkt mit oxidativem Stress konfrontiert werden. Aus dieser Annahme ist die zweite zu testende Hypothese hervorgegangen:

ADMA induziert die Sezernierung von MPO.

Beide Hypothesen sollen in dieser Arbeit untersucht und in ihrer Gültigkeit überprüft werden, da NO eine bedeutende Größe in der kardiovaskulären Physiologie und Pharmakologie ist und somit die Aufklärung der Interaktionen verschiedener Mediatoren der Arteriosklerose eine enorme Relevanz für die Früherkennung und Therapie dieser Erkrankung besitzt.

2 MATERIAL

Für die durchgeführten Experimente werden die speziell für diese Versuche benötigten Substanzen und Puffer direkt im Methodenteil angefügt, im Folgenden sind zunächst die allgemeinen Puffer und Lösungen genannt, die für diese Arbeit verwendet werden.

2.1 ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN

Für Agarosegele

Herstellung eines 1 % Gels

1 g Agarose
5 ml 10x TBE
Ad 100 ml Aqua bidest.
15 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Die Agarose wird in dem hergestellten 1x TBE aufgeköcht, erst nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt ist wird das Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel kann gegossen werden.

Ladepuffer

130 mM Tris-HCl, pH 8,0
20 % Glyzerol
4,6 % SDS
0,02 % Bromphenolblau
2 % DTT

DNA Leitern

100 bp DNA *ladder*(Biolabs)
1 kb DNA *ladder* (Biolabs)

Für Western Blots

10x Laufpuffer

30,3 g Tris
144 g Glycin
10 g SDS
Ad 1000 ml Aqua bidest.

10x Blotpuffer	30,3 g	Tris
	144 g	Glyzin
	Ad 1000 ml Aqua bidest.	
	Zum Ansetzen von 1 l Puffer	
	100 ml	10x Puffer
	200 ml	Methanol
	Ad 1000 ml Aqua bidest.	
Waschpuffer TBST	1,21 g	Tris
	4 g	NaCl
	250 µl	Tween
	Ad 500 ml Aqua bidest.	
	pH Wert einstellen auf 7,6	
Waschpuffer PBSTT	8,765 g	NaCl
	2,850 g	Na ₂ HPO ₄
	0,550 g	NaH ₂ PO ₄
	500 µl	Tween
	3,0 ml	Triton-X-100
	Ad 1000 ml Aqua bidest.	
Blockierpuffer	Waschpuffer +	
	3 % Bovines Serum Albumin	
	oder	
	Waschpuffer +	
	1 % Hämoglobin	
3x Lämmli	188 µl	1 M Tris-HCl pH 6,8
	300 µl	20 % SDS
	300 µl	Glyzerol
	30 µl	1 % Bromphenolblau
	150 µl	β-Mercaptoethanol
	32 µl	Aqua bidest.
Proteinleitern	<i>Prestained protein ladder</i> PageRuler (Fermentas)	
	10 kDa <i>ladder</i> (Life Technologies)	

Für die Homogenisierung der Organe

Hg Puffer	0,121 g	Tris-HCl
	4,280 g	Saccharose
	0,057 g	EGTA
	0,292 g	EDTA
	Ad 50 ml Aqua bidest. pH 7,5	

Hg Lösung	10 ml Hg Puffer +
	100 µl Aprotinin
	35 µl Pepstatin
	10 µl Leupeptin
	50 µl 0,1 M PMSF
	10 µl 1 mM Cantharidin
	100 µl 1 % Triton-X100

2.2 ANTIKÖRPER

Primärantikörper

Für Western Blots	cGK1	(Abgent)
	sGC	(Cayman Chemical)
	VASP/P-VASP	(Immunoglobe)
	eNOS	(BD Biosciences)
	iNOS	(BD Biosciences)
	SLC7A1	(Abnova)

Für Immunfluoreszenz	DDAH 1	(Santa Cruz)
	MPO	(Calbiochem)
	ADMA	(Covalab)

Sekundärantikörper

Für Western Blots *Anti mouse/rabbit/goat* IgG, Konjugat HRP (Vector)

Für Immunfluoreszenz *Anti rabbit* IgG, Konjugat Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)
 Anti mouse IgG, Konjugat Alexa Fluor 594 (Molecular Probes)

2.3 PRIMER

Für die Genotypisierung der hDDAH 1 transgenen Mäuse:

Primer	Sequenz
hDDAH 1 forward	5`-ATG CAA CTT TAG ATG GCG GAG-3`
hDDAH 1 reverse	5`-TCA TCA GGC ACA GTG AGT TTG-3`
GAPDH forward	5`-GCA TCT GAG GGC CCA CTG AAG-3`
GAPDH reverse	5`-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3`

Für die realtime PCRs verwendete Genexpressionsassays (Applied Biosystems):

Gen	Assay
hDDAH 1	Hs00201707_m1
DDAH 1	Mm01319453_m1
DDAH 2	Mm00516768_m1
PRMT 3	Mm00659701_m1
PRMT 5	Mm00550466_m1
PRMT 1	Mm00480133_m1
PRMT 6	Mm00619134_m1
iNOS	Mm00440502_m1
eNOS	Mm01134916_m1
GAPDH	Mm03302249_g1

2.4 TIERMODELLE

hDDAH 1 transgene Maus (Jackson Laboratory, dort geführt unter dem Namen C57BL/6J-Tg(ACTB-DDAH1)1Jpck/J)

Die Mäuse haben einen C57BL/6J Hintergrund und tragen heterozygot das humane DDAH1 Gen, sie sind lebensfähig und fruchtbar ohne jegliche anatomische Anomalien. Zur Herstellung der Linie wurde humane DDAH 1 cDNA in einem modifizierten Aguti Expressionsvektor unter die Kontrolle des humanen ACTB β Aktin Promotors gestellt. Dieses Konstrukt wurde in befruchtete C57BL76J Eizellen injiziert, die Embryos wurden in die Ovidukte von scheinchwangeren Ammen transferiert. Die Expression des Transgens ist beschrieben für Aorta, Herz und Gehirn. Die transgene Aktivität der DDAH zeigt sich in

erniedrigten ADMA Konzentrationen im Plasma der Tiere. Die Aktivität der NO Synthase ist signifikant erhöht im Skelett- sowie Herzmuskel, die Tiere haben einen niedrigeren Blutdruck und eine höhere Herzfrequenz als die Wildtypen.

Die eigene Zucht wurde mit Tieren aus dem Universitätsklinikum Erlangen von Dr. Jacobi aufgebaut.

MPO knockout Maus (Jackson Laboratory, dort geführt unter dem Namen B6.129X1-Mpotm1Lus/J)

Zur Erzeugung der Myeloperoxidase knockout Maus wurde ein Inaktivierungsvektor konstruiert, um ein vorzeitiges Stopcodon innerhalb von Exon 7 des MPO Gens einzufügen. Dieser Inaktivierungsvektor wurde mittels Elektroporation in noch undifferenzierten von 129X1/SvJ-Mäusen abgeleitete RW4 embryonale Stammzellen eingebracht. Die korrekt rekombinierten Stammzellen wurden dann in Blastozysten eingebracht und in die Amme implantiert. Die sich davon ableitenden chimeren Mäuse wurde nach ihrer Geburt auf C57Bl/6J Hintergrund zurückgekreuzt. Durch weitere Kreuzung wurden homozygote Mäuse erzeugt bei denen alle Zellen den gewünschten knockout besaßen. Homozygote MPO knockout Mäuse besitzen eine normale Fertilität und zeigen eine regelrechte Entwicklung sowie keine auffälligen Abnormalitäten im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Produkte des MPO Gens, d.h. mRNA oder Protein, sind in den knockout Mäusen jedoch nicht detektierbar. Ihre neutrophilen Granulozyten und Monozyten besitzen dementsprechend keine endogene Peroxidaseaktivität, die Synthese von HOCl ist ergo nicht vorhanden. Die Superoxidkonzentrationen entsprechen dagegen denen von Wildtyp Mäusen.

3 METHODEN

3.1 VERSUCHE AM TIERMODELL

Für die Versuche am Mausmodell werden 10-14 Wochen alte weibliche Mäuse mit einem Körpergewicht von 25 g bis 30 g verwendet. Es werden folgende Tierstämme eingesetzt:

hDDAH 1 transgene Maus

MPO knockout Maus

C57BL/6J Maus

3.1.1 HALTUNG UND ZUCHT

Die Haltungsbedingungen der Versuchstiere sind ein wesentlicher Einflussfaktor für die Erzielung eines gültigen Versuchsergebnisses. Das gilt für die Aufzucht und die Zeit vor dem Versuch und ebenso für die Haltung während des Experiments. Die Haltung der Versuchstiere des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE) ist durch das Gesetz zum Europäischen Übereinkommen vom 18. März 1986 sowie die EU Richtlinien 86/609 EWG geregelt. Die Tiere sind in den Räumen der Versuchstierhaltung unter konstanten Bedingungen untergebracht. Die Haltung erfolgt tiergerecht bei einer Raumtemperatur von 25 °C und einem Hell Dunkel Zyklus von jeweils 12 Stunden. Die Ernährung besteht aus Trockenpellets (V1536-000 sniffR/M-H, Sniff) sowie Wasser *ad libitum*. Die tägliche Betreuung erfolgt durch das Fachpersonal der Versuchstierhaltung des UKE.

3.1.2 BEHANDLUNGEN

Eine Tierversuchsgenehmigung für die nachfolgend beschriebenen Experimente gemäß des § 7 TSchG sowie eine Ausnahmegenehmigung zur Durchführung durch die Promovendin liegen vor.

3.1.2.1 INTRAPERITONEALE INJEKTIONEN

LPS: Den Mäusen wird intraperitoneal (i.p.) 12,5 mg pro kg Körpergewicht LPS injiziert, den Kontrolltieren entsprechende Volumina NaCl. Die Mäuse werden dann nach einer Zeit

von maximal 24 Stunden durch eine ebenfalls intraperitoneale Gabe von Ketamin/Xylazin anästhesiert und nach Organentnahme durch zervikale Dislokation sakrifiziert.

¹⁵**N-Arginin:** Analog zu den LPS Injektionen werden 100 µl ¹⁵N-Argininlösung injiziert. Nach vier Stunden wird unter Isofluran Narkose die Blase punktiert und Urin entnommen, anschließend erfolgt ebenfalls die Sakrifizierung.

3.1.2.2 IMPLANTATION VON OSMOTISCHEN MINIPUMPEN

Zur kontinuierlichen Gabe von ADMA (250 µmol/kg/Tag) über einen Zeitraum von 28 Tagen werden osmotische Minipumpen der Firma Alzet vom Typ 2004 (Charles River) mit einem Befüllungsvolumen von 100 µl und einer Pumprate von 0,11 µl/h verwendet.



Abbildung 10:

Osmotische Minipumpe

Die Pumpen werden mit der ADMA Lösung entsprechend den Angaben des Herstellers befüllt und 24 Stunden vor der OP in physiologischer Kochsalzlösung bei 37°C zum Vorpumpen inkubiert. Nach erfolgter Narkotisierung des Tieres wird das Operationsfeld am Abdomen rasiert und desinfiziert. Nach einem kleinen Hautschnitt wird subkutan eine kleine Tasche gebildet, in die dann die Pumpe vorgeschoben wird. Der Hautschnitt wird mit Wundklammern (11x2mm, Braun) verschlossen. Das OP-Gebiet wird erneut desinfiziert, zur Analgesie wird noch unter Narkose subkutan Metamizol gegeben und für die nächsten zwei Tage nach der Operation dem Trinkwasser beigefügt. Die Wundheilung und der Sitz der Pumpe werden regelmäßig kontrolliert. Die Wundklammern fallen nach der Abheilung selbständig ab.

3.1.2.3 TELEMETRISCHE MESSUNGEN

Die Operationen sowie die Versuchsdurchführung erfolgt in den Laboren des Instituts für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie in Kooperation mit Herrn Professor



Abbildung 11:

Telemetriesender

Ehmke durch Frau Birgit Hirsch-Hoffmann. Zur radiotelemetrischen Messung von mittlerem arteriellen Blutdruck, Herzfrequenz und lokomotorischer Aktivität der Mausgruppen basal sowie nach LPS Injektion werden die

Transmitter (PhysioTel® PA Implants) vom Typ TA11PA-C20 genutzt. Die Tiere werden durch die intraperitoneale Gabe von Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (18 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und vom Hals bis zum Sternum rasiert, die Fläche wird mit Betaisodona Lösung desinfiziert. Die Maus wird zur Implantation des Katheters in Rückenlage auf einer auf 37°C temperierten Wärmeplatte fixiert um eine Auskühlung zu verhindern. Die Freipräparation der linken *A. carotis communis* wird unter stereomikroskopischer Aufsicht (LEICA MZ 75) durchgeführt. Die Arterie wird hinter einem angebrachten Haltefaden eröffnet und der Katheter wird implantiert und soweit vorgeschoben, bis die Spitze in den Aortenbogen hineinragt, dort wird er fixiert. Anschließend erfolgt die Platzierung des Telemetriesenders im Flankenbereich des Tieres, und der Verschluss der Wunde mit einer Einzelknopfnah (Mersilene 5-0, Ethicon).

Am siebten Tag postoperativ wird mit den Messungen begonnen, wobei zunächst vier Tage lang eine *baseline* ermittelt wird, dann erfolgt eine Injektion von LPS nach der die Tiere dann für weitere 24 Stunden beobachtet werden. Die Tiere bleiben dazu in ihren Käfigen, die Übertragung der radiotelemetrischen Daten erfolgt kontinuierlich über den implantierten Sender auf einen Computer. Die gemessenen Daten werden automatisch gespeichert und mit dem Programm Dataquest A.R.T. Data Analysis ausgewertet.

3.1.2.4 ORGANENTNAHME

Nach der Narkotisierung des Tieres durch die Gabe von Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (18mg/kg Körpergewicht) oder einer inhalativen Isoflurannarkose erfolgt zunächst eine Überprüfung des Schmerzreizes. Ist dieser völlig ausgeschaltet, wird das Tier zur Organentnahme in Rückenlage verbracht und fixiert. Es folgt die Eröffnung des Abdomens über die Medianlinie. Anschließend wird das Darmkonvolut ausgelagert und das Zwerchfell durchschnitten, die Blutentnahme erfolgt durch die Punktierung des Herzens. Das Blut wird umgehend heparinisiert und für 10 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Anschließend werden die Aorta, Nieren, Herz und Leber vorsichtig entnommen und bis zur Feinpräparation in physiologischer PBS Lösung bei 4°C aufbewahrt. Unter mikroskopischer Kontrolle erfolgt die vorsichtige Entfernung des

umgebenden Bindegewebes der Organe und die Spülung verbleibender Blutreste durch intravasale Applikation der PBS Lösung. Die präparierten Organe werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für Immunhistologische Analysen werden die Organe in *tissue-tek* (Sakura) gewebeschonend zunächst in Methylbutan und dann in flüssigem Stickstoff in Blöcken eingefroren.

3.1.3 DNA ANALYSEN

Da es sich bei der Linie der hDDAH 1 transgenen Maus um eine heterozygote Zucht handelt, muss vor Versuchsbeginn der Genotyp jeder Maus ermittelt werden. Hierzu werden den Tieren im Alter von sieben Tagen Schwanzbiopsien entnommen, aus denen dann die DNA isoliert und mit Hilfe einer PCR der Genotyp bestimmt werden kann.

3.1.3.1 ISOLIERUNG DER DNA AUS DEM GEWEBE

Die DNA Isolierungen werden mit dem DNeasy Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierfür werden ca. 20 mg Gewebeproben über Nacht bei 56°C in Lysepuffer inkubiert und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers weiterverarbeitet. Das Homogenat mit der DNA wird dann unter hohen Salzkonzentrationen an eine Membran aus Silikagel gebunden, durch mehrere Waschschrte von restlichen Protein-, Polysaccharid- und Salzanteilen befreit und anschließend mit einem Puffer geringen Salzgehaltes eluiert. Die Reinheit der erhaltenen DNA reicht für die erforderlichen PCRs zur Genotypisierung aus, so dass auf weitere Aufreinigungsschritte verzichtet werden kann.

3.1.3.2 GENOTYPISIERUNG

Mit der Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden selektiv bestimmte Abschnitte der DNA exponentiell amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide fungieren in dieser Reaktion als Startermoleküle. Der Abschnitt, den die Primer beidseitig flankieren, wird in jedem Zyklus der Reaktion verdoppelt. Ein Zyklus selbst besteht aus drei Schritten: Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C, dabei wird die DNA in Einzelstränge aufgespalten. Es folgt das Annealing der Primer an die DNA Einzelstränge bei einer primerspezifischen Temperatur. Der letzte Schritt ist die Extension des komplementären DNA Doppelstranges durch die DNA Polymerase. Den Zyklen wird eine

zusätzliche 15 minütige Denaturierungsphase vorangestellt, um sicherzustellen, dass die gesamte eingesetzte DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Am Ende der PCR wird eine 10 minütige Extensionsphase angehängt, damit alle PCR Produkte vervollständigt werden können.

Zur Genotypisierung der hDDAH 1 transgenen Mäuse bzw. ihrer nicht transgenen *littermates* wird eine PCR mit spezifischen Primern für die humane DDAH 1 durchgeführt, so dass nur bei den Tieren, die diese genetische Veränderung tragen, eine Bande von 300 bp erscheint. Zur Kontrolle wird mit allen Proben zusätzlich eine PCR mit murinen GAPDH Primern durchgeführt, GAPDH ist ein typisches Haushaltsgen und deshalb wird bei allen Proben ein Amplifikat von ca. 200 bp erstellt.

Die PCRs werden in einem 30 µl Ansatz durchgeführt, verwendet wird der Hot Star Taq Mastermix (Qiagen). Die Primer werden mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 50 pmol/µl eingestellt.

PCR Ansatz:

Hot Star Taq Mastermix 2x	15 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
DNA	1 µl
Ad 30 µl Aqua bidest	12 µl

Das verwendete PCR Programm für beide Primerpaare:

95°C für 15 min	} 36 Zyklen
94°C für 1 min	
56°C für 1 min	
72°C für 1 min	
72°C für 10 min	
4°C ∞	

Nach erfolgter PCR werden die Proben mit Ladepuffer (Fermentas) versetzt und mit einer 100 bp DNA Leiter (Biolabs) auf ein Agarosegel aufgetragen und bei 120 V für 30 min in Horizontalgelkammern mit einem Gelvolumen von 30 ml mit TBE als Laufpuffer angestellt. Zur Herstellung des Geles werden 1 % Agarose mit 1x TBE Puffer in der Mikrowelle kurz aufgeköcht, nach Abkühlen auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid versetzt und das Gel gegossen. Das Ethidiumbromid dient dabei dem späteren Sichtbarmachen der Banden, da

es in die DNA interkaliert und unter UV Licht fluoresziert. Die Detektion der Banden erfolgt dann mittels UV Durchlichtapparat, die Dokumentation mit dem Programm BioDocAnalyse von Biometra.



Abbildung 12: **Darstellung eines typischen Bandenmusters auf einem Agarosegel.** Gezeigt sind die PCR Produkte der humanen DDAH 1 Primer (A) sowie die GAPDH Kontroll PCRs (B). Von den getesteten 18 Tieren liefern 10 eine Bande mit den DDAH 1 Primern, diese Tiere werden somit als transgen eingestuft. Die verbleibenden 8 anderen werden als Wildtypen verwendet.

Da GAPDH in allen Proben vorhanden sein sollte dient dieses PCR Produkt lediglich als Kontrolle dafür, dass in allen Proben DNA isoliert werden konnte. Bei den hDDAH 1 PCR Ansätzen zeigt sich bei etwa 50 % aller Proben eine Bande, diese Tiere sind somit Träger des humanen DDAH 1 Gens. Bei den Proben, die keine Bande liefern, ist diese Insertion nicht erfolgt und somit handelt es sich bei diesen Tieren um Wildtypen.

3.1.4 PROTEINANALYSEN

Die Quantifizierung der exprimierten Proteine erfolgt über das Western Blot Verfahren. Hierbei wird zunächst ein Homogenat aus dem zu untersuchenden Gewebe hergestellt, die enthaltenen Proteine werden in einer SDS PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Anschließend werden die Proteine über eine Immundetektion visualisiert, dabei macht man sich das Antigen Antikörper Bindungs Prinzip zunutze: Ein antigenspezifischer Primärantikörper bindet an sein Epitop auf dem Antigen in der aufgetrennten Proteinsuspension. An die Fc Region des primären Antikörpers bindet wiederum ein sekundärer, markierter Antikörper, über den dann die Detektion erfolgt.

3.1.4.1 GEWEBEPRÄPARATION UND HOMOGENISIERUNG

Nach der Entnahme werden die einzelnen Organe (Aorta, Leber, Niere) in PBS Puffer sofort auf Eis gekühlt und unter einer Lupe vom umgebenden Bindegewebe und Fett befreit. Es folgt die Homogenisierung des Gewebes in Hg Lösung im Tissue Lyser, hierbei werden 20-30 mg mit RLT Puffer und einer Stahlkugel für 2 min bei 30 Hz geschüttelt.

Handelt es sich bei den zu untersuchenden Proben um Zellen wie etwa isolierte neutrophile Granulozyten, so entfällt dieser erste Schritt, stattdessen werden die Zellen bis zur Lyse sonifiziert. Anschließend werden die unlöslichen Bestandteile des Homogenats bzw. der Zellsuspension für 5 min bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Bis auf ein Aliquot für die Proteinbestimmung wird der Überstand mit Lämmli versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert.

3.1.4.2 QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die quantitative Analyse der Homogenate erfolgt nach der Bradford Methode, die auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Polypeptide (MG > 3000) unter sauren Bedingungen basiert. Sie ist mit einer Verschiebung der Wellenlänge von 465 nm nach 595 nm verbunden. Da der Farbwechsel nicht linear verläuft, muss bei jeder Bestimmung eine Standardkurve angefertigt werden.

Als Standard wird BSA in Konzentrationen von 0 bis 10 µg in Aqua bidest. verwendet. Die Proben werden in Abhängigkeit von der zu erwartenden Proteinkonzentration eingesetzt und mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 0,8 ml ergänzt. Unter Zusatz von 200 µl Bradford Reagenz wird die Extinktion der Standardreihe bzw. der Proben nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Messung der Proben erfolgt in Duplikat.

BSA Standardreihe:

Aqua bidest	BSA Lösung 0,1 µg/µl	BioRad Bradford Reagenz	Enthaltene Menge Protein
800 µl	0 µl	200 µl	0 µg
795 µl	5 µl	200 µl	0,5 µg
790 µl	10 µl	200 µl	1 µg
780 µl	20 µl	200 µl	2 µg
760 µl	40 µl	200 µl	4 µg
740 µl	60 µl	200 µl	6 µg
720 µl	80 µl	200 µl	8 µg
700 µl	100 µl	200 µl	10 µg

Vorbereitung der Proben:

Aqua bidest	BioRad Bradford Reagenz	Probe
800 μ l – x μ l	200 μ l	x μ l

3.1.4.3 SDS PAGE UND BLOTTEN AUF EINE NITROZELLULOSEMEMBRAN

Je nach Größe des zu detektierenden Proteins werden 7,5 %-15 %ige Poliacrylamidgele der Firma Lonza verwendet, da kleine Proteine leichter durch das Gel wandern, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer sind. Es werden neben den Protein Größenstandards 10 μ g der denaturierten Proteinlösung auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei konstant 120 V für 45 min durchgeführt.

Die aufgetrennten Proteine werden anschließend mit dem Wetblot System (BIO-RAD) für 120 min auf eine Nitrozellulosemembran geblottet, es wird ein senkrecht zum Polyacrylamid Gel gerichtetes elektrisches Feld mit 200 mA angelegt, so dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern. Zur anschließenden Kontrolle des Transfers wird die Membran für 1 min mit Ponceau-S (Sigma) gefärbt und der Größenstandard markiert.

3.1.4.4 IMMUNREAKTIONEN

Nach dem Transfer der Proteine werden zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert, da sich sonst der Antikörper an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würde. Das Blockieren erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur mit einem für den Antikörper nicht erkennbaren Protein, verwendet wird hier abhängig vom verwendeten Antikörper BSA (bovines Serum Albumin) oder Hämoglobin. Anschließend wird die Membran für 2h bei Raumtemperatur mit dem in der Blockierlösung verdünnten Primäantikörper inkubiert. Es folgen 5 Waschschriffe von je 5 min mit einem für jeden Antikörper unterschiedlichen Waschpuffer, hierbei werden schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Die Sekundäantikörperlösung wird dann für 1,5 h auf die Membran gegeben, dieser Antikörper ist spezifisch gegen die Fc Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet und bindet an diesen. Es folgen erneut die Waschschriffe. Der sekundäre Antikörper ist mit dem Enzym HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt. Die HRP katalysiert die Umsetzung von

Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz dann auf einem Film detektiert wird. Verwendet werden sowohl ECL (*enhanced chemiluminescence*) als auch das sensitivere Femto.

3.1.4.5 STRIPPING DER NITROZELLULOSE MEMBRANEN

Da von den meisten Proben nur wenig Protein vorhanden ist, werden die Membranen mehrfach verwendet. Dazu müssen zunächst die Antikörper vom vorherigen Western Blot von der Membran entfernt werden, um ein erneutes Binden der neuen Antikörper zu ermöglichen. Die Membran wird zweimal für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,2M Glycin (pH 2,5) gewaschen und anschließend ebenfalls zweimal für 20 Minuten mit 50mM Tris (pH 7,5). Nach diesem Procedere kann die Membran entweder direkt für die nächste Immunreaktion verwendet werden oder auch durch Trocknung für mehrere Monate konserviert werden.

3.1.5 RNA ANALYSEN

Zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden zellulären Prozesse und Mechanismen ist es essentiell, die Gen Expressionsprofile der unterschiedlichen Gruppen zu analysieren. Aus diesem Grunde wird im Folgenden die Menge an synthetisierter RNA in Leber und Niere mittels realtime PCR ermittelt. Das dem realtime Verfahren zugrunde liegende Prinzip ist die kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals, das während der PCR proportional mit der Menge des Amplifikationsproduktes ansteigt. Verwendet werden Gen Expressionassays von Applied Biosystems, diese Primer sind sequenzspezifisch und komplementär zur Ziel DNA aufgebaut und ermöglichen so eine exakte Quantifizierung der cDNA des gewählten Transkripts. Als interne Kontrolle dient das Haushaltsgen GAPDH.

3.1.5.1 ISOLIERUNG DER RNA AUS DEM GEWEBE

Zur Gewinnung der Gesamt RNA wird das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Es werden 20-30 mg des Gewebes im Tissue Lyser (Qiagen) mit RLT Puffer für 2 min bei 30 Hz homogenisiert, anschließend wird das Lysat kurz abzentrifugiert und der Überstand auf die im Kit enthaltene Säule gegeben. Die RNA wird an eine Membran aus Silikagel gebunden, gewaschen und mit H₂O eluiert. Auf diese Weise können alle RNA Moleküle,

die länger als 200 Nukleotide sind, isoliert werden. Kleinere RNAs werden unter den genannten Bedingungen nicht quantitativ gebunden, da diese ca. 20 % der Gesamt RNA einer Zelle ausmachen, werden die anderen RNAs auf diese Weise gleichzeitig angereichert.

Die Kontrolle der Qualität der RNA erfolgt durch die Ermittlung der Quotienten 260 nm/280 nm sowie 260 nm/230 nm im Photometer. Akzeptiert werden für beide Quotienten Werte im Bereich von 1,8-2,2.

3.1.5.2 REVERSE TRANSKRIPTION

Dient mRNA oder Gesamt RNA als Ausgangsmaterial für die PCR, so muss vor der eigentlichen PCR eine reverse Transkription durchgeführt werden. Die Reaktion wird mit der RNA abhängigen DNA Polymerase reverse Transkriptase durchgeführt, wobei als Produkt eine zur eingesetzten RNA Matrize komplementäre Einzelstrang DNA gebildet wird. Diese cDNA wird dann in der nachfolgenden PCR zur Doppelstrang DNA ergänzt. Bei der reversen Transkription werden zuerst Oligo-(dT)-Primer an die Poly-(A)-Überhänge der mRNA angeheftet und so die gesamte cDNA synthetisiert. Erst in einer anschließenden PCR erfolgt die Anlagerung der für den gesuchten Genabschnitt spezifischen Primer an die cDNA.

Die Synthese der cDNA erfolgt mit dem *High-capacity cDNA archive Kit* (Applied Biosystems). Für die Synthesen werden je 1 µg RNA eingesetzt. Die Kontrolle der Qualität der cDNA wird durch eine PCR mit GAPDH Primern durchgeführt, die Ansätze werden bei folgenden Temperaturen und Zeiten inkubiert:

- 25°C; 10 Minuten
- 37°C; 2 Stunden
- Kühlung auf 4°C

Die Größe und Menge des Amplifikats wird auf einem Agarosegel überprüft,



Abbildung 13: **Typisches Agarosegel zur Kontrolle der cDNA Synthese.** In allen PCR Reaktionen wird eine vergleichbare Menge des GAPDH Gens amplifiziert, daraus wird geschlossen, dass die RNA Isolierung sowie die cDNA Synthese erfolgreich gewesen ist und das Amplifikat für die weiteren Versuche eingesetzt werden kann.

Nach der Reaktion werden 150 µl nukleasefreies H₂O in den Ansatz pipettiert, dieser aliquotiert und die Aliquots bis zur Verwendung in einer realtime PCR bei -20°C gelagert. Als Vorlage für einen PCR Ansatz werden 11 µl dieser verdünnten cDNA eingesetzt.

3.1.5.3 REALTIME PCR

Die eigentliche realtime PCR wird im Applied Biosystems realtime PCR System nach dem Taqman Prinzip durchgeführt: Ein Reporter Fluorophor (Donor, verwendet wird 6-FAM-phosphoramidit = FAM), das durch eine Lichtquelle angeregt wird, gibt einen Teil seiner Energie an einen in ausreichender Nähe befindlichen *Quencher* (Akzeptor) ab. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Diese Methode ist aufwendig und vergleichsweise teuer, bietet aber die Vorteile der hohen Spezifität des Assays. Verwendet werden der Taqman Fast Universal PCR Master Mix und das entsprechende Fast System.

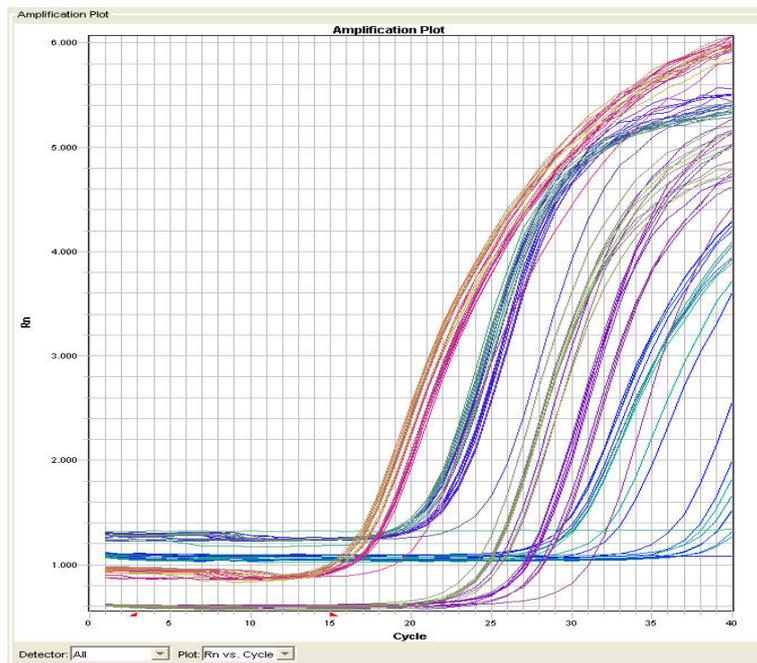


Abbildung 14: **Ergebnis einer typischen realtime PCR.** Je nach Menge an RNA, die im Organismus vorhanden war, erreichen die Amplifikate der cDNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten den Schwellenwert, den sogenannten CT Wert.

Die Auswertung erfolgt durch eine relative Quantifizierung, der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode: Die unterschiedliche Expression wird hier als x fache Expression angegeben. Für die Normalisierung werden die CT Werte der GAPDH Kontrolle herangezogen, die CT Werte werden hierbei einfach voneinander abgezogen (delta CT). Dann werden die beiden delta-CT Werte der einzelnen Gruppen (z.B. Wildtyp/MPO knockout, basal/ nach LPS Gabe) voneinander abgezogen (delta delta CT-Wert) und in die Gleichung x fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) = $2^{-\text{delta-delta-CT}}$ eingesetzt.

3.2 VERSUCHE AN HUVECS IN DER ZELLKULTUR

3.2.1 KULTIVIERUNG VON HUVECS

Die Kultivierung der Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells* = HUVECs) erfolgt bis zur Konfluenz in 75 cm² Zellkulturflaschen in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98 %. Die Kultivierung der HUVECs erfolgt in Endothelial Cell Growth Medium, dem 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt werden. Ein Mediumwechsel wird im Abstand von 2 Tagen vorgenommen. Der konfluente Monolayer zeigt im Phasenkontrast Mikroskop das für Endothelzellen typische Bild polygonaler, pflastersteinartiger Zellen. Nach erreichter Konfluenz wird das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen in 4 ml PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 2 ml 0,05 % Trypsin/EDTA für 3 min im Brutschrank trypsinisiert. Durch Zugabe von 1 ml Kälberserum in Kulturmedium wird die Trypsinreaktion gestoppt, die Zellen in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert (1000 rpm, 3 min). Das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert und auf neue, mit 1 % Gelantinelösung beschichtete Kulturgefäße ausgesät. Einige Tage vor Versuchsbeginn werden die Zellen dann in *chamber slides* überführt und dort kultiviert, bis erneut ein dichter Zellrasen entstanden ist.

3.2.2 IMMUNFLUORESZENZ

Mit den folgenden Versuchen soll die intrazelluläre Lokalisation der Enzyme DDAH 1 und MPO in HUVECs untersucht werden. Da diese Zellen *per se* kein MPO enthalten, werden sie vorher mit 5 µg/ml MPO inkubiert.

Die Zellen auf den *chamber slides* werden für 1 h mit der MPO in Medium bei 37°C inkubiert und danach kurz mit PBS Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 3 % Formaldehyd in PBS für 45 min fixiert und dreimal fünf min gewaschen. Zum Permeabilisieren des Gewebes erfolgt eine Inkubation mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 20 min. Unspezifische Bindungsstellen werden durch das Blocken für 2 h mit 10 % Ziegen Serum/0,1 % Triton in PBS abgesättigt. Es folgt eine Inkubation bei 4°C über Nacht mit 1:100 Verdünnungen der Primärantikörper gegen DDAH 1 und MPO, dies wird dadurch ermöglicht, dass die Antikörper in verschiedenen Spezies hergestellt werden und somit über verschiedene Sekundärantikörper detektiert werden. Die *slides* werden erneut gewaschen und dann für 2 h mit den Alexa Fluor Sekundärantikörpern im Blockmedium inkubiert, es ist wichtig dass die folgenden Schritte in Dunkelheit durchgeführt werden, da sonst das Fluoreszenzsignal stark abnimmt. Nach einem weiteren Waschschriff werden die Zellkerne mit DAPI angefärbt, wobei 1 µg DAPI (1 mg/ml)/ ml PBS eingesetzt wird. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wird erneut gewaschen, die Kammern der slides werden entfernt und das DakoCytomation Faramount *Aequous Mounting Fluid* auf den Objektträger gegeben. Zum Schluss wird ein Deckglas aufgelegt und nach einer Trocknungszeit von etwa 30 min werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Bilder werden an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica) mit einer CCD Kamera von Retiga (1300 QImaging) gemacht, die Nachbearbeitung der Bilder erfolgt mittels Photoshop.

3.3 VERSUCHE MIT NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Im Folgenden soll geklärt werden, ob ADMA in der Lage ist, eine Aktivierung und damit eine MPO Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten zu induzieren. Als Positivkontrolle dient die chemoattraktive Substanz formyl-Methyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP). Als

Negativkontrolle werden einerseits unstimulierte Zellen verwendet, um aber einen reinen Proteineffekt als Auslöser für die Aktivierung auszuschließen wird ebenfalls das ADMA Isomer SDMA verwendet. Als Nachweis für eine Aktivierung der Zellen werden unterschiedliche Methoden verwendet, die entweder eine generelle Superoxidfreisetzung dokumentieren (Cytochrom C Assay), die spezifische Aktivität der Myeloperoxidase nachweisen (TMB Assay) oder die Proteinmenge an MPO in der Probe messen (MPO ELISA). Die neutrophilen Granulozyten werden isoliert wie beschrieben. Die Zellzahl wird in Neubauer Zählkammern bestimmt.

3.3.1 ISOLIERUNG VON HUMANEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Gesunden Probanden werden 50 ml Blut entnommen, dieses wird umgehend heparinisiert und im gleichen Volumen Dextranlösung (45 mg/ml in Natriumchlorid) aufgenommen. Nach einer Sedimentationszeit von 45 Minuten bei Raumtemperatur wird der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 15 ml Histopaque 1077 unterschichtet. Es erfolgt eine Zentrifugation für 30 min bei 600 U/min. Zur hypotonen Lyse der noch vorhandenen kontaminierenden Erythrozyten wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml sterilem Aqua bidest resuspendiert. Nach 10 s werden 45 ml 0,9% NaCl Lösung zugegeben um wieder isotone Bedingungen herzustellen. Es folgt eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 400 U/min. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet in sterilfiltriertem HBSS mit 0,25% BSA resuspendiert. Bis zum Versuchsbeginn werden die Zellen auf Eis gelagert.

3.3.2 INKUBATION DER ISOLIERTEN ZELLEN

Pro Ansatz werden je zwei Millionen Granulozyten in 1 ml HBSS/0,25% BSA aufgenommen und mit den entsprechenden Stimulanzen (ADMA, SDMA, fMLP) versetzt fMLP ist ein typischer Vertreter der Gruppe der Formylpeptide. Dies sind starke bekannte Stimuli für eine Aktivierung der PMN, Di-, Tri- und Tetrapeptide bakterieller Herkunft. Sie werden *in vivo* oder nach Lyse eines Bakteriums freigesetzt. fMLP spielt in Entzündungsprozessen eine Schlüsselkomponente im Anlocken von PMN. ADMA sowie SDMA als Testsubstanzen werden mit einer Endkonzentration von 100 µM verwendet, fMLP mit 10 µM. Es folgt eine

Inkubation im Thermomixer (Eppendorf) für 30 min bei 37°C und leichtem Schütteln. Im Anschluss werden die Zellen bei 800 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand wird für die anschließenden Versuche verwendet.

3.3.3 BESTIMMUNG DER FREIGESETZTEN MPO KONZENTRATION

Mit Hilfe eines MPO ELISAs (Assay Designs) lassen sich die sehr geringen Konzentrationen an MPO im Überstand nachweisen. Diese Methode bedient sich eines aus zwei Antikörpern (Primär- und Sekundärantikörper) bestehenden, hochsensiblen Detektionssystems. Der Primärantikörper bindet an die Myeloperoxidase, im folgenden Schritt der Sekundärantikörper an den primären. An den Sekundärantikörper ist eine Peroxidase gekoppelt, welche nach der Zugabe von Farbstoffsubstrat die optische Dichte des umgesetzten Substrates in einem ELISA Reader messbar macht. Dabei wird das Protokoll gemäß den Herstellerangaben verwendet: Die Proben werden 1:4 in Probenverdünner verdünnt, nach dem Pipettieren der Standardreihe werden je 100 µl der verdünnten Probe aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wird drei mal mit Waschpuffer gewaschen, anschließend wird eine Stunde mit dem *tracer* inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift folgt die Inkubation mit dem Peroxidase Konjugat für eine Stunde. Wieder folgt ein Waschschrift, anschließend werden die TMB Substrate hinzugefügt und die Reaktion wird nach 20 min im Dunklen durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die Messung erfolgt im ELISA Reader bei 450 nm.

3.3.4 BESTIMMUNG DER FREIGESETZTEN ELASTASE MENGE

Elastase ist eine Serin Protease und Bestandteil der azurophilen Granula im Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten. Dieses Enzym hydrolysiert nach seiner Freisetzung aus den Granula unspezifisch eine Vielzahl von Proteinen in den Lysosomen der Granulozyten ebenso wie Proteine der extrazellulären Matrix. Für den folgenden Versuch ist jedoch nicht die Enzymaktivität entscheidend, sondern der Nachweis von Elastase im Überstand wird als zusätzlicher Beweis für die erfolgte Degranulierung der PMN gewertet, somit fungiert MPO nicht gleichzeitig als Testgröße und Messparameter.

Der Nachweis erfolgt mit Hilfe eines Elastase ELISAs (*human PMN Elastase EIA*, ALPCO Diagnostics). Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers: Die Überstände werden zunächst 1:100 verdünnt und die Standardreihe wird pipettiert. Es werden 100 μl der verdünnten Proben in die wells gegeben, die anschließende Inkubation wird bei 200 rpm für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach vier Waschschrritten werden 150 μl des HRP Konjugates in die wells pipettiert und es folgt ein erneuter Inkubations- sowie Waschschrtritt analog den ersten. Es werden anschließend 200 μl der TMB Substratlösung in die wells gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Reaktion wird dann durch Zugabe von 50 μl Stopplösung beendet. Die photometrische Messung erfolgt bei 450 nm.

3.3.5 BESTIMMUNG DER SUPEROXIDFREISETZUNG

Die Superoxidfreisetzung der neutrophilen Granulozyten wird mit einem Superoxid Dismutase (SOD) inhibiertem Cytochrom C Assay gemessen. Hierbei wird das Cytochrom C durch die in den Proben vorhandenen Superoxide reduziert, was zu einer geänderten Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm führt. Durch Zugabe von Superoxid Dismutase lässt sich diese Reaktion hemmen, da dieses Enzym die Reaktion von zwei Superoxidradikalen mit zwei Protonen zu Wasserstoffperoxid katalysiert. Dies kann ebenfalls durch eine Extinktionsmessung dargestellt und so quantifiziert werden. Die Messung wird durch die Zugabe von Cytochrom C (5 μl , 100 μM) gestartet, bei den inhibierten Proben wird zeitgleich die SOD (50 μl , 300 U/ml) zugegeben. Die Menge an freigesetzten Superoxiden wird ermittelt durch Bildung des $\Delta A/\text{min}$ der Probe - $\Delta A/\text{min}$ der inhibierten Probe.

3.3.6 BESTIMMUNG DER MPO AKTIVITÄT

Die MPO als Peroxidase ist in der Lage verschiedene Substrate zu oxidieren. Bei dem verwendeten Assay nutzt man diese Tatsache, um das Substrat (3,3,5,5 Tetramethylbenzidine = TMB) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu oxidieren, das dann seine Absorption bei 655 nm ändert. Die Menge an oxidiertem Substrat ist somit der

Enzymaktivität proportional. Durch Bildung des $\Delta A/\text{min}$ ($A_{1 \text{ min}} - A_{0 \text{ min}}$) der Absorption bei 655 nm kann so die MPO Aktivität bestimmt werden.

Die Proben werden im Puffer (80 mM NaH_2PO_4 pH 5,5) aufgenommen, wobei 930 μl Puffer abzüglich des Probenvolumens eingesetzt werden. Nach der Zugabe von 60 μl TMB Lösung (4,8 mg/ml Dimethylformamid) wird die Reaktion mit 10 μl H_2O_2 Lösung (10 mM in Aqua bidest) gestartet und die OD (optische Dichte) bei 655 nm im Photometer gemessen.

3.3.7 BESTIMMUNG DER NOS AKTIVITÄT

Die Zellen werden für 30 min bei 37°C mit 100 μM ADMA bzw. SDMA in HBSS vorinkubiert, um somit in die Zellen aufgenommen zu werden. Um noch in der Lösung befindliches ADMA und SDMA abzuwaschen, werden die Zellen dann kurz bei 800 rpm zentrifugiert, der Puffer ausgetauscht. Anschließend werden die Zellen sonifiziert und mit Proteaseinhibitoren versetzt, um die enthaltenen Enzyme aktiv zu belassen. Zur Bestimmung der Aktivität der in den PMN exprimierten nNOS und iNOS wird isotopenmarkiertes ^{15}N Arginin eingesetzt. Hiervon werden 100 μM auf die Zellen gegeben, es wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der NOS Aktivität erfolgt in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des UKE durch Herrn Dr. Schwedhelm. Hierfür wird eine GC MS (*gas chromatography mass spectrometry*) Methode verwendet (Böger *et al*, 2004). Die Trennung der Analyten Nitrat und Nitrit erfolgt mit dem Gas Chromatographen und die anschließende Quantifizierung mit dem Massenspektrometer. Hierfür wird mit ^{15}N markiertes Arginin verwendet, welches durch die NOS in der Probe bzw. bei den *in vivo* Versuchen im Organismus zu ^{15}N markiertem NO metabolisiert wird. Dieses wird wiederum zu Nitrit und dann zu Nitrat oxidiert. Nitrat und Nitrit werden mit PFB Bromid derivatisiert und anschließend mit GC MS gemessen.

3.3.8 ADHÄSION VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN AN HUVECS

Die Adhäsion der PMN an das Endothel ist die Voraussetzung für die nachfolgende transendotheliale Migration der Zellen. Aktivierende Stimuli führen auf den Leukozyten zu einer Erhöhung von funktionellem, d.h. bindungsfähigem CD11b/CD18 mit einer entsprechenden Affinitätssteigerung. Auf Endothelzellen führen diese Stimuli zu einer erhöhten Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen wie z.B. dem ICAM 1, welches als Ligand für leukozytäres CD11b/CD18 fungiert. Diese phänotypischen Veränderungen der Zellen gehen einher mit einer Verringerung der Rollgeschwindigkeit der PMN und führen zur festen Adhäsion der Zellen an das Endothel.

Im folgenden Versuch werden nun isolierte PMN mit den zu testenden Substanzen SDMA und ADMA vorinkubiert und anschließend auf HUVECs überführt. Damit soll geprüft werden, ob ADMA in der Lage ist, eine Adhäsion der PMN auf den HUVECs zu induzieren. Hierzu werden die PMN wie beschrieben isoliert und jeweils eine Million PMN für 20 min bei 30°C mit 20mM Calcein AM (AM = Acetoxylester) inkubiert. Calcein AM wird durch die Zellmembran hindurch in lebende Zellen transportiert. In der Zelle wird die Acetoxymethylgruppe unspezifisch durch Esterasen abgespalten und in Calcein umgewandelt. Dieses ist dann in der Lage, Kalziumionen innerhalb der Zelle zu binden, was in einer starken, grünen Fluoreszenz resultiert. Diese Fluoreszenz erlaubt eine kurzzeitige Markierung der PMN, von denen anschließend 100.000 Zellen mit 100 µM SDMA oder ADMA bzw. nur HBSS Puffer als Negativkontrolle auf eine 96 well Platte mit HUVECs gegeben werden. Es folgt eine Inkubation von 20 min bei 30°C, dann werden die wells je einmal mit HBSS Puffer gewaschen, um die nicht gebundenen PMN abzuwaschen. Die Messung der Fluoreszenz der nun an die HUVECs gebundenen PMN erfolgt im Luminometer (Berthold).

3.4 BESTIMMUNG VON ADMA, SDMA UND DDAH AKTIVITÄT

Die Bestimmung von ADMA und SDMA erfolgt in der Klinischen Pharmakologie des UKE durch Dr. Schwedhelm nach der von ihm beschriebenen Methode (Schwedhelm et al. 2005). Verwendet wird ein LC MS/MS System (*liquid chromatography tandem mass*

spectrometry). Die LC MS/MS stellt eine Kopplung aus Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie dar, wobei die Chromatographie der Auftrennung und die Massenspektrometrie der Identifikation und Quantifizierung der Substanzen dient. Zur Quantifizierung von ADMA und SDMA wird stabil isotoopenmarkiertes [²H₆]-ADMA als interner Standard verwendet. Je 25 µl der Proben werden mit 100 µl methanolischem internen Standard versetzt. Die in den Proben vorhandenen Proteine werden durch zugegebene Methanol präzipitiert und der Überstand zur Trockene eingeengt. Es folgt die Derivatisierung des getrockneten Überstands durch Zugabe von 100 µl butanolischer HCl für 17 min bei 65°C mit anschließender Trocknung. Nach erfolgter Resuspendierung in 100 µl Aqua bidest. werden 10 µl in die LC MS/MS injiziert.

Für die Messung der DDAH Aktivität wird ebenfalls das mit Deuterium markierte ADMA verwendet (Maas *et al*, 2007). Die zu untersuchende Probe wird dann für 0 und 30 min mit dem markierten ADMA inkubiert, so dass die enthaltene DDAH dessen Degradierung bewirkt. Dieser ADMA Abbau wird in der LC MS/MS gemessen und somit kann die Aktivität der in der Probe enthaltenen DDAH bestimmt werden. Die Vorbereitung der Proben erfolgt wie oben beschrieben, jedoch wird als interner Standard ein mit ¹⁴C markiertes ADMA verwendet.

3.5 STATISTIK

Alle Daten werden als arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wird mit Hilfe des Student'schen t-Test ermittelt. Die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erster Art wird mit $\alpha = 0,05$ angenommen, das Signifikanzniveau wird dementsprechend mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ festgelegt.

3.6 LEGENDE

Farbwahl: Zur besseren Übersicht werden in dieser Arbeit bestimmte Gruppen einheitlichen Farben zugeordnet:

-  hDDAH 1 transgene Maus
-  MPO knockout Maus
-  Wildtyp Maus
-  Probe behandelt mit ADMA
-  ± Kontrolle

Signifikanz: Ist $p < 0,05$, so wird ein signifikanter Unterschied zwischen den angegebenen Gruppen angenommen, dies wird in den Grafiken mit * gekennzeichnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 CHARAKTERISIERUNG DER DDAH 1 TRANSGENEN MAUS

Die hDDAH 1 transgene Maus wurde erstmals 2003 beschrieben (Dayoub *et al*, 2003). Erste Untersuchungen des neuen Modells ergaben, dass phänotypisch keine Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und den Wildtypnachkommen erkennbar waren. Die Verteilung der Nachkommen folgten den Mendel'schen Gesetzen und auch genaue histomorphometrische Messungen an Herz und Aorta beider Gruppen konnten keine Unterschiede feststellen. Nähere biochemische Analysen zeigten jedoch, dass es physiologisch hochrelevante Abweichungen bei den transgenen Mäusen gab: ADMA Plasma Konzentrationen waren reduziert, wobei die SDMA Konzentrationen identisch waren. Da DDAH nur ADMA, nicht aber SDMA metabolisiert konnte folgerichtig ebenfalls gezeigt werden, dass die DDAH Aktivität in diesen Tieren erhöht war. Es wurden weiter starke Unterschiede in der Menge an Nitrat / Nitrit im Urin gefunden, dies reflektiert die verstärkte Produktion von NO. Untersuchungen am Skelettmuskel bestätigten diesen Befund, auch hier war eine signifikant höhere NOS Aktivität bei gleicher Proteinexpression zu sehen.

Diese Daten offenbaren, dass auch moderate Änderungen der ADMA Konzentrationen weitreichende Konsequenzen für das Zusammenspiel einzelner Organe im Gesamtorganismus haben. Um im Verlauf der vorliegenden Arbeit schlüssige Aussagen treffen zu können, erfolgte zunächst eine weiterführende Charakterisierung der DDAH 1 transgenen Maus. Daher sind im Folgenden die Ergebnisse der Untersuchungen der beteiligten Enzyme auf der Ebene der Genexpression, der Proteinebene, des NO Signalwegs sowie deren Konsequenzen auf die ADMA Konzentrationen dargestellt.

4.1.1 EXPRESSION DES HUMANEN TRANSGENS UND DEN MURINEN DDAH 1 UND 2

Leber und Niere sind die Hauptorgane des ADMA Metabolismus, was zu einem Gradienten zwischen Blutkreislauf und diesen Organen führt (Nijveldt *et al*, 2003). DDAH 1 wird hier besonders stark exprimiert und es wurde eine Kolo-kalisation mit allen Isoformen der NOS beschrieben (Tojo *et al*, 2000). Im Folgenden wird daher hauptsächlich mit diesen Organen gearbeitet. Zunächst wurde mittels realtime PCRs untersucht, ob es in Leber- und Nierengewebe nicht nur endogene murine DDAH Aktivität, sondern als Unterschied in den transgenen Tieren zusätzlich eine Expression der humanen Form der DDAH gibt.

Gen	Organ	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
hDDAH 1	Leber	WT	2,14	1,68	5
		DDAH +/T	353,24	29,79	5
	Niere	WT	1,75	1,48	5
		DDAH +/T	912,05	72,64	5

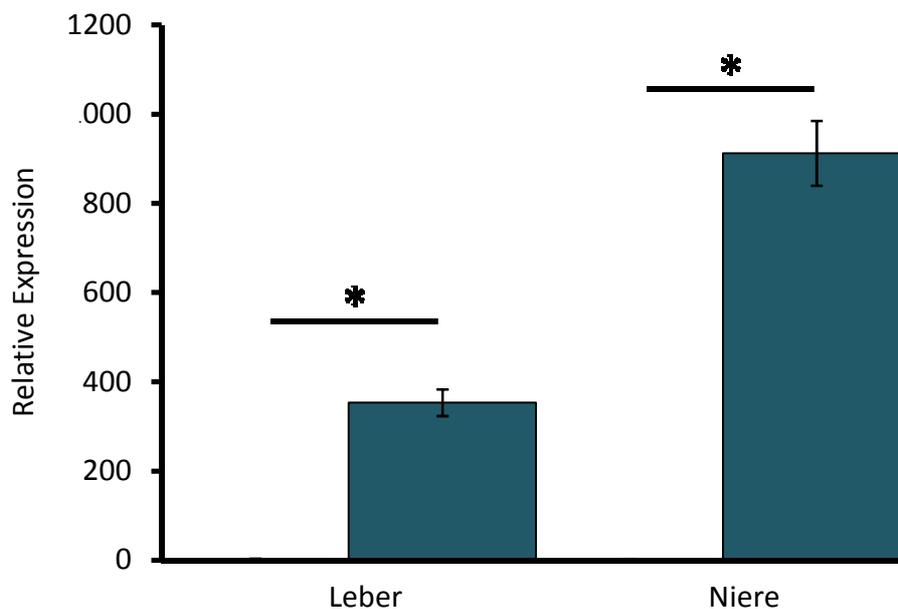
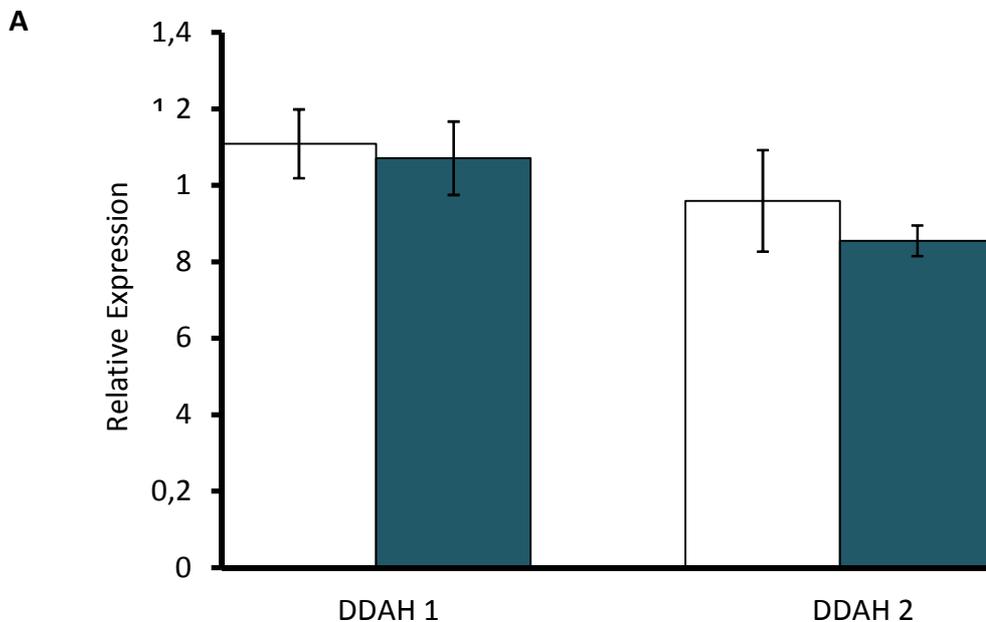


Abbildung 15: **Expression der humanen DDAH 1 in Leber- und Nierengewebe von Wildtypmäusen und DDAH 1 transgenen Mäusen im Vergleich.** Bei den Wildtyp-tieren DDAH +/+ ist keine cDNA nachweisbar, in den transgenen Tieren DDAH +/T (gezeigt in blau) dagegen kann humane cDNA der DDAH 1 deutlich gezeigt werden.

Für beide Organe zeigte sich erwartungsgemäß, dass nur in den transgenen Mäusen cDNA der humanen DDAH 1 nachweisbar war. Diese PCRs dienten somit als Nachweis, dass die

in der weiteren Arbeit untersuchten Gewebe tatsächlich die humane DDAH 1 exprimieren und somit eine nähere Charakterisierung der eventuell bestehenden Unterschiede zwischen den Mausgruppen auf diese genetischen Unterschiede zurückgeführt werden können. Um zu untersuchen, ob es in den transgenen Tieren kompensatorisch zu einer starken Herunterregulierung der Expression der endogenen DDAH 1 und 2 kommt, weil das humane Genprodukt im starken Überschuss vorhanden ist und es somit insgesamt wieder zu einem Ausgleich der Gesamtmenge an verfügbarer DDAH kommt, wurden beide murinen DDAH Isoformen ebenfalls in realtime PCRs untersucht.

Gen	Organ	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
DDAH 1	Leber	WT	1,10	0,08	5
		DDAH +/T	1,07	0,09	5
	Niere	WT	0,89	0,02	5
		DDAH +/T	0,76	0,03	5
DDAH 2	Leber	WT	0,95	0,13	5
		DDAH +/T	0,85	0,04	5
	Niere	WT	0,89	0,02	5
		DDAH +/T	0,76	0,03	5



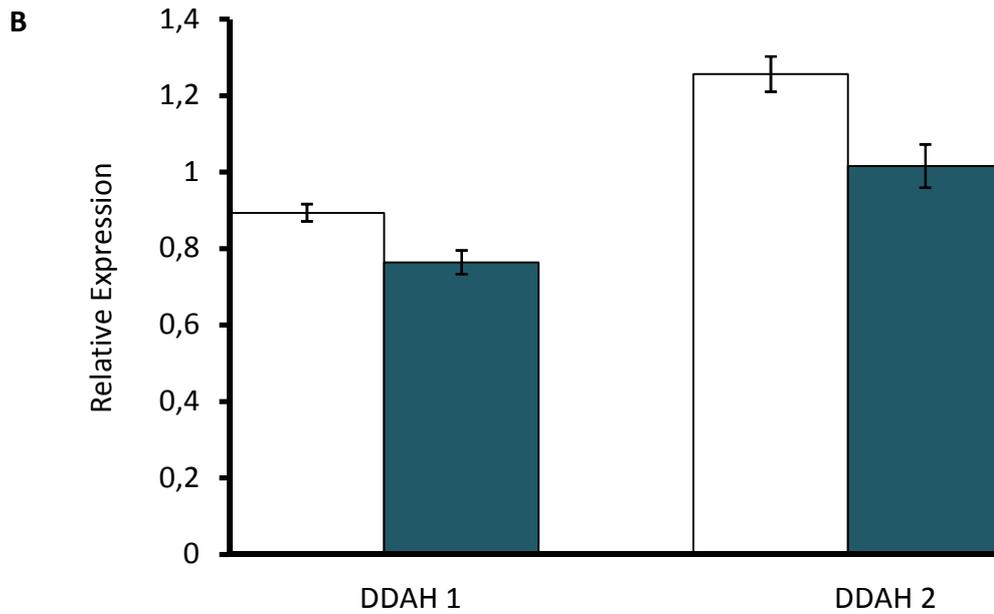


Abbildung 16: **Expression der endogenen DDAH 1 und 2 in Lebergewebe (A) und Nierengewebe (B) von Wildtypmäusen und hDDAH 1 transgenen Mäusen im Vergleich.** Bei beiden Organen ist eine leichte Verringerung der Expression bei den transgenen Tieren zu sehen, diese sind jedoch nicht statistisch signifikant.

In beiden untersuchten Geweben zeigte sich sowohl bei DDAH 1 als auch 2 eine leichte Herunterregulierung bei den transgenen Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen, allerdings ist dieser Effekt zwischen den Gruppen nicht signifikant. In der Bilanz haben die hDDAH 1 transgenen Tiere durch das humane Transgen eine stark erhöhte DDAH Expression in Leber und Niere.

4.1.2 EXPRESSION DER ENOS UND INOS

Die endotheliale NOS wird konstitutiv exprimiert, ihre Aktivität im Gefäßendothel ist zwar auch von mechanischen Kräften abhängig, die hauptsächliche Regulierung erfolgt jedoch über die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Im Gegensatz zur iNOS, die zwar auch konstitutiv, insbesondere jedoch nach Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren vermehrt exprimiert wird. Die Aktivität der iNOS kaum reguliert, sodass es nach ihrer Induzierung zu einer schnellen, starken und langanhaltenden NO Synthese kommt. Beide Isoformen sind auch in der Leber und in den Nieren relevant, deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob es ADMA abhängige Unterschiede in der Expression dieser NOS Formen in diesen Geweben gibt.

Gen	Organ	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
eNOS	Leber	WT	2,63	0,56	5
		DDAH +/-T	0,89	0,05	5
	Niere	WT	1,76	0,09	5
		DDAH +/-T	0,99	0,08	5
iNOS	Leber	WT	0,83	0,06	5
		DDAH +/-T	0,37	0,03	5
	Niere	WT	1,55	0,10	5
		DDAH +/-T	0,96	0,08	5

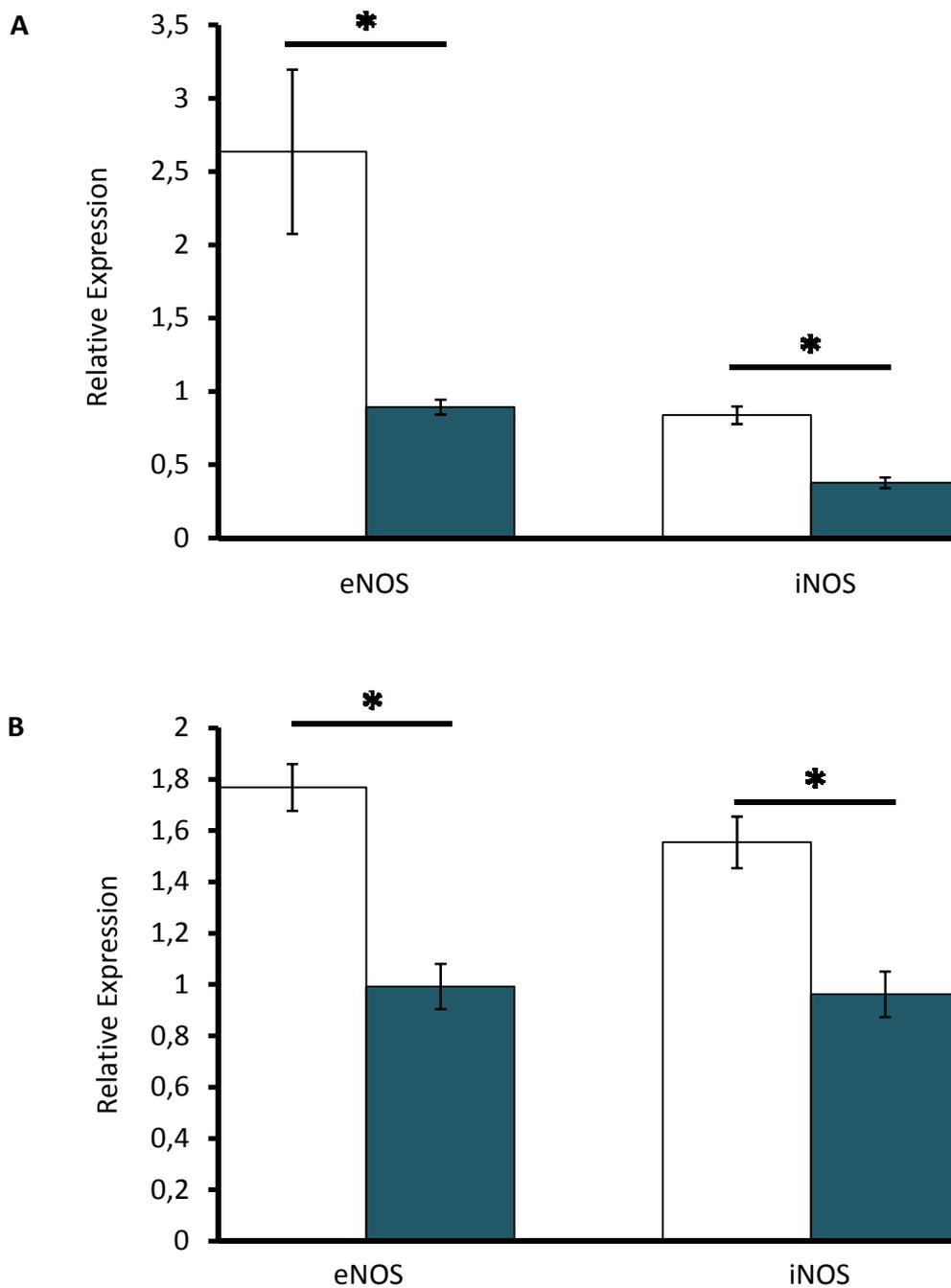


Abbildung 17: Die relative Expression von eNOS und iNOS in Lebergewebe (A) und Nierengewebe (B) von Wildtyp und hDDAH 1 transgenen Mäusen im Vergleich. Es ist deutlich zu sehen, dass die iNOS in beiden Mausmodellen in der Leber schwächer exprimiert wird als die eNOS, in Nierengewebe ist dieser Unterschied nicht vorhanden. Darüber hinaus besteht ein signifikanter Unterschied zwischen WT und hDDAH 1 Mäusen: Beide Isoformen werden in beiden Organen der transgenen Tiere wesentlich weniger transkribiert.

Die Auswertung der realtime PCRs zeigen starke Unterschiede in der Genexpression von hDDAH 1 und WT Tieren. DDAH 1 Mäuse exprimieren in beiden untersuchten Organen signifikant weniger von beiden NOS Isoformen. Im Lebergewebe ist zusätzlich noch erkennbar, dass die eNOS bei beiden Mausmodellen stärker exprimiert wird als die iNOS.

4.1.3 ADMA UND SDMA PLASMA KONZENTRATIONEN

Aufgrund der beschriebenen Unterschiede in der DDAH Genexpression zwischen den hDDAH 1 transgenen und Wildtyptieren in 4.1.1 sollte nun der funktionelle Nachweis erbracht werden, dass als Resultat auch die Proteinexpression und Enzymaktivität bei den hDDAH 1 transgenen Mäusen erhöht ist. Hierzu wurde das Plasma beider Tiergruppen entnommen und die ADMA und SDMA Konzentrationen darin bestimmt.

		Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
Basal	ADMA	WT	0,67	0,03	9
		DDAH +/-T	0,48	0,02	9
LPS		WT	0,95	0,08	9
		DDAH +/-T	0,52	0,02	9
Basal	SDMA	WT	0,15	0,01	9
		DDAH +/-T	0,17	0,01	9
LPS		WT	0,2	0,02	9
		DDAH +/-T	0,25	0,02	9

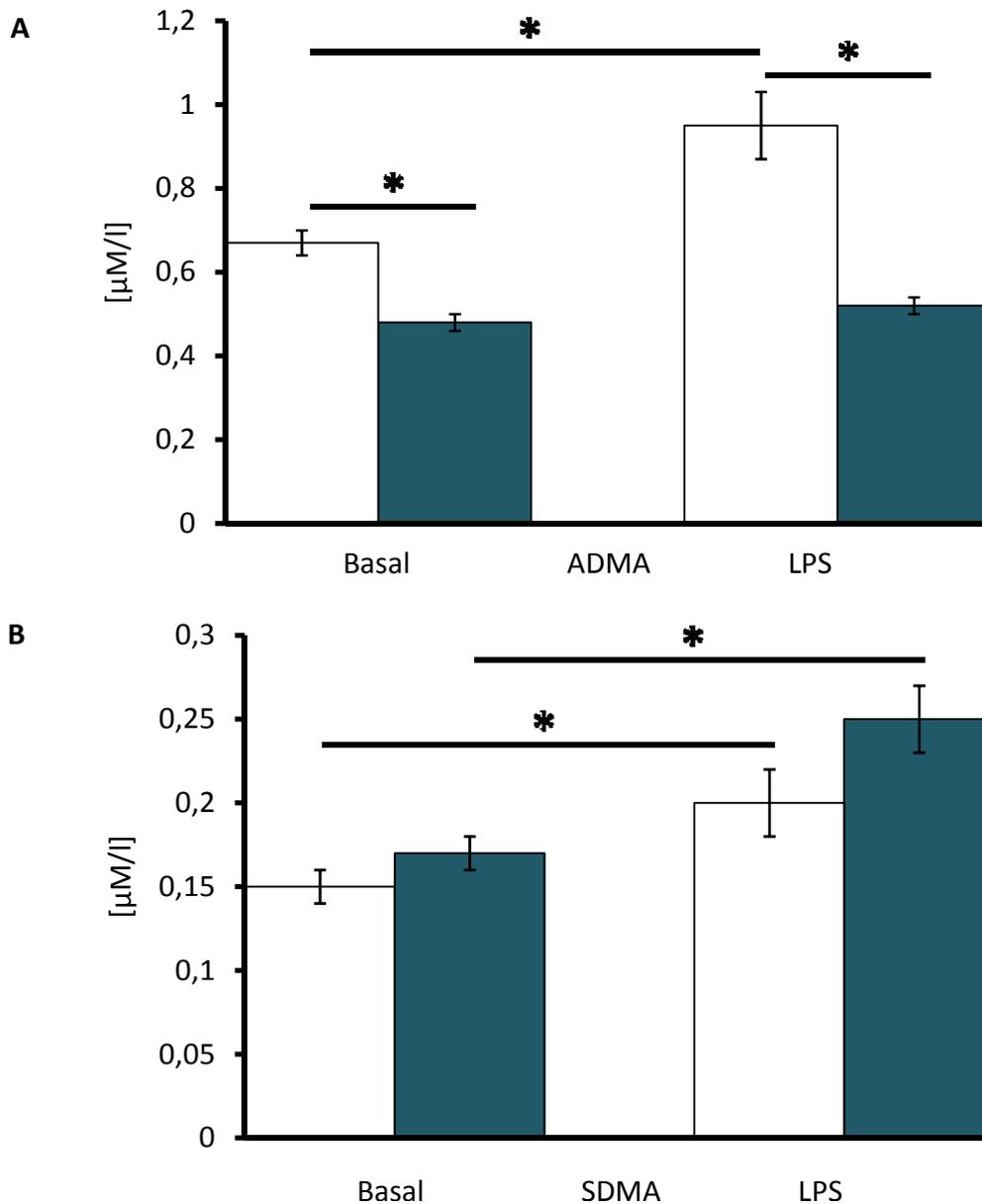


Abbildung 18: **ADMA und SDMA Konzentrationen im Plasma von transgenen Tieren und Wildtypen basal und nach Gabe von LPS.** (A) Die ADMA Plasmakonzentrationen unterscheiden sich statistisch signifikant mit $p \leq 0,01$ bei den Mausgruppen, wobei die transgenen Mäuse weniger haben. Nach 4 Stunden nach LPS Gabe ist bei den Wildtypen ein deutlicher ADMA Anstieg zu sehen, bei den transgenen Tieren nicht. (B) Bei den SDMA Konzentrationen ist basal kein signifikanter Unterschied vorhanden.

Es sind basal deutliche Unterschiede in den ADMA Plasmakonzentrationen zwischen den Wildtypen und den transgenen Tieren zu sehen. Die SDMA Werte hingegen unterscheiden sich nicht. Nach erfolgter LPS Injektion ändert sich dieses Bild: Die transgenen Tiere haben keine geänderten ADMA Werte, bei den Wildtypen hingegen ist ein signifikanter Anstieg

zu sehen. Die SDMA Werte steigen bei beiden Tiergruppen als Ausdruck verschlechterter Nierenfunktion unter septischen Bedingungen signifikant an.

4.1.4 MODULATION DES NO SIGNALWEGES DURCH DDAH

Arteriosklerotische Veränderungen in den Gefäßen sind verbunden mit Änderungen im NO:cGMP Signalweg (Melichar *et al*, 2004). Auch bereits in frühen Stadien dieser Erkrankung produzieren inflammatorische Zellen reaktive Sauerstoffspezies, die das vasoprotektive NO inaktivieren. Auch endogene NOS Inhibitoren wie ADMA können in diesem frühen Stadium bereits erhöht sein und so die *de novo* Synthese behindern. Neben den bekannten Effekten wie oxidativem Stress können diese Änderungen auch die Expression sowie Aktivität der NO *downstream* Signalkaskade betreffen und diese modifizieren: Das aus dem Endothel stammende NO stimuliert die Produktion des *second messengers* cGMP durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) in glatten Muskelzellen. cGMP verändert die Wirkung von mehreren Zielproteinen. Es aktiviert die cGMP abhängige Proteinkinase 1 (cGK1), ein Vorgang, der essentiell ist für sowohl die vasorelaxierenden (Pfeifer *et al*, 1998) als auch die antiproliferativen Effekte von NO (Lincoln *et al*, 1998). Eines der am besten charakterisierten Effektorproteine ist VASP, dessen Phosphorylierungsgrad am Serin 239 ist ein sensibler Monitor für die Aktivität des gesamten NO:cGMP Signalwegs (Schulz *et al*, 2002) und damit für vaskulären oxidativen Stress (Mollnau *et al*, 2002) und die Endothelfunktion (Mülsch *et al*, 2001).

Da die hDDAH1 transgenen Mäuse weniger ADMA besitzen als die Wildtypen kann die NOS verstärkt NO produzieren, weil weniger Hemmstoff vorhanden ist. Im Folgenden soll untersucht werden, welchen Einfluss diese Tatsache auf die Moleküle hat, die *downstream* der NOS die NO Effekte modulieren. Da es sich bei diesen Molekülen um Enzyme handelt, kommt es nicht nur auf die Expression auf Genebene an, sondern auch auf die Aktivität. Als Maß der Aktivität des NO Signalweges dient der Phosphorylierungsgrad von VASP. Aus diesem Grunde wurde neben der Proteinexpression der löslichen Guanylatzyklase und Proteinkinase 1 auch dieser Quotient von P-VASP am Gesamt VASP ermittelt.

Protein	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
sGC	WT	0,63	0,06	3
	DDAH +/T	0,76	0,14	3
cGK1	WT	0,40	0,02	3
	DDAH +/T	0,70	0,04	3
P-VASP/ VASP	WT	43,70	3,66	3
	DDAH +/T	56,30	0,78	3

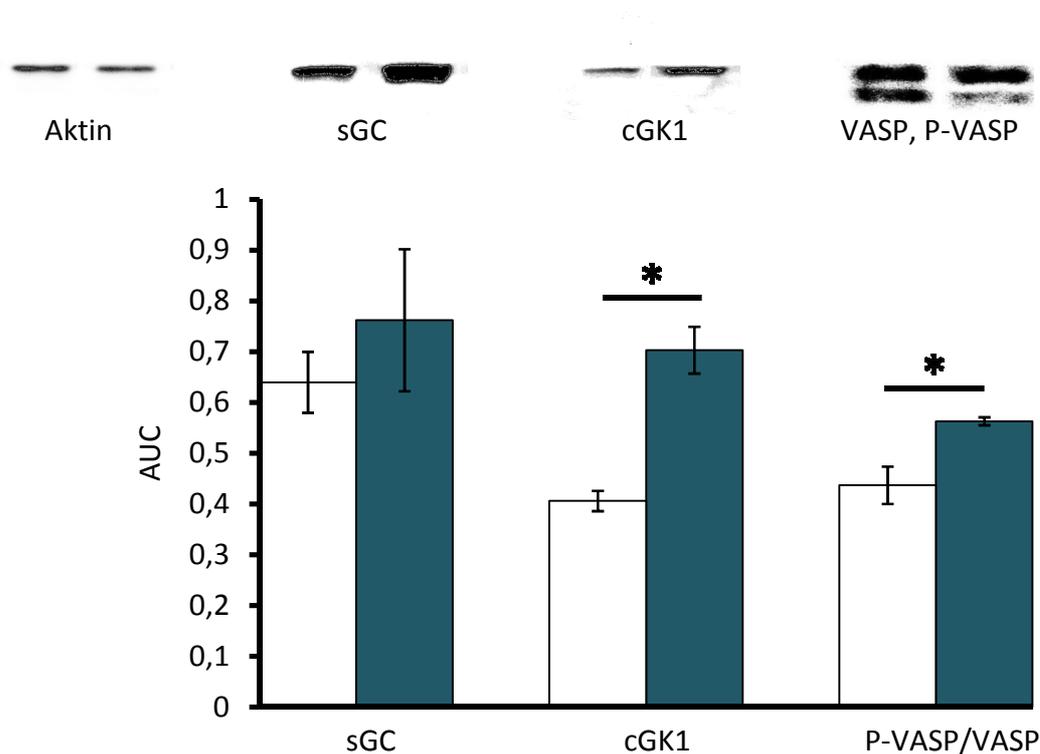


Abbildung 19: **Typisches Ergebnis sowie die Auswertungen eines Western Blots mit Antikörpern gegen das Haushaltsgen Aktin als Ladekontrolle, sGC, cGK1 sowie beiden Formen von VASP in Aortengewebe.** (A) Die Banden eines Blots (B) Die Auswertung mit allen Western Blots. Die erste Bande gehört jeweils zu drei gepoolten Aorten von WT Mäusen (n=1 entspricht so also den Aorten von je 3 Tieren), analog dazu die zweiten Banden zu Aorten von hDDAH1 transgenen Tieren. In der Ladekontrolle ist kein Unterschied in der Bandenstärke zu sehen, bei sGC und cGK1 ist die zweite Bande sehr viel stärker ausgeprägt und bei den hDDAH1 Tieren ist der Anteil von phosphoryliertem VASP am Gesamt VASP stark erhöht. Alle Daten in (B) wurden auf die Menge an Aktin in den jeweiligen Blots normalisiert.

Die Versuche wurden an Aortengewebe durchgeführt, da das NO im Endothel gebildet wird und somit hier ein direkter Einfluss der verfügbaren NO Menge auf die weitere Signalkaskade nachweisbar ist. Da eine murine Aorta keine ausreichenden Mengen an Protein zur Verfügung stellt, wurden für die Versuche je drei Aorten gepoolt. Dies wurde

dreimal mit verschiedenen Tieren wiederholt, um die Ergebnisse zu validieren. Bei den hDDAH 1 transgenen Tieren ist signifikant mehr sGC und cGK1 vorhanden, auch die Aktivität der cGK1 ausgedrückt im Phosphorylierungsgrad von VASP ist erhöht. Somit resultiert eine gesteigerte DDAH 1 Expression in niedrigeren ADMA Konzentrationen und einer Verstärkung der NO Signalkaskade.

4.2 HYPOTHESE I: MPO INDUZIERT ADMA AKKUMULATION

Die vorausgehenden Versuche haben bestätigt, dass veränderte ADMA nachhaltig und deutlich sichtbar über verschiedene Mechanismen in die Parameter der Endothelfunktion eingreifen. Es stellt sich nun die Frage, ob dieser Mechanismus vom MPO Weg beeinflusst werden kann, da beiden Signalwegen wichtige Funktionen in der Entstehung und Unterhaltung von endothelialen Dysfunktionen zukommen: Das durch MPO gebildete reaktive HOCl reagiert mit einer Vielzahl oxidierbarer Biomoleküle, die ungesättigte Doppelbindungen, Thiole oder Stickstoffkomponenten enthalten. Einige wesentliche Chlorierungsreaktionen finden mit Pyridinnukleotiden, Cholesterol und ungesättigten Fettsäuren unter Bildung von Chlorhydrinen und mit Aminogruppen unter Bildung von Chloraminen statt. Im Endeffekt bewirkt somit die MPO Aktivität, dass oxidative Veränderungen an Makromolekülen wie der DNA und verschiedenen Proteinen stattfinden. Dies sind Prozesse, die durchaus regulatorische Funktionen besitzen können.

Es ist bekannt, dass die Aktivität der DDAH sehr sensitiv für derartige Stimuli ist: Die Aktivität wird generell beeinträchtigt durch oxidativen Stress, was zu einer Akkumulation von ADMA führt. Es ist gezeigt, dass NO Zysteine der DDAH S-nitrosylieren kann, dies geschieht vor allem bei überschießender NO Produktion nach Induzierung der iNOS und ist als negativer *feedback* Mechanismus anzusehen (Palm *et al*, 2007). Eine Vielzahl von weiteren Ursachen kommt aber ebenfalls für die Entstehung von oxidativem Stress und somit für eine unerwünschte Inaktivierung der DDAH in Frage wie etwa oxidiertes LDL Cholesterol, inflammatorische Zytokine oder auch Infekte (Cooke *et al*, 2004). Vor allem aber könnte die MPO Aktivität in diesem Zusammenhang ein wichtiger Mediator sein.

4.2.1 VORAUSSETZUNGEN

Im Folgenden wird die Hypothese untersucht, dass die MPO Aktivität einen direkten Einfluss auf die DDAH Aktivität haben könnte. Aufgrund der hohen Reaktivität von HOCl, dem Reaktionsprodukt von MPO, sind die meisten Oxidationsprodukte nicht spezifisch und führen zu Schäden an unterschiedlichen Molekülen (Bergt *et al*, 2004). Somit ist die Grundvoraussetzung für eine Interaktion zwischen MPO und DDAH eine intrazelluläre Kolokalisation, damit das HOCl die DDAH überhaupt erreichen kann. Um dies zu untersuchen, wurden HUVECs mit MPO inkubiert, welches wie auch im Organismus in die Zellen aufgenommen wurde. Die Zellen wurden dann fixiert und mit Antikörpern gegen DDAH 1 sowie MPO inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

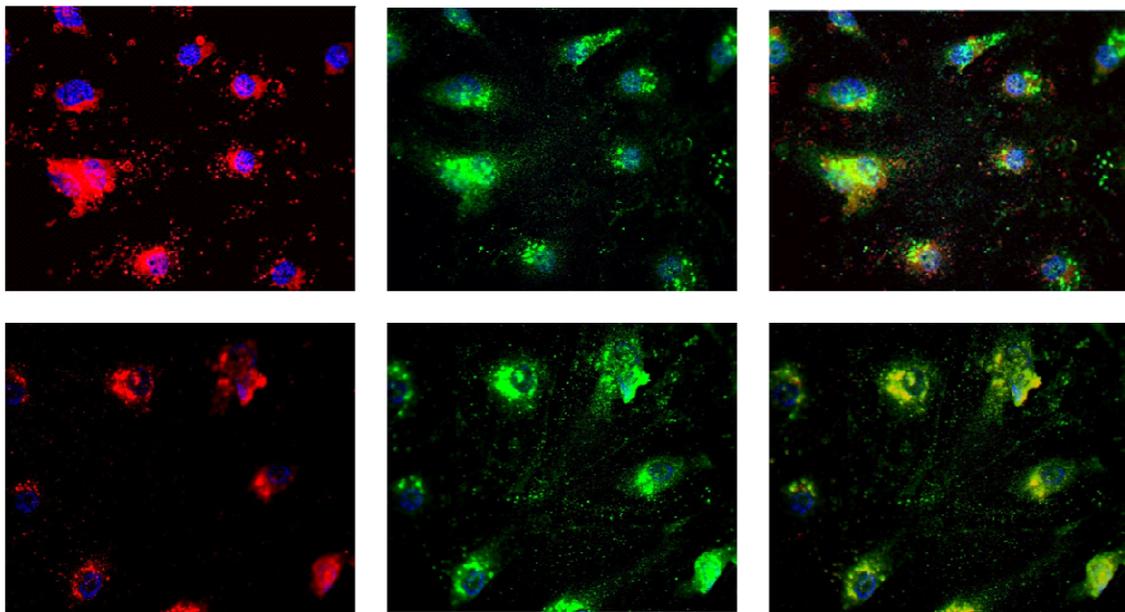


Abbildung 20: **Immunfluoreszenzaufnahmen von HUVECs mit Antikörpern gegen DDAH1 (rot) und MPO (grün).** In den übereinander gelegten Bildern (*merge*) rechts erscheinen die Überschneidungen in der Lokalisation beider Antikörper in gelb.

Die Zellkerne der Endothelzellen sind in blau eingefärbt, die DDAH 1 erscheint in rot. Wie auf dem Bild zu sehen ist, handelt es sich bei diesem Enzym um ein primär zytoplasmatisches Protein, wobei es jedoch auch in der Membran von Endothelzellen lokalisiert werden konnte (Birdsey *et al*, 2000). Die MPO akkumuliert ebenfalls im

Zytoplasma und kann wie auch die DDAH um den Kern herum bzw. im Kern lokalisiert werden. Zusätzlich ist zu sehen, dass einige Moleküle MPO noch von der Inkubation außen an den Zellen haften, wodurch die typischen pflastersteinartigen Strukturen der Endothelzellen sichtbar werden. Im übereinander gelegten Bild sind die Orte der Kolo-kalisation beider Proteine gelb gefärbt- somit konnte gezeigt werden, dass MPO und DDAH 1 intrazellulär ähnlich lokalisiert sind und deshalb eine direkte Interaktion zwischen diesen Enzymen möglich ist.

4.2.2 MPO MODULIERT DIE GENEXPRESSION

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die Produkte von MPO oder die MPO selbst die Expression der am ADMA Metabolismus beteiligten Proteine auf Genebene ändern.

4.2.2.1 DDAH EXPRESSION

Im Folgenden wurde der Einfluss von MPO auf die Genexpression der DDAH 1 und DDAH 2 anhand des MPO knockout Mausmodells im Vergleich zu Wildtyp-Tieren untersucht.

Gen	Organ	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
DDAH 1	Leber	WT	1,01	0,05	5
		MPO -/-	14,14	2,11	5
	Niere	WT	1,00	0,05	5
		MPO -/-	12,41	0,55	5
DDAH 2	Leber	WT	1,00	0,04	5
		MPO -/-	1,05	0,07	5
	Niere	WT	1,02	0,08	5
		MPO -/-	1,40	0,09	5

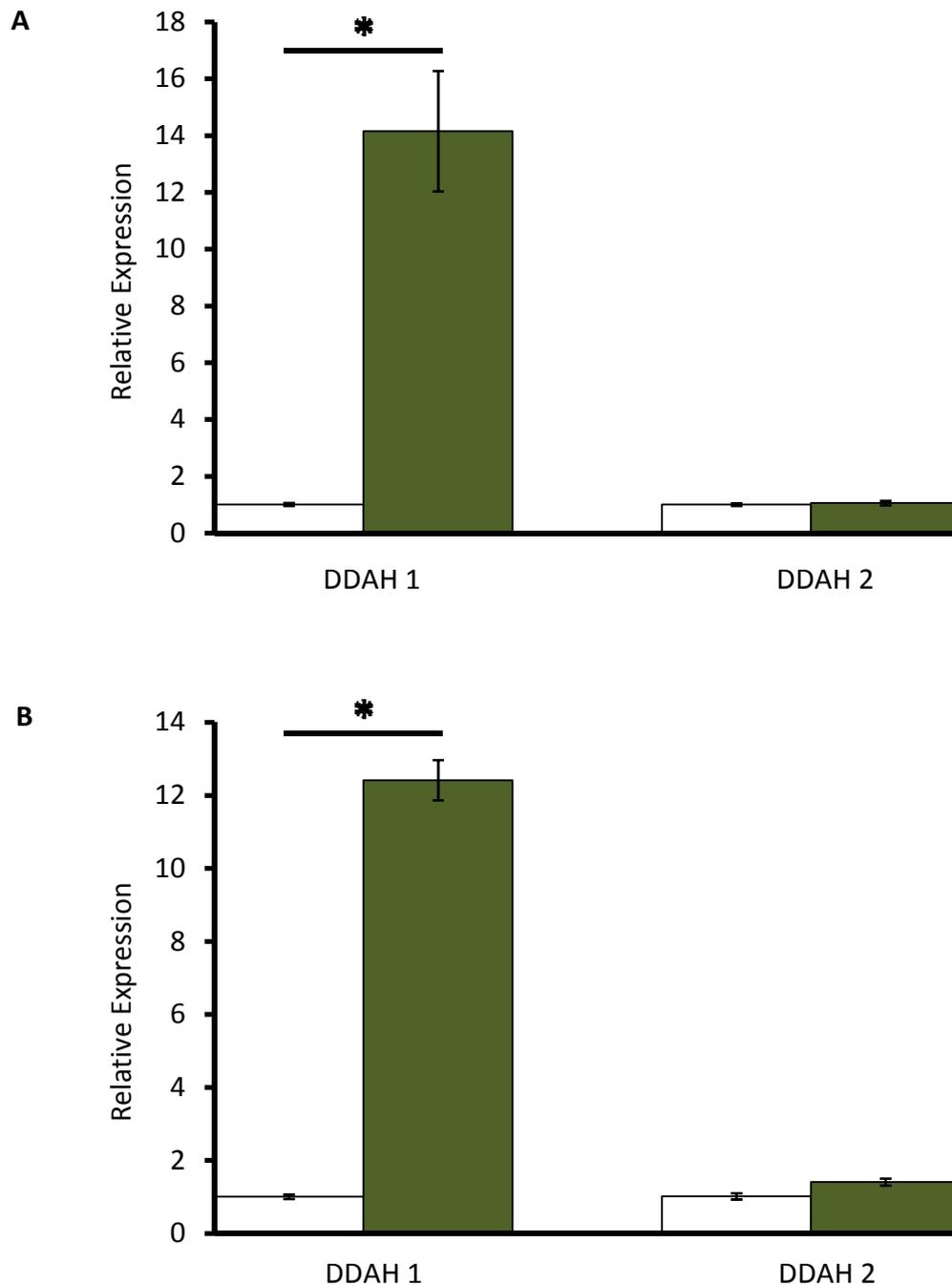


Abbildung 21: **Expression der DDAH 1 und 2 in Lebergewebe (A) und Nierengewebe (B) von Wildtypmäusen und MPO knockout Tiere im Vergleich.** Bei beiden Organen ist eine starke Erhöhung der DDAH 1 Expression bei den knockout Tieren zu sehen. Die DDAH 2 Expression ist bei beiden Mausgruppen ähnlich.

Die Ergebnisse der realtime PCRs zeigen drastische Unterschiede in der DDAH 1 Expression zwischen Wildtyp und MPO knockout Tieren: In beiden untersuchten Organen haben die

MPO knockouts eine 12-14 fach erhöhte Expression. Bei der DDAH 2 Expression hingegen sind keine Unterschiede vorhanden. Es konnte somit gezeigt werden, dass MPO durch eine Änderung der Genexpression stark in den ADMA Metabolismus eingreift. Da das ADMA abbauende Enzym DDAH betroffen ist, wurden im Folgenden ebenfalls die ADMA bildenden Proteine, die Protein Methyltransferasen (PRMT), untersucht.

4.2.2.2 PRMT EXPRESSION

Die Gruppe der PRMT wird in zwei Klassen unterteilt: Typ 1 (PRMT 1, 3, 4, 6) methyliert einen Stickstoff zweimal und führt so zur Bildung von ADMA, Typ 2 (PRMT 5) führt durch die einfache Methylierung beider endständigen Stickstoffe zur Synthese von SDMA. Es wurde untersucht, ob sich die Expression diese ADMA bzw. SDMA generierenden Proteine bei MPO Defizienz ändert.

Gen	Organ	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
PRMT 1	Leber	WT	1,01	0,05	5
		MPO -/-	0,67	0,11	5
	Niere	WT	1,00	0,03	5
		MPO -/-	0,80	0,02	5
PRMT 3	Leber	WT	1,00	0,03	5
		MPO -/-	0,74	0,07	5
	Niere	WT	1,01	0,08	5
		MPO -/-	0,96	0,07	5
PRMT 6	Leber	WT	1,00	0,03	5
		MPO -/-	0,60	0,09	5
	Niere	WT	1,03	0,12	5
		MPO -/-	0,94	0,08	5
PRMT 5	Leber	WT	1,01	0,07	5
		MPO -/-	1,18	0,13	5
	Niere	WT	1,01	0,06	5
		MPO -/-	1,42	0,06	5

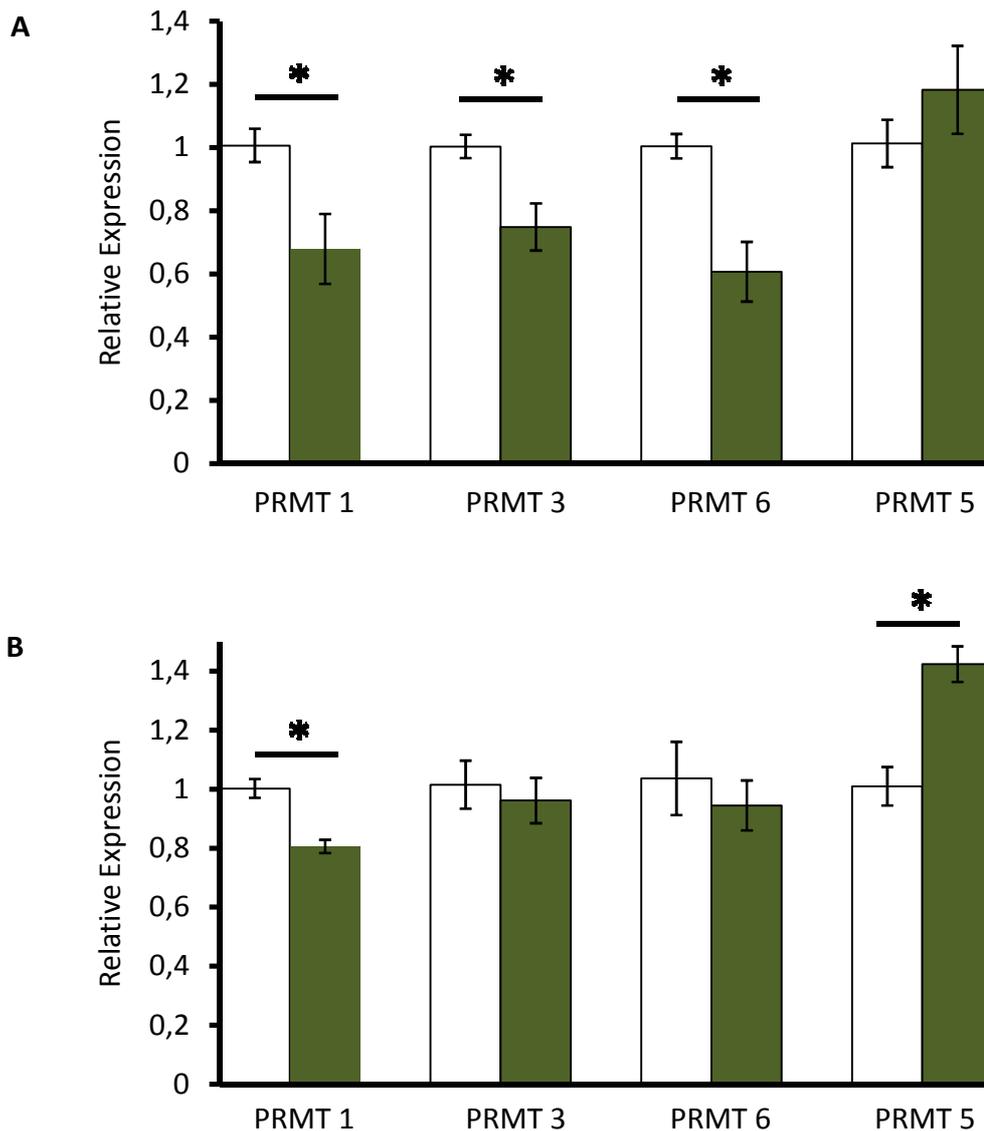


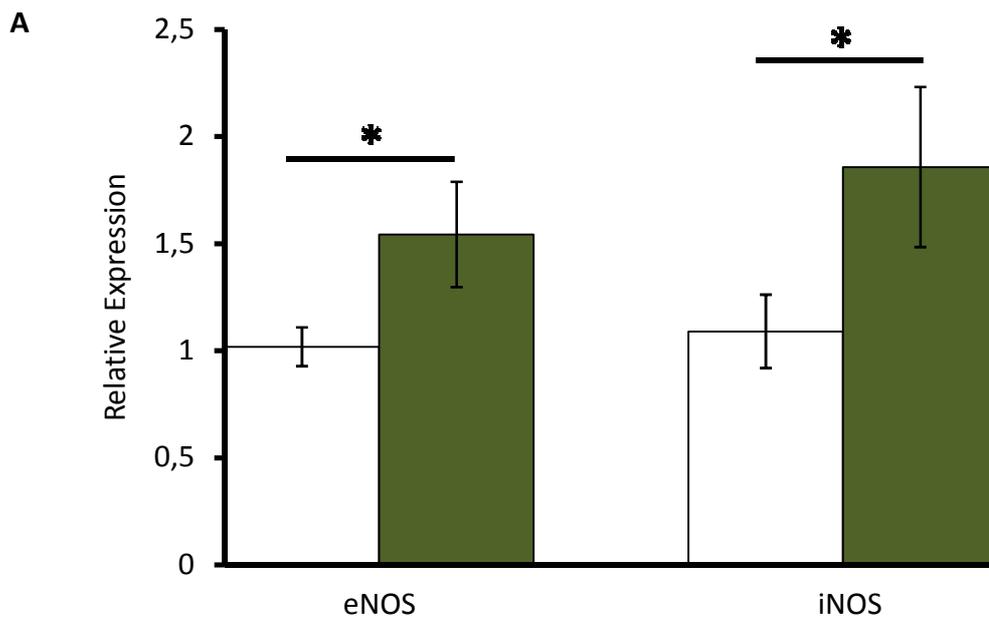
Abbildung 22: **Expression der PRMT in Leber- und Nierengewebe bei Wildtyp und MPO knockout Tieren.** In beiden untersuchten Organen, Leber (A) und Niere (B), ist die Expression der ADMA generierenden PRMT 1,3 und 6 leicht erniedrigt, während die Expression der SDMA generierenden PRMT 5 leicht erhöht ist.

Die Daten zeigen, dass die Expression der PRMT durch MPO leicht geändert wird: Die für die ADMA Synthese zuständigen PRMT 1, 3 und 6 werden in den knockout Tieren in beiden untersuchten Organen weniger exprimiert als in den Wildtypen. Die SDMA generierende PRMT 5 hingegen wird in den knockout Mäusen verstärkt exprimiert.

4.2.2.3 NOS EXPRESSION

Da die vorherigen Versuche zeigen, dass MPO in der Lage ist, die Genexpression von sowohl DDAH als auch PRMTs zu ändern, sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch die NOS Isoformen eNOS und iNOS Expression beeinflusst wird.

Gen	Organ	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
eNOS	Leber	WT	1,01	0,09	5
		MPO -/-	1,54	0,24	5
	Niere	WT	1,05	0,17	5
		MPO -/-	1,83	0,24	5
iNOS	Leber	WT	1,09	0,17	5
		MPO -/-	1,85	0,37	5
	Niere	WT	1,02	0,10	5
		MPO -/-	2,33	0,20	5



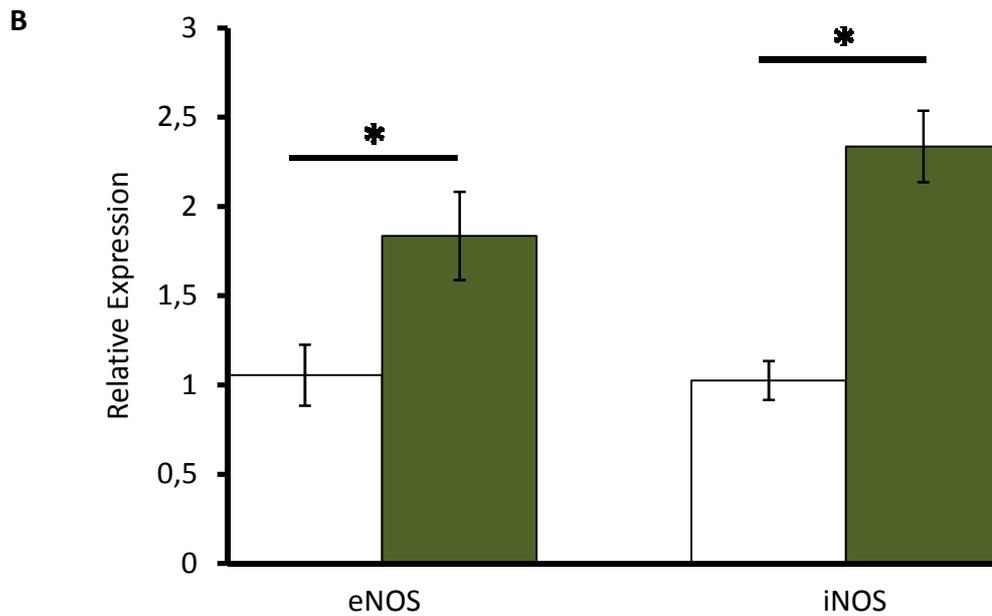


Abbildung 23: **Die relative Expression von eNOS und iNOS in Lebergewebe (A) und Nierengewebe (B) von Wildtyp und MPO knockout Mäusen im Vergleich.** Es ist deutlich zu sehen, dass beide Formen der NOS in beiden Organen in knockout Tieren stärker exprimiert werden als in den Wildtypen.

Beide untersuchten Isoformen der NOS wurden in Leber und Niere der MPO knockout Tiere stärker exprimiert als in den Wildtypen. Auch hier konnte also ein Einfluss von MPO auf die Transkription nachgewiesen werden. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich diese Unterschiede auch auf Proteinebene bestätigen lassen.

4.2.3 MPO MODULIERT DIE PROTEINEXPRESSION DER NOS

Nachdem die realtime Expressionsversuche mit den NOS in Leber- und Nierengewebe durchgeführt wurden, sollte nun die Menge an gebildeter eNOS und iNOS in Aortengewebe untersucht werden, da sich hier der Hauptort der für die Endothelfunktion relevante NO Synthese befindet.

Protein	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
eNOS	WT	0,99	0,02	3
	MPO -/-	2,02	0,09	3
iNOS	WT	0,99	0,12	3
	MPO -/-	1,71	0,26	3

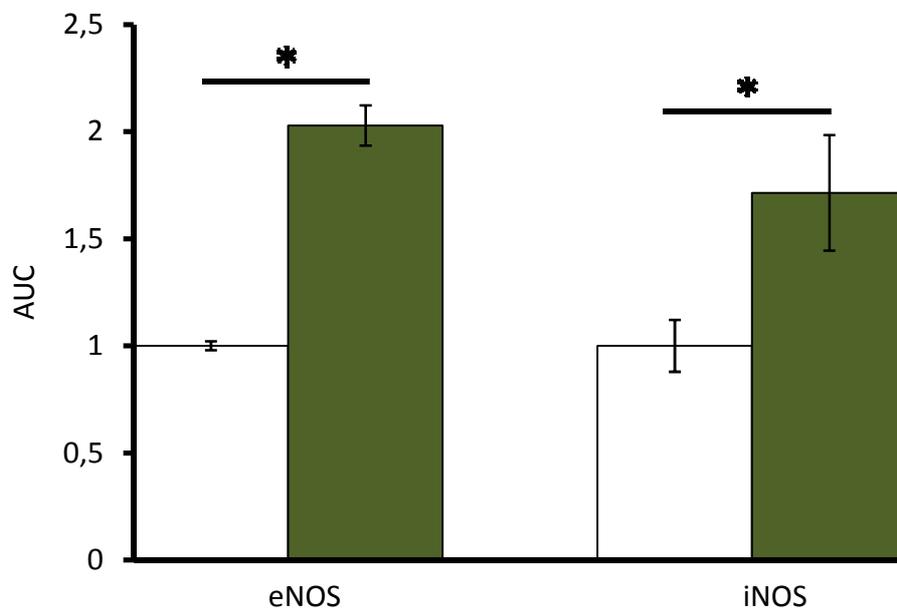


Abbildung 24: **Ergebnisse der Western Blots von eNOS und iNOS in Aortengewebe.** Beide Formen der NOS sind in den MPO knockout Tieren verstärkt vorhanden.

Die Western Blots zeigen deutlich, dass auch auf Proteinebene bei den MPO knockout Tieren mehr iNOS und eNOS als bei den Wildtypen vorhanden ist, dies bestätigt die Beobachtungen zur Expression von eNOS und iNOS auf Genebene unter 4.2.2.3.

4.2.4 MPO MODULIERT DEN NO SIGNALWEG

Analog zu den vorherigen Versuchen unter 4.1.4 wurde nun der NO *downstream* Weg in den MPO knockout Mäusen untersucht. Da diese Tiere kein MPO besitzen, welches das gebildete NO inaktivieren könnte, ist eine höhere NO Bioverfügbarkeit zu erwarten. Im Folgenden soll untersucht werden, ob dies auch in einer verstärkten Expression und Aktivität der beteiligten Moleküle des NO Signalwegs resultiert.

Protein	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
sGC	WT	0,92	0,15	3
	MPO -/-	1,31	0,12	3
cGK1	WT	0,50	0,05	3
	MPO -/-	0,88	0,03	3
P-VASP/ VASP	WT	61,70	3,53	3
	MPO -/-	75,00	3,06	3

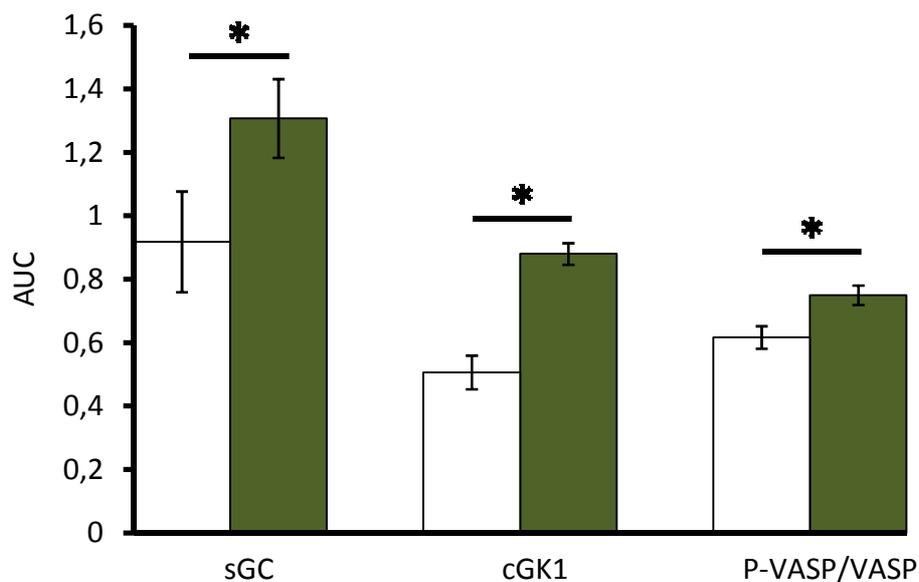


Abbildung 25: **Auswertung der Western Blots mit Antikörpern gegen das Haushaltsgen Aktin als Ladekontrolle, sGC, cGK1 sowie beiden Formen von VASP in Aortengewebe.** (A) Die Banden eines Blots (B) Die Auswertung mit allen Western Blots. Die erste Bande gehört jeweils zu drei gepoolten Aorten von WT Mäusen, analog dazu die zweiten Banden zu Aorten von MPO knockout Tieren. Es ist mehr sGC und cGK1 bei den knockout Mäusen zu sehen, auch der Anteil von phosphoryliertem VASP am Gesamt VASP ist hier erhöht. Alle Daten wurden auf die Menge an Aktin in den jeweiligen Blots normalisiert.

Auch für diese Experimente wurden für die Versuche je drei Aorten gepoolt. Es ist deutlich zu sehen, dass bei den MPO knockout Tieren signifikant mehr sGC und cGK1 exprimiert wird, auch der Phosphorylierungsgrad vom VASP ist erhöht. Somit konnte gezeigt werden, dass auch MPO Defizienz zu einer Verstärkung der NO Signalkaskade führt.

4.2.5 MPO MODULIERT DIE DDAH 1 AKTIVITÄT

Im Folgenden wurde überprüft, ob MPO oder ihre Produkte neben der Beeinflussung der Gen- sowie Proteinexpression auch direkt einen Einfluss auf die Aktivität der am ADMA Metabolismus beteiligten Enzyme nehmen können. Hierbei wurde das intakte DDAH 1 Enzym mit MPO und den entsprechenden Substraten für MPO inkubiert und anschließend die Aktivität der DDAH mit der unbehandelten DDAH verglichen. Um zu evaluieren, ob es sich um eine direkte Protein Protein Interaktion oder um die Auswirkungen des MPO Produktes HOCl handelt, wurde die DDAH 1 zusätzlich statt mit MPO nur mit HOCl inkubiert bzw. mit inaktiver MPO.

DDAH Aktivität	Mittelwert	SEM	Anzahl
basal	0,66	0,03	6
mit MPO	0,14	0,03	6
mit HOCl	0,003	0,003	3
mit inaktiver MPO	0,67	0,016	3

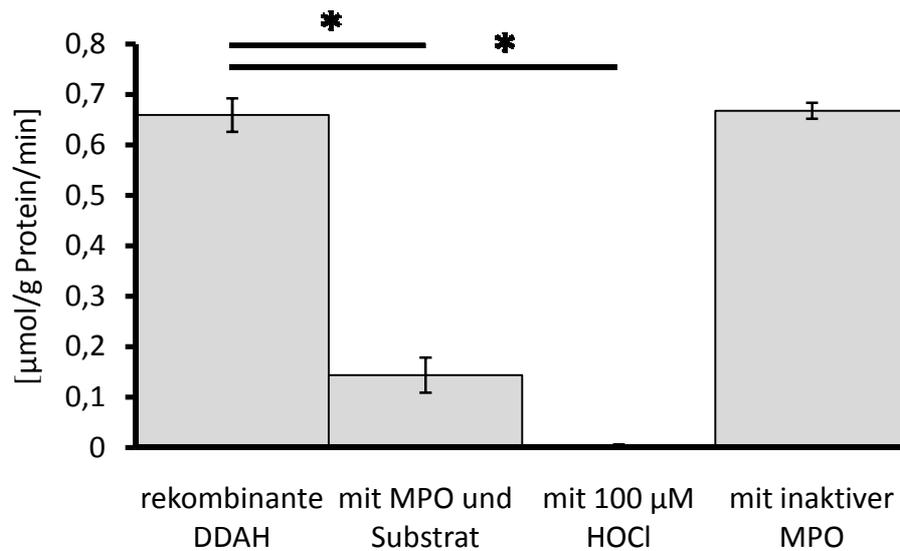


Abbildung 26: **Modulierung der DDAH Aktivität durch MPO.** Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Versuchsdurchgängen, die DDAH Aktivität wird durch Zugabe von MPO stark reduziert, ebenso durch Zugabe von HOCl. Wird die MPO jedoch vor Zugabe inaktiviert, so ist keine Veränderung der DDAH Aktivität festzustellen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Aktivität der DDAH durch MPO stark verringert wird. Ebenfalls konnte derselbe Effekt durch Zugabe von HOCl erzielt werden. Um zu klären, ob diese Effekte von MPO direkt auf ihre Aktivität zurückgeführt werden können wurde dann durch Hitze inaktivierte MPO zu dem Ansatz gegeben: Es konnte keinerlei Änderung der DDAH Aktivität beobachtet werden.

Diese Versuche wurden mit definierten Mengen und aufgereinigten Proteinen durchgeführt, es sollte im Anschluss daran geprüft werden, ob MPO diese Effekte auch unter physiologischen Bedingungen in den Organen auf die DDAH hat.

Organ	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
Leber	WT	7,55	0,36	5
	MPO -/-	8,50	0,40	5
Niere	WT	11,26	0,73	5
	MPO -/-	15,27	1,37	5

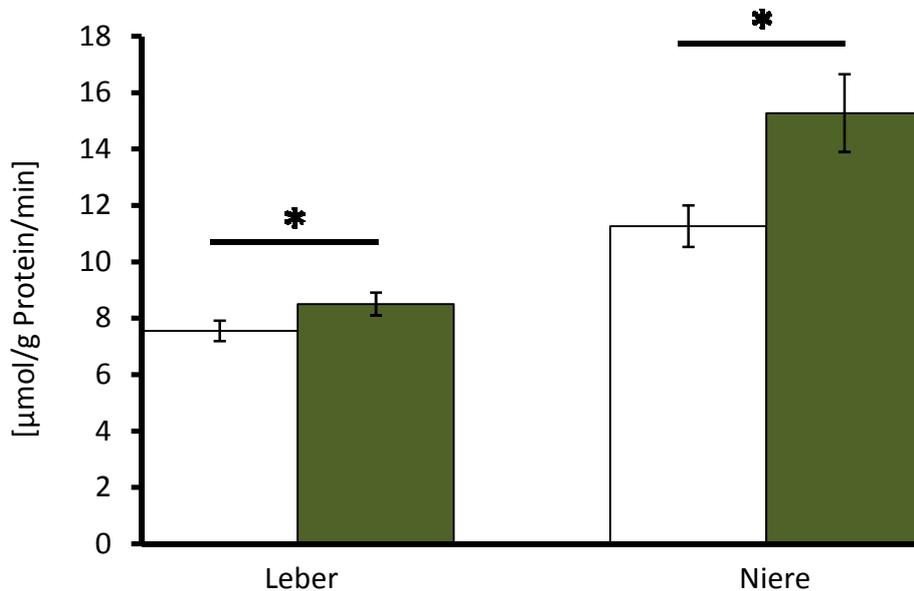


Abbildung 27: **Modulierung der DDAH Aktivität durch MPO im Organhomogenat.** In beiden untersuchten Organen Leber und Niere ist bei den MPO knockout Mäusen eine höhere DDAH Aktivität zu sehen als in den Wildtypen.

Die Ergebnisse bestätigen die vorherigen Versuche an der isolierten DDAH: Auch in den Organhomogenaten von Leber und Niere sind bei den MPO knockout Tieren erhöhte DDAH Aktivitäten festzustellen.

4.2.6 MPO MODULIERT DIE NOS AKTIVITÄT

Da in 4.2.5 gezeigt werden konnte, dass MPO bzw. ihre Produkte die DDAH Aktivität hemmt, sollte anschließend überprüft werden, ob dieser Effekt sich auch in einer geänderten NOS Aktivität widerspiegelt, da eine redoxsensitive Inhibierung der DDAH zu einer erhöhten Kapazität des endogenen NOS Inhibitors ADMA und so zu einer reduzierten NOS Aktivität führen müsste.

Hierzu wurde den Tieren markiertes ¹⁵N-Arginin injiziert. Nach vier Stunden wurde durch eine Blasenpunktion der gesammelte Urin entnommen und untersucht. Dabei wurde der Anteil an durch die NOS umgesetztes Arginin zu Citrullin bestimmt.

NOS Aktivität	Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
basal	WT	4,12	0,30	4
	MPO -/-	5,74	0,54	5
mit LPS	WT	4,38	0,11	4
	MPO -/-	11,29	0,87	3

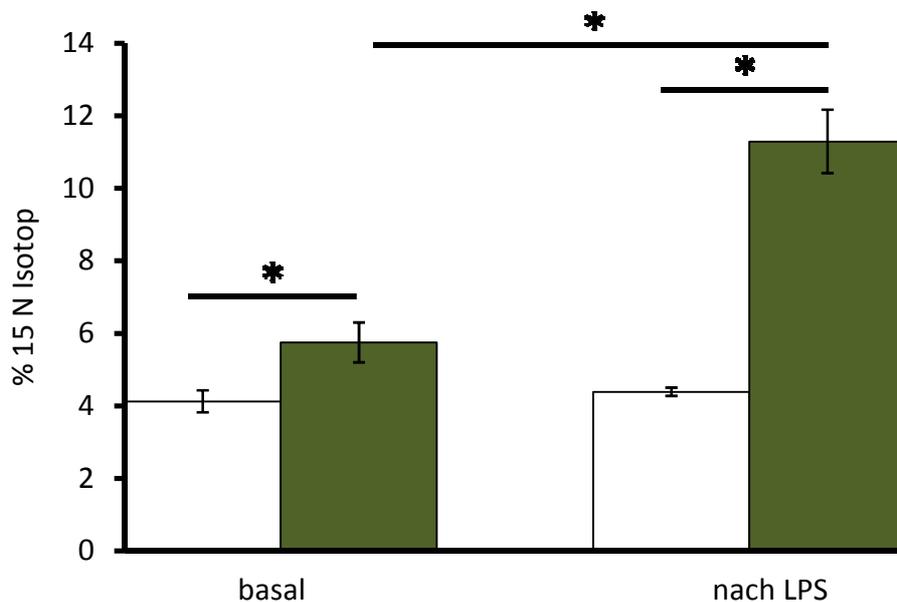


Abbildung 28: **Aktivität der NOS in Wildtyp und MPO knockout Tieren.** MPO knockout Mäuse haben bereits basal eine höhere NOS Aktivität, unter LPS bleibt die Aktivität der Wildtypiere gleich, bei den knockout Tieren steigt sie noch einmal signifikant an.

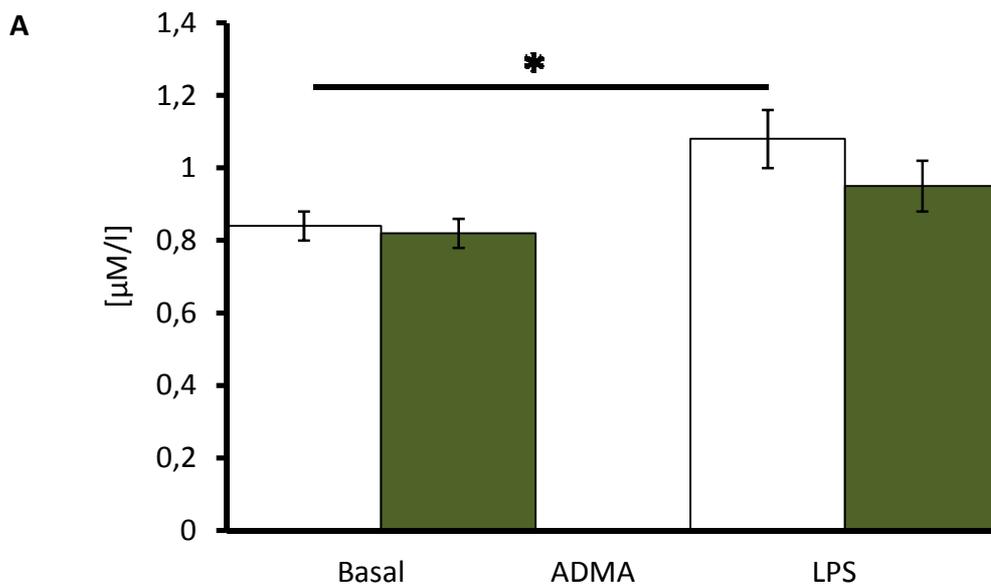
Die Messungen der NO Synthase Aktivität ergaben, dass die MPO knockout Mäuse verglichen mit den Wildtypen basal wie auch unter LPS eine signifikant höhere NOS Aktivität haben. Besonders auffallend ist, dass es bei den Wildtypen nach LPS Gabe zu keinem Anstieg der NOS Aktivität kommt, während sich die Aktivität bei den knockout Mäusen annähernd verdoppelt.

4.2.7 MPO MODULIERT ADMA PLASMA KONZENTRATIONEN

Da unter 4.2.5 gezeigt wurde, dass MPO knockout Mäuse in Leber und Nierengewebe eine höhere DDAH Aktivität haben als Wildtypmäuse und sich dies unter 4.2.6 mit einer

ebenfalls gesteigerten systemischen NOS Aktivität bestätigte, soll nun untersucht werden, ob diese Unterschiede der ADMA Metabolisierung ausreichen, um eine Änderung der ADMA Plasma Konzentrationen zu induzieren. Analog zu den Messungen unter 4.1.3 der DDAH transgenen Tiere wurden im Folgenden unter basalen Bedingungen sowie nach LPS Injektion die ADMA und SDMA Konzentrationen im Plasma bestimmt.

		Maus	Mittelwert	SEM	Anzahl
Basal	ADMA	WT	0,84	0,04	20
		MPO -/-	0,82	0,04	17
LPS	ADMA	WT	1,08	0,08	19
		MPO -/-	0,95	0,07	17
Basal	SDMA	WT	0,16	0,01	20
		MPO -/-	0,16	0,01	17
LPS	SDMA	WT	0,25	0,02	19
		MPO -/-	0,25	0,02	17



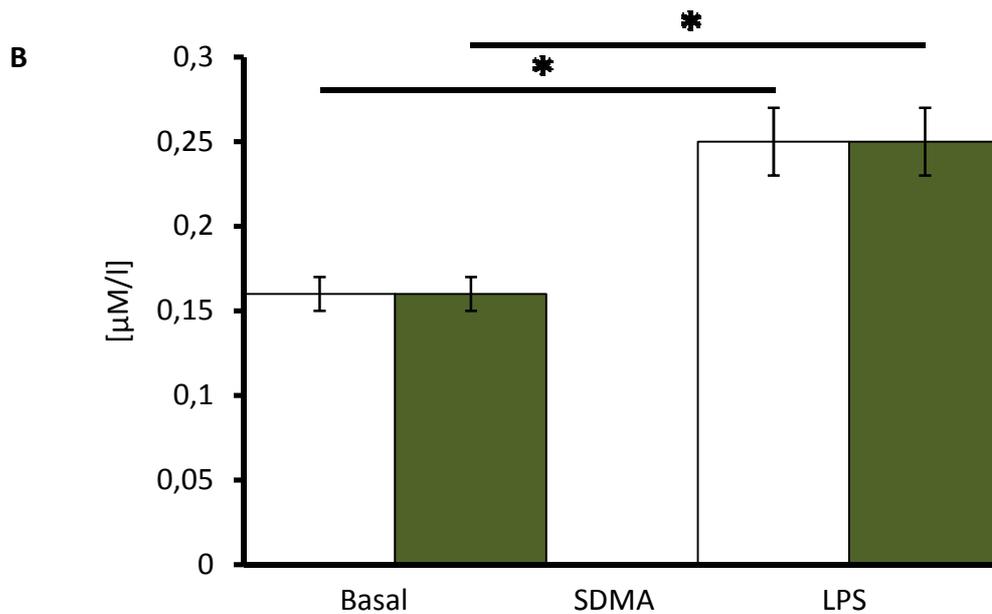


Abbildung 29: **ADMA und SDMA Konzentrationen im Plasma von MPO knockout Tieren und Wildtypen basal und nach Gabe von LPS.** A) Die ADMA Plasma Konzentrationen unterscheiden sich zwar nicht signifikant, die knockout Mäuse haben aber etwas weniger. Nach 4 Stunden nach LPS Gabe ist bei den Wildtypen ein deutlicher ADMA Anstieg zu sehen, bei den knockout Tieren ist ein geringerer Anstieg zu sehen. B) Bei den SDMA Konzentrationen ist basal kein signifikanter Unterschied vorhanden. Nach LPS Gabe stiegen die Plasma Konzentrationen in beiden Mausgruppen signifikant an.

Es sind basal leichte Unterschiede in den ADMA Plasmakonzentrationen zwischen den Wildtypen und den MPO knockout Tieren zu sehen. Die SDMA Werte hingegen unterscheiden sich nicht. Nach LPS Injektion haben die MPO knockout Tiere keine signifikant geänderten ADMA Werte, bei den Wildtypen hingegen ist ein signifikanter Anstieg zu sehen. Die SDMA Werte steigen bei beiden Tiergruppen signifikant an.

4.2.8 MPO MODULIERT PHYSIOLOGISCHE PARAMETER

NO spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des Blutdruckes, es ist ein starker Vasodilatator. Unter 4.2.4 wurde gezeigt, dass MPO knockout Mäuse einen heraufgeregelten NO Signalweg aufweisen, daher sollen nun die Auswirkungen dieses Effekts *in vivo* getestet werden. Es war deshalb das Ziel dieser Experimente, die Kreislaufparameter von MPO knockout und Wildtypmäusen Mäusen im wachen Zustand in Ruhe und nach mittels LPS Gabe induzierter Sepsis zu untersuchen. Drei knockout Tiere und vier Wildtypkontrollmäuse erhielten einen Katheter. Blutdruck und Herzfrequenz wurden 8 Tage nach der Operation unter wachen Bedingungen aufgezeichnet.

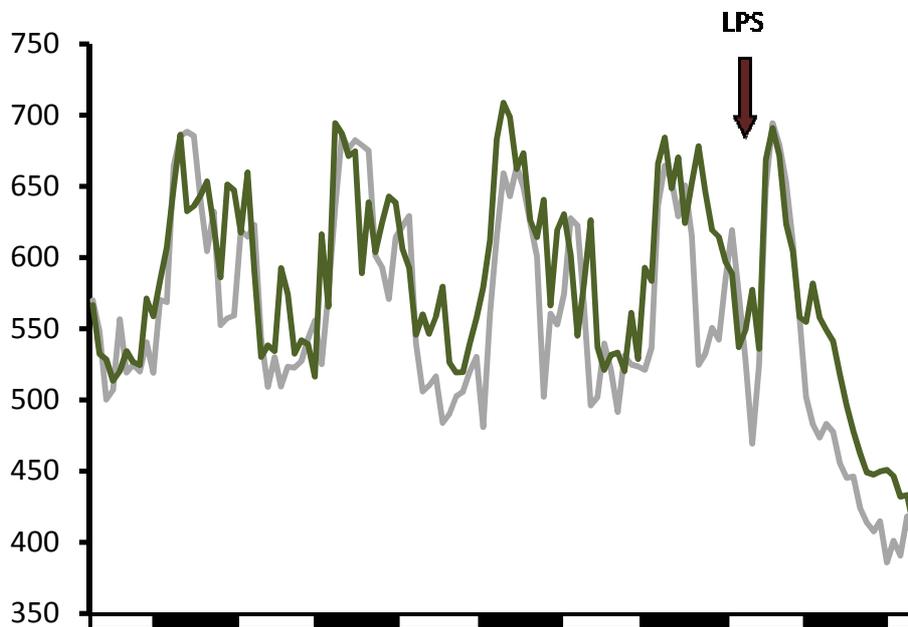


Abbildung 30: **Herzfrequenz bei Wildtyp Tieren und MPO knockout Tieren.** Dargestellt ist die aufgezeichnete Herzfrequenz der Tiere, wobei für jede Stunde der Mittelwert aus den Einzelwerten gebildet wurde. Die x Achse zeigt die Tageszeit, weißes Feld heißt Tag, schwarzes Feld Nacht. Der Zeitpunkt der LPS Gabe an Tag vier ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Herzfrequenz festzustellen.

In der Abbildung ist deutlich der Tag/Nacht Rhythmus der Tiere zu verfolgen. Da sie tagsüber schlafen ist die Herzfrequenz entsprechend niedrig, nachts hingegen sind aufgrund ihrer Aktivität deutliche Spitzen zu sehen. An Tag vier wurde morgens LPS injiziert, dies hat zunächst bei beiden Tiergruppen einen starken Anstieg, gefolgt von

einem massiven Abfall der Herzfrequenz zur Folge. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen vorhanden.

Die gemessenen Blutdrücke folgen ebenfalls dem Tag/Nacht Rhythmus der Tiere und liefern daher ein ähnliches Bild wie die Herzfrequenz (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswert hingegen war die unterschiedliche Blutdruckänderung nach LPS Gabe bei den beiden Mausgruppen.

Gruppe	Mittelwert	SEM	Anzahl
WT	89,80	4,83	4
MPO -/-	65,63	3,90	3

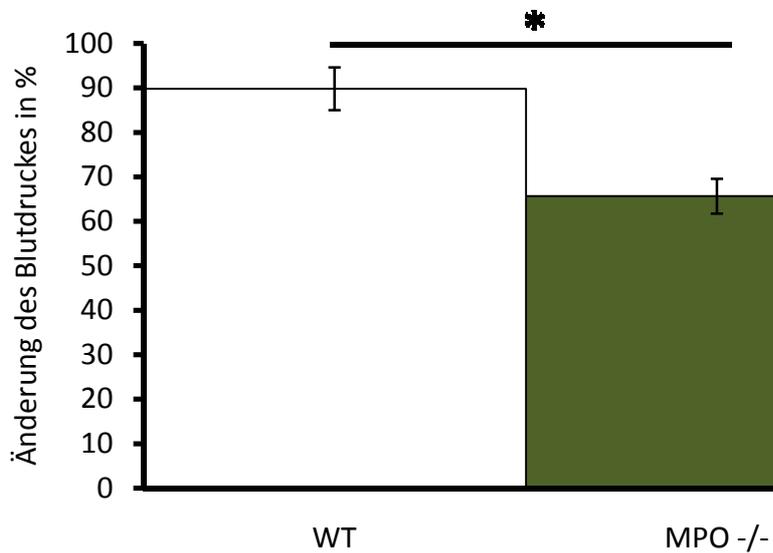


Abbildung 31: **Blutdruckänderung nach LPS Gabe bei Wildtypen und MPO knockout Tieren.** Dargestellt sind die prozentualen Änderungen der mittleren arteriellen Blutdrücke nach 24 Stunden der LPS Gabe verglichen mit den Ausgangswerten. Bei den MPO knockout Tieren ist ein deutlich stärkerer Blutdruckabfall nach LPS zu sehen als bei den Wildtypen.

Beim Vergleich der Blutdrücke vor bzw. 24 Stunden nach LPS Gabe fällt auf, dass bei den MPO knockout Tieren ein stark ausgeprägter Abfall des Blutdrucks um 34,37 % gemessen wurde. Bei den Wildtypen hingegen ist dieser Blutdruckabfall mit 10,20 % sehr viel schwächer ausgeprägt.

4.3 HYPOTHESE II: ADMA INDUZIERT DIE SEZERNIERUNG VON MPO

Im vorangehenden Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass freigesetztes MPO im Organismus über eine Modulation der DDAH Expression und Aktivität in der Lage ist, die zirkulierenden ADMA Konzentrationen zu erhöhen. Im folgenden Teil soll nun untersucht werden, ob ADMA *per se* in der Lage ist, die Freisetzung von MPO aus Neutrophilen Granulozyten zu steigern. Zunächst soll der hypothetische Mechanismus kurz skizziert werden: Erhöhte ADMA Konzentrationen konnten in verschiedenen Studien korreliert werden mit einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie unter 1. beschrieben. Diese Tatsache wird dem Effekt zugeschrieben, dass ADMA über eine Hemmung der NO Synthese dessen Bioverfügbarkeit einschränkt und so die vasoprotektiven Funktionen nicht mehr ausgeübt werden können. NO wird in vielen Zelltypen gebildet, so auch in Blutzellen, wobei für diese Arbeit speziell die neutrophilen Granulozyten relevant sind, da diese für die MPO Sezernierung verantwortlich sind. PMN synthetisieren ähnlich große Mengen an NO wie Endothelzellen (Sethi und Dikshit *et al*, 2000).

Dieser Befund unterstreicht die bislang kaum untersuchte Bedeutung dieser Zellen für den NO Haushalt unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen. Es wurde kürzlich gezeigt, dass die nNOS in PMN konstitutiv exprimiert wird, nach Induzierung mit LPS wurde auch die iNOS nachgewiesen (Saini *et al*, 2006). Bislang ist bekannt, dass endogenes NO das Rollen, die Adhäsion sowie die Migration von PMN inhibiert (Secco *et al*, 2003). Die genauen Mechanismen, über die die verfügbare NO Menge reguliert wird, konnten bisher nicht gezeigt werden.

4.3.1 VORAUSSETZUNGEN

Als Voraussetzung dafür, dass im Organismus erhöhte ADMA Konzentrationen einen Einfluss auf die NO Synthese in neutrophilen Granulozyten nehmen können, muss das ADMA entweder direkt in den PMN gebildet werden oder aber es muss in die Zellen hineingelangen können. Es muss also zunächst geklärt werden, ob ADMA über entsprechende Transportsysteme in diese Zellen gelangen kann.

4.3.1.1 DER TRANSPORTER SLC7A1 IN PMN

Wie unter 1.3.3 beschrieben, ist der Transporter für ADMA wie auch für Arginin die SLC7A Familie, dessen am meisten verbreiteter und bereits in Makrophagen beschriebener Vertreter SLC7A1 ist. Im Folgenden wurden deshalb Western Blots mit isolierten neutrophilen Granulozyten auf dieses Transportprotein gemacht.

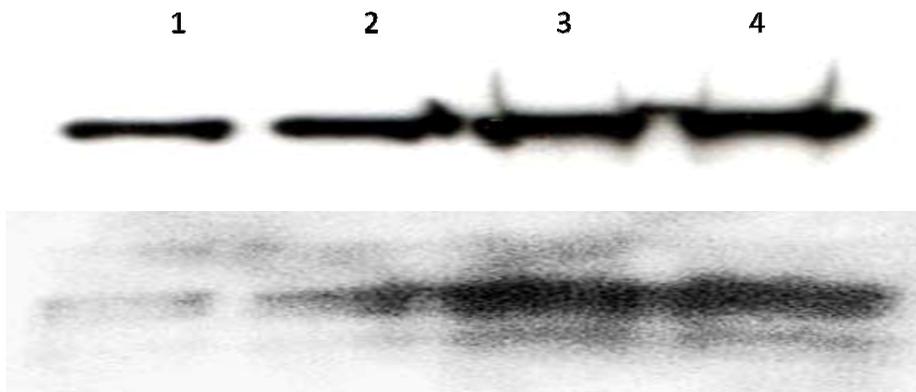


Abbildung 32: **Western Blot vom SLC7A1 Transporter mit α Aktin (obere Bande) als Ladekontrolle.** In Spur 1 wurden 250.000 Zellen verwendet, in 2 500.000, in 3 1.000.000 und in Spur 4 2.000.000 Zellen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Bande vom Transporter proportional zur Ladekontrolle mit steigender Zellzahl ansteigt.

Die Abbildung zeigt, dass der Transporter SLC7A1 in isolierten PMN vorhanden ist. Die Menge an Transporterprotein steigt proportional zur Menge der Ladekontrolle, also der Zellzahl an. Der Nachweis des SLC7A1 Transporters in den PMN legt den Schluss nahe, dass zirkulierendes ADMA in neutrophile Granulozyten gelangen kann.

4.3.1.2 ADMA IN PMN

Da der Transporter in der Membran der PMN vorhanden ist, sollte nun gezeigt werden, dass sich tatsächlich ADMA in diesen Zellen befindet und dass es möglich ist, die intrazelluläre ADMA Konzentration durch die Zugabe von externem ADMA zu steigern. Dies dient dem Nachweis, dass der Transporter aktiv ist und ADMA in die Zelle hineinbefördert. Dazu wurden PMN isoliert und Immunfluoreszenzaufnahmen mit bzw. ohne ADMA Inkubation der Zellen durchgeführt.

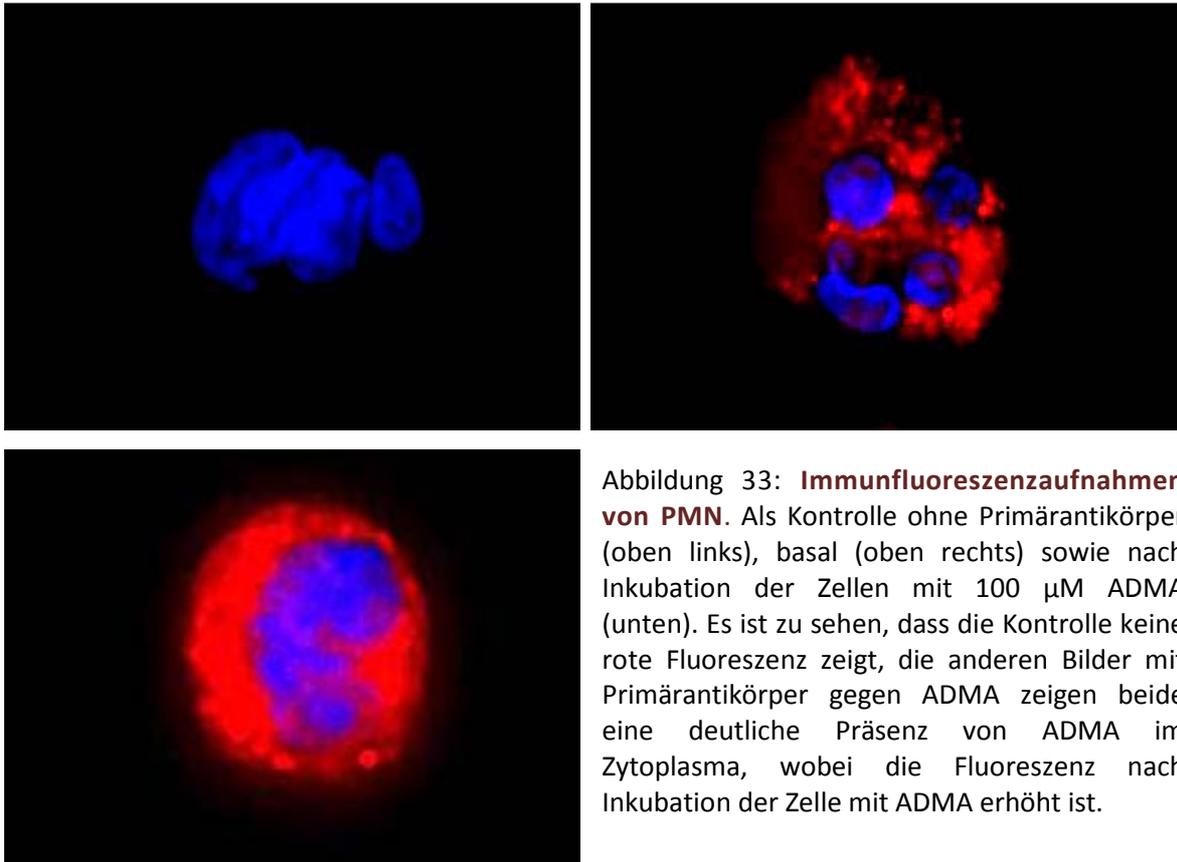


Abbildung 33: **Immunfluoreszenzaufnahmen von PMN.** Als Kontrolle ohne Primärantikörper (oben links), basal (oben rechts) sowie nach Inkubation der Zellen mit 100 μM ADMA (unten). Es ist zu sehen, dass die Kontrolle keine rote Fluoreszenz zeigt, die anderen Bilder mit Primärantikörper gegen ADMA zeigen beide eine deutliche Präsenz von ADMA im Zytoplasma, wobei die Fluoreszenz nach Inkubation der Zelle mit ADMA erhöht ist.

Die Kontrolle ohne Erstantikörper (oben links) zeigt nur den segmentierten Zellkern nach DAPI Färbung in blau, keinerlei rote Fluoreszenz, weshalb ausgeschlossen werden kann, dass PMN eine Eigenfluoreszenz aufweisen oder der Sekundärantikörper unspezifisch an die Zellen bindet. Im zweiten Bild (oben rechts) wurden die Zellen ebenfalls permeabilisiert, um dem Antikörper zu ermöglichen, in die Zelle hinein zu gelangen. Anhand der roten Fluoreszenz wird deutlich, dass ADMA im Zytoplasma detektiert wurde. Wurden die Zellen zusätzlich vor dem Permeabilisieren mit ADMA vorinkubiert, wird die Fluoreszenz noch stärker (unten). Aus dieser Tatsache wurde geschlossen, dass ADMA über die SLC7A1 Transporter in der Membran in die Zelle eingeschleust werden konnte.

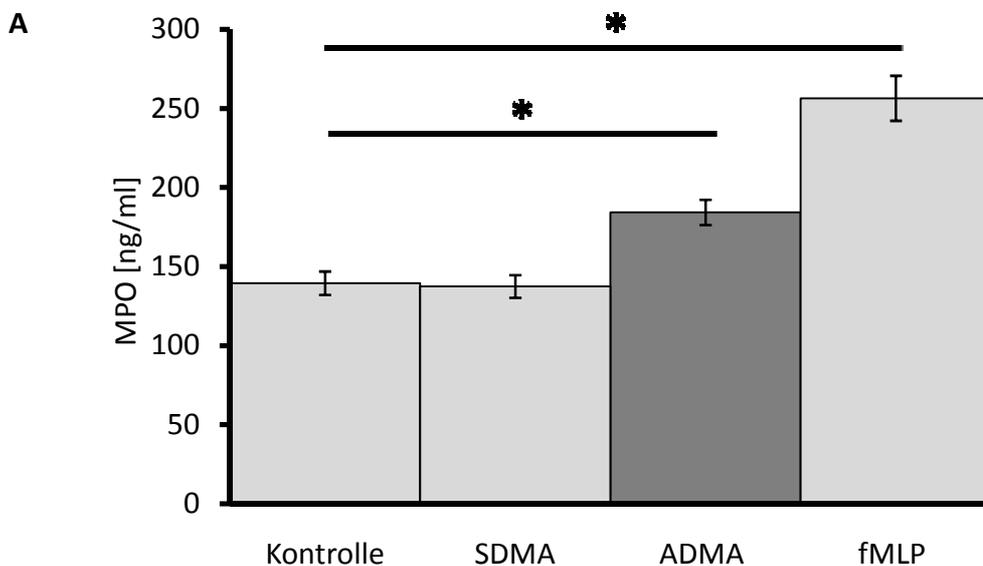
4.3.2 ADMA AKTIVIERT PMN

Es wurde unter 4.3 bereits dargestellt, dass NO für PMN wichtig ist, um die Aktivierung der Zellen zu verhindern. Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Rolle ADMA als endogener Inhibitor der NO Synthase, der in der Lage ist, in die PMN zu gelangen und dort zu akkumulieren (siehe 4.3.1.1) dabei spielt.

4.3.2.1 ADMA FÜHRT ZUR DEGRANULIERUNG VON PMN

Sowohl MPO als auch Elastase sind Proteine, die sich in spezifischen Granula der neutrophilen Granulozyten befinden und nur nach erfolgter Degranulierung freigesetzt werden. Ist also im Überstand der isolierten PMN eines dieser Proteine nachweisbar, spricht dies für eine Aktivierung und damit einhergehende Degranulierung der PMN. Im Folgenden wurden daher die Überstände auf MPO und Elastase untersucht.

	Stimulus	Mittelwert	SEM	Anzahl
MPO	Kontrolle	139,55	7,40	6
	SDMA	137,50	7,17	6
	ADMA	184,30	7,94	6
	fMLP	256,40	14,24	6
	Elastase	Kontrolle	4,89	0,39
Elastase	SDMA	5,72	0,25	5
	ADMA	7,41	0,65	5
	fMLP	9,76	0,88	5



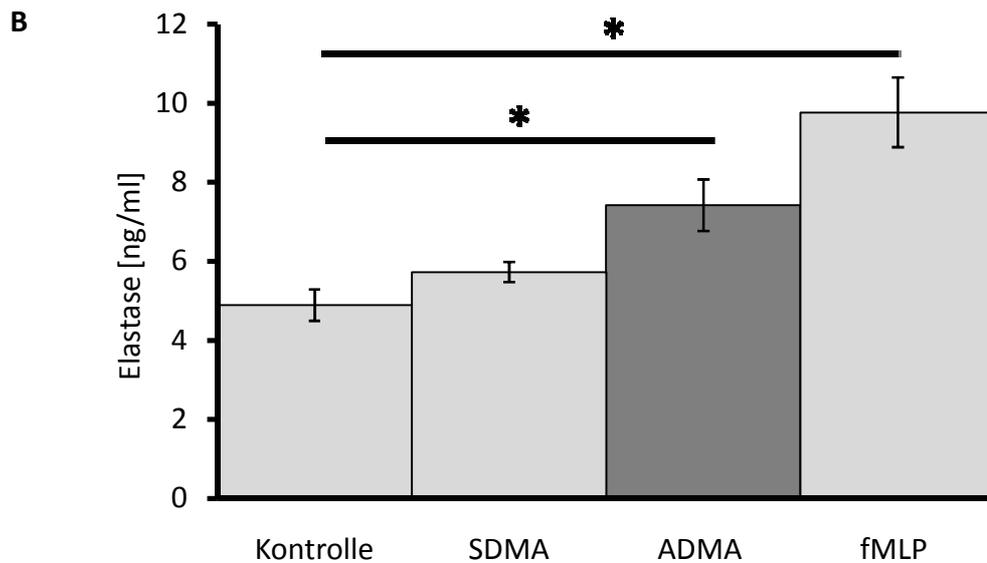


Abbildung 34: **MPO (A) und Elastase (B) Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten.** Beide Grafiken zeigen das gleiche Ergebnis: Durch eine Inkubation der PMN mit 100 μM ADMA kann eine Freisetzung von beiden Proteinen hervorgerufen werden. Dieser Effekt ist nach Inkubation mit 10 μM fMLP noch stärker ausgeprägt, bei 100 μM SDMA hingegen kommt es zu keiner verstärkten Freisetzung von MPO oder Elastase im Vergleich zur Kontrolle.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass PMN nach erfolgter ADMA Inkubation offenbar degranulieren, da beide untersuchten Proteine, MPO und Elastase, in den Überständen signifikant erhöht waren. fMLP Inkubation führte zu einem ähnlichen Bild, allerdings bei beiden Proteinen sogar stärker als ADMA. SDMA scheint keinen Effekt zu haben, die Proteine wurden beide auf Kontrollniveau detektiert.

4.3.2.2 ADMA INDUZIERT SUPEROXIDFREISETZUNG AUS PMN

Der oxidative *burst* ist die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies durch PMN und Kennzeichen ihrer Aktivierung (siehe 1.5.2). Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Konfrontation von neutrophilen Granulozyten mit ADMA ausreicht, um diese Reaktion auszulösen.

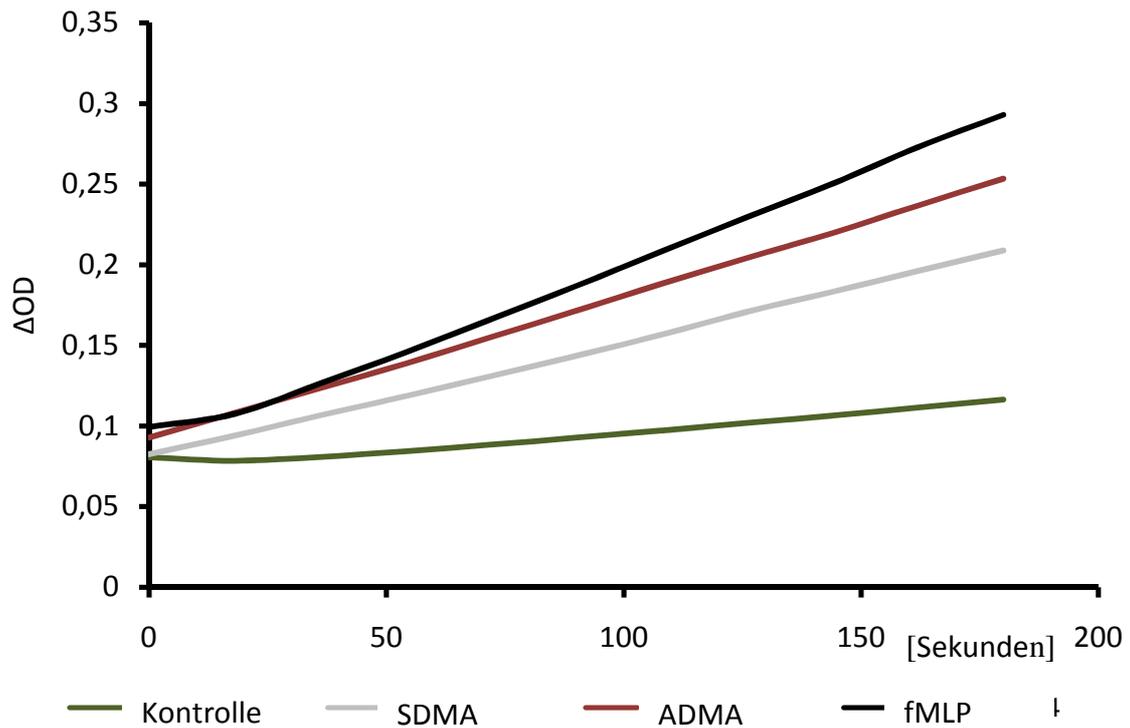


Abbildung 35: **Ergebnis einer Superoxidmessung in PMN.** Durch die Inkubation der Zellen in SDMA ist ein leichter Anstieg der freigesetzten Superoxidmenge zu sehen, dieser Effekt ist bei ADMA Inkubation noch verstärkt. Am meisten Radikale werden durch die Inkubation der Zellen mit fMLP freigesetzt.

Diese Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis der Superoxidmessung. Zur weiteren Auswertung wurden die Messungen mehrfach wiederholt und die Änderung der Absorption pro Minute pro 1.000.000 Zellen als Ausdruck freigesetzter Superoxidmenge bestimmt.

Stimulus	Mittelwert	SEM	Anzahl
Kontrolle	0,27	0,21	6
SDMA	0,46	0,28	7
ADMA	0,71	0,25	13
fMLP	1	0	13

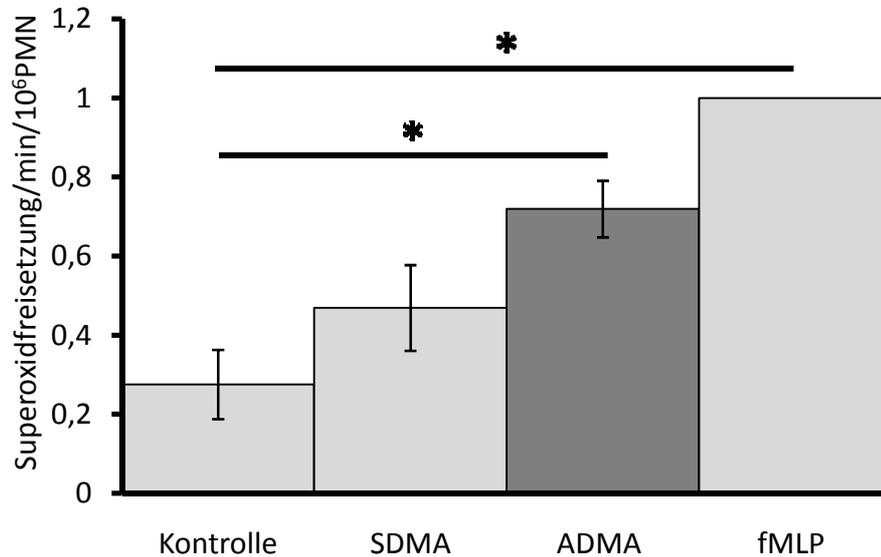


Abbildung 36: **Ergebnisse der Superoxidmessung in PMN nach Inkubation mit SDMA, ADMA, fMLP oder nur Puffer.** Es ist deutlich zu sehen, dass die Zellen durch Inkubation mit ADMA signifikant mehr Superoxid produzieren als unter Kontrollbedingungen nur mit Puffer. SDMA Inkubation liefert hingegen keinen signifikanten Anstieg. Am meisten Radikale werden durch die Inkubation der Zellen mit fMLP freigesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass ADMA offenbar in der Lage ist, ähnlich wie die bekannte chemoattraktive Substanz fMLP einen oxidativen *burst* auszulösen. Auch nach SDMA Inkubation ist ein leichter jedoch nicht signifikanter Anstieg der Superoxidmenge. Um sicherzustellen, dass auch tatsächlich MPO für diese Produktion verantwortlich ist, wurden im Folgenden weitere Untersuchungen durchgeführt.

4.3.2.3 ADMA ERHÖHT DIE MPO AKTIVITÄT IN PMN

Durch den gewählten Assay war es möglich, die Aktivität von MPO in der Zellsuspension zu messen. MPO kann nur dann aktiv sein, wenn die PMN degranuliert sind, weil das MPO ansonsten nicht aktiv ist, wie unter 1.4 beschrieben.

Stimulus	Mittelwert	SEM	Anzahl
Kontrolle	0,04	0,01	6
SDMA	0,03	0,01	6
ADMA	0,06	0,01	6
fMLP	0,08	0,01	6

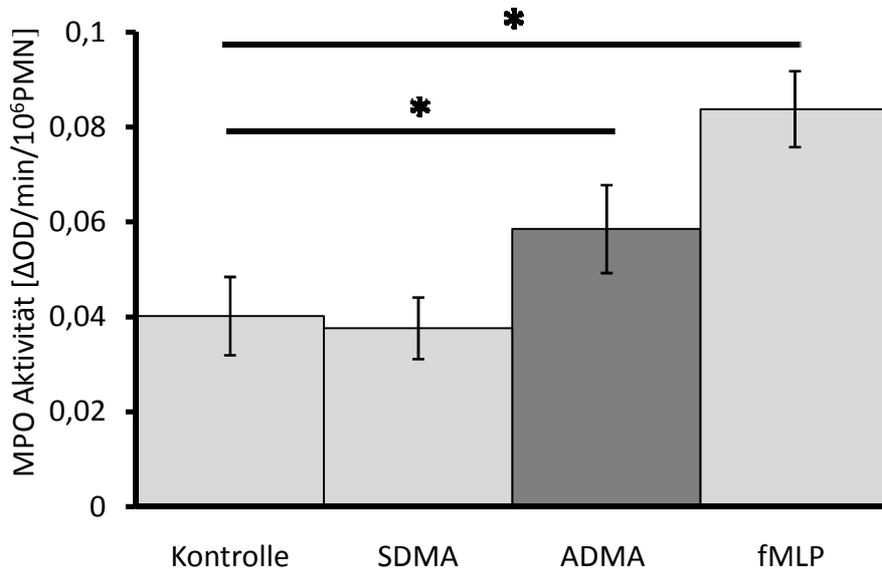


Abbildung 37: **MPO Aktivität in PMN nach Inkubation mit SDMA, ADMA, fMLP oder nur Puffer.** Die Zellen haben durch Inkubation mit ADMA signifikant mehr MPO Aktivität als unter Kontrollbedingungen nur mit Puffer oder SDMA. Am höchsten ist die MPO Aktivität durch die Inkubation der Zellen mit fMLP.

ADMA hat auch in diesem Versuch einen Effekt auf die PMN, wenn auch schwächer ausgeprägt als nach Behandlung mit fMLP. PMN entwickeln nach ADMA Inkubation eine höhere MPO Aktivität als unter Kontrollbedingungen. SDMA Inkubation hingegen führt zu keinerlei Unterschieden in der MPO Aktivität verglichen mit der Negativkontrolle.

4.3.2.4 ADMA HEMMT DIE NO SYNTHESE IN PMN

Die vorherigen Versuche zeigen, dass ADMA einen aktivierenden Einfluss auf neutrophile Granulozyten besitzt. Im Folgenden sollte der Mechanismus dahinter untersucht werden. Da bekannt ist, dass ADMA ein potenter NOS Inhibitor ist, wurde untersucht, ob ADMA seine Effekte auf PMN über eine Hemmung der dort exprimierten nNOS und iNOS ausübt.

Hierzu wurde isotopenmarkiertes ^{15}N -Arginin eingesetzt, um die Aktivität der NOS zu bestimmen.

Stimulus	Mittelwert	SEM	Anzahl
SDMA	3,92	0,38	4
ADMA	2,18	0,50	4

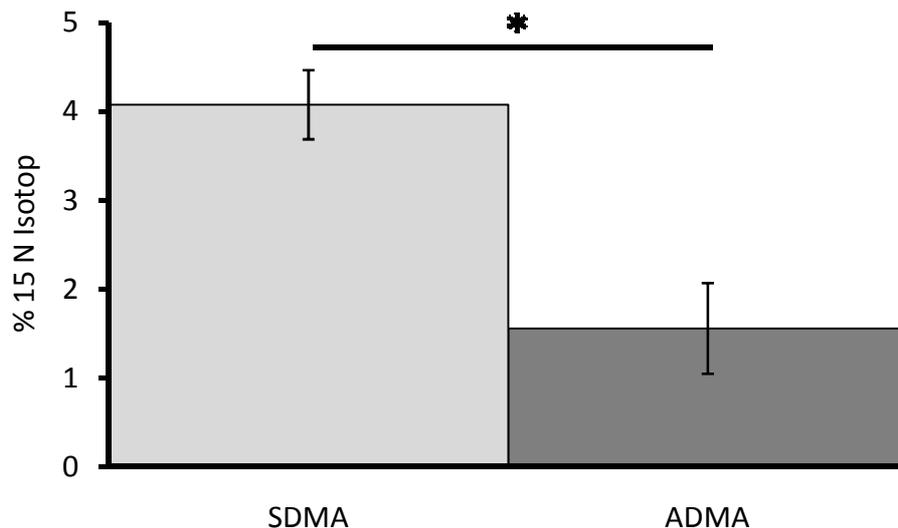


Abbildung 38: **Hemmung der NOS Aktivität in PMN durch ADMA.** Es ist eine signifikante Hemmung der NOS nach Inkubation der Zellen mit ADMA zu sehen. SDMA hatte keinen Effekt.

Es konnte gezeigt werden, dass ADMA die NO Synthasen in PMN signifikant hemmt. Die Zugabe von ADMA zu den Zellen reicht aus, um den Umsatz von markiertem Arginin um mehr als die Hälfte zu senken. Somit ist es denkbar, dass die aktivierenden Effekte von ADMA über diesen Mechanismus ausgeübt werden.

4.3.2.5 ADMA INFUSION FÜHRT ZUR AKKUMULATION VON MPO *IN VIVO*

Nachdem die vorherigen *in vitro* Versuche zeigten, dass ADMA in der Lage ist, eine Aktivierung von PMN zu induzieren, sollte im Folgenden untersucht werden, ob dieser Effekt auch *in vivo* stattfindet.

Hierzu wurden Mäusen mit ADMA befüllte Pumpen implantiert, nach der definierten Zeit von 28 Tagen wurde das Blut entnommen und darin die MPO Mengen bestimmt.

Stimulus	Tage	Mittelwert	SEM	Anzahl
ADMA	0	58	5	6
	28	99	21	6
NaCl	0	50	8	6
	28	58	9	6

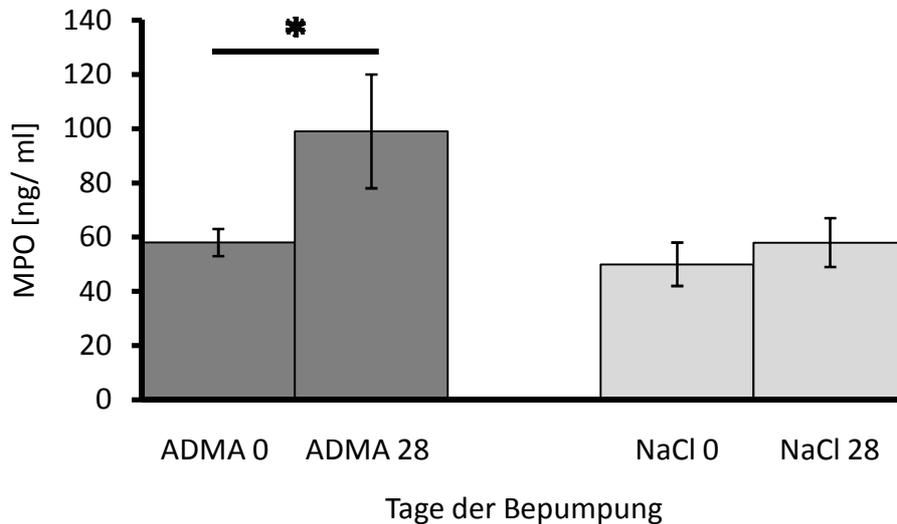


Abbildung 39: **Messung der MPO Konzentrationen in ADMA/ SDMA bepumpten Wildtyp Tieren.** Es ist nach 28 Tagen ein signifikanter Anstieg von MPO in den Tieren messbar. Die Kontrolltiere, die mit NaCl bepumpt wurden, zeigen keinen signifikanten Anstieg. Basal ist ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar.

Auch *in vivo* ist ADMA in der Lage, einen Anstieg von MPO zu induzieren. Dies bestätigt die vorherigen *in vitro* Versuche. Den Kontrolltieren wurde ebenfalls eine Pumpe implantiert, diese war mit NaCl gefüllt. Bei diesen Tieren konnte kein signifikanter Anstieg von MPO beobachtet werden, so dass der Effekt bei den ADMA Pumpen tatsächlich auf dem infundierten ADMA und nicht auf einem generalisierten unspezifischen inflammatorischen Reiz der Pumpenimplantation beruhen.

4.3.3 ADMA FÜHRT ZU ADHÄSION VON PMN

Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Endothel ist ein frühes Stadium ihrer Rekrutierung zu inflammatorischen Läsionen (Marks *et al*, 1989). NO ist ein Regulator der Adhäsion, wie unter 1.2 näher beschrieben. Die vorherigen Versuche zeigten bereits, dass ADMA in der Lage ist, PMN zu aktivieren und eine Degranulierung auszulösen, im

Folgendes soll darüber hinaus untersucht werden, ob ADMA auch eine verstärkte Adhäsion dieser Zellen an das Endothel induzieren kann.

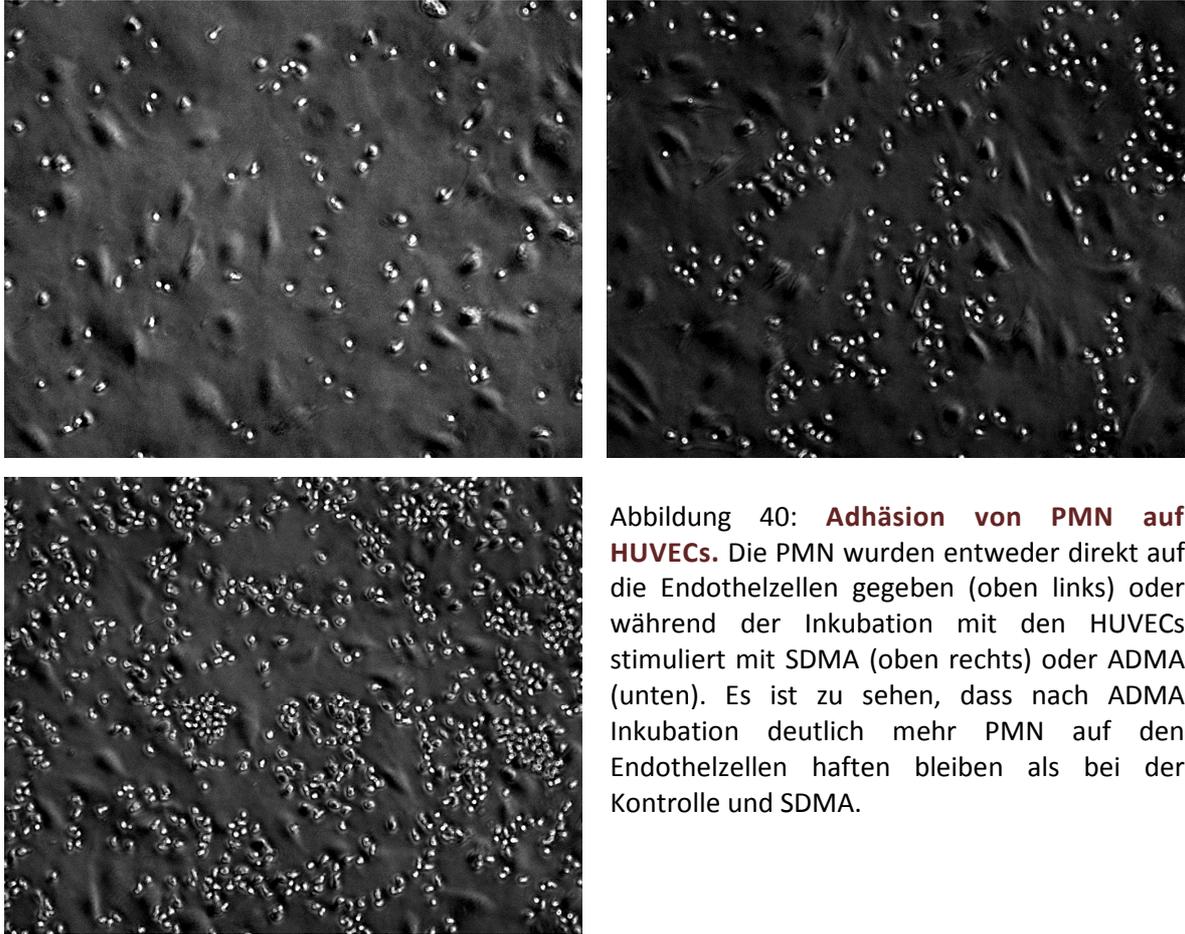


Abbildung 40: **Adhäsion von PMN auf HUVECs.** Die PMN wurden entweder direkt auf die Endothelzellen gegeben (oben links) oder während der Inkubation mit den HUVECs stimuliert mit SDMA (oben rechts) oder ADMA (unten). Es ist zu sehen, dass nach ADMA Inkubation deutlich mehr PMN auf den Endothelzellen haften bleiben als bei der Kontrolle und SDMA.

Die Bilder zeigen, dass auch schon ohne Stimulation (oben links) einige vereinzelte PMN an die HUVECs binden. Es lässt sich nicht vermeiden, dass bei der Isolierung einige Zellen aktiviert werden, da die Prozedur mehrfaches Zentrifugieren sowie direkte Zellkontakte beinhaltet. Bei Inkubation der Zellen mit SDMA (oben rechts) auf den Endothelzellen sind etwas mehr PMN gebunden als bei der Kontrolle. Bei den mit ADMA inkubierten Zellen allerdings sind deutlich die meisten Zellen an die HUVECs gebunden. Dieses Experiment konnte zeigen, dass ADMA in der Lage ist, die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen zu induzieren. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurde im Folgenden der gleiche Ansatz vorbereitet, die PMN wurden aber zusätzlich fluoreszenzmarkiert, so dass die Menge an gebundenen Zellen an den Endothelzellen über die Menge an Fluoreszenz detektiert werden konnte.

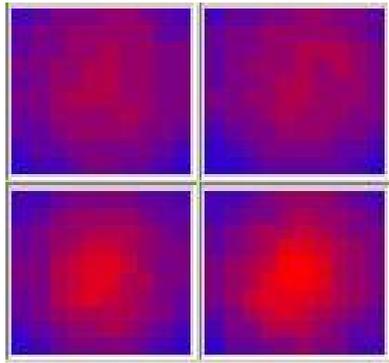


Abbildung 41: **Fluoreszenzmarkierte PMN im Fluorometer.** Oben zu sehen ist eine Doppelbestimmung mit SDMA inkubierten Zellen, unten deutlich stärker eine Doppelbestimmung nach ADMA Inkubation.

Stimulus	Mittelwert	SEM	Anzahl
SDMA	42,98	2,63	6
ADMA	85,41	17,48	6

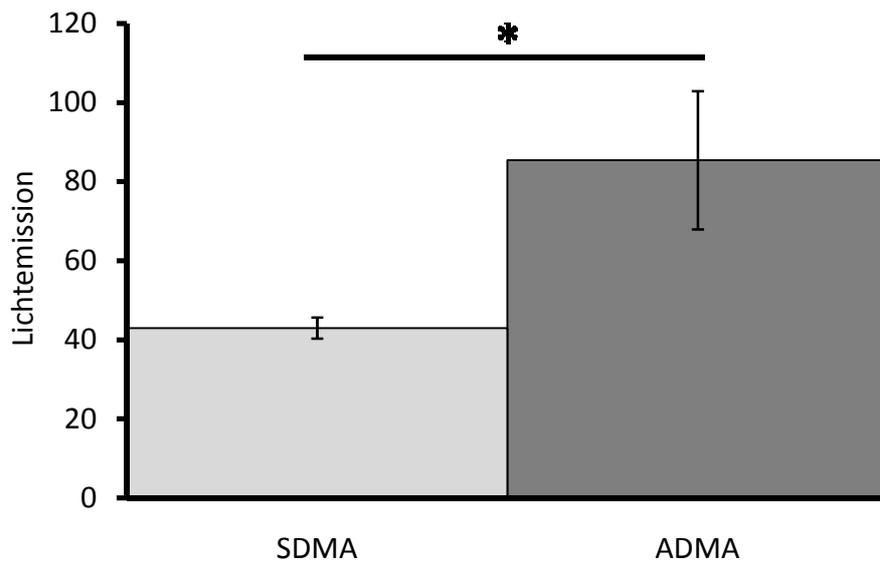


Abbildung 42: **Auswertung der Adhäsionsversuche im Fluorometer.** Mit 100 μ M ADMA stimulierte PMN adhäreren signifikant mehr an Endothelzellen als mit 100 μ M SDMA behandelte. Die Werte wurden auf unbehandelte Kontrollen normalisiert.

Die Auswertung zeigt, dass ADMA als Stimulus ausreicht, um eine Adhäsion von PMN an Endothelzellen zu induzieren. Mit SDMA inkubierte PMN hingegen zeigen zwar mehr Adhäsion als die Kontrollzellen, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant.

5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt um zu untersuchen, ob zwei bislang als unabhängig voneinander betrachtete Wege der Verringerung der NO Bioverfügbarkeit durch einerseits gesteigerte NO Inaktivierung durch MPO Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten und andererseits der reduzierten NO Synthese durch Akkumulation von ADMA isoliert voneinander zu betrachten sind oder sich gegenseitig beeinflussen und verstärken können. Nachdem eine Interaktion zwischen ADMA und MPO grundsätzlich bestätigt werden konnte, wurden die dahinterstehenden Mechanismen der gegenseitigen Regulation weiter charakterisiert. Im Folgenden sollen die Ergebnisteil beschriebenen Experimente interpretiert und zu den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen in Beziehung gesetzt werden.

Das vom Endothel freigesetzte Stickstoffmonoxid ist der potenteste endogene Vasodilator, es übt seine Effekte über die Stimulierung der löslichen Guanylatzyklase zur cGMP Bildung aus (Murad *et al*, 1996). NO ist somit ein Modulator des Blutflusses und des Blutdruckes, beeinflusst aber auch die vaskuläre Struktur durch die Inhibierung der Interaktionen der zirkulierenden Blutbestandteile mit der Gefäßwand: Thrombozytenaggregation und Adhäsion von Leukozyten sind bei einem gesunden Endothel kaum vorhanden (Stamler *et al*, 1989), der Verlust von NO hingegen forciert die Entstehung von vaskulären Läsionen (Cayatte *et al*, 1994). Eine Verminderung der NO Bioverfügbarkeit tritt bereits in frühen Stadien vaskulärer Erkrankungen auf und wirkt bei der Initiation und Progression von Arteriosklerose mit. Die Mechanismen der endothelialen Dysfunktion sind multifaktoriell und abhängig von der Art der vaskulären Störung. Sie kann sowohl auf eine erhöhte Menge an Vasokonstriktoren oder eine verringerte Menge an Vasodilatoren zurückgeführt werden.

Bei der Verringerung der vasodilatorischen Einflüsse kommen vor allem Veränderungen im NO Signalweg in Frage, deren mögliche Ursachen im Folgenden dargestellt und untersucht werden:

- Verringerung der NO Halbwertszeit
- Verringerung der Sensitivität gegenüber NO
- Verringerung der NOS Expression oder
- Verringerung der NOS Aktivität.

Experimentelle Belege gibt es für jeden dieser Mechanismen. Eine erhöhte Ausschüttung von Superoxiden im Gefäß ist meist die Folge von Arteriosklerose und deren Risikofaktoren (Ohara *et al*, 1993). Die Halbwertszeit von NO ist unter Bedingungen von oxidativem Stress stark reduziert (Rubanyani *et al*, 1985), es kommt zu zellulären Schäden wie der Zerstörung von Zellmembranen, Signalkaskaden und letztlich zum Absterben ganzer Zellen (Beckman *et al*, 1996). Zu diesen oxidativen Enzymssystemen, die für den oxidativen Stress in der Gefäßwand verantwortlich sind, zählt die Myeloperoxidase. Im Gegensatz zu den oxidierenden Substanzen und Enzymen verlängern Antioxidantien die NO Halbwertszeit, verstärken die NOS Expression und stellen die Endothelfunktion wieder her (Ramasamy *et al*, 1999). In späteren Stadien der Arteriosklerose wird eine reduzierte NO Sensitivität beobachtet, vermutlich durch die Inaktivierung von NO oder der löslichen Guanylatzyklase als NO Effektormolekül. Außerdem ist unter diesen pathologischen Bedingungen eine verringerte Expression der NOS beschrieben (Oemar *et al*, 1998). Letztlich hat die intensive Forschung auf diesem Gebiet in den vergangenen Jahren zeigen können, dass endogene Inhibitoren der NOS für die Dysfunktion des endothelialen Vasodilatators bei Patienten mit koronaren und peripheren Arterienerkrankungen sowie einer Vielzahl anderer kardiovaskulärer Krankheiten (1, Abbildung 2) verantwortlich sind. Bei diesen Inhibitoren handelt es sich um ADMA und L-NMMA. Da Untersuchungen aber ergaben, dass ADMA in zehnfach höheren Konzentrationen im Organismus vorkommt als L-NMMA, stand in dieser Arbeit ADMA im Fokus der Untersuchungen.

Um den Einfluss von ADMA auf den NO Signalweg zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell gewählt, welches durch die Überexpression der humanen DDAH 1, also dem ADMA metabolisierenden Enzym, eine um etwa dreißig Prozent erniedrigte ADMA Plasmakonzentrationen aufweist. Dieses Modell wurde zwar bereits von verschiedenen

Arbeitsgruppen untersucht (2.4), für die Ziele dieser Arbeit jedoch war es zunächst nötig, eine weitere Charakterisierung vorzunehmen (4.1). Es sollte geklärt werden, ob es durch eine Verringerung des zirkulierenden NOS Inhibitors zu Änderungen in der Expression der am NO Weg beteiligten Enzyme und folglich eventuell zu einer Änderung des weiteren NO Signalweges kommt. Es zeigte sich, dass es durch die starke Expression der hDDAH 1 in den untersuchten Geweben Leber und Niere (4.1.1) zu einer kompensatorischen, jedoch nicht statistisch signifikanten Herunterregulierung der Expression der murinen DDAH 1 sowie DDAH 2 kommt. Auch die Expression der NOS Isoformen eNOS und iNOS wurde untersucht, in beiden Organen fand sich in den transgenen Tieren eine signifikant verringerte Expression (4.1.2). Auch dies lässt auf einen Rückkopplungsmechanismus schließen: Da sich in den DDAH transgenen Tieren weniger ADMA in der Zirkulation befindet (4.1.3), wird die NOS nicht inhibiert und kann so viel mehr NO produzieren als bei den Wildtypen, bei denen das ADMA die NO Synthese behindert. Als Reaktion auf die höhere NO Produktion wird bei den DDAH 1 transgenen Tieren offenbar die Genexpression der NOS Formen inhibiert, da ansonsten zu viel NO gebildet werden würde, welches für die Zelle in großen Mengen, wie etwa unter septischen Bedingungen, zytotoxisch wirkt (Leiper *et al*, 2002). NO ist außerdem in der Lage, die Zysteine der DDAH zu nitrosylieren und so das aktive Zentrum zu inaktivieren (Knipp *et al*, 2003). Es gelang der Arbeitsgruppe um Leiper zu zeigen, dass es einen Regelkreis zwischen NO Synthese und DDAH Aktivität gibt: Wird viel NO gebildet, so wird die DDAH dadurch inaktiviert, die ADMA Konzentrationen steigen und verhindern so durch die Inhibierung der NOS die weitere NO Produktion. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Regulierung nicht nur auf Ebene der Enzymaktivität sondern zusätzlich auf Genexpressionsebene stattfindet.

Die ADMA und SDMA Plasma Konzentrationen beider Tiergruppen, DDAH 1 transgene Mäuse sowie Wildtypen, wurden basal gemessen, sowie, basierend auf der großen Bedeutung die NO im Rahmen septischer Vorgänge spielt, nach intraperitonealer Gabe von LPS (Lipopolysaccharide). Es handelt sich hierbei um ein etabliertes Sepsismodell: Bei der gewählten LPS Dosis wird in Mäusen eine Sepsis induziert, die nach etwa 36-48 Stunden zum Tod der Tiere durch Multiorganversagen führt. Dabei stellt LPS ein hoch

potentes biologisches Bakteriengift dar, welches das murine Abwehrsystem mit seinen Mediatoren selbst zum Angreifer werden lässt. Die Reaktion des Immunsystems auf das Endotoxin gerät dabei außer Kontrolle und führt zu einer Überreaktion (Scheibel *et al*, 2007). Es kommt im Verlauf zu einer Organdysfunktion und zu Gerinnungsstörungen, bis hin zum Schock mit Multiorganversagen (Cohen *et al*, 2002). Vier Stunden nach LPS Gabe wurden die Tiere sakrifiziert und ihr Blut zur ADMA und SDMA Messung entnommen. Es zeigte sich (4.1.3) wie bereits von anderen Arbeitsgruppen dargestellt (Leiper *et al*, 1999), dass die transgenen Tiere wie erwartet signifikant niedrigere ADMA Konzentrationen aufweisen als die Wildtypen, wobei die SDMA Konzentrationen sich nicht unterscheiden. Dies liegt daran, dass durch die Überexpression der DDAH 1 mehr ADMA metabolisiert werden kann, wobei SDMA kein Substrat für dieses Enzym darstellt, sondern lediglich über die Nieren ausgeschieden wird. Nach induzierter Sepsis kommt es bei den Wildtyp Tieren zu einem starken und signifikanten Anstieg von ADMA, bei den transgenen Tieren ist dies nicht der Fall. Dieser Befund ist damit zu erklären, dass bei den Wildtypen unter septischen Bedingungen durch Induzierung der iNOS und generellem oxidativem Stress, z.B. durch MPO Freisetzung aus den neutrophilen Granulozyten das redoxsensitive Enzym DDAH stark geschädigt wird und das ständig neu gebildete ADMA nicht mehr metabolisieren kann: Es akkumuliert. Bei den hDDAH 1 Tieren findet grundsätzlich derselbe Mechanismus statt, allerdings haben sie einen Überschuss an DDAH, so dass nicht alle Enzyme durch oxidativen Stress inaktiviert werden und ADMA nach wie vor metabolisiert werden kann. Die SDMA Konzentrationen steigen bei beiden Tiergruppen als Ausdruck eingeschränkter Nierenfunktion unter der Sepsis signifikant an.

Die vorherigen Versuche lassen bereits vermuten, dass aufgrund der verringerten NOS Inhibitor Konzentration mehr NO in den hDDAH 1 transgenen Tieren gebildet wird. Dies konnte bereits von anderen Gruppen gezeigt werden (Konishi *et al*, 2007). Um zu evaluieren, ob eine erhöhte NO Bildung tatsächlich einen verstärkten Reiz zur Vasodilatation bedingt, wurde im Folgenden der Einfluss einer verstärkten Synthese von NO auf seinen weiteren Signalweg hin untersucht. Wie unter 1.2.2 beschrieben, stimuliert das gebildete NO die cGMP Produktion durch die lösliche Guanylatzyklase (sGC), daraus resultiert dann die Aktivierung der Proteinkinase 1 (cGK1), die letztlich das Vasodilator

stimulierte Phosphoprotein phosphoryliert (Melichar *et al*, 2004). Die Menge dieser Proteine sowie der Phosphorylierungsgrad von VASP wurden in den Aorten von Wildtyp-Tieren sowie den hDDAH 1 transgenen Tieren bestimmt (4.1.4). Es konnte eine klare Relation zwischen einer gesteigerten NO Bioverfügbarkeit bei den hDDAH 1 Mäusen und einer signifikant erhöhten Proteinmenge von sGC und cGK1 festgestellt werden verglichen mit den Wildtypen. Auch der Anteil an phosphoryliertem VASP am gesamten VASP war signifikant erhöht.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dann der NO Signalweg auch im MPO knockout Mausmodell untersucht. Diese Tiere haben durch die MPO Defizienz eine verlängerte Halbwertszeit von NO im Organismus, da dieses nicht vom MPO inaktiviert werden kann. Wie nach den Ergebnissen unter 4.1.4 bei den hDDAH 1 transgenen Tieren zu erwarten war, zeigte sich auch bei den MPO knockout Tieren eine statistisch signifikante Erhöhung der Proteinmenge der NO Signalmoleküle (4.2.4). Somit konnte für den weiteren Verlauf der Arbeit davon ausgegangen werden, dass beide Mausgruppen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen mehr bioverfügbares NO besitzen, bei den hDDAH 1 Tieren wegen verstärkter NO Synthese, bei den MPO knockout Mäusen wegen der verlängerten Halbwertszeit des Radikals.

5.1 HYPOTHESE 1

Es wurde in diesem Teil der Arbeit die Hypothese untersucht, dass eine verstärkte MPO Sezernierung *per se* in der Lage ist, eine Akkumulation von ADMA zu induzieren. Ein wichtiger Mechanismus, über den MPO die ADMA Konzentrationen modulieren könnte wurde in 4.2.2 überprüft. MPO könnte die Expression der DDAH auf Genebene ändern, woraus eine veränderte Synthese der DDAH und somit ein geänderter ADMA Metabolismus resultieren würde: Oxidantien wie die MPO Produkte sind verantwortlich für Gewebeschäden und provozieren Onkogenese, ihre pathophysiologische Rolle in der Modifizierung von Nukleobasen und Aminosäuren ist weitreichend erforscht. Ihre Fähigkeit, Proteine und DNA zu *crosslinken* jedoch wurde kaum beachtet, obwohl reversible DNA Protein Interaktionen der Schlüssel zur Genexpression, DNA Replikation und Reparatur sind. Die Gruppe um Patricia konnte zeigen, dass HOCl als

Reaktionsprodukt der MPO sowohl Einzel- als auch Doppelstrang DNA an Proteine *crosslinken* kann (Patricia *et al*, 2001). Dies ist ein bislang völlig neuer Mechanismus, über den HOCl seine toxischen Effekte ausübt. Die Autoren der Untersuchungen unterstreichen die Tatsache, dass die Effizienz des DNA Protein *crosslinking* nicht groß sein muss, um entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Funktion auszuüben: Durch HOCl können beispielsweise Transkriptionsfaktoren permanent an Promotoren gebunden werden oder Polymerasen an Gene, so dass die Transkription dauerhaft geändert wird. Es ist außerdem denkbar, dass HOCl auch RNA und Proteine *crosslinken* kann, was die Anordnung und Funktion der Ribosomen schädigen könnte. Es wird davon ausgegangen, dass HOCl als kleines membrandiffundierendes Molekül in den Zellkern gelangen müsste, um dort auf die DNA treffen zu können. Dies wäre aufgrund der hohen Reaktivität schwierig. Da die Gruppe um Murao 1988 zeigen konnte, dass MPO selbst in der Lage ist, in den Kern zu gelangen und dort zu akkumulieren ist auch diese Möglichkeit, dass die MPO im Kern aktiv ist und dort HOCl freisetzt, welches dann mit der DNA interagieren kann, denkbar und wahrscheinlicher. Es wurden in dieser Arbeit die Genexpressionsprofile am ADMA Metabolismus beteiligter Proteine von Wildtypmäusen mit denen der MPO knockout Tiere verglichen (4.2.2.1). Es zeigte sich, dass die MPO knockout Tiere ca.14 mal soviel DDAH 1 in beiden untersuchten Organen exprimieren als die Wildtypen. Somit ist es gelungen, eine Beteiligung von MPO an der Genexpression nachzuweisen. Es wurde dann die Spezifität dieses Effekts dadurch gezeigt, dass ebenfalls die Genexpression der DDAH 2 beider Tiergruppen analysiert wurde, hier wurde kein Unterschied festgestellt. Um zu sehen, ob MPO an weiteren Expressionsänderungen von Proteinen aus dem ADMA Stoffwechsel beteiligt ist, wurden anschließend die PRMTs untersucht (4.2.2.2): Auch hier ändert MPO die Expression. Die ADMA generierenden PRMTs 1,3 und 6 wurden signifikant weniger exprimiert, während die SDMA generierende PRMT 5 tendenziell stärker exprimiert wird.

Es konnte also gezeigt werden, dass MPO die Akkumulation von ADMA dadurch verstärkt, dass sie die Expression des ADMA metabolisierenden Enzyms DDAH 1 drastisch vermindert und außerdem die Bildung von ADMA durch vermehrte Expression der entsprechenden PRMTs begünstigt.

Es bleibt die Frage, ob die gesteigerte NO Bioverfügbarkeit (4.2.4) und die stärkere NOS Aktivität (4.2.6) der MPO knockout Tiere allein auf weniger ADMA zurückgeführt werden kann, oder ob auch hier MPO die Genexpression ändert (4.2.2.3). Es wurde deshalb die Expression beider relevanter NOS Formen, iNOS und eNOS untersucht. Tatsächlich exprimieren die MPO knockout Tiere mehr von beiden Isoformen sowohl in Leber als auch Nierengewebe. Dies ließ sich auch auf Proteinebene bestätigen (4.2.3): Auch im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die MPO knockout Tiere signifikant mehr eNOS und iNOS Protein haben als die Wildtypen. Auch hier also greift MPO regulatorisch in die Gen- bzw. daraus resultierend auch in die Proteinexpression ein.

Im Folgenden soll ein weiterer möglicher Mechanismus beschrieben werden, über den MPO den ADMA Metabolismus beeinflussen kann. Ergebnisse vorheriger Studien haben gezeigt, dass die DDAH Aktivität direkt über eine S-Nitrosylierung des aktiven Zentrums reguliert wird (Menne *et al*, 2006). Ein möglicher Mediator dieser Reaktion könnte NO sein, wobei es damit eine negative Rückkopplung auf seine eigene Synthese ausüben würde: Eine Hemmung der DDAH hat einen Anstieg von ADMA und somit eine Verringerung der NOS Effizienz zur Folge. Jedoch ist nicht nur NO in der Lage, die DDAH Aktivität zu modulieren (1.3.5). Auch mehrere oxidative Enzymsysteme kommen hierfür in Frage. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde getestet, ob die Reaktionsprodukte der MPO ebenfalls zu einer Inhibierung der DDAH fähig sind und ob *in vivo* eine solche Reaktion bestätigt werden kann. Hierzu wurde zunächst überprüft, ob die beiden Proteine DDAH und MPO intrazellulär derartig lokalisiert sind, dass eine Interaktion zwischen ihnen möglich wäre, denn das durch die MPO freigesetzte HOCl ist sehr reaktiv und führt direkt nach Bildung unspezifisch zu Oxidationsschäden an allen Makromolekülen der Zelle (Bergt *et al*, 2004). Die Versuche mit MPO inkubierten Endothelzellen zeigten eine klare Kollokalisierung der DDAH 1 mit MPO (4.2.1): Beide Proteine akkumulieren im Zytoplasma sowie am oder im Kern. Dies wäre nur mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops genau zu differenzieren. Für diese Arbeit ist jedoch die Aussagekraft hinreichend, dass beide Enzyme aufgrund ihrer Lokalisation in der Zelle miteinander interagieren können. Es gibt verschiedene denkbare Möglichkeiten, wie diese Interaktion aussehen könnte: Zum Einen ist eine direkte Protein Protein Interaktion, also eine Wechselwirkung der Proteine durch

unmittelbaren Kontakt möglich. Solche Interaktionen werden über nicht kovalente Wechselwirkungen (Van der Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindung) der Aminosäurereste zwischen den beteiligten Proteinen vermittelt. Dabei können sich beide Proteine wechselseitig in ihrer Konformation beeinflussen. Eine solche Änderung der Konformation hat meist gleichzeitig eine Funktionsänderung des jeweiligen Proteins zur Folge (u.a. Aktivierung oder Inaktivierung). Protein Protein Interaktionen finden meist sehr spezifisch an bestimmten dafür vorgesehenen Domänen der beteiligten Proteine statt. Tatsächlich geht man davon aus, dass jedes Protein Interaktionen mit durchschnittlich mindestens drei anderen Proteinen eingeht (Uetz und Pohl, 2004), für die DDAH sind solche Stellen allerdings bislang nicht beschrieben. Die zweite Möglichkeit einer Interaktion beinhaltet keine direkte Bindung beider Proteine, vielmehr wird vermutet, dass die Produkte der MPO Aktivität wie HOCl an der DDAH Schäden verursachen, die dann zu einer Aktivitätsänderung führen. Eine redoxensitive Inhibierung der DDAH ist durch die Sauerstoffradikale Superoxid und Peroxynitrit wie auch NO beschrieben (Leiper *et al*, 2002). Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde isolierte DDAH 1 mit MPO selbst oder nur mit dem Reaktionsprodukt HOCl inkubiert und dann die DDAH Aktivität gemessen (4.2.5). Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von MPO und ihren Substraten tatsächlich eine deutliche ca. sechsfache Verringerung der DDAH Aktivität zur Folge hat, der Effekt mit HOCl allein war sogar noch stärker. Die Inkubation der DDAH mit inaktivierter MPO hingegen führte zu keiner Änderung der DDAH Aktivität verglichen mit der Kontrolle. Dies lässt darauf schließen, dass die MPO über den zweiten beschriebenen Weg Einfluss auf die DDAH Aktivität nimmt: Wäre eine direkte Protein Protein Interaktion Auslöser der Aktivitätsänderung, so würde auch inaktive MPO diesen Effekt ausüben, hingegen die Zugabe von HOCl ohne MPO sollte keinen Effekt haben. Dies ist jedoch nicht der Fall. Nur wenn die zugegebene MPO aktiv ist oder wenn ihr Reaktionsprodukt HOCl direkt zugegeben wird kommt es zu einer Inhibierung der DDAH.

Diese Ergebnisse ließen sich auch mit homogenisiertem Leber- und Nierengewebe bestätigen: Die MPO knockout Tiere weisen eine stärkere DDAH Aktivität auf als die Wildtypen, wenn auch dieser Unterschied in der Leber klein und deshalb nicht signifikant ist. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die individuelle DDAH Aktivität jeder

Maus ein wenig variiert, weshalb eine signifikante Unterscheidung beider Tiergruppen nur in Organen höchster DDAH 1 Expression wie der Niere möglich ist.

Aus einer geänderten DDAH Aktivität sollte auch eine Änderung der NOS Aktivität resultieren: Da die MPO knockout Tiere eine gesteigerte DDAH Aktivität aufweisen, ist davon auszugehen dass diese Tiere weniger ADMA besitzen und somit weniger Hemmung der NOS erfolgt, die somit aktiver sein müsste. Es wurde daher *in vivo* die NOS Aktivität in den Tieren gemessen (4.2.6): In der Tat ist die Aktivität in den MPO knockout Tieren bereits basal signifikant höher als bei den Wildtypen. Da MPO unter diesen Bedingungen allerdings nur in sehr geringem Maß freigesetzt wird und die NOS Aktivität nach induzierter iNOS unter septischen Bedingungen erst einen kritischen maximalen Wert erreicht, wurde in den Tieren ebenfalls unter diesen pathologischen Bedingungen im bereits beschriebenen LPS Sepsismodell die NOS Aktivität gemessen. Es zeigte sich, dass die NOS Aktivität als Ausdruck der nun eingeschalteten iNOS bei den Wildtyptieren leicht ansteigt, während sich die sowieso schon stärkere Aktivität bei den KO Tieren nochmals verdoppelte. Dies ist dadurch zu erklären, dass es zwar bei beiden Tiergruppen zu einer Induzierung der iNOS kommt (dies wurde mit entsprechenden realtime PCR Versuchen bestätigt, Daten nicht gezeigt), die ausgeschüttete MPO jedoch führt zur Inaktivierung der DDAH, somit zu einer Akkumulation von ADMA. ADMA kann somit alle Formen der NOS in einem solchen Ausmaß hemmen, dass es nur zu einem schwachen Anstieg der NOS Aktivität kommt. Bei den MPO knockout Tieren hingegen ist kein MPO vorhanden, welches die DDAH hemmen könnte. Somit wird hier das ADMA weiterhin metabolisiert und es kommt zum starken Anstieg der NOS Aktivität. Um diese Theorie zu bestätigen, wurden die ADMA sowie SDMA Plasmakonzentrationen in den beiden Tiergruppen bestimmt (4.2.7). Wie zu erwarten war, haben die MPO knockout Tiere unter septischen Bedingungen signifikant weniger zirkulierendes ADMA als die Wildtyptiere als Ausdruck der noch aktiven DDAH, welche nur bei den Wildtyp von den freigesetzten MPO Produkten inhibiert wird. Die SDMA Werte hingegen unterscheiden sich weder basal noch nach LPS in beiden Gruppen, denn es wird anders als ADMA ausschließlich über die Nieren ausgeschieden und nicht enzymatisch metabolisiert. Der Anstieg in beiden Gruppen nach LPS Gabe ist somit mit der stark eingeschränkten Nierenfunktion unter septischen

Bedingungen zu erklären. Basal ist zwar eine Tendenz feststellbar, nach der weniger ADMA in den MPO knockout Tieren vorliegt. Dieser Trend ist statistisch betrachtet jedoch nicht signifikant. Dies überrascht zunächst, kann aber damit begründet werden, dass basal nur sehr wenig MPO freigesetzt wird, welches sich dann nicht primär in der Zirkulation sondern im Gewebe aufhält. Entsprechende Versuche wurden durchgeführt (Daten nicht gezeigt) und ergaben signifikant weniger ADMA in den MPO knockout Tieren in der Niere. Diese Arbeit konnte somit zeigen, dass MPO über die Inaktivierung der DDAH zu einer Akkumulation von ADMA führt, zur Vervollständigung dieser Ergebnisse wurden abschließend die Auswirkungen auf die physiologischen Parameter Herzfrequenz und Blutdruck getestet. Hierzu wurden diese Parameter bei Wildtypen und MPO knockout Tieren unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen nach LPS Gabe miteinander verglichen. Basal konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, dies kann erneut auf die geringen MPO Konzentrationen, die unter diesen Bedingungen freigesetzt werden, zurückgeführt werden. Nach LPS Gabe hingegen war bei den MPO knockout Mäusen ein massiver Blutdruckabfall zu beobachten, dieser fiel bei den Wildtypen signifikant schwächer aus. Hierfür kommen zwei Erklärungen in Betracht: Entweder haben die MPO knockout Tiere eine stark verschlechterte Herzleistung oder stark erweiterte Gefäße. Da bei beiden Tierkollektiven eine ähnliche Herzfrequenz gefunden wurde, lässt vermuten dass der Blutdruckabfall auf einer verstärkten Vasodilatation bei MPO knockout Tieren beruht. Bei den Wildtypentieren bewirkte die unter LPS erfolgende MPO Ausschüttung einerseits eine Inaktivierung des gebildeten NO wie in 4.2.4 beschrieben und andererseits eine Inaktivierung der DDAH wie in 4.2.5 gezeigt, welche wiederum zu einer Akkumulation von ADMA führt (4.2.7). Beides resultiert in einer Eindämmung der überschießenden NO Produktion im Rahmen der LPS induzierten Sepsis durch die iNOS, die Gefäße werden also nur geringfügig erweitert. Bei den MPO knockout Tieren hingegen fehlt die MPO Ausschüttung, so dass das gebildete NO nicht inaktiviert wird und die DDAH weiterhin ADMA metabolisiert, der NO Synthese wird nicht entgegengewirkt. NO als starker Vasodilator bewirkt dann eine starke Gefäßerweiterung, die Ursache für den beobachteten massiven Blutdruckabfall.

Diese Erkenntnisse implizieren, dass MPO nicht nur schädigende Effekte hat, sondern dass die MPO induzierte Inaktivierung der DDAH mit konsekutiver ADMA Akkumulation auch als negativer *feedback* Mechanismus verstanden werden kann, durch den der Organismus vor weiterem Schaden bewahrt wird.

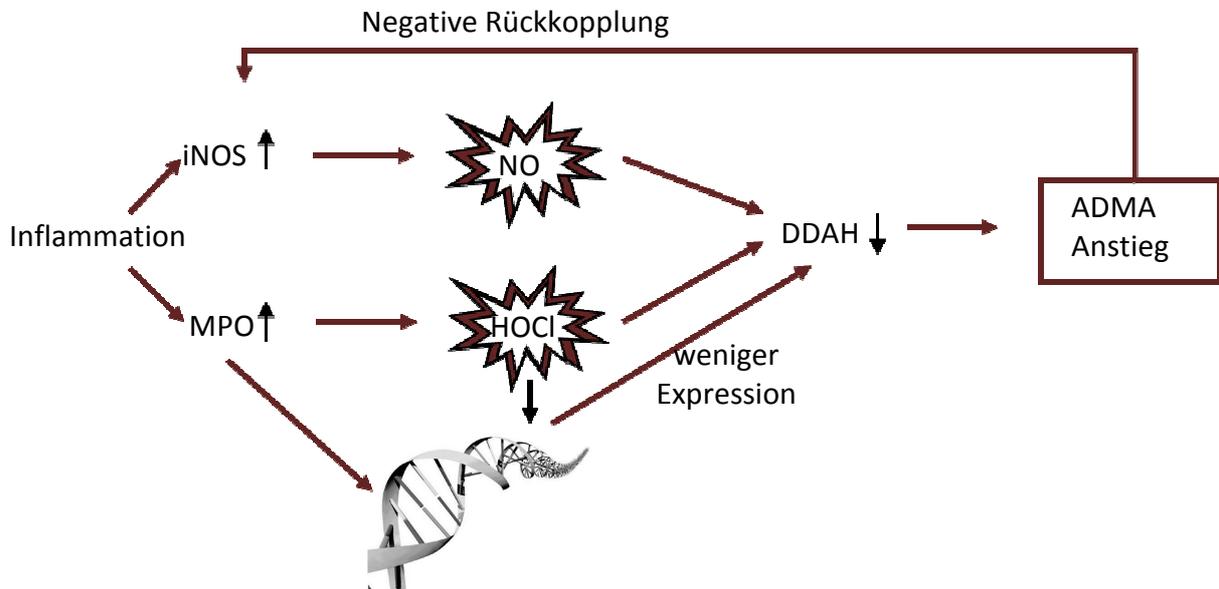


Abbildung 43: **Die Mechanismen, über die MPO die Akkumulation von ADMA induziert.** Im Rahmen von inflammatorischen Zuständen im Organismus wird die Expression der iNOS induziert und MPO wird von den PMN freigesetzt. Die jetzt aktive iNOS produziert große Mengen NO, durch die MPO Aktivität wird HOCl gebildet. Beide Reaktionsprodukte verringern durch Oxidation die Aktivität der DDAH. MPO und HOCl inhibieren zusätzlich die Transkription des DDAH 1 Gens und verringern so dessen Expression, dies verringert die Enzymaktivität zusätzlich. Durch den verminderten Abbau kommt es zu einem Anstieg der ADMA Konzentration.

Insgesamt wurde die erste Hypothese, dass MPO in der Lage ist, eine Akkumulation von ADMA zu induzieren, bestätigt. Es konnten mehrere Mechanismen identifiziert werden, über die MPO ihre Wirkungen ausübt (Abbildung 43): Zum Einen verringert das MPO Reaktionsprodukt HOCl die DDAH Aktivität und zum Anderen verändert MPO die Genexpression mehrerer am ADMA Stoffwechsel beteiligter Enzymsysteme. Beide Wege haben so die gleiche Konsequenz und ergänzen einander: Es kommt zur verstärkten Synthese und verringertem Abbau und somit zur MPO induzierten Akkumulation von ADMA.

5.2 HYPOTHESE 2

Die Mechanismen, über die ADMA als endogener NOS Inhibitor diese Effekte ausüben kann sind bislang nicht untersucht worden. Die Rolle von NO in der inflammatorischen Antwort des Organismus in verschiedenen pathologischen Zuständen ist aber bereits gut verstanden (Nussler *et al*, 1993): Während bislang meist das im Endothel gebildete NO für die nach erfolgter Induzierung einer Inflammation entstehenden Gewebeschäden verantwortlich gemacht wird, könnten auch die migrierenden inflammatorischen Zellen wie PMN deutlich zur NO Produktion beitragen und selbst Quellen der NO Synthese am Ort der Entzündung sein. Neutophile produzieren *in vitro* 10- 100 nM/5min/10⁶Zellen NO, ähnlich viel wie auch Endothelzellen (Salvemini *et al*, 1989). Daher könnten PMN, die immerhin bis zu 60 % der zirkulierenden Leukozyten darstellen, die vollständige für den Organismus benötigte NO Menge in der Zirkulation zur Verfügung stellen. Inflammatorische Zustände wie eine Sepsis (Ochoa *et al*, 1991) sind mit einer Hochregulation der iNOS und resultierenden erhöhten NO Mengen in Plasma und Urin assoziiert (Wheeler *et al*, 1997). Diese Erkenntnisse dienen als Grundlage für die nachfolgenden Experimente: Es wurde vorausgesetzt, dass neutrophile Granulozyten NO über die nNOS und iNOS produzieren (Saini *et al*, 2006) und dass das gebildete NO die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, Adhäsion und Migration verhindert (Secco *et al*, 2003). Es wurde daher in dieser Arbeit untersucht, inwiefern ADMA als Inhibitor der NO Synthese in diese Mechanismen eingreifen und sie ändern kann. Daher wurde zunächst überprüft, ob ADMA zu den NO Synthasen in PMN vordringen kann, um diese dann zu inhibieren. Dazu wurde das für ADMA zuständige Transportsystem SLC7A1 in PMN untersucht: Es wurde bisher in Neuronen, im Endothel sowie in Makrophagen beschrieben (Schmidt *et al*, 1993). Tatsächlich konnte dieser Transporter nun ebenfalls in isolierten PMN nachgewiesen werden (4.3.1.1). Somit kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur endogenes ADMA in den PMN als Inhibitor agieren kann, sondern auch das zirkulierende ADMA kann in die PMN aufgenommen werden und dort wirken. Als nächstes wurde untersucht, ob dieser Prozess auch tatsächlich stattfindet. Es wurde mittels Immunfluoreszenz das in PMN vorhandene ADMA sichtbar gemacht (4.3.1.2), um außerdem zu zeigen, dass ADMA effektiv über die Transporter in die Zellen transportiert

wird. Außerdem wurde dargestellt, dass nach Inkubation der Zellen mit ADMA ein deutlicher Anstieg der in der Zelle vorhandenen ADMA Konzentration zu verzeichnen ist. Somit ist ADMA potentiell in der Lage, einen Einfluss auf die NO Synthese und damit auf die Aufrechterhaltung des inaktiven Zustands der PMN zu nehmen. Die Entwicklung von einem frei mit der Zirkulation fließenden neutrophilen Granulozyten zu einem aktivierten Zustand ist ein koordinierter Prozess: PMN reagieren auf sezernierte inflammatorische Mediatoren wie Zytokine mit der Freisetzung der Granulainhalte, also mit Degranulierung, um eventuelle eingedrungene Erreger unschädlich machen zu können. Die Rolle von Stickstoffmonoxid in diesem Prozess ist bislang zwar nicht vollständig aufgeklärt, ihm wird aber ein protektiver Effekt im Rahmen der Degranulierung zugeschrieben (Mócsai *et al*, 1999). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von ADMA auf die Aktivierung der PMN untersucht, dazu wurden die Zellen mit ADMA bzw. den entsprechenden Kontrollen inkubiert und anschließend einige Parameter untersucht, die für eine Aktivierung charakteristisch sind (4.3.2.1 bis 4.3.2.3). Es zeigte sich, dass die in den Granula der PMN befindlichen Substanzen MPO und Elastase nach ADMA Inkubation der Zellen auch in den Überständen, also außerhalb der Granula nachzuweisen waren. Ursache hierfür muss eine erfolgte und durch ADMA induzierte Degranulierung sein, ein bislang unbekannter Stimulus. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde in den Überständen der PMN die freigesetzte Menge an Superoxiden als Maß für den oxidativen *burst* nach Aktivierung der PMN sowie die Aktivität der Myeloperoxidase gemessen. Auch diese Versuche zeigten einen signifikanten Anstieg in beiden untersuchten Größen nach ADMA Inkubation der Zellen. ADMA konnte somit durch diese Versuche als neuer Mediator der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten identifiziert werden. Um Einsicht in den dahinterstehenden Mechanismus zu erhalten, wurde anschließend geprüft, ob ADMA in der Lage ist, die NO Synthesen der PMN zu hemmen. Es ist bereits bekannt, dass NO von diesen Zellen benötigt wird, um eine Aktivierung zu unterdrücken (Secco *et al*, 2003). Es konnte gezeigt werden (4.3.2.4), dass ADMA die NO Produktion der PMN inhibiert, so dass die in den vorherigen Versuchen beobachtete ADMA induzierte Aktivierung der PMN auf die Hemmung der intrazellulären NOS zurückzuführen ist.

Nach diesen *in vitro* erhobenen Erkenntnissen sollte untersucht werden, ob dieser Mechanismus auch *in vivo* relevant ist. Hierzu wurde Wildtyp-Tieren über vier Wochen ADMA infundiert (4.3.2.5), nach dieser Zeit wurde die MPO Konzentration im Plasma bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass es durch eine endogene Erhöhung der ADMA Konzentration zu einem signifikanten Anstieg der MPO Konzentrationen kommt. Bei den Kontrolltieren war kein signifikanter Effekt zu sehen, was bestätigt, dass in der Tat ausschließlich das infundierte ADMA zu den gestiegenen MPO Mengen führt.

Nachdem nun ADMA als aktivierender Stimulus der PMN identifiziert wurde, sollte nun der Einfluss von ADMA auf eine weitere wichtige Funktion der PMN untersucht werden: Die Adhäsion der Zellen an das Endothel als Grundlage für die nachfolgende Transmigration (Bienvenu *et al*, 1994). Die Rekrutierung von PMN an den Ort der Inflammation wird hauptsächlich bestimmt von Ereignissen, die in den betroffenen Regionen der Mikrovaskulatur stattfinden. Wenn die Leukozyten in Kontakt mit der Gefäßwand kommen, induzieren Faktoren der Endothelzellen bzw. der PMN selbst adhäsive Interaktionen zwischen diesen Zellen. Oftmals handelt es sich bei diesen Faktoren um Stoffe, die auch für die Aktivierung und Degranulierung der PMN verantwortlich sind. Da dies für ADMA gezeigt wurde, sollte untersucht werden, ob ADMA auch einen Einfluss auf die Adhäsion der PMN hat. Hierzu wurden PMN mit ADMA stimuliert und auf kultivierte Endothelzellen gegeben (4.3.3). Nachdem die ungebundenen PMN abgewaschen wurden, hatten in den Kontrollgruppen einige PMN an die Endothelzellen gebunden, da aufgrund der vorhergehenden Isolierung der Zellen eine Aktivierung einiger weniger Zellen nicht ausgeschlossen werden kann. Bei den mit ADMA stimulierten PMN allerdings war eine starke Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an die Endothelzellen zu sehen. Um diese Beobachtung quantifizieren zu können wurden die PMN fluoreszenzmarkiert und der Versuch wiederholt. Dabei diente die Menge an Fluoreszenz an den Endothelzellen als Maß für die Menge der daran gebundenen PMN. So wurde gezeigt, dass durch eine Inkubation mit ADMA mehr als doppelt so viele PMN an die Endothelzellen gebunden hatten als bei den Kontrollen, somit konnte ADMA auch für den Vorgang der Adhäsion der PMN als wichtiger Mediator identifiziert werden.

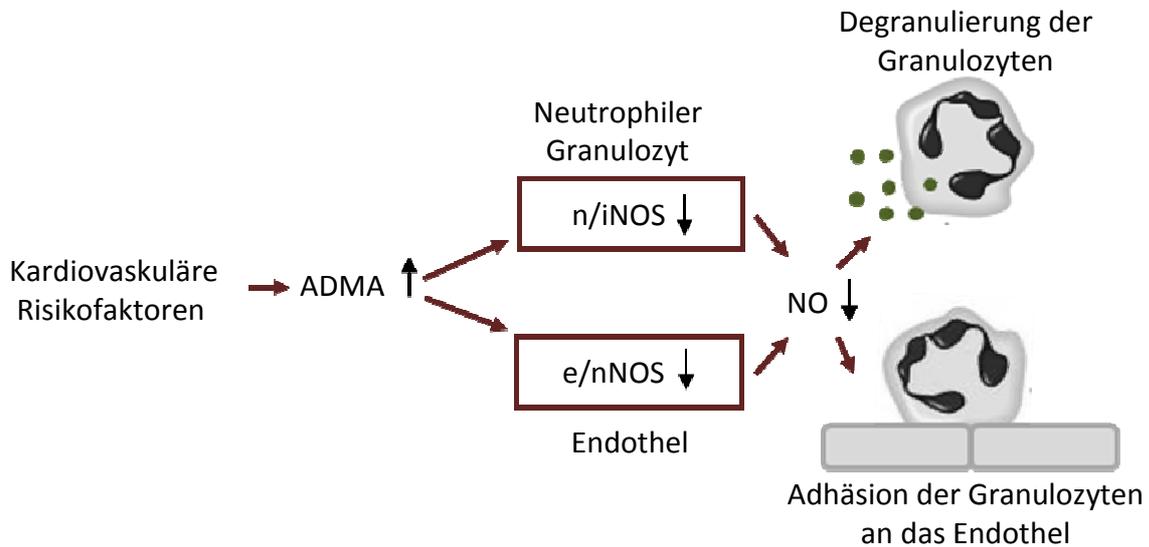


Abbildung 44: **Mechanismus der ADMA Wirkung auf neutrophile Granulozyten.** Durch verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren oder Erkrankungen kommt es zur Akkumulation von ADMA im Organismus. Dies führt zu einer endogenen Hemmung der NO Synthesen, besonders relevant sind hier die NOS der PMN sowie der Endothelzellen. Es wird weniger NO produziert, wodurch dessen protektive Effekte auf die Aufrechterhaltung eines inaktiven Zustandes der PMN nicht mehr ausgeübt werden können.

Insgesamt konnte die zweite Hypothese, dass ADMA in der Lage ist, die Sezernierung von MPO zu induzieren, bestätigt werden. Darüber hinaus wurden die Mechanismen untersucht, über die ADMA eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bewirkt (Abbildung 44). Durch die Inhibierung der leukozytären NO Synthesen sinken die NO Konzentrationen, dies führt zur Degranulierung, zur Auslösung des oxidativen *bursts* sowie zur Adhäsion der PMN an das Endothel.

6 AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde eine bislang unbekannte Interaktion von zwei Stoffwechselwegen aufgedeckt und charakterisiert. Die zugrunde liegenden Mechanismen konnten aufgezeigt und ausführlich beschrieben werden. Es verbleiben jedoch noch unbeachtete Teilaspekte, welche in nachfolgenden Projekten bearbeitet werden sollen.

In der ersten Hypothese konnte gezeigt werden, dass eine Sezernierung von MPO im Organismus über die Änderung der DDAH 1 Aktivität zum Einen und über die Änderung der Genexpression einiger für den ADMA Metabolismus relevanter Enzyme zum Anderen eine Erhöhung der ADMA Konzentrationen zur Folge hat. Es ist bereits bekannt, dass es sich bei der Myeloperoxidase um ein stark kationisches Protein handelt, welches nach der Sezernierung aus den Granula der PMN im Zytoplasma und auch im Zellkern akkumuliert (Murao *et al*, 1988). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die MPO im Kern die Genexpression einiger Proteine spezifisch und hocheffektiv ändert. Bislang unklar jedoch bleibt der exakte Mechanismus dahinter. Denkbar wäre einerseits, dass die MPO in Kern aktiv ist und somit HOCl freisetzt, welches Schäden an der DNA oder daran gebundenen Proteinen induziert und somit die Transkription betroffener Gene ändert. Dies würde jedoch unspezifisch stattfinden und nicht wie beobachtet spezifisch für bestimmte Gene. Daher ist es vorstellbar, dass MPO als eine Art Transkriptionsfaktor agiert und durch sequenzspezifische Bindung an die Promotorbereiche einiger Gene bindet. Hierfür wäre es sinnvoll, den regulatorischen Bereich (Promotor, Enhancer) vor einem Gen zu untersuchen, von dem bekannt ist, dass MPO die Expression ändert: DDAH 1 wäre eine gute Wahl. Der gesamte Bereich sollte mittels PCR in überlappende, kurze (200-300 bp) DNA Fragmente unterteilt werden und mit Hilfe eines EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) das Fragment und somit die Sequenz identifiziert werden, an das MPO bindet. Ein EMSA dient dem Nachweis von DNA bindenden Proteinen, wie eben Transkriptionsfaktoren. Es wird das zu testende Protein mit dem DNA Fragment und wenn möglich dem Antikörper gegen das Protein (*Supershift*) inkubiert und anschließend auf einem Poly AcrylamidGel ausgewertet. Hat das Protein an die DNA gebunden, so wandern diese Komplexe langsamer als freie DNA und können so identifiziert werden.

Im Rahmen der Experimente der zweiten Hypothese wurde festgestellt, dass ADMA über die Hemmung der NOS eine Aktivierung von PMN, eine Sezernierung von MPO und eine verstärkte Adhäsion bewirken kann. In dieser Arbeit wurden somit die Aspekte der Degranulierung sowie Adhäsion als Kennzeichen der Aktivierung untersucht, ein dritter relevanter Aspekt ist die Migration der Zellen. Die Migration aus dem Gefäßsystem in das umgebende Gewebe stellt einen zentralen Schritt bei der Entstehung von akuten inflammatorischen Zuständen dar und die Fähigkeit zur Migration ist die Hauptfunktion der PMN um zu den betroffenen Gewebsarealen zu gelangen. In einem Migrationsassay sollte überprüft werden, ob die Zellen entweder durch Stimulation mit ADMA eher zur Migration zu einem bekannten Stimulus hin neigen, oder sogar ob ADMA selbst als Chemotaxin agieren und einen solchen Stimulus darstellen könnte. Hierfür geeignet wäre ein System von Chemotaxis *slides* (ibidi), in dem beide Annahmen getestet werden könnten.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass MPO, bzw. die Produkte der MPO Aktivität wie HOCl, durch die Hemmung des ADMA metabolisierenden Enzyms DDAH zu einer Akkumulation von ADMA führen. Da die DDAH bereits von anderen (1.3.3) als sehr redoxsensitives Enzym beschrieben wurde, welches durch oxidativen Stress inaktiviert werden kann, wäre es folgerichtig möglich, dass nicht nur MPO als oxidatives Enzymsystem der PMN für die Inaktivierung in Frage kommt, sondern auch andere Komponenten in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Es wäre für weitere Studien sehr interessant zu untersuchen, ob eventuell auch bei anderen Enzymsystemen, welche für die Generierung von ROS verantwortlich sind, eine Interaktion mit ADMA nachzuweisen ist. Potenziell zu testende Enzyme wären beispielsweise die Xanthin Oxidase oder die NADPH Oxidase. Beide sind hinreichend charakterisiert und für beide gibt es entsprechende transgene Mausmodelle.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen sind charakterisiert durch verminderte vaskuläre Reaktivität und assoziiert mit erhöhter kardiovaskulärer Morbidität. Oxidativer Stress, gesteigerte Inflammation und reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid sind die zugrunde liegenden Mechanismen der Entstehung und Chronifizierung dieser Erkrankung. Es sind mehrere Wege bekannt, über die die Endothelfunktion beeinträchtigt werden kann: Die häufigsten Ursachen sind Verminderung der NO Synthese, Verminderung der Expression oder Aktivität des NO generierenden Enzyms, Erhöhung der endogenen Inhibitoren der NO Synthase oder Verminderung der Halbwertszeit im Organismus durch erhöhten Umsatz. Das in dieser Arbeit untersuchte asymmetrische Dimethylarginin verringert durch Konkurrenz mit dem physiologischen Substrat der NO Synthase Arginin die Bildung von NO und führt so zu einer Verminderung dessen Bioverfügbarkeit. Zum Anderen führt die Ausschüttung des ebenfalls untersuchten Enzyms Myeloperoxidase durch dessen enzymatische Aktivität zur Inaktivierung bereits gebildeten NOs sowie zur Entstehung von ROS und damit zu oxidativem Stress im Gefäß.

In dieser Arbeit wurde eine bislang unbekannt Interaktion dieser beiden bislang als unabhängig voneinander betrachteter Mediatoren des Arginin/NO Weges aufgedeckt und charakterisiert. Hierzu wurden zunächst zwei Hypothesen aufgestellt, mit deren Hilfe die Interaktionen näher beschrieben werden konnten: Zum Einen wurde gezeigt, dass MPO *per se* in der Lage ist, eine Akkumulation von ADMA über eine Inaktivierung des ADMA abbauenden Enzyms DDAH zu induzieren. Es wurde dargestellt, dass MPO und DDAH aufgrund ihrer intrazellulären Kolokalisation miteinander interagieren können. Diese Interaktion wurde dann zunächst *in vitro* bestätigt. Die Aktivität der DDAH wurde durch Zugabe von MPO oder ihrem Reaktionsprodukt HOCl äußerst potent inhibiert. Diese Inaktivierung der DDAH wurde dann *in vivo* bestätigt: Als Ausdruck inaktivierter DDAH kam es zum Anstieg von ADMA und dadurch zu einer Inaktivierung der NO Synthesen. Da MPO unter septischen Bedingungen verstärkt freigesetzt wird wurde die NOS Aktivität auch unter diesen pathologischen Bedingungen getestet. Es zeigte sich, dass MPO trotz Induzierung der iNOS und somit dramatischer Zunahme an potenziell NO produzierenden Enzymen selbst unter diesen Bedingungen in der Lage ist, eine Steigerung der NO

Produktion durch die Akkumulation von ADMA zu unterbinden. Neben der Inaktivierung der DDAH auf Proteinebene wurde ein weiterer Mechanismus aufgedeckt, über den MPO die DDAH Aktivität moduliert. MPO ändert die Genexpression der am ADMA Metabolismus beteiligten Enzymsysteme: Die Expression der DDAH 1 wird reduziert, während die Expression der ADMA generierenden Enzyme ansteigt, wodurch wiederum eine Akkumulation von ADMA resultiert. Durch diese Mechanismen ist MPO in der Lage, die Verminderung der NO Bioverfügbarkeit und die Entstehung und das Fortschreiten einer endothelialen Dysfunktion zu aggravierern.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Umkehrschluss der ersten Hypothese bewiesen, dass ADMA durch die Verringerung der NO Synthese in Granulozyten (PMN) zu einer verstärkten Sezernierung von MPO führt, wodurch die Zellen verstärkt mit oxidativem Stress konfrontiert werden. Zunächst wurde experimentell gezeigt, dass in neutrophilen Granulozyten der ADMA Transporter SLC7A1 vorhanden ist sowie, dass ADMA in diesen Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu MPO akkumuliert. Im nächsten Schritt wurde zunächst *in vitro* untersucht, inwiefern ADMA einen Einfluss auf die Aktivierung der PMN ausübt. Dazu wurden Parameter bestimmt, die für aktivierte PMN charakteristisch sind. Es zeigte sich, dass die Zellen durch ADMA Stimulation degranulieren und auch der typische oxidative *burst* ausgelöst wurde. Dieser Effekt konnte anschließend *in vivo* bestätigt werden: Durch die endogene Erhöhung von zirkulierendem ADMA wurden im Mausmodell erhöhte MPO Konzentrationen als Ausdruck erfolgter Degranulierung der PMN gemessen. Nachdem somit ADMA als neuer Stimulus für die Aktivierung von Granulozyten identifiziert werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob ADMA ebenfalls die Adhäsion dieser Zellen an das Endothel induzieren und somit die Grundlage für eine spätere Transmigration schaffen kann. Tatsächlich konnte ADMA auch für diese Funktion der PMN als neuer Stimulus identifiziert werden.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit eine Interaktion zwischen dem ADMA und MPO Stoffwechselweg nachgewiesen, welche von beiden Seiten ausgeht und so zur Verstärkung der einzelnen Signalwege führt. Da beide Wege bereits für sich genommen hohe Risiken für die Entstehung und Progression arteriosklerotischer Veränderungen bergen, bietet das Wissen um die hier untersuchte Interaktionen einen neuen Ansatz im Verständnis der Pathogenese sowie mögliche Therapieansätze dieser Erkrankung.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- 1 Todesursachen in den Industrienationen 2006.
- 2 Klinische Bilder mit erhöhten ADMA Plasma Konzentrationen.
- 3 Der Aufbau eines Gefäßes.
- 4 Die Effekte von Stickstoffmonoxid im Kardiovaskulären System.
- 5 Struktur von ADMA
- 6 Biosynthese, Metabolismus und Wirkung von ADMA
- 7 Flussdiagramm der Faktoren, die die Aktivität der DDAH beeinflussen.
- 8 Die Reaktion von MPO.
- 9 Der Vorgang der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Infektionsherd.
- 10 Osmotische Minipumpe
- 11 Telemetriesender
- 12 Darstellung eines typischen Bandenmusters auf einem Agarosegel.
- 13 Typisches Agarosegel zur Kontrolle der cDNA Synthese.
- 14 Ergebnis einer typischen realtime PCR.
- 15 Expression der humanen DDAH 1 in Leber- und Nierengewebe von Wildtypmäusen und DDAH transgenen Mäusen im Vergleich.
- 16 Expression der endogenen DDAH 1 und 2 in Lebergewebe (A) und Nierengewebe (B) von Wildtypmäusen und DDAH transgenen Mäusen im Vergleich.

- 17 Die relative Expression von eNOS und iNOS in Lebergewebe (A) und Nierengewebe (B) von Wildtyp und DDAH1 transgenen Mäusen im Vergleich.
- 18 ADMA und SDMA Konzentrationen im Plasma von transgenen Tieren und Wildtypen basal und nach Gabe von LPS.
- 19 Typisches Ergebnis sowie die Auswertungen eines Western Blots mit Antikörpern gegen das Haushaltsgen Aktin als Ladekontrolle, sGC, cGK1 sowie beiden Formen von VASP in Aortengewebe.
- 20 Immunfluoreszenzaufnahmen von HUVECs mit Antikörpern gegen DDAH1 (rot) und MPO (grün).
- 21 Expression der DDAH 1 und 2 in Lebergewebe (A) und Nierengewebe (B) von Wildtypmäusen und MPO knockout Tiere im Vergleich.
- 22 Expression der PRMT in Leber- und Nierengewebe bei Wildtyp und MPO knockout Tieren.
- 23 Die relative Expression von eNOS und iNOS in Lebergewebe (A) und Nierengewebe (B) von Wildtyp und MPO knockout Mäusen im Vergleich.
- 24 Ergebnisse der Western Blots von eNOS und iNOS in Aortengewebe.
- 25 Auswertung der Western Blots mit Antikörpern gegen das Haushaltsgen Aktin als Ladekontrolle, sGC, cGK1 sowie beiden Formen von VASP in Aortengewebe.
- 26 Modulierung der DDAH Aktivität durch MPO.
- 27 Modulierung der DDAH Aktivität durch MPO im Organhomogenat.
- 28 Aktivität der NOS in Wildtyp und MPO knockout Tieren.

- 29 ADMA und SDMA Konzentrationen im Plasma von MPO knockout Tieren und Wildtypen basal und nach Gabe von LPS.
- 30 Herzfrequenz bei Wildtyp Tieren und MPO knockout Tieren.
- 31 Blutdruckänderung nach LPS Gabe bei Wildtypen und MPO knockout Tieren.
- 32 Western Blot vom SLC7A1 Transporter mit α Aktin (obere Bande) als Ladekontrolle.
- 33 Immunfluoreszenzaufnahmen von PMN.
- 34 MPO (A) und Elastase (B) Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten.
- 35 Ergebnis einer Superoxidmessung in PMN.
- 36 Ergebnisse der Superoxidmessung in PMN nach Inkubation mit SDMA, ADMA, fMLP oder nur Puffer.
- 37 MPO Aktivität in PMN nach Inkubation mit SDMA, ADMA, fMLP oder nur Puffer.
- 38 Hemmung der NOS Aktivität in PMN durch ADMA.
- 39 Messung der MPO Konzentrationen in ADMA/ SDMA bepumpten Wildtyp Tieren.
- 40 Aufnahmen von adhären PMN auf HUVECs.
- 41 Fluoreszenzmarkierte PMN im Fluorometer.
- 42 Auswertung der Adhäsionsversuche im Fluorometer.
- 43 Die Mechanismen, über die MPO die Akkumulation von ADMA induziert.
- 44 Mechanismus der ADMA Wirkung auf neutrophile Granulozyten.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
bp	Basenpaare
BSA	(bovines) Rinderserum Albumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGK1	Proteinkinase 1
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DDAH +/-	hDDAH 1 transgen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
eNOS	endotheliale NO Synthase
hDDAH 1	humane DDAH 1
HOCl	hypochlorige Säure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
iNOS	induzierbare NO Synthase

i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
KO	knock out
LPS	Lipopolysaccharid
MPO	Myeloperoxidase
MPO -/-	MPO knockout
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NO Synthase
NO	<i>nitric oxide</i>
OD	optische Dichte
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PMN	neutrophiler Granulozyt
PRMT	Proteinmethyltransferase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SDMA	symmetrisches Dimethylarginin
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOD	Superoxiddismutase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht
VASP	Vasodilator stimuliertes Phosphoprotein
WT	Wildtyp

10 LITERATURVERZEICHNIS

Achan V, Broadhead M, Malaki M et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1455–1459

Achan V, Ho HK, Heeschen C, Stuehlinger M, Januarg JJ, Kimoto M, Vallance P, Cooke JP. ADMA regulates angiogenesis: genetic and metabolic evidence. *Vasc Med*. 2005 Februar; 10(1):7-14.

Albsmeier J. Bedeutung endogener Inhibitoren der NO Synthase für kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre pharmakologische Therapie. Hamburg 2004. Dissertation.

Andrew P.J. and Meyer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* 1999 43(3):521-531.

Aßmus UB, Untersuchungen zur Rolle von IKK β und IKK γ in akuten Schädigungsmodellen der Leber. Hannover 2004. Dissertation.

Baldus S, Rudolph V, Roiss M, Ito WD, Rudolph TK, Eiserich JP, Sydow K, Lau D, Szöcs K, Klinke A, Kubala L, Berglund L, Schrepfer S, Deuse T, Haddad M, Risius T, Klemm H, Reichenspurner HC, Meinertz T, Heitzer T. Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase. *Circulation*. 2006 April 18; 113(15):1871-8.

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

Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, Singh P, Anantharamaiah GM, Chait A, Brunzell J, Geary RL, Oram JF, Heinecke JW. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 31; 101(35):13032-7.

Biennu K, Harris N, Granger DN. Modulation of leukocyte migration in mesenteric interstitium. *Am J Physiol*. 1994 Oct; 267(4 Pt 2):H1573-7.

Birdsey GM, Leiper JM, Vallance P. Intracellular localization of dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpressed in an endothelial cell line. *Acta Physiol Scand* 168: 73–79, 2000.

Böger RH. Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med*. 2003 November; 41(11):1467-72.

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

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998 November 3; 98(18):1842-7.

Böger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev*. 2005 März; 10(1):14-23

Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res*. 2003 Oktober 1; 59(4):824-33.

Böger RH, Vallance P, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl*. 2003 Dezember; 4(4):1-3.

Böger RH. When the endothelium cannot say 'NO' anymore. ADMA, an endogenous inhibitor of NO synthase, promotes cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2003 November; 24(21):1901-2.

Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl*. 2003 Dezember; 4(4):23-8.

Boisvert MB et al. A proteomic analysis of arginine methylated protein complexes. *Mol Cell Proteomics*. 2003 Dezember; 2(12):1319-30.

Bos A, Wever R, Roos D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1978 Jul 7; 525(1):37-44.

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 Mai; 14(5):753-9

Celik T, Iyisoy A, Yuksel C, Jata B. The beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on serum asymmetric dimethylarginine levels in the patients with cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2008 Dezember 19.

Chen MF, Xie XM, Yang TL, Wang YJ, Zhang XH, Luo BL, Li YJ. Role of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reactions by angiotensin II. *J Vasc Res*. 2007; 44(5):391-402.

Cohen KD, Sarelius IH. Muscle contraction under capillaries in hamster muscle induces arteriolar dilatation via K(ATP) channels and nitric oxide. *J Physiol*. 2002 Mar 1; 539(Pt 2):547-55.

Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation*. 2004 Apr 20; 109(15):1813-8. Review.

Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 September; 20(9):2032-7.

Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl*. 2003 Dezember; 4(4):53-60.

Cooke JP. The pivotal role of nitric oxide for vascular health. *Can J Cardiol*. 2004 Aug; 20 Suppl B:7B-15B. Review.

Dayal S, Rodionov RN, Arning E, Bottiglieri T, Kimoto M, Murry DJ, Cooke JP, Faraci FM, Lentz SR. Tissue-specific downregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 August; 295(2):H816-25.

Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation*. 2003 Dezember 16; 108(24):3042-7.

Knipp M. How to control NO production in cells: N,N-dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase as a novel drug target. *Chembiochem* 7: 879–889, 2006.

Knipp M, Braun O, Gehrig PM, Sack R, Vasak M. Zn(II)-free dimethylargininase-1 (DDAH-1) is inhibited upon specific Cys-S-nitrosylation. *J Biol Chem* 278: 3410–3416, 2003.

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* 276: 40449–40456, 2001.

Konishi H, Sydow K, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Mar 13; 49(10):1099-105.

Fenna R, Zeng J, Davey C. *Arch Biochem Biophys*. Structure of the green heme in myeloperoxidase. 1995 Jan 10;316(1):653-6.

Folkes LK, Candeias LP, Wardman P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch Biochem Biophys*. 1995 Oct 20;323(1):120-6.

Furchgott RF. Nitric oxide: from basic research on isolated blood vessels to clinical relevance in diabetes. *An R Acad Nac Med (Madr)*. 1998; 115(2):317-31.

Furchgott RF. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA*. 1996 Oktober 9; 276(14):1186-8.

Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RMJ and Moncada S. Regional and cardiac haemodynamic effects of NG, NG-dimethyl-L-arginine and their reversibility by vasodilators in conscious rats. *Br. J. Pharmacol* (1993), 110, 1457-1464.

Gary, J. D., and Clarke, S. PRMT 3, a Type I Protein Arginine *N*-Methyltransferase That Differs from PRMT1 in Its Oligomerization, Subcellular Localization, Substrate Specificity, and Regulation *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1998, 61, 65-131

Glickman MH and Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* 82(2):373-428 2002 April.

Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Whitley G. Estrogen stimulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 108: 1575–1580, 2003.

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* 178: 551–556, 1998.

Huang YI, Surichamorn W, Cao GL, Meng M, Pou S, Rosen GM, Salcedo TW, Strimpler A, Veale C, Bernstein PR, Bonuccelli CM. Effect of trifluoromethyl ketone-based elastase inhibitors on neutrophil function in vitro. *J Leukoc Biol.* 1998 Sep; 64(3):322-30.

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novemberel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 1999 Juni 22; 99(24):3092-5.

Jacobi J, Sydow K, von Degenfeld G, Zhang Y, Dayoub H, Wang B, Patterson AJ, Kimoto M, Blau HM, Cooke JP. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2005 März 22; 111(11):1431-8.

Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethylarginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 245: 5751–5758.

Kapp A, Zeck-Kapp G. Activation of the oxidative metabolism in human polymorphonuclear neutrophilic granulocytes: the role of immuno-modulating cytokines. *J Invest Dermatol.* 1990 Dec; 95(6 Suppl): 94S-99S.

Kielstein JT, Märzten-Lobenhoffer J, Vollmer S, Bode-Böger SM. L-Arginine, ADMA, SDMA, creatinine, MDRD formula: detour to renal function testing. *J Nephrol*. 2008 November-Dezember; 21(6):959-61.

Kielstein JT, Sydow K. Glomerular filtration and coronary flow: is ADMA the faucet regulating both? *Am J Hypertens*. 2008 Juni; 21(6):601-2.

Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. Detection of NG,NGdimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys* 300: 657–662, 1993.

Konishi H, Sydow K, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury. *J Am Coll Cardiol*. 2007 März 13; 49(10):1099-105.

Kurowska EM. Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr Pharm Des*. 2002; 8(3):155-66.

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 USA* 99: 13527–13532, 2002.

Leiper J, Nandi M, Torondel B, Murray-Rust J, Malaki M, O'Hara B, Rossiter S, Anthony S, Madhani M, Selwood D, Smith C, Wojciak- Stothard B, Rudiger A, Stidwill R, McDonald NQ, Vallance P. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* 13: 198–203, 2007.

Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 343: 209–214, 1999.

Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 542–548, 2003.

Leiper J, Vallance P. New tricks from an old dog: nitric oxide-independent effects of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1419–1420, 2006.

Lentz SR, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atheroscler Suppl.* 2003 Dezember; 4(4):61-5.

Lincoln TM, Dey NB, Boerth NJ, Cornwell TL, Soff GA. Nitric oxide-cyclic GMP pathway regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation: implications in vascular diseases. *Acta Physiol Scand.* 1998 Dec; 164(4):507-15.

Mac Allister RJ, Fickling SA, Whitley GS, Vallance P. Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol.* 1994 Mai; 112(1):43-8.

Marks RM, Todd RF 3rd, Ward PA. Rapid induction of neutrophil-endothelial adhesion by endothelial complement fixation. *Nature.* 1989 May 25; 339(6222):314-7.

Melichar VO, Behr-Roussel D, Zabel U, Uttenthal LO, Rodrigo J, Rupin A, Verbeuren TJ, Kumar H S A, Schmidt HH. Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 23; 101(47):16671-6.

Menne J, Park JK, Agrawal R, Lindschau C, Kielstein JT, Kirsch T, Marx A, Muller D, Bahlmann FH, Meier M, Bode-Böger SM, Haller H, Fliser D. Cellular and molecular mechanisms of tissue protection by lipophilic calcium channel blockers. *FASEB J.* 2006 May; 20(7):994-6.

Miranda TB, Miranda M, Frankel A, Clarke S. PRMT7 Is a Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family with a Distinct Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, Issue 22, 22902-22907, Mai 28, 2004.

Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a Novel Marker of atherosclerosis. *Circulation.* 1999 März 9; 99(9):1141-6.

Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol.* 1999 Jan 15; 162(2):1120-6.

Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 2002 Mar 8; 90(4):E58-65.

Mülsch A, Oelze M, Klöss S, Mollnau H, Töpfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Münzel T. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation.* 2001 May 1; 103(17):2188-94.

Murad F. The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA.* 1996 Oct 9;276(14):1189-92.

Murao S, Stevens FJ, Ito A, Huberman E. Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Feb; 85(4):1232-6.

Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, Vallance P, McDonald N. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* 8: 679–683, 2001.

Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J. Cell Biol.* 113 (5): 981.

Nijveldt RJ, Teerlink T, van Guldener C, Prins HA, van Lambalgen AA, Stehouwer CDA, Rauwerda JA, van Leeuwen PAM. Handling of asymmetrical dimethylarginine and symmetrical dimethylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia. *Nephrol Dial Transplant* 18: 2542–2550, 2003.

Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol.* 1993 Aug; 54(2):171-8. Review.

Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg.* 1991 Nov; 214(5):621-6.

Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation.* 1998 Jun 30; 97(25):2494-8.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 671–677, 1987.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 264: 10205–10209, 1989.

Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K. Metabolism of NG,NG and NG,N_G-dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys* 252: 526– 537, 1987.

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.* 1993 Jun; 91(6):2546-51.

Paik WK, Kim S. Protein methylation in rat brain *in vitro*. *Journal of Neurochemistry*, 1969, Vol. 16, pp. 1257 to 1261.

Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Dezember; 293(6).

Palmer R.M.J., Ashton D.S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664 - 666 1988 Juni.

Papapetropoulos A, Rudic, Sessa W. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* 1999 43(3):509-520.

Patricia MK, Natarajan R, Dooley AN, Hernandez F, Gu JL, Berliner JA, Rossi JJ, Nadler JL, Meidell RS, Hedrick CC. Adenoviral delivery of a leukocyte-type 12 lipoxygenase ribozyme

inhibits effects of glucose and platelet-derived growth factor in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res.* 2001 Apr 13; 88(7):659-65.

Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszódi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fässler R, Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 1998 Jun 1; 17(11):3045-51.

Ramasamy S, Drummond GR, Ahn J, Storek M, Pohl J, Parthasarathy S, Harrison DG. Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 1999 Jul; 56(1):116-23.

Rubanyi G, Paul RJ. Two distinct effects of oxygen on vascular tone in isolated porcine coronary arteries. *Circ Res.* 1985 Jan; 56(1):1-10.

Saini R, Patel S, Saluja R, Sahasrabudhe AA, Singh MP, Habib S, Bajpai VK, Dikshit M. Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. *J Leukoc Biol.* 2006 Mar; 79(3):519-28.

Sakurada M, Shichiri M, Imamura M, Azuma H, Hirata Y. Nitric oxide upregulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 via cyclic GMP induction in endothelial cells. *Hypertension.* 2008 November; 52(5):903-9.

Salvemini D, Korbut R, Anggård E, Vane JR. Lipopolysaccharide increases release of a nitric oxide-like factor from endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 1989 Nov 14; 171(1):135-6. No abstract available.

Salvemini D, de Nucci G, Sneddon JM, Vane JR. Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *Br J Pharmacol.* 1989 Aug; 97(4):1145-50.

Salvemini D, de Nucci G, Gryglewski RJ, Vane JR. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Aug; 86(16):6328-32.

Scheibel M. Die Rolle von I κ B β im LPS-induzierten Sepsismodell. Dissertation TU München 2007.

Schepers E, Glorieux G, Dhondt A, Leybaert L, Vanholder R. Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Dezember 4.

Schmidt K, Klatt P, Mayer B. Characterization of endothelial cell amino acid transport systems involved in the actions of nitric oxide synthase inhibitors. *Mol Pharmacol*. 1993 Sep; 44(3):615-21.

Schultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch Biochem Biophys*. 1962 Mar; 96:465-7.

Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, Woelken-Weckmüller S, Walter U, Reichenspurner H, Meinertz T, Münzel T. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation*. 2002 Mar 12;105(10):1170-5.

Schulze F. Entwicklung und Validierung immunologischer Nachweisverfahren für asymmetrisches Dimethyl-L-arginin (ADMA). Hamburg 2004. Dissertation.

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

Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH. Highthroughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006.

Secco, D.D., Paron, J.A., De Oliveira, S.H., Ferreira, S.H., Silva, J.S. & Cunha FDE, Q. (2003). Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide*, 9, 153–164.

Segarra G, Medina P, Vila JM, Chuan P, Domenech C, Torondel B, Lluçh A. Inhibition of nitric oxide activity by arginine analogs in human renal arteries. *Am J Hypertens*. 2001 November; 14(11 Pt 1):1142-8.

Sethi S, Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb Res.* 2000 Nov 1; 100(3):223-47. Review.

Siekmeier R, Grammer T, März W. Roles of oxidants, nitric oxide, and asymmetric dimethylarginine in endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2008 Dezember; 13(4):279-97.

Singh JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase: a new therapeutic target for the modulation of nitric oxide and angiogenesis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2007 September; 8(9):736-41.

Smirnova IV, Kajstura M, Sawamura T, Goligorsky MS. Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 August; 287(2):H782-90.

Smith CL, Anthony S, Hubank M, Leiper JM, Vallance P. Effects of ADMA upon gene expression: an insight into the pathophysiological significance of raised plasma ADMA. *PLoS Med* 2: 1031–1043, 2005.

Smith CL, Birdsey GM, Anthony S, Arrighi FI, Leiper JM, Vallance P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulated ADMA levels VEGF expression and cell phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 984–989, 2003.

Stamler JS. S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995; 196:19-36. Review.

Stühlinger MC, Stanger O. Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Curr Drug Metab.* 2005 Februar; 6(1):3-14.

Surdacki A. L-arginine analogs--inactive Märzkers or active agents in atherogenesis? *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008 Oktober; 6(4):302-11.

Sydow K, Hornig B, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Münzel T, Böger RH. Endothelial dysfunction in patients with peripheral arterial disease and chronic hyperhomocysteinemia: potential role of ADMA. *Vasc Med.* 2004 Mai; 9(2):93-101.

Sydow K, Mondon CE, Cooke JP. Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA. *Vasc Med*. 2005 Juli; 10 Suppl 1:S35-43.

Sydow K, Mondon CE, Schrader J, Konishi H, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression enhances insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 April; 28(4):692-7.

Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis, Supplements*, Vol. 4, No. 4. (December 2003), pp. 41-51.

Tojo A, Kimoto M, Wilcox CS. Renal expression of constitutive NOS and DDAH: separate effects of salt intake and angiotensin. *Kidney Int* 58: 2075–2083, 2000.

Tojo A, Madsen K, Wilcox CS. Expression of immunoreactive nitric oxide synthase isoforms in rat kidney: effects of dietary salt and losartan. *Jpn Heart J* 36: 389–398, 1995.

Tojo A, Onozato ML, Fujita T. Role of macula densa neuronal nitric oxide synthase in renal diseases. *Med Mol Morphol* 39: 2–7, 2006.

Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 52: 1593–1601, 1997.

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

Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, Imaizumi T. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine. *Circ Res* 92: 226–233, 2003.

Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Fukami K, Okuda S. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a novel emerging risk factor for cardiovascular disease and the development of renal injury in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2007 Juni; 11(2):115-21.

Uetz P. und Pohl E. Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen. In: Wink et al., Molekulare Biotechnologie, Wiley-VCH 2004.

Vallance P. Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk. *Lancet* 358: 2096–2097, 2001.

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

Vallance P, Leiper J. Asymmetric dimethylarginine and kidney disease— marker or mediator? *J Am Soc Nephrol* 16: 2254–2256, 2005.

Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 1: 939–950, 2002.

Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1023–1030, 2004.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339: 572–575, 1992.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 20: S60–S62, 1992.

Verrey F, Meier C, Ristic Z, Klauser, S. Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *EMBO J.* 2002 21: 580-589

Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):532-42. Vladimirova-Kitova LG, Deneva TI, Angelova E, Bichev AN, Nikolov FP. Role of some biomarkers of atherogenic risk in the screening for molecular defects in the low density lipoprotein receptor in severe hypercholesterolemia. *Folia Med (Plovdiv).* 2008 Juli-September; 50(3):14-22.

Walter U, Waldmann R, Nieberding M. Intracellular mechanism of action of vasodilators. *Eur Heart J*. 1988 Juni; 9 Suppl H: 1-6.

Wang D, Gill P, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M, Dennehy K, Li M, Modlinger P, Leiper J, Vallance P, Adler O, Leone A, Tojo A, Welch WJ, Wilcox CS. Isoform-specific regulation by NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/ NO. *Circ Res* 101: 627–635, 2007.

Wang C, Xu D, Zhang L, Xie D, Guo H. Molecular dynamics and density functional studies of substrate binding and catalysis of arginine deiminase. *J Phys Chem B* 111: 3267–3273, 2007.

Wheeler MA, Smith SD, Saito N, Foster HE Jr, Weiss RM. Effect of long-term oral L-arginine on the nitric oxide synthase pathway in the urine from patients with interstitial cystitis. *J Urol*. 1997 Dec; 158(6):2045-50.

Xia Y, Tsai A, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 273: 25804–25808, 1998.

Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6954–6958, 1997.

Xin HY, Jiang DJ, Jia SJ, Song K, Wang GP, Li YJ, Chen FP. Regulation by DDAH/ADMA pathway of lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in endothelial cells. *Thromb Haemost* 97: 830– 838, 2007.

Zharikov SI, Sigova AA, Chen S, et al. Cytoskeletal regulation of the L-arginine/NO pathway in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280:L465±L473.

Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Inflammation and atherosclerosis in end-stage renal disease. *Blood Purif*. 2003; 21(1):29-36.

11 ANHANG

- Erklärung
- Publikationen
- *Curriculum vitae*
- Danksagung

ERKLÄRUNG

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

Interaktionen des endogenen NO Synthase Inhibitors asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) mit der leukozytären Peroxidase Myeloperoxidase (MPO) in *mus musculus* und *homo sapiens*

in der experimentellen Kardiologie des Universitären Herzzentrums Hamburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Meinertz ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die 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, 9. Februar 2009

PUBLIKATIONEN

MANUSKRIPTE

- (1) Frank Leypoldt, Chi-un Choe, Mathias Gelderblom, **Eike-Christin von Leitner**, Dorothee Atzler, Edzard Schwedhelm, Christian Gerloff, Karsten Sydow, Rainer H. Böger and Tim Magnus. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 transgenic mice are not protected from ischemic stroke. Eingereicht bei stroke.
- (2) **Eike-Christin von Leitner**; Anna Klinke, PhD, Edzard Schwedhelm, PhD; Jan T. Kielstein, MD; Renke Maas, MD, Stephan Willems, MD; Thomas Meinertz, MD; Heimo Ehmke, MD; Rainer H. Böger, MD; Stephan Baldus, MD; Karsten Sydow, MD. Asymmetric dimethylarginine increases myeloperoxidase concentrations by activating polymorphonuclear neutrophil granulocytes. In Vorbereitung.
- (3) **Eike-Christin von Leitner**; Edzard Schwedhelm, PhD; Anna Klinke, PhD, Dorothee Atzler, PhD; Olaf Hellwinkel, PhD; Renke Maas, MD, Denise Lau, PhD; Thomas Meinertz, MD; Heimo Ehmke, MD; Rainer H. Böger, MD; Stephan Baldus, MD; Karsten Sydow, MD. Myeloperoxidase increases asymmetric dimethylarginine concentrations by impairing dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity. In Vorbereitung.
- (4) Edzard Schwedhelm, PhD; **Eike-Christin von Leitner**; Dorothee Atzler, PhD, Christine Schmitz, MD; Johannes Jacobi, MD; Thomas Meinertz, MD; Stephan Baldus, MD; Thomas Munzel, MD; John P. Cooke, MD, PhD; Rainer H. Böger, MD; Renke Maas, MD, Karsten Sydow. Intensive characterization of the human DDAH1 transgenic mice. In Vorbereitung.

AKZEPTIERTE ABSTRACTS

- (1) Sydow K, **von Leitner EC**, Maas R, Kielstein JT, Klinke A, Schwedhelm E, Schulze F, Lau D, Ehmke H, Meinertz T, Böger RH, Willems S, Baldus S. Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) steigert die Leukozytendegranulation und NADPH-Oxidase-Aktivität. Vortrag. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. Clin. Res. Cardiol. 2008; 97:
- (2) Sydow K, **von Leitner EC**, Maas R, Klinke A, Schwedhelm E, Kielstein JT, Lau D, Ehmke H, Meinertz T, Willems S, Böger RH, Baldus S. ADMA enhances leukocyte activation and degranulation – interaction between ADMA and the NO-oxidizing hemoprotein myeloperoxidase (MPO). Vortrag. 4th International ADMA Symposium.
- (3) Sydow K, **von Leitner EC**, Maas R, Kielstein JT, Klinke A, Schwedhelm E, Schulze F, Lau D, Ehmke H, Meinertz T, Böger RH, Willems S, Baldus S. Interaktionen zwischen dem endogenen NO Synthase Inhibitor asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und dem NO-oxidierenden Hämoprotein Myeloperoxidase (MPO). Poster. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. Clin. Res. Cardiol. 2009.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Familienstand	ledig
Geburtstag	16.12.1979
Geburtsort	Stade

AUSBILDUNG

1992 – 1995	Kaiserin-Auguste-Victoria-Gymnasium, Celle
1995 - 1999	Vincent-Lübeck-Gymnasium, Stade
07 1999	Abitur
07 2000 - 06 2002	Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig Grundstudium der Biologie
08 2002	Vordiplom in den Fächern Botanik, Zoologie, Mikrobiologie, Organische Chemie, Mathematik und Genetik
08 2002 - 12 2005	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU) Hauptstudium der Mikrobiologie, Zellbiologie und Toxikologie
01 2006	Abschluss des Studiums als Diplom-Biologin
05 2006 - 04 2009	Doktorandin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf in der experimentellen Kardiologie

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Meinertz danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Klinik durchzuführen, sowie für die interessante Themenstellung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Streit für seine Bereitschaft zur Betreuung dieser Arbeit und für die hilfreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Wenzel danke ich für die nette Kooperation und Übernahme der Position des Disputationsgutachters.

Ich danke Herrn PD Dr. Warnecke, Herrn PD Dr. Lorbiecke, Frau PD Dr. Lüthje und Herrn PD Dr. Lüthen für die Mitarbeit in meiner Disputation als Prüfungskommission.

Desweiteren möchte ich mich für die Betreuung während der gesamten Arbeit bei Herrn Dr. Karsten Sydow bedanken. Seine zahlreichen Anregungen und Ideen waren eine große Hilfe für das Gelingen meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Böger, Herrn Dr. Edzard Schwedhelm und Frau Atzler aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie sowie Prof. Dr. Ehmke und Frau Hirsch-Hoffmann des Instituts für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie für die fruchtbaren Kooperationen.

Mein Dank geht ebenfalls an meine Kollegen und Freunde Anna, Christine, Denise, Kati, Kai, Hartwig und Philipp für die bis zuletzt tatkräftige Unterstützung, Motivation und ständige Diskussionsbereitschaft. Zudem hatte ich mit ihnen sehr viel Spaß im Labor.

Ich danke meiner Mutter, Thomas, meinen Schwestern und meinen Großeltern für Ihre Unterstützung und ihre Geduld mit meiner manchmal recht begrenzten Teilnahme am Familienleben. Besonders Robin danke ich für seine Nervenstärke in den letzten Monaten.