

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie  
und Toxikologie  
Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

## **Untersuchungen zur Proteasom-Beteiligung an der Regulation der freien Konzentration des Asymmetrischen Dimethylarginins**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Laura Fischer  
aus Düsseldorf-Kaiserswerth

Hamburg 2010

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 03.03.2011**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Böger**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. K. Sydow**

**Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. S. Storch**

für meine Familie

1	ZIEL DER ARBEIT	5
2	GRUNDLAGEN	6
2.1	WIRKUNG VON STICKSTOFFMONOXID	6
2.2	DEFINITION VON ADMA	7
2.3	ENTSTEHUNG VON ADMA	8
2.4	ABBAU VON ADMA	9
2.5	METHODEN ZUR MESSUNG VON ADMA	11
2.6	KLINISCHE BEDEUTUNG VON ADMA	11
2.7	THERAPEUTISCHE ANSÄTZE ZUR BEEINFLUSSUNG ERHÖHTER ADMA-KONZENTRATIONEN IM BLUTPLASMA	13
2.8	DAS PROTEASOM	14
2.9	HEMMUNG DES PROTEASOMS	16
3	METHODEN	17
3.1	VERSUCHSVORBEREITUNG UND VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	17
3.1.1	<i>Zellkultivierung</i>	17
3.1.2	<i>Hemmung des Proteasoms</i>	18
3.1.3	<i>Gewinnung der Zellen und des Zellkulturüberstandes</i>	18
3.2	HEMMUNG MITTELS PROTEASOMHEMMER MG 132	19
3.2.1	<i>Hemmung in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden</i>	19
3.2.2	<i>Hemmung in den Konzentrationen 0,01 µM und 1 µM über verschiedene Zeiträume</i>	20
3.3	HEMMUNG MITTELS PROTEASOMHEMMER EPOXOMICIN	21
3.3.1	<i>Hemmung in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden</i>	21
3.3.2	<i>Hemmung in den Konzentrationen 0,0001 µM und 0,01 µM über verschiedene Zeiträume</i>	21
3.4	MESSUNG DER ZYTOTOXIZITÄT DER EINGESETZTEN STOFFE	22
3.5	PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY	26
3.6	MESSUNG DER ADMA-KONZENTRATION MITTELS LC-MS/MS IM ZELLKULTURÜBERSTAND	28
3.7	DER QUOTIENT AUS ADMA UND SDMA	30
3.8	GEL-ELEKTROPHORESE / WESTERN BLOT	31

4	ERGEBNISSE	36
4.1	ALLGEMEINES ZUR DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	36
4.2	ERGEBNISSE DER ZYTOTOXIZITÄTSMESSUNG	36
4.2.1	<i>Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung von Mg 132</i>	36
4.2.2	<i>Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung von Epoxomicin</i>	37
4.3	ERGEBNISSE DER PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY	38
4.3.1	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden</i>	38
4.3.2	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 0,01 µM über verschiedene Zeiträume</i>	39
4.3.3	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 1 µM über verschiedene Zeiträume</i>	40
4.3.4	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden</i>	41
4.3.5	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,0001 µM über verschiedene Zeiträume</i>	41
4.3.6	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,01 µM über verschiedene Zeiträume</i>	42
4.4	ERGEBNISSE DER BESTIMMUNG DER ADMA-KONZENTRATION IM ZELLKULTURÜBERSTAND	43
4.4.1	<i>Näheres zur Bestimmung der ADMA-Konzentration</i>	43
4.4.2	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden</i>	44
4.4.3	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 0,01 µM über verschiedene Zeiträume</i>	45
4.4.4	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 1 µM über verschiedene Zeiträume</i>	45
4.4.5	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden</i>	46
4.4.6	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,0001 µM über verschiedene Zeiträume</i>	47
4.4.7	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,01 µM über verschiedene Zeiträume</i>	48
4.5	ERGEBNISSE FÜR SDMA UND DEN QUOTIENTEN AUS ADMA UND SDMA	49

4.6	ERGEBNISSE DER GEL-ELEKTROPHORESE / WESTERN BLOT	51
4.6.1	<i>Vorbemerkungen</i>	51
4.6.2	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden</i>	52
4.6.3	Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume	54
4.6.4	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 1 <math>\mu\text{M}</math> über verschiedene Zeiträume</i>	56
4.6.5	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden</i>	58
4.6.6	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,0001 <math>\mu\text{M}</math> über verschiedene Zeiträume</i>	60
4.6.7	<i>Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,01 <math>\mu\text{M}</math> über verschiedene Zeiträume</i>	62
5	DISKUSSION	64
5.1	EINLEITUNG ZUR DISKUSSION	64
5.2	DISKUSSION ZU DEN ERGEBNISSEN DER PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY	64
5.3	DISKUSSION ZU DEN ERGEBNISSEN DER BESTIMMUNG DER ADMA-KONZENTRATION IM ZELLKULTURÜBERSTAND	66
5.4	DISKUSSION ZU DEN ERGEBNISSEN DER SDMA-KONZENTRATION UND ZUR ERSTELLUNG DES QUOTIENTEN AUS ADMA UND SDMA	68
5.5	DISKUSSION ZU DEN ERGEBNISSEN DER GEL-ELEKTROPHORESE / WESTERN BLOT	70
5.5.1	<i>Betrachtung der Vorgehensweise</i>	70
5.5.2	<i>Diskussion der Ergebnisse nach der Proteasomhemmung mittels Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen über verschiedene Zeiträume</i>	71
5.5.3	<i>Diskussion zu den Ergebnissen nach der Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen über verschiedene Zeiträume</i>	72
5.6	ZUSAMMENFASSUNG DER DISKUSSION	74
6	ZUSAMMENFASSUNG	76

## Inhaltsverzeichnis

---

7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78
8	LITERATURVERZEICHNIS	79
9	MATERIALIEN	88
9.1	ZELLEN	88
9.2	ZELLKULTURMEDIEN	88
9.3	SUBSTANZEN	88
9.4	PUFFER UND LÖSUNGEN	91
9.5	VERBRAUCHSMATERIALIEN	96
9.6	GERÄTE	97
10	ANHANG	99
10.1	DANKSAGUNG	99
10.2	LEBENS LAUF	100
10.3	ERKLÄRUNG	101

## 1 Ziel der Arbeit

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine der Haupttodesursachen in der deutschen Bevölkerung und bedürfen deshalb einer besonderen Aufmerksamkeit (Meyer GP et al; 2004). Bei einem großen Teil der Erkrankten ist das N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-arginin (asymmetrisches Dimethylarginin; ADMA) in erhöhten Konzentrationen nachzuweisen. ADMA ist ein Protein-Abbauprodukt und stellt aufgrund seiner Rolle als endogener Inhibitor der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase einen wichtigen Risikofaktor bei kardiovaskulären Erkrankungen dar. ADMA entsteht im Zuge des regulären Proteinabbaus in den Körperzellen, wobei an der endgültigen Freisetzung von ADMA durch den Abbau methylierter Proteine u.a. das Proteasom beteiligt sein könnte. Diese methylierten Proteine entstehen vorher im Rahmen der posttranslationalen Proteinmodifikation durch eine Gruppe spezifischer Enzyme – den Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT). Im Zuge des Abbaus eben dieser Arginin-methylierten Proteine werden neben ADMA auch das symmetrische Dimethylarginin (SDMA) und das Monomethylarginin (L-NMMA) freigesetzt. Hierbei könnte, wie oben bereits beschrieben, das Proteasom beteiligt sein. Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, der sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorkommt und entsprechend markierte (ubiquitinylierte) Proteine zu Fragmenten abbaut.

Auf diesem Weg evtl. freigesetztes ADMA wird später zu einem großen Teil durch spezifische Enzyme – den Dimethylarginin Dimethylaminohydrolasen (DDAH) – abgebaut und zu einem kleineren Teil durch die Nieren eliminiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in Zellkulturversuchen untersucht werden, inwieweit die Konzentration von ADMA im Sinne der o.g. Ausführungen durch Hemmung des Proteasoms beeinflusst werden kann. Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Ist es durch Hemmung des Proteasoms möglich, die freie Konzentration von ADMA zu beeinflussen?
- 2) Ist der Einfluß auf ADMA auf eine Veränderung bei den ADMA-abbauenden Enzymen zurückzuführen?



## 2 Grundlagen

### 2.1 Wirkung von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) wurde Anfang der 1980er Jahre von Robert Furchtgott und Mitarbeitern als "Endothelium-Derived Relaxing Factor" entdeckt (Furchtgott RF et al; 1980). Es ist ein gasförmiger Botenstoff, der leicht durch alle Zellmembranen diffundieren kann. So hat er eine relativ große Reichweite auch wenn er über keine große Lebensdauer verfügt (einige Sekunden).

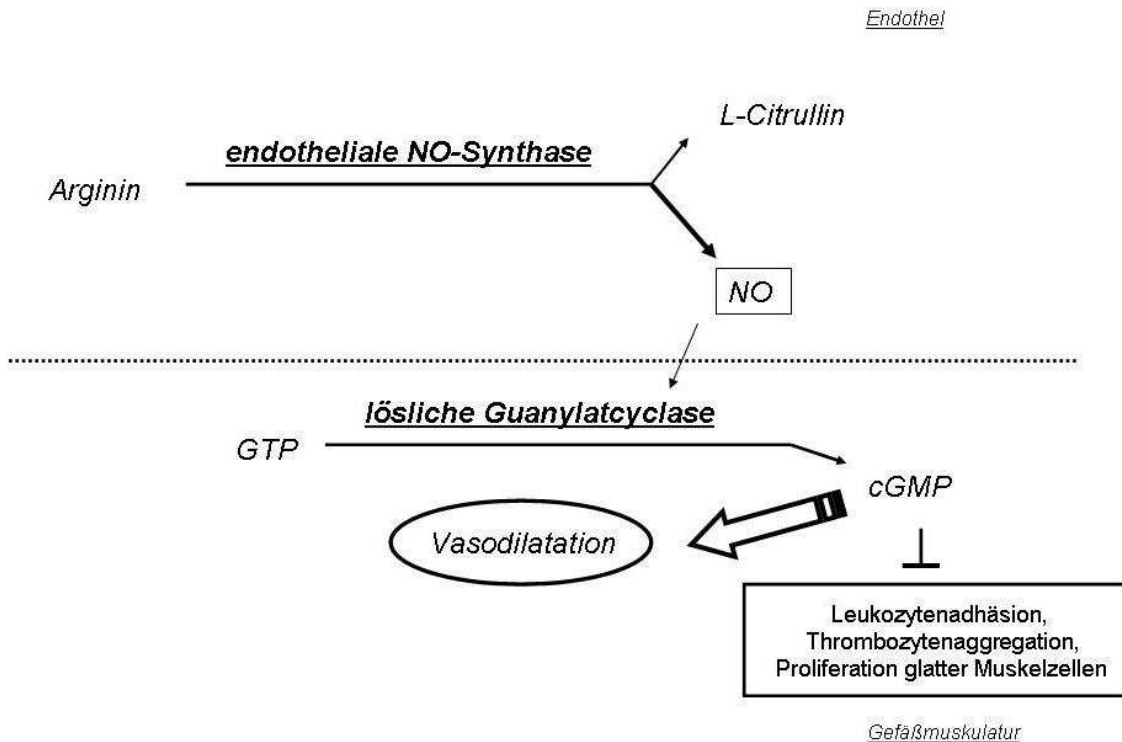
NO wird von der NO-Synthase aus L-Arginin abgespalten, welches dadurch zu L-Citrullin umgewandelt wird.

Von der NO-Synthase existieren drei in Zellen vorkommende Isoformen.

Die neuronale NO-Synthase (nNOS) wird in Nervenzellen exprimiert und hilft bei der Freisetzung von NO als nervalem Botenstoff. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) kommt in unseren Zellen normalerweise nicht vor. Sie kann allerdings durch Entzündungsmediatoren induziert werden.

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) wiederum setzt NO in Endothelzellen als Botenstoff frei, damit über die dann folgende Signalkaskade die Gefäßmuskulatur relaxiert werden kann (Übersicht bei: Krumenacker JS et al; 2004).

Diese Signalkaskade beinhaltet das Eindringen von NO in die benachbarten Muskelzellen, um dort die lösliche Guanylatcyclase zu aktivieren, die dann aus Guanosintriphosphat (GTP) cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) herstellt. Der 'second messenger' cGMP vermittelt in der Folge den eigentlichen Effekt des NO (Krumenacker JS et al; 2004). Daraus resultiert neben anderen Effekten eine Vasodilatation – also eine Entspannung der Gefäßmuskulatur und damit u.a. eine Erweiterung des endothelialen Lumens und somit eine Senkung des peripheren Widerstands und infolgedessen des Blutdrucks (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1: Signalkaskade der Vasodilatation**

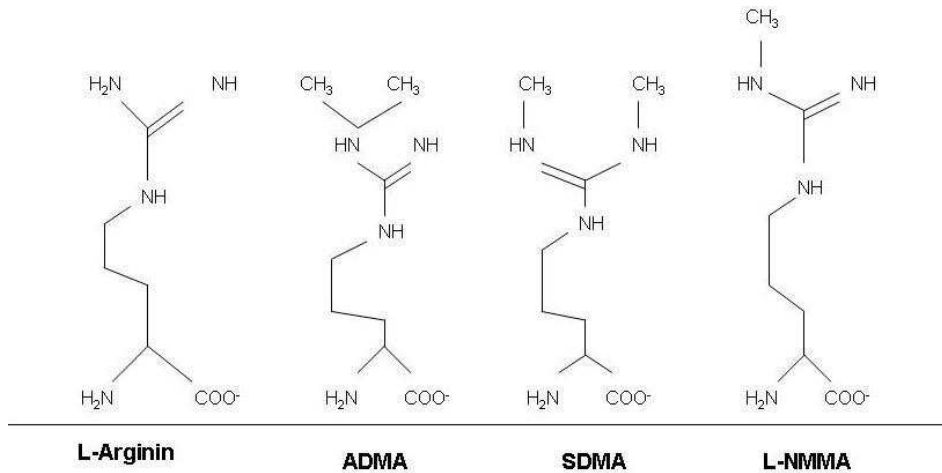
NO hat zudem u.a. einen positiven Einfluss auf den Blutfluss und hemmt gleichzeitig die Thrombozytenaggregation, die Leukozytenadhäsion am Endothel und die Proliferation glatter Muskelzellen (Stamler JS et al; 1989 und Tsao PS et al; 1997).

Außerdem reduziert es die Freisetzung von Superoxid-Radikalen, welche an zahlreichen entzündlichen und zelltoxischen Prozessen beteiligt sind. Seine vielfältigen positiven Funktionen haben NO im Laufe der Zeit den Namen "endogenes anti-atherosklerotisches Molekül" eingebracht (Cooke JP et al; 1997).

## 2.2 Definition von ADMA

$N^G, N^G$ -Dimethyl-L-arginin ist ein natürlicherweise vorkommendes Abbauprodukt des Proteinstoffwechsels im Körper und kann im Blutplasma nachgewiesen werden. Es wird auch asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) genannt. Neben ADMA werden im Zuge des Protein-Abbaus als Derivate des L-Arginins auch  $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-arginin - symmetrisches Dimethylarginin

(SDMA) – und **N-Monomethyl-L-arginin** (L-NMMA) freigesetzt (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Strukturformeln von L-Arginin, ADMA, SDMA und L-NMMA

### 2.3 Entstehung von ADMA

ADMA entsteht neben SDMA und L-NMMA im Zuge des regulären Proteinabbaus in den Körperzellen.

Im Rahmen der posttranslationalen Protein-Modifikation – ein Prozess zur Modifikation der Funktion und Zielzuweisung von Proteinen – werden in Proteinen L-Argininreste durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) methyliert. Hierbei werden eine oder mehrere Methylgruppen von dem Methylgruppendonator S-Adenosylmethionin (ein Zwischenprodukt des Homocystein-Stoffwechsels) auf proteinständige L-Argininreste übertragen. Dabei entsteht S-Adosylhomocystein als Begleitprodukt (Gosh SK et al; 1988) (siehe Abbildung 3).

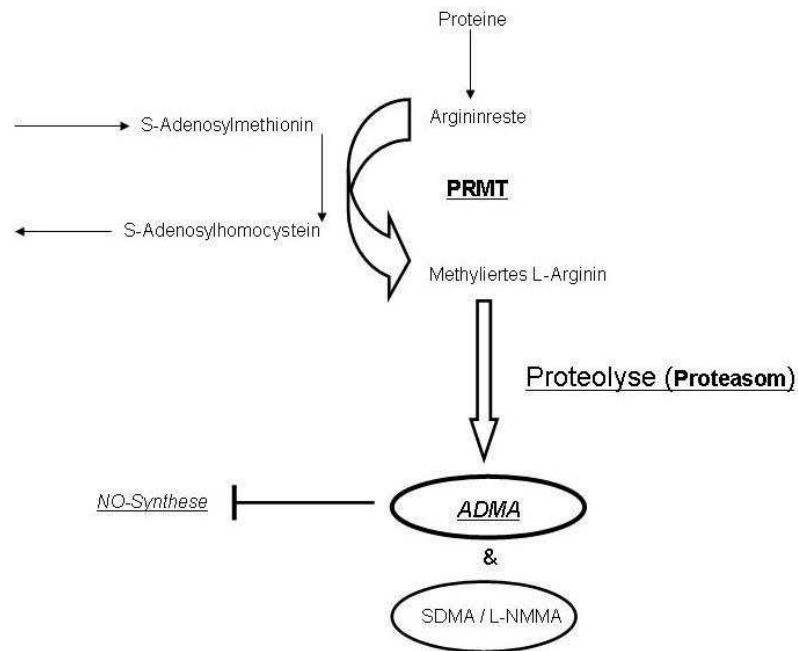
PRMTs existieren in Säugetieren in mehreren Isoformen (Form 1 bis 7), die wiederum zwei Enzym-Typen zugeordnet werden können. So gehören die PRMT-Formen 1 bis 4 und 6 zu Typ I, während die PRMT-Formen 5 und 7 dem Enzym-Typ II zugeordnet werden. Weiterhin können die PRMTs in Bezug auf ihre Lokalisation in der Zelle unterteilt werden. So kommen die Formen 1, 2, 4 und 6 vorwiegend nukleär – also im Zellkern – vor, während die Formen 3 und 5 im Zytosol zu finden sind. Diese Verteilung hängt vermutlich mit dem Vorkommen ihrer Substrate zusammen (Übersicht bei Lin WJ et al; 1996).

Während beide PRMT-Typen L-NMMA (< 10%) bilden, ist je nach Menge der übertragenen Methylgruppen der PRMT-Typ II zusätzlich für die Entstehung von SDMA verantwortlich, während Typ I die Bildung von ADMA fördert (Gosh SK et al; 1988).

Durch anschließende Proteolyse dieser methylierten Proteine werden dann, vermutlich unter Einfluss des Proteasoms, ADMA sowie SDMA und L-NMMA freigesetzt (siehe Abbildung 3).

Es gibt verschiedene Ursachen, die zu erhöhten ADMA-Plasmaspiegeln führen können.

So kann es z.B. sein, dass durch die Proteolyse ein Überschuss an ADMA entsteht. Das Resultat wären erhöhte Spiegel von ADMA,



**Abbildung 3: ADMA-Synthese**

SDMA und L-NMMA im Blutplasma. Andererseits kann auch der Abbau von ADMA gestört sein, was ebenso zu einem Ansteigen der Konzentrationen im Blutplasma führen würde (mit Ausnahme von SDMA) (Böger RH; 2005).

## 2.4 Abbau von ADMA

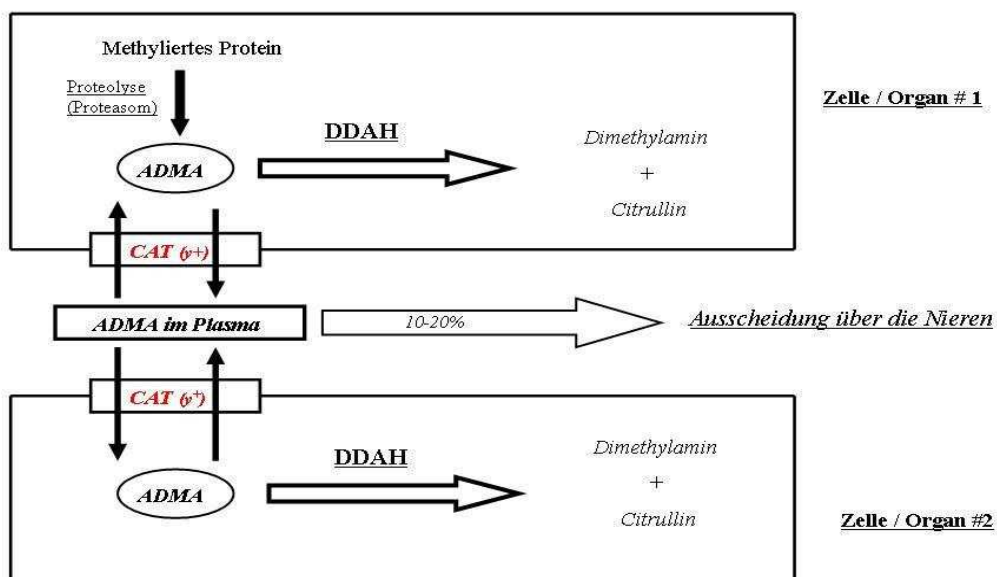
Mit der Entdeckung von ADMA im Jahr 1970 (Kakimoto Y et al; 1970) war lange Zeit nicht klar, wie dieses Stoffwechselprodukt im Körper wieder abgebaut wird. 1976 untersuchte McDermott die Elimination von ADMA und im Zuge dessen auch von SDMA und L-NMMA. Er stellte fest, dass SDMA zu einem weit

höheren Teil als ADMA und L-NMMA durch die Nieren ausgeschieden wird (McDermott JR; 1976).

Nachdem 1987 Versuche mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem ADMA und SDMA durchgeführt wurden, fand man für SDMA keinen Metaboliten. ADMA konnte man allerdings L-Citrullin zuordnen. Das offensichtlich für den Abbau von ADMA verantwortliche Enzym wurde 1989 entdeckt und  $\text{N}^{\text{G}},\text{N}^{\text{G}}$ -**D**imethylarginin **D**imethylamino**h**ydrolase genannt (DDAH) (Ogawa T et al; 1987).

Seine Schlüsselrolle im ADMA-Stoffwechsel konnte durch geplante Überexpression des dazugehörigen Gens und Hemmung der enzymatischen Aktivität bewiesen werden (MacAllister et al; 1996). Von der DDAH existieren 2 Isoformen, wobei gezeigt werden konnte, dass die DDAH-1 v.a. in Geweben dominiert, die die neuronale NO-Synthase (nNOS) exprimieren, während die DDAH-2 vorwiegend in Geweben vorkommt, die die endotheliale Form der NO-Synthase (eNOS) exprimieren (Leiper JM et al; 1999).

Während SDMA ausschließlich renal eliminiert wird, wird ADMA zu einem Anteil von 80–90% über die DDAH abgebaut und zu einem kleineren Teil (ca. 10–20%) über die Nieren (Achan V et al; 2003). Durch  $\text{y}^+$ -Transporter, die zur Gruppe der 'Kationischen Aminosäure Transporter' (CAT) gehören (diese transportieren nur kationische – also positiv geladene – Aminosäuren), kann ADMA vor dem oben beschriebenen Abbau die Plasmamembran überwinden (Mann GE; 2003) (siehe Abbilung 4).



**Abbildung 4:** Elimination von ADMA (nach Teerlink T; 2005)

Mit dem Plasma wird ADMA im Körper weiter transportiert und kann entweder in andere Zellen aufgenommen und durch die DDAH zu Dimethylamin und L-Citrullin abgebaut oder über die Nieren ausgeschieden werden (Teerlink T; 2005) (siehe Abbildung 4).

### **2.5 Methoden zur Messung von ADMA**

Eine relativ neue Methode zur ADMA-Quantifizierung wurde 2005 von Schwedhelm entwickelt und beschrieben. Die Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Methode (LC-MS/MS) macht es möglich, ADMA und – im Gegensatz zum bereits vorher bekannten ELISA – auch SDMA und Arginin innerhalb einer kurzen Analysedauer und ohne vorherige, zeitaufwendige chromatographische Trennung voneinander zu messen. Die Durchlaufzeit einer Probe kann somit auf 1,6 min reduziert werden, und die Trennung der Analyte durch spezifische Fragmentierungsmuster ist innerhalb 1 min beendet (Schwedhelm E et al; 2005).

Diese Methode bietet die Möglichkeit, Quotienten aus den ADMA-, SDMA- und Arginin-Werten zu bilden und diese miteinander zu vergleichen. So ist z.B. der Quotient aus Arginin und ADMA ein Maß für die Menge der zur Verfügung stehenden Substrate der NOS (Böger RH; 2006) und der ADMA/SDMA-Quotient für die DDAH-Aktivität.

### **2.6 Klinische Bedeutung von ADMA**

Obwohl ADMA bereits 1970 zum ersten Mal beschrieben wurde, erkannte man seine Rolle als endogenen Inhibitor der NO-Synthese erst 1992 (Vallance P et al; 1992). So beschrieben u.a. Böger et al (1998) den genauen Mechanismus dieser Hemmung. Danach handelt es sich bei ADMA – im Gegensatz zu seinem inaktiven Isomer SDMA – um einen kompetitiven Hemmstoff der NO-Synthese. Das bedeutet, dass ADMA mit L-Arginin – dem eigentlichen Substrat der NO-Synthese – um den Bindungsplatz am Enzym

konkurriert. Dies führt u.a. zu einer verminderten NO-Produktion und damit zu endothelialer Dysfunktion (Böger RH et al; 1998). Dieses ist u.a. anhand einer reduzierten Ausscheidung von Nitrat – dem NO-Metaboliten im Urin – nachweisbar (Böger RH et al; 1998).

Eine Reihe unterschiedlicher Studien haben gezeigt, dass ADMA infolge dieses Mechanismus bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle spielt, wobei aber beachtet werden muss, dass ADMA in einem gewissen Normbereich auch bei gesunden Personen vorkommt (Schulze F et al; 2004 und Schwedhelm E et al; 2007).

Ein Ansteigen der ADMA-Plasmaspiegel ist bei den verschiedensten kardiovaskulären, aber auch metabolischen Erkrankungen zu beobachten und nachzuweisen. Dies könnte zumindest bei letzteren u.U. an einer gestörten natürlichen Elimination von ADMA über die Nieren liegen.

So spielen sie eine Rolle bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Schulze F et al; 2005), peripherer arterieller Verschlusskrankheit (Böger RH et al; 1997), Herzinsuffizienz (Kielstein JT et al; 2003), Bluthochdruck (Kielstein JT et al; 2003), terminaler Niereninsuffizienz (Böger RH et al; 2003), Insulin-Resistenz (Sydow K et al; 2005), oxidativem Stress (Böger RH et al; 2000) und Hyperhomocysteinämie (Dayal et al; 2005). Außerdem existieren Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen erhöhten ADMA-Konzentrationen und Atherosklerose-Markern, wie die Intima-Media-Dicke der A. Carotis (Myazaki et al; 1999) sowie auf erhöhte kardiovaskuläre Mortalität (Schnabel R et al; 2005). Auch Patienten mit Demenz zeigen offenbar einen erhöhten ADMA-Plasmaspiegel (Selley ML; 2003). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die ADMA-Freisetzung in Zellen in Anwesenheit von LDL-Cholesterin deutlich ansteigt, was zu der These veranlasst, dass die so entstehenden, erhöhten ADMA-Konzentrationen für einen Teil der gesundheitsschädigenden Wirkung des LDL-Cholesterins verantwortlich sind (Böger RH; 2003).

Weiterhin haben neuere Studien gezeigt, dass ADMA als stärkste Einfluss-Größe bei schwerkranken Patienten auf der Intensivstation zu sehen ist (Nijveldt RJ et al; 2003). Maas et al. beschrieben 2007 anhand der Daten einer weiteren durchgeführten Studie, dass erhöhte ADMA-Konzentrationen bei Patienten, die einen operativen Eingriff überstanden haben, als Marker für Komplikationen und/oder verlängerten Krankenhausaufenthalt anzusehen ist

(Maas R et al; 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Infusion von ADMA bei gesunden Probanden zu einer beeinträchtigten Nieren-Funktion, einer reduzierten Auswurfleistung des Herzens, sowie einem erhöhten Blutdruck führen können (Achan V et al; 2003). Erstaunlicherweise finden sich erhöhte ADMA-Konzentrationen auch bei eigentlich gesunden Personen. So konnte durch eine Studie gezeigt werden, dass es – einhergehend mit ansteigenden ADMA-Plasmakonzentrationen – mit höherem Lebensalter zum Auftreten einer endothelialen Dysfunktion kommen kann (Bode-Böger SM; 2003).

### ***2.7 Therapeutische Ansätze zur Beeinflussung erhöhter ADMA-Konzentrationen im Blutplasma***

Therapeutische Ansätze, ADMA-Konzentrationen im Plasma zu verringern, sind bisher nicht allzu vielversprechend (Maas R; 2005). So haben Studien gezeigt, dass Statine, bzw. eine Pravastatin-Gabe über einen relativ kurzen Zeitraum von 8 Wochen, keinen Einfluss auf die ADMA-Plasmakonzentration hatten, dafür aber zu einer verstärkten Genexpression der NO-Synthase führen (Eid HM et al; 2003). ACE-Hemmer konnten hingegen nachweislich eine Verringerung der ADMA-Werte um 12–20% herbeiführen (Chen JW et al; 2002). Bereits 1998 konnte zudem gezeigt werden, dass extern zugeführtes L-Arginin bei Patienten mit erhöhten ADMA-Konzentrationen nicht nur die damit zusammenhängende klinische Symptomatik verringert, sondern auch die endothelabhängige Vasodilatation verbessert (Böger GI et al; 2004).

Verhoeven et al. zeigten in einer Placebo-kontrollierten Studie, dass der selektive Estrogen-Rezeptor-Modulator HMR 3339 zu einer Dosis-abhängigen Reduktion der ADMA- und SDMA-Werte im Blut gesunder, postmenopausaler Frauen führt (Verhoeven MO et al; 2007). Rosiglitazon, ein Arzneistoff, welcher bei Personen mit Insulin-Resistenz eingesetzt wird, konnte nicht nur die Insulin-Sensitivität verbessern, sondern auch die Plasmakonzentration von ADMA erniedrigen (Stühlinger MC et al; 2002). Ebenso wurde aufgezeigt, dass Metformin, ein Medikament, welches bei Typ 2 Diabetes eingesetzt wird, die Plasma-Konzentrationen von ADMA um bis zu 30% verringern kann (Asaga-



mi T et al; 2002). Morimoto et al beschrieben einen Abfall der ADMA-Konzentration im Plasma von 27%, wenn die Hämodialyse (z.B. vonnöten im Rahmen einer Niereninsuffizienz) mittels einer mit Vitamin E beschichteten Polysulfon-Membran durchgeführt wird (Morimoto H et al; 2005).

Ein weiterer Ansatz, die ADMA-Konzentration durch externe Mittel abzusenken, besteht darin, durch Hochregulieren der DDAH-Aktivität den Abbau zu beschleunigen. So fanden sich deutlich reduzierte ADMA-Plasma-Level in Mäusen, in denen das ADMA-abbauende Enzym DDAH überexprimiert war (Jacobi J et al; 2005).

Weiterhin wurde festgestellt, dass eine Hemmung mit sehr niedrigen Konzentrationen des Proteasomhemmstoffes Mg 132 zu einer erhöhten Expression von endothelialer NOS führt. Dies hat wiederum eine erhöhte NO-Synthese zur Folge, die erhöhten ADMA-Spiegeln und deren Hemmwirkung positiv entgegenwirken könnte (Meiners S et al; 2006).

### **2.8 Das Proteasom**

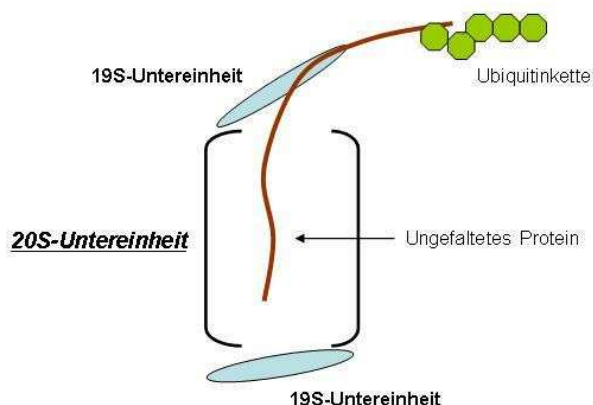
Das Proteasom ist ein Dreh- und Angelpunkt des Proteinstoffwechsels und – wie oben bereits beschrieben – vermutlich eine wichtige Komponente der endgültigen Freisetzung von ADMA und SDMA.

Dieser streng regulierte Mechanismus beinhaltet nicht nur den Abbau 'alter' Proteine durch das Proteasom, sondern auch jener, die falsch hergestellt wurden und nicht mehr repariert werden können (Patterson C et al; 2002).

Im Zytosol und dem Endoplasmatischen Retikulum einer Zelle befinden sich sogenannte Chaperone (**Hitzeschockproteine**; Hsp), die nicht nur für die korrekte Proteinfaltung sondern auch für eventuell nötige Korrekturarbeiten zuständig sind (Patterson C et al; 2002). Sie binden u.a. an falsch gefaltete Proteine und helfen unter ATP-Verbrauch bei der korrekten Faltung. Zugleich sind Hitzeschockproteine nicht unwesentlich an der Apoptose (programmierter Tod einer Zelle) beteiligt (Patterson C et al; 2002).

Sollen Proteine – aus welchem Grund auch immer – im regulären Stoffwechsel dem Abbau durch das Proteasom zugeführt werden, so müssen sie vorher entsprechend markiert werden. Dies geschieht durch das Ubiquitin, ein Molekül mit 76 Aminosäuren, welches durch ein entsprechendes Enzym kovalent an die Proteine angehängt wird. Diese Markierung dient hauptsächlich dem Proteasom als Erkennung, auch wenn die Ubiquitylierung ebenso Endocytose (das Aufnehmen von Stoffen in die Zelle durch Einstülpfen der Membran) und/oder eine Signal-Weitergabe fördern kann (Patterson C et al; 2002).

Das 26S-Proteasom ist ein 2000 kDa großer, ATP-abhängiger Proteinkomplex, der sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma Proteine zu Fragmenten abbaut. Er besteht aus einer 700 kDa schweren 20S-Untereinheit, in der der proteolytische Abbau geschieht, und zwei 19S-Untereinheiten, die als eine Art Kappe an den jeweiligen Enden sitzen und den Zugang zur 20S-Untereinheit regulieren. Die Fass-förmige 20S-Untereinheit besteht wiederum aus 4 Einheiten (Ringe), die einen zentralen Raum bilden, in dem der Abbau stattfindet. Die zwei zentralen  $\beta$ -Ringe beinhalten dabei verschiedene proteolytische Stellen, an denen der Proteinabbau letztlich erfolgt, während die äußeren  $\alpha$ -Ringe eine kleine Eintrittsöffnung ummanteln, aber keinerlei bewiesene Funktion in der Proteolyse ausüben (Lee DH et al; 1998).



**Abbildung 5: Das Proteasom**

Damit Proteine zum Abbau durch die 20S-Untereinheit zugelassen werden, müssen sie vorher anhand ihrer angefügten Polyubiquitin-Kette von den 19S-Untereinheiten erkannt und durchgelassen werden (siehe Abbildung 5). Bevor der endgültige Abbau an den  $\beta$ -Ringen erfolgt, muss noch

die Polyubiquitinkette entfernt werden. Sie wird durch bestimmte Enzyme freigesetzt und kann erneut zur Markierung von Proteinen verwendet werden. Die Proteine selbst werden durch entsprechende 'antichaperone' Aktivität des

Proteasomkomplexes entfaltet. Nachdem die Proteine zu Peptiden mit Größen von 3–20 Aminosäuren abgebaut wurden, werden sie von anderen Enzymen, den Peptidasen, auf einzelne Aminosäuren reduziert (Patterson C et al; 2002).

### **2.9 Hemmung des Proteasoms**

Die in Punkt 2.8 angesprochenen Funktionen des Proteasoms machen es zu einem zentralen Schalter in einer Zelle und lassen den Schluss zu, dass über eine Manipulation bzw. vorrangig Hemmung des Proteasoms in den Stoffwechsel einer Zelle eingegriffen und damit therapeutisch gehandelt werden kann.

Bisher sind verschiedene Substanzen bekannt, die durch Bindung an bestimmte Untereinheiten das Proteasom in seiner, am Protein-Abbau beteiligten, Tätigkeit hemmen können. Der bekannteste und experimentell am häufigsten verwendete Proteasominhibitor ist Mg 132, ein Stoff, der das Proteasom reversibel hemmt (Lee et al; 1998). Der Stoff Epoxomicin hingegen hat eine irreversible Hemmwirkung auf die Proteasom-Arbeit (Meng L et al; 1999). Ebenso haben Lactacystin und kleinere Peptide mit einer Aldehyd-, Vinylsulfon-, Borsäure- oder Glyoxal-Gruppe eine hemmende Wirkung auf das Proteasom (Lee DH et al; 1998). Weiterhin deuten Studien darauf hin, dass bestimmte Hormone wie Insulin und einige Aminosäuren, wie Leucin, Tyrosin oder Phenylalanin die Proteasom-Tätigkeit beeinflussen können (Hamel FG; 2003).

Es muss allerdings immer beachtet werden, dass Proteasominhibitoren durch ihren Eingriff in den Stoffwechsel einer Zelle eventuell auch zellschädigende oder sogar -tötende Effekte haben könnten.

## **3 Methoden**

### ***3.1 Versuchsvorbereitung und Versuchsdurchführung***

#### **3.1.1 Zellkultivierung**

Die in den Versuchen verwandten Zellen waren EAhy-Zellen – Hybride aus HUVEC (**H**uman **U**mbilical **V**ein **E**ndothelial **C**ells) und einer humanen Atemwegsepithel-Zelllinie (Edgell CJ et al; 1983). Um in den Zellen Versuche durchführen zu können, bei denen die Tätigkeit des Proteasoms durch Zugabe bestimmter Stoffe gehemmt wird, musste vorher eine entsprechend große Anzahl dieser Zellen angezüchtet werden. Dies geschah in insgesamt 5 x 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen, die zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns voll bewachsen waren.

In den Zellkulturflaschen wurde das noch enthaltene Zellkulturmedium abgesaugt und durch jeweils 2 ml 2-fach-Trypsin ersetzt. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden geschah so innerhalb weniger Minuten, und es wurden in jede Flasche je 4 ml Zellkulturmedium (aufbereitet mit 10% FCS und 5x HAT) zugegeben, um die zellschädigende Wirkung des Trypsins zu neutralisieren. Nachfolgend wurde die Zell-Suspension aller Zellkulturflaschen in einem 50 ml fassenden Falcon-Röhrchen gesammelt und ca. 4 ml Zellkulturmedium (s.o.) dazu pipettiert.

Anschließend wurden in 5 sterile 6-Well-Platten 1 ml der Zell-Suspension je Well pipettiert und sofort 2 ml Zellkulturmedium (s.o.) je Well hinzugegeben.

Die beschrifteten 6-Well-Schalen wurden nun für ca. 48 Stunden bei 37°C und einer Zufuhr von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, damit die Zellen anwachsen konnten.

### 3.1.2 Hemmung des Proteasoms

Nach Ablauf der oben beschriebenen 48 Stunden Inkubationszeit wurde zunächst der jeweils zur Proteasomhemmung verwendete Stoff in den entsprechenden Konzentrationen vorbereitet. Dies erfolgte als Lösung in Zellkulturmedium (aufbereitet als Hungermedium mit 1% FCS und 5x HAT), um die Zellen später über das Nährmedium mit dem Hemmstoff versetzen zu können (Stammlösung der Proteasominhibitoren in Medium). Als Kontroll-Substanz wurde **Dimethyl-Sulfoxid** (DMSO) verwandt, da hierin die Proteasominhibitoren gelöst waren. Im Anschluss wurde das Medium aus den für 48 Stunden inkubierten 6-Well-Schalen abgesaugt und die unterschiedlich konzentrierten Lösungen, der Anzahl an 6-Well-Schalen entsprechend, in die jeweiligen Wells à 3 ml pipettiert. Die Schalen wurden nachfolgend erneut bei 37°C und 5%-iger CO<sub>2</sub>-Zufuhr inkubiert. Nunmehr gemäß der in der Versuchsplanung festgelegten Inkubationszeit.

### 3.1.3 Gewinnung der Zellen und des Zellkulturüberstandes

Nach Ablauf der jeweils in den Versuchen festgelegten Inkubationszeit wurde aus den einzelnen Wells der 6-Well-Zellkulturschalen das Zellkulturmedium (Zellkulturüberstand) abpipettiert, in zugehörige Röhrchen überführt und während der weiteren Arbeitsschritte auf Eis gelagert. Die am Boden der Wells befindlichen Zellen wurden nun in 2 Durchgängen mit jeweils 2 ml warmem 'Phosphat **B**uffered **S**aline' (PBS) pro Well gespült, und es wurden hiernach 200 µl eines bestimmten, vor nicht mehr als 24 Stunden hergestellten, Lysier-Puffers (siehe Punkt 9.4) je Well zugegeben.

Nach fünfminütiger Inkubation lösten sich so die Zellen vom Boden ab und konnten mithilfe eines Gummischabers in den Wells gesammelt werden. Diese Zell-Suspensionen wurden sofort in zugehörige Eppendorfgefäße überführt und die 6-Well-Platte verworfen. Die Eppendorfgefäße wurden anschließend für 5 min bei 95°C mit Hilfe eines Thermomixers gekocht, um die Proteinstruktur zu denaturieren.

Abschließend wurden die, mit dem Zellkulturüberstand befüllten Röhrchen und die Eppendorfgefäße mit den Zell-Lysaten bei -20°C eingefroren.

### **3.2 Hemmung mittels Proteasomhemmer Mg 132**

#### **3.2.1 Hemmung in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden**

Die EAhy-Zellen wurden gemäß Punkt 3.1.3 vom Boden der 14 genutzten 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen gelöst und auf sterile 6-Well-Platten überführt. Nach Ablauf der 48 Stunden, die die Zellen zum Anwachsen benötigten, wurde zunächst der Proteasomhemmer Mg 132, gemäß Packungsanleitung in 1 ‰ DMSO gelöst, in den entsprechenden Konzentrationen vorbereitet. Im Zellkulturmedium gelöst ergaben sich folgende Konzentrationen:

Mg 132	0,01 µM
Mg 132	0,1 µM
Mg 132	1 µM
Mg 132	10 µM
.....	
DMSO	0,1%

Der Versuch wurde anschließend gemäß der Punkte 3.1.2 und 3.1.3 durchgeführt, wobei die Inkubationszeit 24 Stunden betrug.

### **3.2.2 Hemmung in den Konzentrationen 0,01 $\mu\text{M}$ und 1 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume**

Die Vorbereitung der nächsten zwei Versuche erfolgte gemäß Punkt 3.1.1, wobei in diesem Fall der Proteasomhemmstoff in dem ersten Versuch nur in der Konzentration 0,01  $\mu\text{M}$  verwandt wurde und in dem folgenden Versuch in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$ . Die Durchführung entsprach der unter Punkt 3.1.2, wobei allerdings die Inkubationszeit der mit dem Hemmstoff versetzten Zellen verändert wurde und sowohl für Mg 132 0,01  $\mu\text{M}$  als auch für 1  $\mu\text{M}$  die Versuchsplanung ein Ermitteln der zu bestimmenden Werte bei Stunde 0 vorsah. Daher wurde sofort der Überstand der ersten 6-Well-Platten (Mg 132 0 Stunden und DMSO 0 Stunden) ohne Inkubation gemäß Punkt 3.1.3 abpipettiert und die Zellen geerntet. Die verbliebenen Platten wurden bei 37°C und 5%-iger CO<sub>2</sub>-Zufuhr inkubiert und es wurden gemäß Versuchsplanung zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellkulturüberstand und die Zellen geerntet:

Zeitschema:

0 Stunden  
1 Stunde  
3 Stunden  
6 Stunden  
9 Stunden  
12 Stunden  
24 Stunden

– jeweils Mg 132 0,01  $\mu\text{M}$  oder 1  $\mu\text{M}$  und DMSO 0,1%

### **3.3 Hemmung mittels Proteasomhemmer Epoxomicin**

#### **3.3.1 Hemmung in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden**

Bei den Versuchsreihen, bei denen der Proteasomhemmstoff Epoxomicin genutzt wurde, änderten sich bei der Durchführung nur die Konzentration des eingesetzten Stoffes und die Handhabung, da Epoxomicin lichtempfindlich ist und durch entsprechende Abdeckung gegen Zersetzung geschützt werden muss.

In Verbindung mit dem ersten Versuch, der mit diesem Proteasomhemmstoff durchgeführt wurde, wurden Epoxomicin – gemäß Packungsanleitung vorher in DMSO gelöst – und die mitgeführte Kontrolle DMSO dabei in folgenden Konzentrationen angemischt:

Epoxomicin	0,0001 $\mu$ M
Epoxomicin	0,001 $\mu$ M
Epoxomicin	0,01 $\mu$ M
Epoxomicin	0,1 $\mu$ M
Epoxomicin	1 $\mu$ M
.....	
DMSO	0,1%

#### **3.3.2 Hemmung in den Konzentrationen 0,0001 $\mu$ M und 0,01 $\mu$ M über verschiedene Zeiträume**

Die Vorbereitung der nächsten beiden Versuche mit dem Proteasomhemmstoff Epoxomicin erfolgte erneut gemäß Punkt 3.1.1, wobei in diesem Fall der Proteasomhemmstoff wiederum je Versuch in nur einer Konzentration verwandt wurde (0,0001  $\mu$ M bzw. 0,01  $\mu$ M). Die Durchführung änderte sich im Prinzip nicht. Nur die Inkubationszeit der mit dem Hemmstoff versetzten Zellen wurde



wie schon bei der Durchführung mit Mg 132 verändert. Auch hier sah die Planung ein Ermitteln bei Stunde Null vor. Daher wurde erneut direkt der Überstand der ersten 6-Well-Platten (Epoxomicin 0 Stunden und DMSO 0 Stunden) ohne Inkubation gemäß Punkt 3.1.3 abpipettiert und die Zellen geerntet. Die verbliebenen Platten wurden wie schon zuvor inkubiert und gemäß Versuchsplanung der Zellkulturüberstand und die Zellen nach verschiedenen Zeiträumen geerntet:

Zeitschema:

0 Stunden  
1 Stunde  
3 Stunden  
6 Stunden  
9 Stunden  
12 Stunden  
24 Stunden

– jeweils Epoxomicin 0,0001 µM oder 0,01 µM und jeweils DMSO 0,1%

### **3.4 Messung der Zytotoxizität der eingesetzten Stoffe**

Um eine u.U. vorliegende zellschädigende Wirkung der bei den Zellversuchen eingesetzten Proteasomhemmstoffe zu erkennen, wurde eine sogenannte **Laktat-Dehydrogenase (LDH) – Zytotoxizitäts-Messung** durchgeführt. Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches Kit der Firma Roche verwendet.

Zur Durchführung der Messung wurde im Vorfeld eine ausreichende Menge EAhy-Zellen in 2 x 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen angezüchtet. Die Zellen wurden mittels 2-fach Trypsin – es wurde eine jeweilige Menge von 2 ml eingesetzt –

abgelöst und hiernach je 4 ml Zellkulturmedium (aufbereitet mit 10% FCS und 5x HAT) zugegeben.

Diese so entstandenen Zellsuspensionen wurden in ein 15 ml – Falcon–Röhrchen überführt und sodann bei 36°C und 3,5 g (Erdschwerebeschleunigung:  $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ ) für 5 min zentrifugiert. Da sich das Zell–Pellet infolgedessen am Boden des Falcon–Röhrchens befand, konnte der Überstand abpipettiert und das Falcon–Röhrchen mit 10 ml frischem Zellkulturmedium (aufbereitet mit 10% FCS und 5x HAT) aufgefüllt werden. Das Zell–Pellet löste sich dadurch vom Boden des Röhrchens ab, und die Suspension konnte in eine sterile Schale überführt werden. Mittels einer Mehrkanalpipette wurden anschließend je 100  $\mu\text{l}$  der Zell–Suspension in die entsprechenden Wells einer sterilen 96–Well–Platte transferiert. Hierbei ist zu beachten, dass 6 Wells für die mitzuführende 'Background Control' frei bleiben mussten.

Die so aufbereitete 96–Well–Platte wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C und einer 5%igen  $\text{CO}_2$ –Zufuhr inkubiert. Dies ermöglichte es den EAhy–Zellen, am Boden der Wells festzuwachsen.

Im Anschluss an die Inkubationszeit konnten die Lösungen mit den Testsubstanzen angefertigt werden. Hierbei war zu beachten, dass die bei den Zellversuchen verwandten Proteasomhemmstoffe und die während dieser Zytotoxizitäts–Messung benötigten Kontroll–Substanzen im Vorhinein in doppelter Konzentration anzumischen waren, da sie während der Zugabe in die entsprechenden Wells noch einmal 1:1 verdünnt wurden und dadurch die Konzentrationen gemäß der durchgeführten Zellversuche bzw. für eine korrekte Kontrolle erreichten.

Das Vorbereiten der jeweiligen Proben erfolgte nach folgendem Schema, wobei immer eine Menge für jeweils 6 Wells (gemäß einer 6–fach Messung) angefertigt wurde:

## Methoden

---

Mg 132	20 $\mu$ M
Mg 132	2 $\mu$ M
Mg 132	0,2 $\mu$ M
Mg 132	0,02 $\mu$ M
Epoxomicin	2 $\mu$ M
Epoxomicin	0,2 $\mu$ M
Epoxomicin	0,02 $\mu$ M
Epoxomicin	0,002 $\mu$ M
Epoxomicin	0,0002 $\mu$ M

High Control	100 $\mu$ l Zellkulturmedium mit 4% Triton-X 100
--------------	--

Das Zellkulturmedium wurde, den Bedingungen der vorangegangenen Zellversuche angepasst, mit 1% FCS und 5x HAT.

Nach der Vorbereitung der benötigten Substanzen wurde das in den Wells der 96-Well-Platte über Nacht inkubierte Medium vollständig abpipettiert und verworfen, ohne dabei die Zellen am Boden zu beschädigen. Nachfolgend konnten mit einer Multipette jeweils 100  $\mu$ l Zellkulturmedium (entsprechend der vorangegangenen Zellversuche versetzt mit 1% FCS und 5x HAT) in jedes Well vorgegeben werden. In die für die obligatorische 'Background Control' und die 'Low Control' vorgesehenen Wells wurden hierbei direkt 200  $\mu$ l gegeben. Die Wells der 'Background Control' beinhalteten – wie oben beschrieben – somit nur Zellkulturmedium und keine EAhy-Zellen, während die Wells der 'Low Control' analog dem im Kit der Firma Roche vorgegebenen Schema mit Zellen und Zellkulturmedium versetzt wurden. In diese Wells wurden keine weiteren Stoffe gegeben.

Anschließend wurden je 100  $\mu$ l der angefertigten Testsubstanzen in die vorgesehenen Wells der 96-Well-Platte pipettiert, was im Resultat der oben beschriebenen, erneuten Verdünnung im Verhältnis 1:1 entsprach und zu den in den Zellversuchen genutzten Konzentrationen der Proteasomhemmstoffe

## Methoden

---

bzw. der im Kit der Firma Roche vorgegebenen Konzentration der 'High Control' führte. So ergab sich schließlich insgesamt folgendes Schema:

Mg 132	0,01 $\mu\text{M}$
Mg 132	0,1 $\mu\text{M}$
Mg 132	1 $\mu\text{M}$
Mg 132	10 $\mu\text{M}$
Epoxomicin	0,0001 $\mu\text{M}$
Epoxomicin	0,001 $\mu\text{M}$
Epoxomicin	0,01 $\mu\text{M}$
Epoxomicin	0,1 $\mu\text{M}$
Epoxomicin	1 $\mu\text{M}$
DMSO	0,1%

Background Control	200 $\mu\text{l}$ Zellkulturmedium
Low Control	200 $\mu\text{l}$ Zellkulturmedium & EAhy-Zellen
High Control	200 $\mu\text{l}$ Zellkulturmedium mit 2% Triton-X 100 & EAhy-Zellen

Die nun mit den zu messenden Stoffen versetzte 96-Well-Platte wurde nachfolgend bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Zufuhr von 5% für 24 Stunden inkubiert. Dies entsprach der maximal in den Zellversuchen durchgeführten Inkubationszeit.

Nach Ablauf der festgelegten Inkubationszeit wurden mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 100  $\mu\text{l}$  des Überstandes je Well abpipettiert und in die korrespondierenden Wells einer weiteren 96-Well-Platte überführt. Die vorher genutzte Platte konnte sodann verworfen werden.

Hiernach wurden 100  $\mu\text{l}$  je Well des im Voraus frisch angemischten Reaktionsmixes – siehe folgendes Schema – des Fertig-Kits der Firma Roche pipettiert:

Menge berechnet für 100 Wells:

250 µl des Katalysators (Diaphorase/NAD<sup>+</sup> Lösung)

11,25 ml des Farbstoffes

---

ergibt 11,5 ml Reaktionsmix

Nach dieser Aufbereitung wurde die 96-Well-Platte abgedeckt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss konnte die Wellenlänge der jeweiligen Überstände gemessen und mit den einzelnen, mitgeführten Kontrollen verglichen und mittels eines ELISA-Lesegerätes bei 490 nm gemessen und anschließend ausgewertet werden.

### **3.5 Proteinbestimmung nach LOWRY**

Nachdem deutlich wurde, dass die Bestimmung der Proteinkonzentration nicht mit der üblichen Methode nach Bradford möglich war, da das im Lysierpuffer enthaltene SDS mit dem Farbstoff der Bradford-Reagenz interagiert, wurde die Proteinbestimmung nach Lowry verwandt.

Hierzu ist kommerziell ein fertiges Kit der Firma Pierce erhältlich, welches zwei verschiedene Reagenzien enthält. Das eine Reagenz ist gemäß Packungsanleitung eine Lösung aus Kupfersulfat, Kaliumiodid und eines Natriumsalzes in einem alkalischen Natriumkarbonat-Puffer. Das Zweite ist ein konzentriertes Folin-Ciocalteu-Reagenz. Nach entsprechender Aufbereitung entstehen durch eine Reaktion der eingesetzten Proteinproben mit dem ersten Reagenz ein Kupfer-Protein-Komplexe. Durch Zugabe des verdünnten Folin-Ciocalteu-Reagenz entsteht ein wasserlösliches Produkt, dessen bläuliche Färbung eine photometrische Quantifizierung der in den jeweiligen Proben enthaltenen Proteinkonzentration ermöglicht.

Die Messungen wurden in Einzelbestimmungen durchgeführt und anhand einer Standardkurve mit anschließender Berechnung die Proteinkonzentration

ermittelt. Da die Standardkurve schon vorher festgelegt und abgespeichert wurde, war eine Standardreihe an Küvetten bei der Proben-Aufbereitung nicht erforderlich.

In Küvetten wurden jeweils 190 µl Aqua bidest vorgelegt. Zusätzlich wurden 200 µl steriles Wasser in eine Küvette pipettiert, die als 'Blank' markiert wurde. Diese Küvette wurde später zur Festlegung des Nullwertes der Messung genutzt und enthielt keinerlei Probe. Anschließend wurden die jeweiligen Proben (Zellysate) à 10 µl in die entsprechenden Küvetten pipettiert. Vor dem nächsten Pipettierschritt wurde das Folin-Ciocalteau-Reagenz hergestellt. Dazu wurde eine Verdünnung mit dem Folin-Ciocalteau-Konzentrat des Kits und Aqua bidest im Verhältnis 1:1 hergestellt. Die Menge des benötigten Reagenz konnte vorher anhand der Probenanzahl berechnet werden. Diese Lösung wurde immer erst kurz vor Gebrauch hergestellt und vor Licht geschützt, da sie sonst zersetzt worden wäre. Anschließend wurden 1 ml des zweiten Lowry-Reagenz des Kits in jede Küvette pipettiert und mit Hilfe von Einwegspateln gemischt. Die Flüssigkeit in den Küvetten bekam so die durch chemische Reaktionen bedingte bläuliche Färbung. Die Küvetten wurden nun für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine ausreichende Reaktion der Reagenzien mit den Proben zu gewährleisten. Nach Ablauf dieser Zeit wurden in jede Küvette 100 µl der vorher hergestellten Folin-Ciocalteau-Aqua bidest-Lösung pipettiert und erneut mit Hilfe von Einwegspateln gemischt, bis keine Schlieren mehr in der Flüssigkeit zu sehen waren. Die Küvetten wurden nun abgedeckt im Dunkeln – zum Schutz des Folin-Ciocalteau-Reagenz – für 30 min inkubiert. Anschließend konnte die photometrische Messung anhand einer vorher erstellten Standardkurve und immer im Vergleich mit der 'Blank'-Küvette durchgeführt werden. Die Absorption wurde hierbei bei 750 nm gemessen und die anhand der Standardkurve ermittelten Werte konnten mit folgender Formel in Proteinkonzentrationen (µg/µl) umgerechnet werden:

$$\frac{\text{Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l})}{\text{eingesetzte Probenmenge } (\mu\text{l})} * 20 \text{ (Probenmenge in Verdünnung)}$$
$$= \text{Proteinkonzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

### 3.6 Messung der ADMA-Konzentration mittels LC-MS/MS im Zellkulturüberstand

Um die Werte des bei den durchgeführten Zellversuchen evtl. freigesetzten ADMA zu ermitteln, wurden die ADMA-Konzentrationen in den zuvor gewonnenen Überständen mittels LC-MS/MS quantifiziert. Diese Methode erlaubt – anstelle einer chromatographischen Trennung – eine Messung durch spezifische Fragmentierungsstrukturen mit nur einem vorhergehenden Derivations-Schritt und die gleichzeitige Messung von ADMA, SDMA und L-Arginin in den Proben (Schwedhelm E et al; 2007).

Auf eine 96-Well-Platte wurde eine mit 40  $\mu\text{mol}$  D<sup>7</sup>-L-Arginin und 2  $\mu\text{mol}$  D<sup>6</sup>-ADMA pro Well (als Standard für ADMA und SDMA bei der Auswertung) als internem Standard bereits fertig beschichtete und zur Mikrofiltration geeignete 96-Well-Platte aufgesetzt und mit einer Multipette wurden je Well 100  $\mu\text{l}$  Methanol vorgelegt. Durch 5-minütiges Mischen bei 3000 Umdrehungen auf dem Schüttler wurde der interne Standard im Methanol gelöst. Anschließend wurden die Proben pipettiert. Hierbei wurden immer eine Kalibrationsreihe und eine Reihe von Qualitätskontrollen mitgeführt. Es wurden je Well und insgesamt je Konzentration dreimal 20  $\mu\text{l}$  entsprechend folgendem Schema pipettiert :

<u>Standard:</u>	
<b>Well 1 bis 3:</b>	Aqua bidest
<b>Well 4 bis 6:</b>	0,5 $\mu\text{M}$ ADMA 0,5 $\mu\text{M}$ SDMA 60 $\mu\text{M}$ L-Arginin
<b>Well 7 bis 9:</b>	1 $\mu\text{M}$ ADMA 1 $\mu\text{M}$ SDMA 120 $\mu\text{M}$ L-Arginin
<b>Well 10 bis 12:</b>	2 $\mu\text{M}$ ADMA 2 $\mu\text{M}$ SDMA 250 $\mu\text{M}$ L-Arginin

Qualitätskontrolle:

<b>1) Low Control (Well 13 bis 15)</b>	Plasma basal	
<b>2) Medium Control (Well 16 bis 18)</b>	Plasma basal	+ 0,5 µM ADMA 0,5 µM SDMA 100 µM L-Arginin
<b>3) High Control (Well 19 bis 21)</b>	Plasma basal	+ 1 µM ADMA 1 µM SDMA 250 µM L-Arginin

Diese Werte umfassen die Größenordnung der i.d.R. zu erwartenden Messwerte. Somit ist ein Vergleich der Werte der zu messenden Proben mit einer Standardkurve gewährleistet.

Nun wurden je Well 50 µl der zu messenden Proben pipettiert. Anschließend wurden die Substanzen auf der Platte erneut für 5 min bei 3000 Umdrehungen auf den Schüttler gestellt.

Das anschließende Zentrifugieren der Proben erfolgte für 5 min bei 2000 Umdrehungen und einer Temperatur von 4°C. Nachdem die Proben so in die untere 96-Well-Platte gebracht wurden, konnte die obere Platte verworfen werden, und die Proben-Lösungen wurden bei 80°C für ungefähr 1 Stunde auf den Thermoblock gestellt, bis die in den Wells enthaltene Flüssigkeit vollständig verdampft und die Reste am Boden auskristallisiert waren.

Sobald sich keine Lösung mehr in den Wells der Platte befand, wurde diese für einen kurzen Zeitraum zum Abkühlen beiseite gestellt. Anschließend wurden mit Hilfe einer Multipette 100 µl buthanolische HCL (Buthanol und Acetylchlorid in Lösung) unter dem Abzug (buthanolische HCL kann gesundheitsschädigende Wirkung haben) je Well pipettiert, da die zugesetzten Proben und Standards als ihre Butylester gemessen wurden. Die Proben wurden dann für ½ Stunde bei genau 75°C auf dem Thermoblock abgedeckt derivatisiert.

Das im Anschluss folgende Zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen für 1 min und einer Temperatur von 4°C ermöglichte es der an der Abdeckung der Platte kondensierten Flüssigkeit, sich wieder in den entsprechenden Wells anzusam-



meln. Nun wurde die Abdeckplatte entfernt und die Platte erneut bis zum vollständigen Verdampfen der Flüssigkeit – dies entsprach ca. 1 Stunde – bei 80°C auf den Thermoblock gestellt. Hiernach waren die aufbereiteten Proben vollständig auskristallisiert und die Platte konnte abgedeckt bei -20°C im Eisfach zwischengelagert oder direkt zur Messung vorbereitet werden.

Zur Durchführung der Messung mittels LC-MS/MS mussten die vorher nach obigem Schema aufbereiteten 96-Well-Platten Raumtemperatur haben.

War diese Bedingung gegeben, so konnten mittels einer Multipette je Well 100 µl der zum Messen benötigten Lösung (siehe Punkt 9.4) zugegeben werden. Vor dem Start der Messung wurde die Platte nun ein letztes Mal für 1 min bei 300 Umdrehungen auf den Schüttler gestellt.

Der pH-Wert wurde – eventuell durch Zugabe von Säure – auf pH 4 eingestellt, die Platte auf einen Prostar-Autosampler gestellt und jeweils 10 µl der Proben direkt in die LC-MS/MS überführt. Die Analyse wurde mittels einer Varian 1200L Triple Quadropole MS durchgeführt, die mit 2 HPLC-Pumpen ausgestattet ist und im Laufe der Messung typische Fragmente der einzelnen Stoffe erzeugt, die selektiert werden und schliesslich ein Signal erzeugen.

Die Auswertung der Messung erfolgte mithilfe der zugehörigen Varian-Computer-Software.

### **3.7 Der Quotient aus ADMA und SDMA**

Der Quotient aus ADMA und SDMA ist im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse der ADMA-Konzentration und der durch Gelelektrophorese/Western-Blot erfolgten Auswertung der Menge an ADMA-abbauenden Enzymen (DDAHs) ein Maß für die Aktivität eben dieser Enzyme. Er wird durch mit Hilfe der Werte der ADMA-Messungen und der im Rahmen der LC-MS/MS-Messung ebenfalls ermittelten Werte des SDMA ermittelt. Ein Rückschluss auf die Aktivität der DDAHs ist möglich, da SDMA auf dem gleichen Weg wie ADMA

durch die Arbeit des Proteasoms entsteht, aber nicht über die DDAH abgebaut wird.

### **3.8 Gel-Elektrophorese / Western Blot**

Eine Elektrophorese dient zur Auftrennung bestimmter Teilchen. Dabei wird eine Spannung angelegt, die dazu führt, dass die Teilchen – abhängig von ihrer Größe und der elektrischen Ladung – in einem Trägermaterial unterschiedlich schnell zur anderen Seite wandern.

Als Trägermaterialien können – je nach den zu trennenden Teilchen – verschiedene Stoffe zum Einsatz kommen, wobei bei der Protein-Trennung i.d.R. Polyacrylamid-Gele verwendet werden. Diese Art der Trennung wird dann als 'Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis' bezeichnet (SDS-PAGE). SDS bindet als negatives Detergenz an die einzelnen Proteinmoleküle, während es gleichzeitig zur gegenseitigen Abstoßung zwischen den einzelnen SDS-Molekülen kommt. Dies führt zu einer Maskierung der eigentlichen Ladung der Protein-Moleküle, die somit zur gegenüberliegenden Elektrode wandern und auf diese Art linear, gemäß ihrer Größe, aufgetrennt werden können. Anschließend werden diese so entstehenden Protein-Banden-Muster durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Membran transferiert. Dieser Vorgang – sprich das Übertragen auf eine Trägermembran – wird Western Blot genannt. Die Protein-Banden-Muster bleiben bei dem Vorgang komplett erhalten und können – auf der Trägermembran haftend – weiter bearbeitet werden. So kann man mittels der sogenannten Immunodetektion durch das Antigen-Antikörper-Bindungsprinzip bestimmte Banden markieren. Lässt man bei der vorhergehenden Elektrophorese einen kommerziell erhältlichen Protein-Standard mitlaufen, so lassen sich die entstehenden Protein-Banden-Muster später z.B. mithilfe einer Computer-Software auch vergleichen und auswerten.

Die Gel-Elektrophorese diente im Zuge dieser Arbeit dazu, die Menge der ADMA-abbauenden Enzyme DDAH-1 und -2 nachzuweisen, sowie zur Klä-

rung, ob das Proteasom in den Versuchen auch tatsächlich gehemmt wurde. Dies würde man anhand eines spezifischen Antikörpers erkennen, der an ubiquitynierte Proteine bindet, die sich durch fehlenden Abbau des gehemmten Proteasoms anstauen würden und so sichtbar wären.

Zu Beginn mussten spezifische Trägermaterialien hergestellt werden, die zur Auftrennung der durch die vorangegangenen Zellversuche gewonnenen Proteinfragmente dienen.

Es wurden – wie bei der Protein-Auftrennung üblich – Polyacrylamid-Trenngele genutzt, die SDS enthielten. Dazu wurden 7,5%-ige Trenngele gegossen, die eine Dicke von 1,00 mm aufwiesen, und durch die Auswahl von 15er-Kämmen konnten mit jedem hergestelltem Gel 15 Taschen befüllt werden. Dabei wurde in eine Tasche immer ein Standard pipettiert, der als Anhaltspunkt für die Molekülgröße der im Laufe des Versuches nachgewiesenen Proteine diene.

Vorversuche ergaben, dass es – aufgrund der unterschiedlichen Molekülgrößen der nachzuweisenden Proteinfragmente von DDAH-1, DDAH-2 und der Menge an ubiquitynierten Proteinen – möglich war, in einem Versuch mit allen Antikörpern gleichzeitig zu arbeiten. So musste nur eine geringe Menge der in den vorangegangenen Zellversuchen gewonnenen, begrenzten Probenmenge an denaturiertem Protein genutzt werden.

Um einen Vergleich zwischen den Proben und ein gleichmäßiges 'Laufen' derselbigen zu ermöglichen, wurden immer genau 10 µl Probe pipettiert und mit 5 µl eines kommerziell erhältlichen, mit Mercaptoethanol aufzubereitenden, 'Laemmli Sample Buffers' gemischt. Zudem wurde immer ein spezifischer Antikörper zur Ladungskontrolle genutzt – der Vimentin-Antikörper, welcher eine Molekülgröße von 58 kDa aufweist und dessen Ziel-Antigen in allen Zellen vorhanden ist.

Zum Herstellen der Polyacrylamid-Gele wurden 1,00 mm 'Spacer Plates' und die zugehörigen Deckplatten mit 1N KOH für 15 min vorbehandelt, mit destilliertem Wasser abgespült, mit Isopropanol gesäubert und mittels zugehöriger Haltesysteme eingespannt, damit zwischen den Glasplatten ein

Zwischenraum entstand, in den dann die Gele gefüllt werden konnten. Nach einer Dichtigkeitsprüfung durch Einfüllen und wieder Auskippen von Aqua bidest, konnte das im Voraus hergestellte flüssige Trenngel (siehe Punkt 9.4) in den Zwischenraum pipettiert werden. Hierbei mussten ca. 1 cm Abstand zur oberen Glaskante eingehalten werden, da im Anschluss das Sammelgel oberhalb des Trenngels pipettiert wurde. Um den entstehenden Rand des Trenngels zu glätten, wurde es mit ca. 1 ml Isopropanol überschichtet.

Nach dem Polymerisieren des Trenngels konnte das in der Zwischenzeit angefertigte flüssige Sammelgel (siehe Punkt 9.4) nach dem Abkippen des Isopropanols auf das Trenngel pipettiert werden.

Dann wurden die – vorher ebenfalls mit Isopropanol gereinigten – 15er-Kämme in den Raum zwischen den Glasplatten gebracht. Diese führten dazu, dass das Sammelgel unter Ausbildung von Taschen polymerisierte. Die fertigen Polyacrylamid-Gele konnten anschließend mit den Proben und dem oben angeführten Standard befüllt werden, um die eigentliche Elektrophorese durchzuführen. Dies geschah nach dem Entfernen der 15er-Kämme, indem die Suspension aus den jeweiligen, zu messenden Proben (die in den Zellversuchen gewonnenen Zell-Lysate mit den bereits denaturierten Proteinen) und dem Sample Buffer (s.o.) in Eppendorfgefäßen vorgelegt und anschließend in die einzelnen Taschen der Gele pipettiert wurden.

Die Gele wurden hierzu bereits in ein spezifisches, für die Elektrophorese genutztes Haltersystem eingespannt, welches mit Laufpuffer (siehe Punkt 9.4) gefüllt wurde. Im Anschluss wurde die Spannung angelegt und den Proteinen bei 150 V für ca. 70 min Zeit zum Auftrennen gegeben. Die Laufzeit orientierte sich hierbei an den bekannten Molekülgrößen der nachzuweisenden Proteine.

Nach der entsprechenden Laufzeit wurde das Gel aus der Halterung genommen, von der Glasplatte auf eine Nitrozellulosemembran überführt und sofort zwischen Wathman-Papier und jeweils 2 Schwämmen in die zugehörige Halterung gebracht und diese mit Transferpuffer (siehe Punkt 9.4) aufgefüllt. Nachfolgend konnte für 1 Stunde eine Stromstärke von 400 mA angelegt werden, wobei aufgrund der Wärmeentwicklung während des Transfers ein Kühlaggregat mit in die Halterung gebracht und das ganze System auf Eis ge-

lagert wurde.

Nach Ablauf der Transferzeit konnte das Gel verworfen werden, da die bei der Elektrophorese entstandenen Banden auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Um eben diese sichtbar zu machen, wurde die Nitrozellulosemembran hiernach mit Ponceau Rot angefärbt und anschließend, unter Orientierung an den entstandenen Banden des mitgelaufenen Standards und den Molekülgrößen der nachzuweisenden Proteine (im Folgenden aufgeführt), in Streifen geschnitten:

Ubiquitinylierte Proteine	ca. 100 bis 250 kDa	
Ladungsmarker Vimentin	ca. 58 kDa	←
DDAH-2	ca. 40 bis 45 kDa	←
DDAH-1	ca. 35 kDa	←

Diese Streifen wurden sodann mit 1x **Tris-Buffered-Saline** (TBS) von der Ponceau Rot-Färbung befreit und nachfolgend in 5%-iger Blockierlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf der Schaukel inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, die später nicht markiert werden sollen. Hiernach wurden die Membranstreifen mit 1x **Tween-TBS** (TBST) gewaschen und konnten dann mit der 1. Antikörperlösung versetzt werden.

Da diese Lösungen (siehe Punkt 9.4) durch längere Standzeit bei Raumtemperatur zersetzt werden, wurden sie erst kurz zuvor hergestellt, und dann direkt auf die zugehörigen Nitrozellulosemembran-Streifen gegeben. Die Streifen wurden über Nacht abgedeckt bei ca. 4°C im Kühlraum auf der Schaukel inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die 1. Antikörperlösung verworfen und die Nitrozellulosemembran-Streifen nach erneutem Waschen mit 1x TBST für eine Stunde mit der jeweiligen 2. Antikörperlösung (siehe Punkt 9.4) bei Raumtemperatur für 1 Stunde auf der Schaukel inkubiert. Anschließend wurde auch diese Lösung verworfen und die Streifen abermals mit 1x TBST gewaschen.

Nachfolgend wurden die Streifen mit einer aus den Reagenzien eines kommerziell erhältlichen Fertigungskits hergestellten ECL-Lösung versetzt. Dadurch konnten die mit Antikörper markierten Protein-Banden anschließend sichtbar gemacht und mit Hilfe der Computer-Software 'Syn Gene' der Firma Gene Tools miteinander verglichen und ausgewertet werden. Dabei erkannte das Programm die Banden der Proteine und verglich automatisch den Unterschied der Intensität der einzelnen Banden.

## **4 Ergebnisse**

### ***4.1 Allgemeines zur Darstellung der Ergebnisse***

Da es sich bei den Versuchen jeweils um 6-fach-Messungen handelte, wurden die Graphen einheitlich mit dem arithmetischen Mittel (Durchschnittswert) erstellt, wobei immer der Standardfehler angegeben wird. Die Signifikanzschwelle wurde in allen Versuchen einheitlich bei  $p < 0,05$  gegen die jeweils mitgeführte Kontrolle festgelegt. Ermittelt wurde die Signifikanz bei den 24-Stunden-Versuchen, in denen verschiedene Konzentrationen eines Stoffes verwandt wurden, mittels t-Test. In den Versuchen mit einer Stoffkonzentration und mehreren Zeiträumen, wurde die Signifikanz mittels 2-Wege-Anova ermittelt.

In der graphischen Darstellung der Ergebnisse wird zur Bezeichnung signifikanter Unterschiede jeweils der ermittelte p-Wert angegeben.

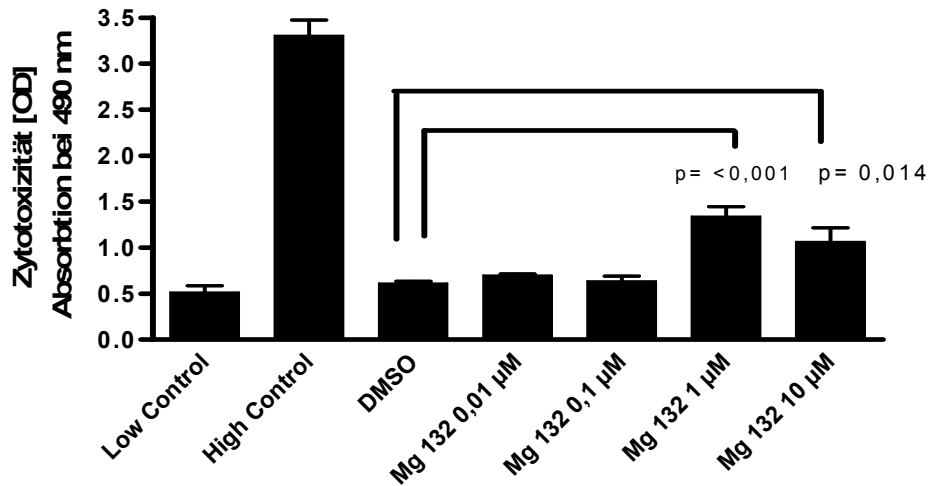
Eine Signifikanz gegen die Zeit bezeichnet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Ausgangspunkt, wobei hier – wenn nicht anders gekennzeichnet – kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und eingesetztem Stoff zu bestimmten Zeitpunkten besteht.

### ***4.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung***

#### **4.2.1 Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung von Mg 132**

Die graphische Darstellung der im Zytotoxizitäts-Assay ermittelten Absorptionen der einzelnen Mg 132-Konzentrationen zeigen eine im Vergleich zu der immer mitgeführten DMSO-Kontrolle erhöhte zellschädigende Wirkung bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Mg 132 (vgl. Abb. 6). Für Mg 132 in der Konzentration

1  $\mu\text{M}$  bedeutet dies  $1,341 \pm 0,104$  (OD) mit  $p < 0,001$  und für 10  $\mu\text{M}$  Mg 132  $1,066 \pm 0,1497$  (OD) mit  $p = 0,014$  gegen die Kontrolle DMSO mit  $0,613 \pm 0,023$  (OD).

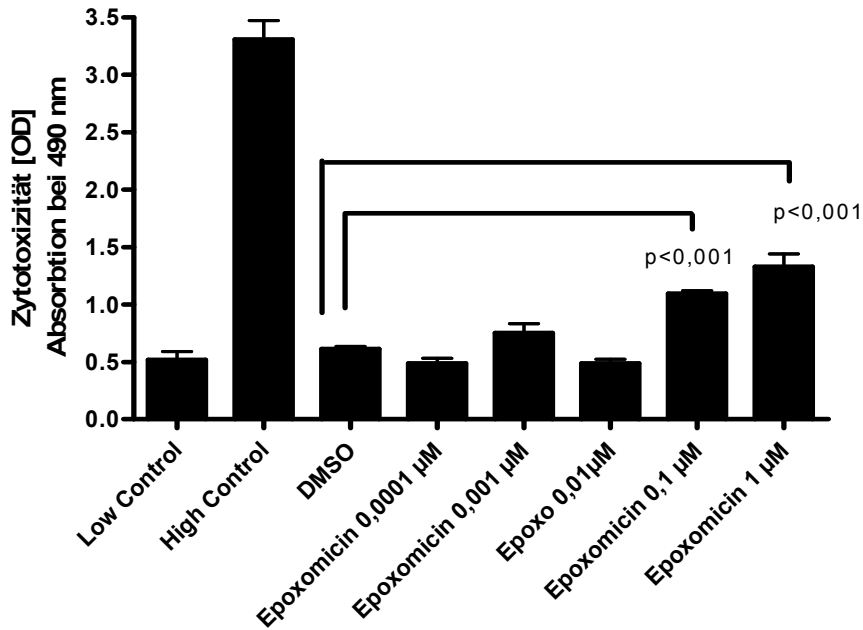


**Abbildung 6:** Zytotoxizität von Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

#### 4.2.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung von Epoxomicin

Die Werte der Epoxomicin-Konzentrationen zeigen in der Zytotoxizitäts-Messung ein ähnliches Bild wie schon bei Mg 132. Während eine Konzentration von 0,001  $\mu\text{M}$  ( $0,753 \pm 0,082$  (OD)) Epoxomicin kaum einen Unterschied zu DMSO ( $0,613 \pm 0,022$  (OD)) erkennen lässt, weisen 0,1  $\mu\text{M}$  ( $1,095 \pm 0,023$  (OD)) mit  $p < 0,001$ ) und 1  $\mu\text{M}$  ( $1,329 \pm 0,112$  (OD)) mit  $p < 0,001$ ) des Proteasomhemmers eine deutlich höhere Absorption in der Messung und damit eine höhere zellschädigende Wirkung auf (vgl. Abb. 7). Auch hier muss man dieses Ergebnis auf die mitgeführte 'High Control' (s.o.) beziehen, die sicher zytotoxisch ist und somit als Vergleichsmarke dient.





**Abbildung 7:** Zytotoxizität von Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

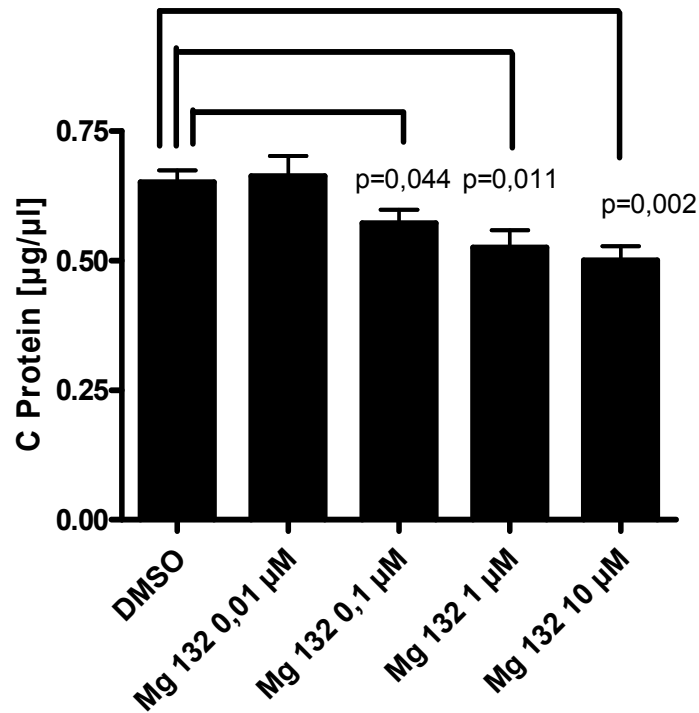
### 4.3 Ergebnisse der Proteinbestimmung nach LOWRY

#### 4.3.1 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

Nachdem der Zellkulturüberstand und die Zellen wie in Punkt 3.1.3 gewonnen und die Zytotoxizität der eingesetzten Stoffe untersucht wurde, konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Durchführung nach dem Prinzip von Lowry ist unter Punkt 3.5 näher ausgeführt.

Die folgende Abbildung (Nr. 8) zeigt die Proteinkonzentrationen nach 24 Stunden bei einer Hemmung des Proteasoms durch Mg 132. Die Kontrolle enthielt hierbei DMSO. Die Proteinkonzentrationen in µg/µl wurden gegen die verwendeten Hemmstoff-Konzentrationen aufgetragen.

Die graphische Darstellung zeigt deutlich einen signifikanten ( $p < 0,05$  gegen Kontrolle) Abfall der Proteinkonzentration in den mit Proteasomhemmer behandelten Zellen. Für Mg 132 0,1  $\mu\text{M}$  bedeutet dies  $p=0,044$  ( $0,57 \pm 0,026 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), für Mg 132 1  $\mu\text{M}$   $p=0,011$  ( $0,53 \pm 0,033 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und für Mg 132 10  $\mu\text{M}$   $p=0,002$  ( $0,50 \pm 0,027 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gegen die Kontrolle ( $0,65 \pm 0,023 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).



**Abbildung 8:**

**Proteinkonzentration für Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden**

#### 4.3.2 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume

Nach Auswertung der durch die Bestimmung der Proteinkonzentration gewonnenen Daten mit Hilfe eines 2-Wege-Anova-Tests, konnte festgestellt werden, dass sich die in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  angegebenen Proteinkonzentrationen von Mg 132 und der Kontrolle DMSO zu keinem Zeitpunkt signifikant unterscheiden. So betragen sie z.B. nach 12 Stunden im Mittel der jeweils durchgeführten 6-fach-Messung  $0,71 \pm 0,072 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  in den durch Mg 132 gehemmten Zellen, und bei der mit DMSO versetzten Kontrolle  $0,77 \pm 0,072 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Einzig signifikant sind die Konzentrationsunterschiede der jeweiligen Stoffe über verschiedene Zeiträume (z.B. Beginn bis Ende des Versuchs) mit  $p < 0,001$  (siehe Abb.9).

### 4.3.3 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume

Wie die Abbildung 9 B) zeigt, sieht man hier – wenn auch nicht signifikant – eine Verminderung der Proteinkonzentration nach Behandlung der Zellen mittels Mg 132 1  $\mu\text{M}$  ( $0,70 \pm 0,057 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $0,80 \pm 0,080 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) nach 3 Stunden.

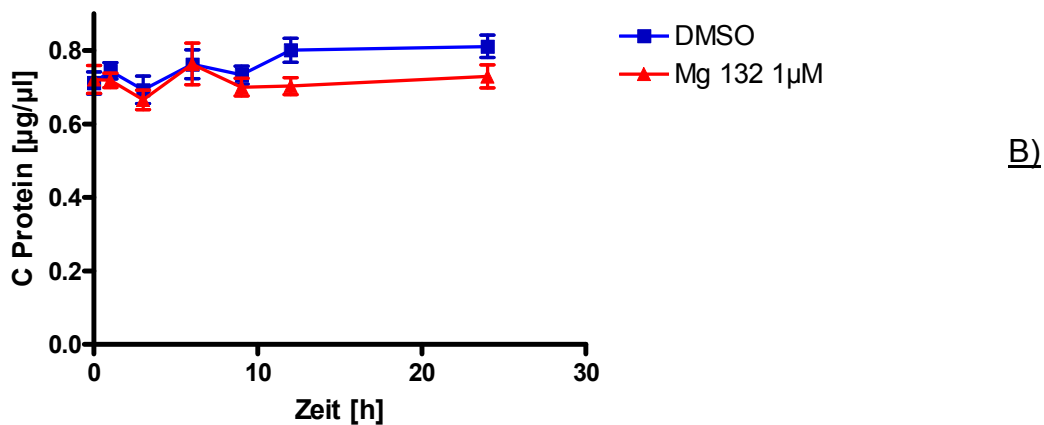
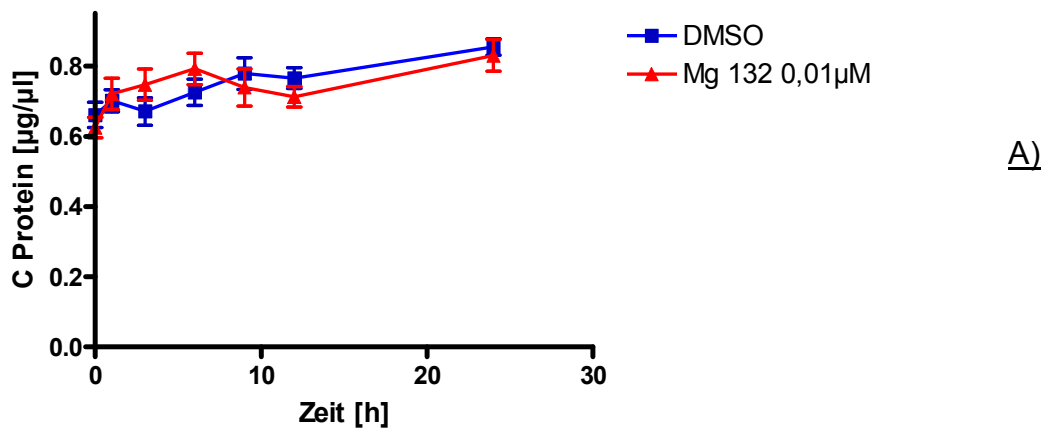
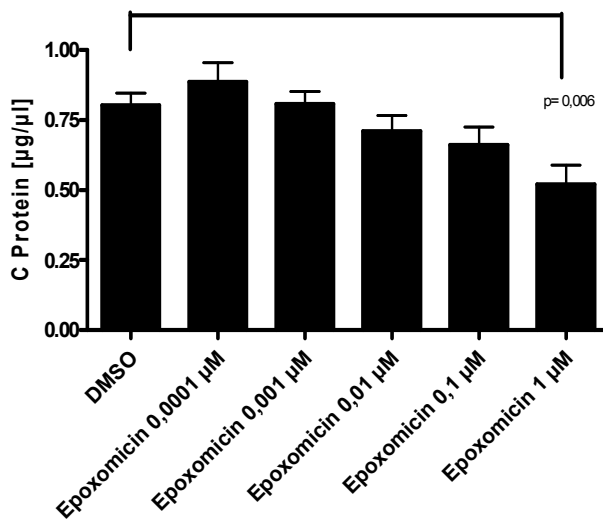


Abbildung 9 A) und B): Proteinkonzentration bei Mg 132 0,01  $\mu\text{M}$  und Mg 132 1  $\mu\text{M}$  über verschiedene Zeiträume

#### 4.3.4 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

Unter Nutzung des Proteasomhemmstoffes Epoxomicin wurde das gleiche Untersuchungsverfahren angewandt wie auch schon bei Mg 132. Auch hier wurde zuerst die Proteinkonzentration durch Nutzung der Lowry-Methode bestimmt. Dazu wurde, wie in Abbildung 10 ersichtlich, die aus den jeweiligen 6-fach Messungen ermittelten Proteinkonzentration (in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gegen die Konzentration des zugegebenen Stoffes (in  $\mu\text{M}$ ) aufgetragen und ein eventuell



**Abbildung 10:**

Proteinkonzentration für Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

signifikanter Unterschied zwischen Epoxomicin und der Kontrolle (DMSO) ermittelt.

Ein signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$  gegen die Kontrolle

( $0,80 \pm 0,045 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

ist nur bei Zugabe

von 1  $\mu\text{M}$  Epoxo-

micin ersichtlich

( $0,52 \pm 0,068 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

mit  $p=0,006$ ).

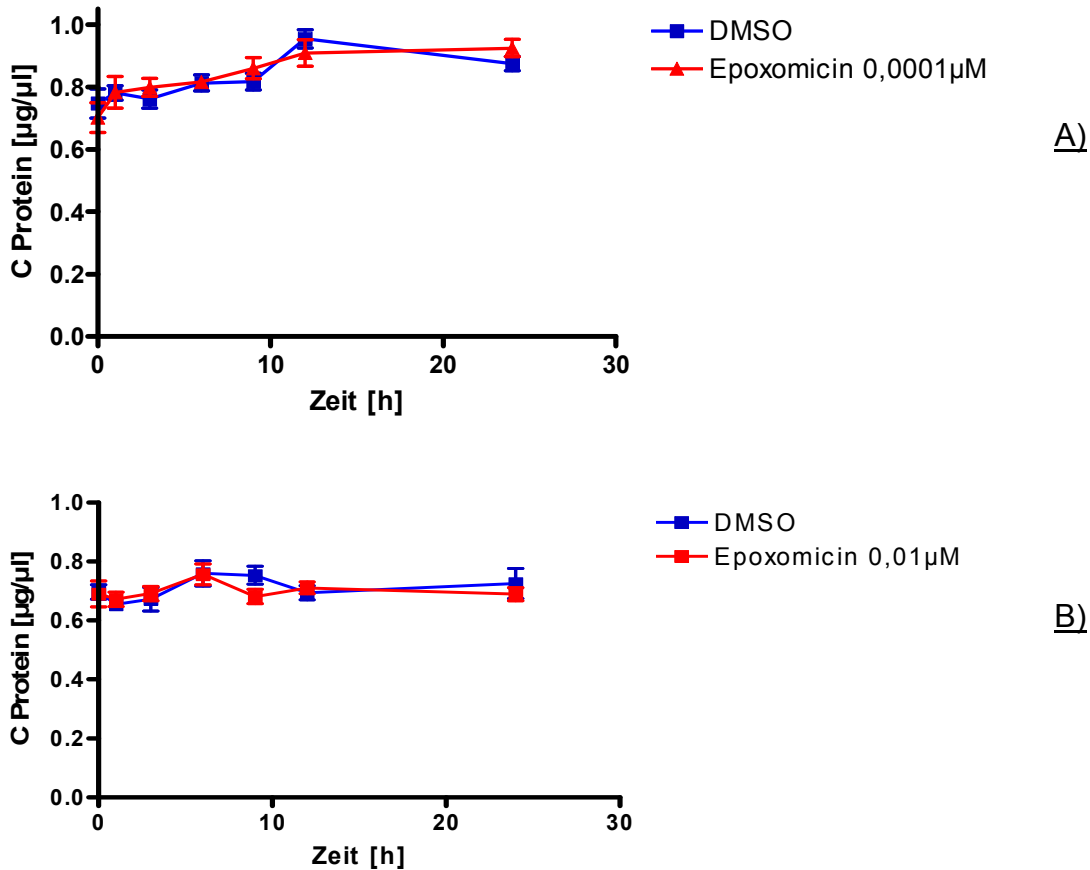
#### 4.3.5 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,0001 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume

Die ermittelten Daten der Proteinkonzentration (in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurden auch in diesem Fall gegen die Zeit (in Stunden) aufgetragen und die Signifikanz mittels 2-Wege-Anova ermittelt. Die Analyse der Daten ergab allerdings keinen

Unterschied zwischen Epoxomicin und der Kontrolle. Zu Stunde 6 wiesen die Daten von der mitgeführten Kontrolle (DMSO) und den mit Epoxomicin versetzten Zellen sogar nahezu identische Werte auf ( $0,81\pm 0,063$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in der Kontrolle gegen  $0,82\pm 0,037$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in den mit Epoxomicin versetzten Zellen). Einzig die Veränderung der Proteinkonzentrationen der jeweiligen Stoffe zu den verschiedenen Zeitpunkten weist eine Signifikanz auf ( $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 11 A)).

#### **4.3.6 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume**

Die Auswertung der Daten der Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Hemmung des Proteasoms in EAhy-Zellen mittels Epoxomicin in der Konzentration 0,01  $\mu\text{M}$  erfolgte identisch zu den vorhergehenden Versuchen. Es fanden sich weder eine Verringerung der Proteinkonzentration noch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier resultierten z.B. aus den Daten von Stunde 6 nahezu identische Werte. Sie betragen für die mit Epoxomicin behandelten Zellen  $0,76\pm 0,086$   $\mu\text{g}$  Protein pro  $\mu\text{l}$  und für die Kontrolle (DMSO)  $0,76\pm 0,106$   $\mu\text{g}$  Protein pro  $\mu\text{l}$ . Die Darstellung der Proteinkonzentrationen weist auch hier wieder eine Signifikanz zu den verschiedenen Zeitpunkten auf (siehe Abb. 11 B)). Auf die Bedeutung dieses Ergebnisses wird unter Punkt 5.2 näher eingegangen.



**Abbildung 11 A) und B):** Proteinkonzentration für Epoxomicin 0,0001 μM und 0,01 μM über verschiedene Zeiträume

#### **4.4 Ergebnisse der Bestimmung der ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand**

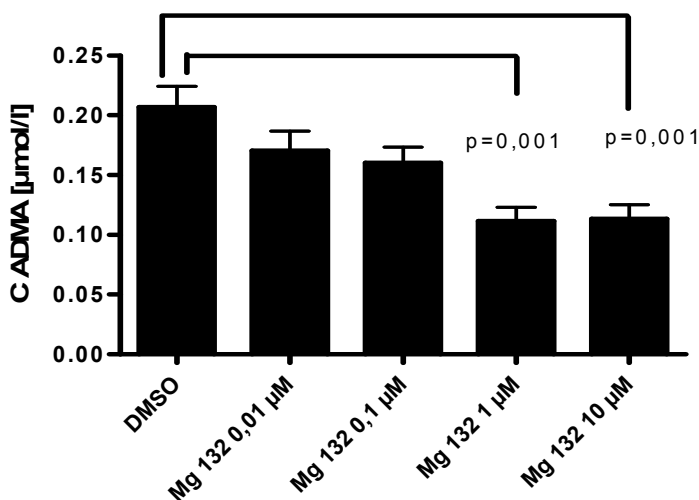
##### **4.4.1 Näheres zur Bestimmung der ADMA-Konzentration**

Nach der Ermittlung der Proteinkonzentration, folgte für die jeweiligen Versuche die Bestimmung der freien ADMA-Konzentration und SDMA-Konzentration im Überstand, der während der Zellkulturversuche gewonnen wurde (siehe Punkt 3.1.3). Die Messungen wurden entsprechend der Darstellung unter Punkt 3.6 durchgeführt und die gewonnenen Daten anschließend mittels der zugehörigen Varian-Software ausgewertet und nachfolgend graphisch dargestellt. Hierbei wurde, wie auch schon bei der Messung der Proteinkonzentrationen, die

Signifikanzschwelle bei  $p < 0,05$  gegen die Kontrolle festgesetzt. Bei den 24-Stunden-Versuchen, in denen unterschiedliche Konzentrationen der Proteasomhemmstoffe verwandt wurden, erfolgte die Analyse mittels eines t-Tests. Zur Analyse der Messungen aus den Zellkulturversuchen, in denen die Wirkung einer einzigen Konzentration des Proteasomhemmstoffes über verschiedene Zeitpunkte genauer betrachtet wurde, wurde ein 2-Wege-Anova-Test eingesetzt. Die Konzentrationen wurden in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben und die Werte als Durchschnittswert der jeweiligen 6-fach-Messung mit Darstellung des Standardfehlers aufgetragen.

#### 4.4.2 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

Für die Messung der freien ADMA-Konzentration in den Überständen aus dem Zellkulturversuch mit dem Proteasomhemmstoff Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen ( $0,01 \mu\text{M}$ ;  $0,1 \mu\text{M}$ ;  $1 \mu\text{M}$ ;  $10 \mu\text{M}$ ) ergab sich eine Verringerung der ADMA-Werte im Vergleich zur Kontrolle (DMSO;  $0,21 \pm 0,017 \mu\text{mol/l}$ ), wobei eine Signifikanz mit  $p < 0,05$  gegen die Kontrolle nur bei  $1 \mu\text{M}$  ( $0,11 \pm 0,011 \mu\text{mol/l}$  mit  $p = 0,001$ ) und  $10 \mu\text{M}$  ( $0,11 \pm 0,012 \mu\text{mol/l}$  mit  $p = 0,002$ ) deutlich wurde (vgl. Abb. 12).



**Abbildung 12:** ADMA-Konzentration bei Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

#### 4.4.3 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume

Die Darstellung der Gesamtheit der ADMA-Werte aus dem Zellkulturüberstand des Versuches

mit Mg 132

0,01  $\mu\text{M}$  über

verschieden

Zeiträume

zeigt eine Sig-

nifikanz gegen

die Zeit

( $p < 0,001$ ) –

also zwischen

0 und 24 Stun-

den (vgl. Abb. 13),

wobei die ADMA-

Werte sich im

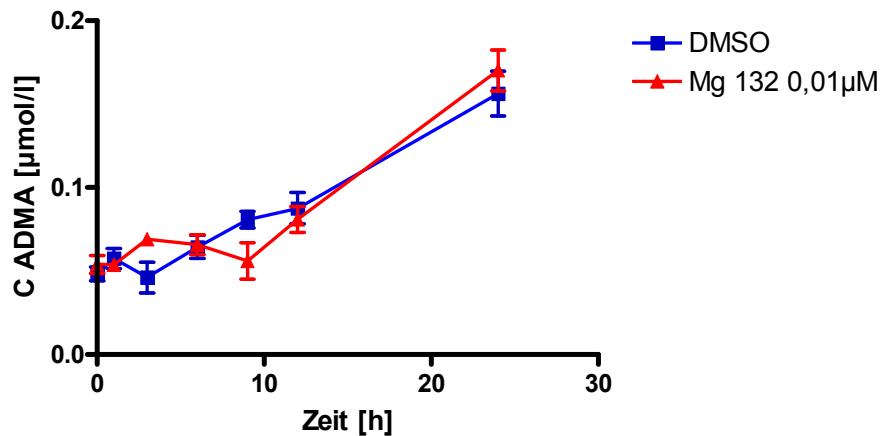
Laufe des Ver-

suches erhöhten und im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO bei der Analyse

durch einen 2-Wege-Anova-Test kein signifikanter Unterschied sichtbar wurde

(vgl. nach 12 Stunden: Mg 132 0,01  $\mu\text{mol}$   $0,08 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$  gegen DMSO

$0,09 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$ ).



**Abbildung 13: ADMA-Konzentration für Mg 132 0,01  $\mu\text{M}$  über verschiedene Zeiträume**

#### 4.4.4 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume

Die graphische Darstellung der gemessenen Konzentration des freien ADMA im

Überstand aus dem Zellkulturversuch mit dem Proteasomhemmer Mg 132 in

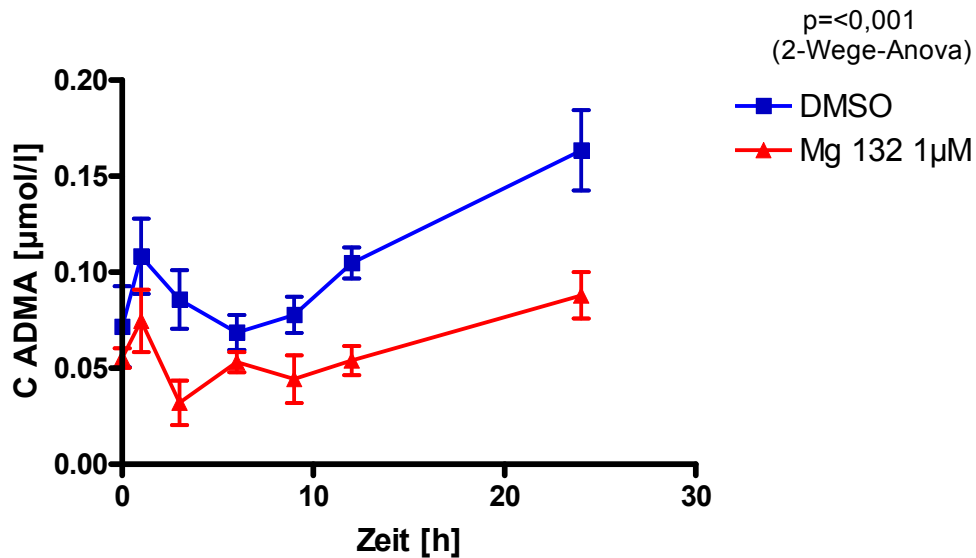
der Konzentration 1  $\mu\text{M}$  über verschiedene Zeiträume gegen die jeweils mitge-

führte Kontrolle DMSO zeigt zeitweise einen Abfall der ADMA-Konzentration.

Nach der Analyse mit einem 2-Wege-Anova-Test zeigt sich sowohl eine



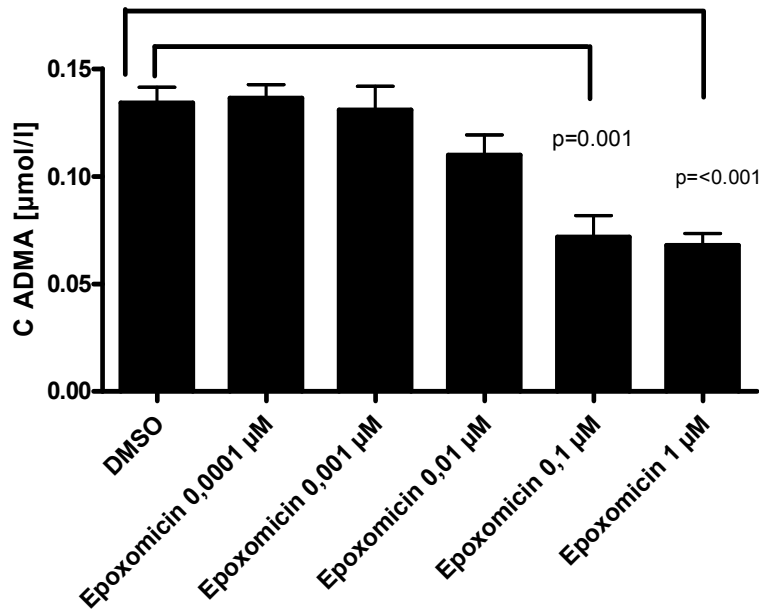
Signifikanz gegen die Zeit ( $p < 0,001$ ), als auch ein signifikanter Unterschied der ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand der mit Mg 132 versetzten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) über verschiedene Zeiträume (vgl. Mg 132 1  $\mu\text{M}$  nach 9 Stunden:  $0,06 \pm 0,03 \mu\text{mol/l}$ , DMSO nach 9 Stunden:  $0,08 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$  und Mg 132 nach 24 Stunden:  $0,07 \pm 0,03 \mu\text{mol/l}$ , DMSO nach 24 Stunden:  $0,16 \pm 0,03 \mu\text{mol/l}$ ) (vgl. Abbildung 14).



**Abbildung 14:** ADMA-Konzentration für Mg 132 1  $\mu\text{M}$  über verschiedene Zeiträume

#### 4.4.5 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

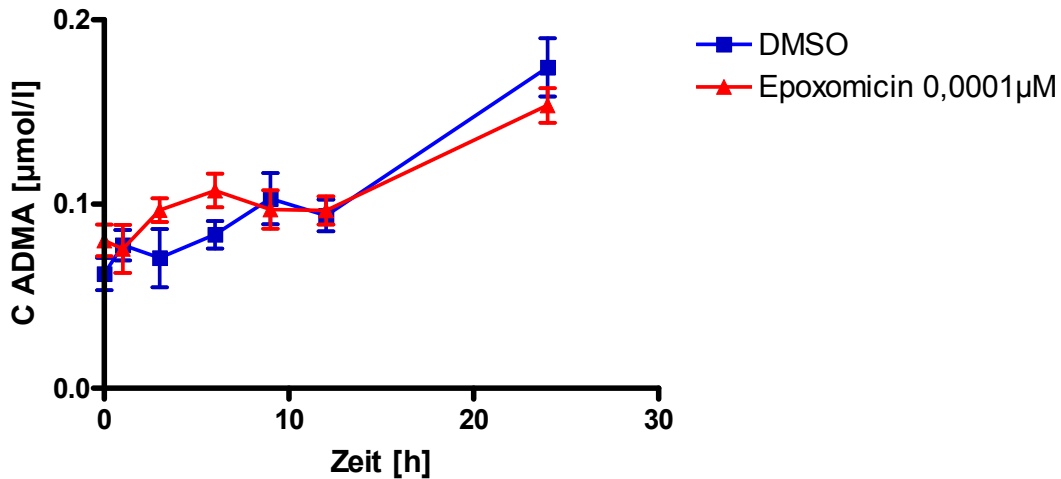
Stellt man die Werte der ADMA-Messung aus dem Zellkulturüberstand des 24-Stunden-Versuches mit unterschiedlichen Konzentrationen von Epoxomicin graphisch dar und analysiert sie mithilfe eines t-Tests, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur mitgeführten DMSO-Kontrolle ( $0,13 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$ ) bei 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Epoxomicin (beide  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$ ). Bei 0,0001  $\mu\text{M}$  und 0,001  $\mu\text{M}$  Epoxomicin lässt sich kein Unterschied im Vergleich zu DMSO erkennen. 0,01  $\mu\text{M}$  Epoxomicin für 24 Stunden lässt in der Grafik wiederum einen Abfall gegenüber DMSO erkennen, der aber die Signifikanzschwelle mit  $p = 0,066$  ( $0,11 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$ ) gegen die Kontrolle nicht unterschreitet (vgl. Abb. 15).



**Abbildung 15:** ADMA-Konzentration für Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden

#### 4.4.6 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,0001 µM über verschiedene Zeiträume

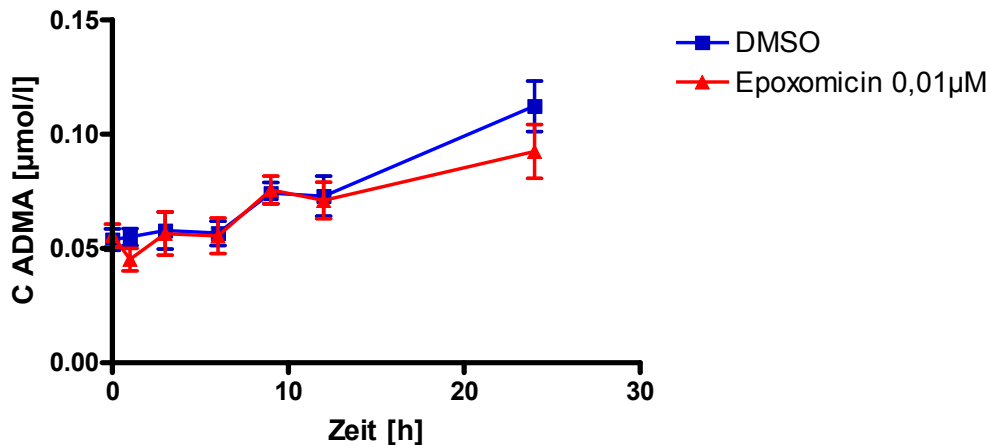
Die Werte der ADMA-Konzentrationen nach verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen mit Epoxomicin 0,0001 µM gegen die Kontrolle zeigen nach der Analyse mittels eines 2-Wege-Anova-Tests keinerlei Signifikanz. Mit der Zeit nehmen die ADMA-Konzentrationen zu, wobei aber kein Unterschied zwischen den mit Epoxomicin versetzten Zellen und den mitgeführten DMSO-Kontrollen zu erkennen ist. So finden sich nach 1 Stunde  $0,08 \pm 0,03$  µmol/l ADMA im Überstand der behandelten Zellen und  $0,08 \pm 0,02$  µmol/l in der Kontrolle. Nach 24 Stunden steigen diese Werte auf  $0,15 \pm 0,02$  µmol/l im Vergleich zu  $0,17 \pm 0,04$  µmol/l in der Kontrolle. Es zeigt sich also eine geringfügig kleinere Konzentration in den mit Epoxomicin behandelten Zellen, die aber aufgrund der Streuung bei der durchgeführten 6-fach-Messung keine eindeutige Tendenz wiedergeben, da sie die Signifikanzschwelle nicht übersteigen. Eine Signifikanz ist erneut nur über verschiedene Zeiträume ermittelbar, ohne Unterschied zwischen den mit Proteasomhemmer behandelten Zellen und der Kontrolle ( $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** ADMA-Konzentration für Epoxomicin 0,0001 µM über verschiedene Zeiträume

#### 4.4.7 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,01 µM über verschiedene Zeiträume

Die Darstellung der ADMA-Werte aus den Überständen der Versuche mit Epoxomicin 0,01 µM über verschiedene Zeiträume lässt nach Analyse eine Überschreitung der Signifikanzschwelle in Abhängigkeit von der Zeit erkennen ( $p < 0,001$ ). Es handelt sich hierbei – wie schon bei dem Versuch mit Mg 132 0,01 µM – um eine Erhöhung der freien ADMA-Konzentration sowohl im Überstand der behandelten als auch in dem der unbehandelten Zellen. Zudem fanden sich in den Überständen der mit Epoxomicin versetzten Zellen fast identische Werte wie in den mitgeführten Kontrolle. So ergaben sich nach 6 Stunden  $0,06 \pm 0,02$  µmol/l in den mit Proteasomhemmer behandelten Zellkultur-Überständen im Vergleich zu  $0,06 \pm 0,01$  µmol/l in der Kontrolle und nach 12 Stunden  $0,07 \pm 0,02$  µmol/l in den behandelten und  $0,07 \pm 0,02$  µmol/l in den unbehandelten Überständen (siehe Abb. 17).



**Abbildung 17:** ADMA-Konzentration für Epoxomicin 0,01 µM über verschiedene Zeiträume

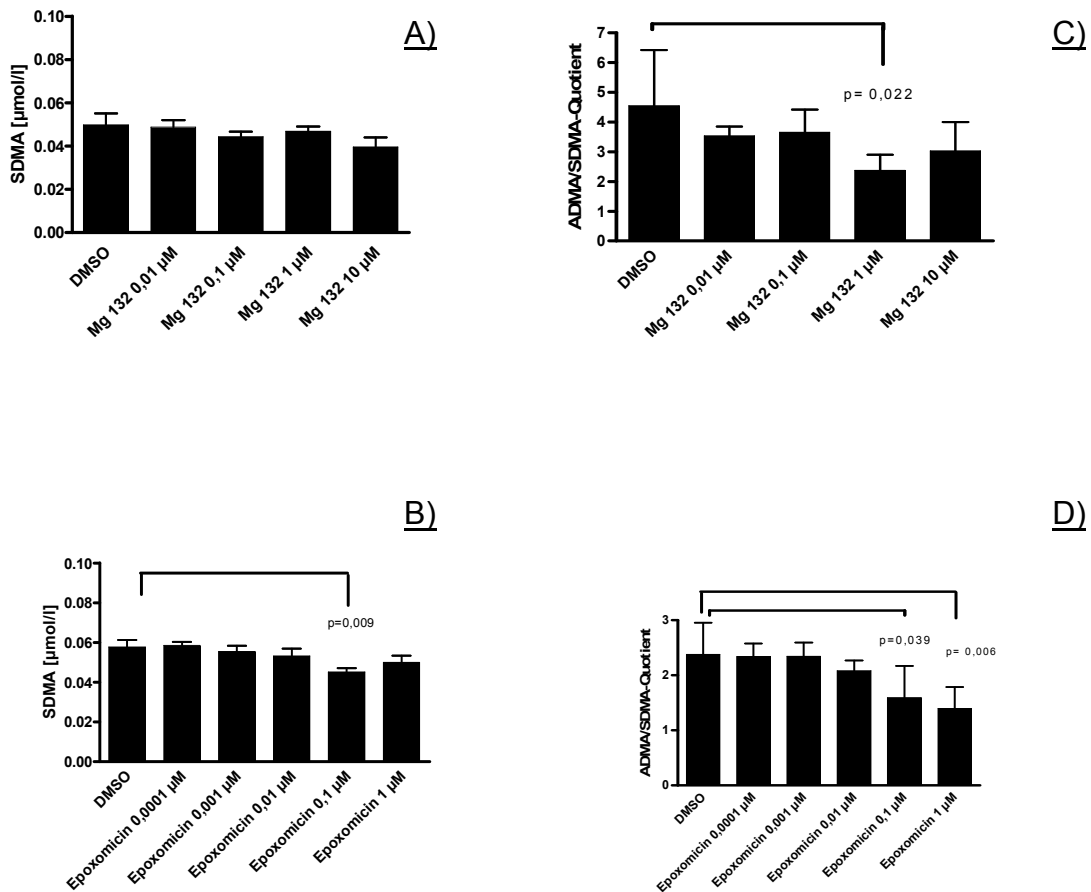
#### 4.5 Ergebnisse für SDMA und den Quotienten aus ADMA und SDMA

Die Darstellung der zusätzlich zu ADMA ermittelten Konzentrationen des SDMA zeigen nach der Proteasomhemmung mittels Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen über 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit Proteasomhemmer behandelten Zellen und der mitgeführten Kontrolle. Die Werte der SDMA-Konzentration nach Inkubation mit dem Proteasomhemmer Epoxomicin zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen Epoxomicin in der Konzentration 0,1 µM ( $0,045 \pm 0,002$  µmol/l) und der Kontrolle ( $0,058 \pm 0,003$  µmol/l).

Wertet man den Quotienten aus ADMA und SDMA aus, so zeigen sich Signifikanzen sowohl für Mg 132 über 24 Stunden als auch für Epoxomicin über denselben Zeitraum. Bei Mg 132 bezog sich dies auf die Konzentration 1 µM ( $2,37 \pm 0,21$  mit  $p=0,022$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $4,54 \pm 0,77$ ) und bei Epoxomicin zeigte sich sowohl bei 0,1 µM ( $1,60 \pm 0,23$  mit  $p=0,039$ ) als auch für

## Ergebnisse

1  $\mu\text{M}$  ( $1,40 \pm 0,16$  mit  $p=0,006$ ) ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (DMSO;  $2,38 \pm 0,23$ ) (vgl. Abb. 18).



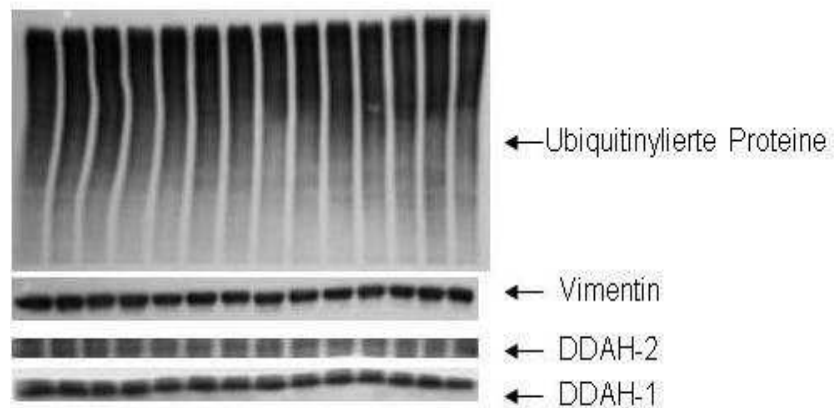
**Abbildung 18 A), B), C) und D):** SDMA-Konzentration für Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen über 24 Stunden und für Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen über 24 Stunden sowie der Quotient aus ADMA und SDMA für Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen über 24 Stunden und Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen über 24 Stunden

## 4.6 Ergebnisse der Gel-Elektrophorese / Western Blot

### 4.6.1 Vorbemerkungen

Die Western Blots wurden durchgeführt, um zu erkennen, ob eine eventuell aus den mit Proteasomhemmern durchgeführten Zellversuchen resultierende Veränderung der ADMA-Konzentration einer Veränderung der Menge der ADMA-abbauenden Enzyme DDAH-1 und DDAH-2 zugeschrieben werden kann. Bei einem verstärkten Abbau, also erniedrigter ADMA-Konzentration nach Hemmung des Proteasoms, könnte dies eventuell – wie schon unter Punkt 2 beschrieben – mit einer verstärkten Arbeit der DDAHs zusammenhängen. In dem Fall würden diese in der Auswertung der Daten des Western Blots stärker zu Tage treten. Zudem sollte mithilfe eines spezifischen Antikörpers (mouse monoclonal Antikörper, FK2) geklärt werden, ob tatsächlich eine Hemmung des Proteasoms und damit eine erhöhte Anzahl nicht abgebauter, aber ubiquitinylierter (also zum Abbau markierter) Proteine im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle vorliegt.

Ein entsprechend durchgeführter Western Blot, bei dem, wie vorher beschrieben, alle nachzuweisenden Proteinbanden durch entsprechende Bearbeitung gleichzeitig dargestellt wurden, zeigte sich dann wie in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19:** Darstellung eines Western Blots nach entsprechender Bearbeitung

Um eine realistische Darstellung erzielen zu können, wurden alle aus den Zellversuchen gewonnen, Proteinproben mittels des – unter Punkt 3.8 beschriebenen – Verfahrens gemessen und anschließend mit Hilfe der zugehörigen Software ('Gene Tools' der Firma SynGene) ausgewertet. Die Messwerte der jeweiligen 6-fach-Messungen (da je 6 Wells im Zellversuch) konnten als Durchschnittswert mit Standardfehler graphisch dargestellt werden. Die Signifikanzschwelle wurde – wie schon bei den vorhergehenden Messungen der Protein- und ADMA-Konzentration – bei  $p < 0,05$  gegen die Kontrolle festgelegt. Sie wurde bei den 24-Stunden-Versuchen, in denen verschiedene Konzentrationen verwendet wurden, mittels t-Test ermittelt und bei den 1-Konzentrations-Versuchen, die über mehrere Stunden abgelesen wurden, durch einen 2-Wege-Anova-Test ermittelt. Die Werte ergaben sich aus einer Verrechnung gegen den jeweiligen gemessenen Wert des verwendeten Ladungsmarkers Vimentin (siehe auch Punkt 3.8), da in den Versuchen bei unterschiedlicher Proteinkonzentration immer die gleiche Probenmenge aufgetragen wurde, und diese Diskrepanz entsprechend standardisiert werden musste.

### **4.6.2 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden**

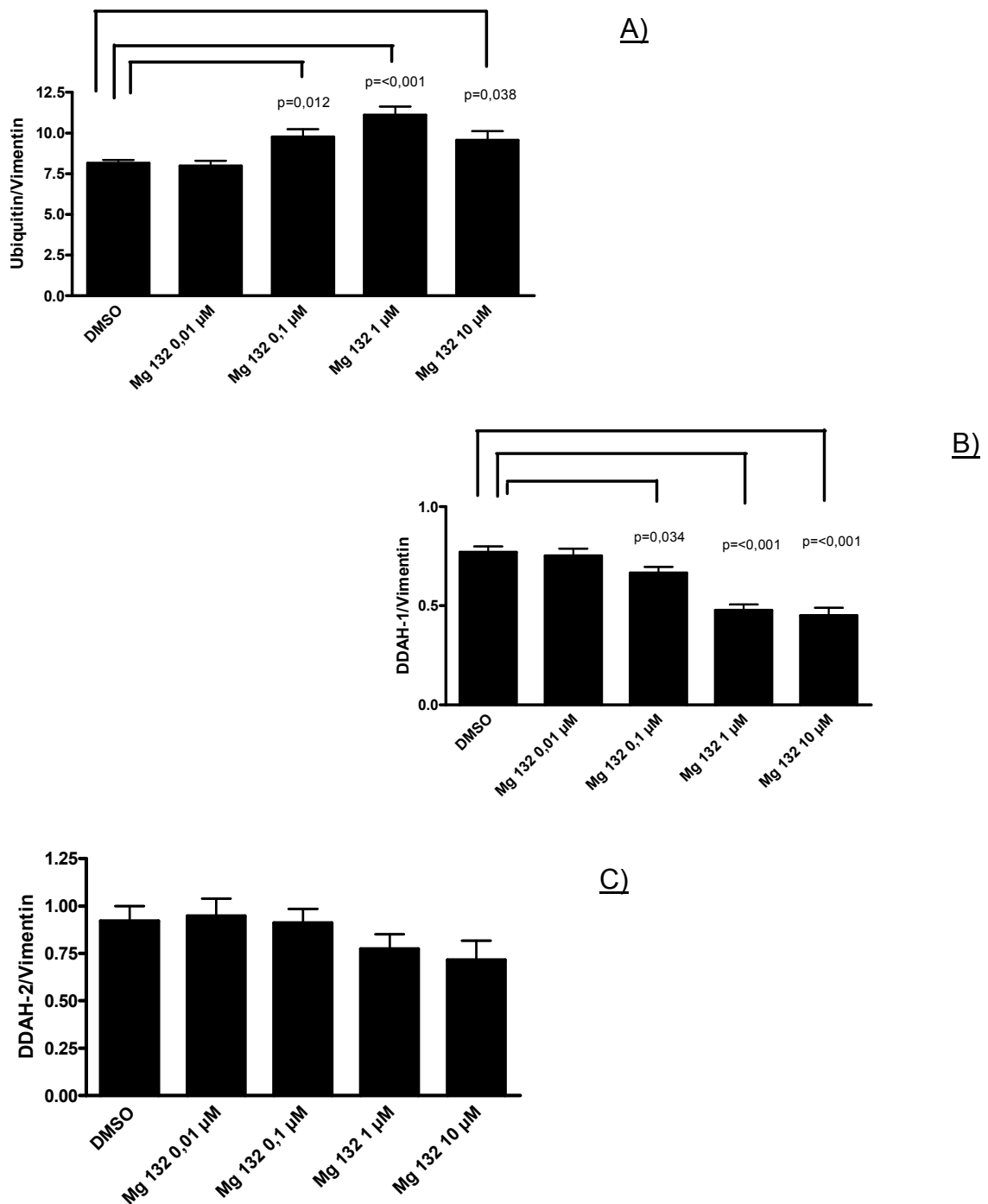
#### **A) Menge an ubiquitinylierten Proteinen**

Die graphische Darstellung der ausgewerteten und analysierten Daten aus der gelelektrophoretischen Messung der Proteinproben des 24 Stunden-Versuches mit Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) erlaubte die Ermittlung signifikanter Unterschiede für die Akkumulation ubiquitinylierter Proteine ('Ubiquitin' in den Abbildungen). Diese wurden jeweils einzeln aufgetragen und untereinander mit den zugehörigen Kontrollen verglichen. Die Darstellung der Werte zeigt signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (DMSO).

Bei der Ubiquitin-Darstellung erwiesen sich nach Durchführung der t-Testung die Mg 132-Konzentrationen 0,1 $\mu\text{M}$  mit  $p=0,012$  ( $9,759 \pm 0,487$ ), 1 $\mu\text{M}$  mit

## Ergebnisse

$p < 0,001$  ( $11,100 \pm 0,534$ ) und  $10 \mu\text{M}$  mit  $p = 0,038$  ( $9,561 \pm 0,557$ ) als signifikant gegen die mitgeführte Kontrolle ( $8,137 \pm 0,214$ ). Die Werte für Mg 132  $0,1 \mu\text{M}$  und Mg 132  $1 \mu\text{M}$  sind erhöht und könnten so als Beweis für eine Proteasomhemmung angesehen werden, da sich offensichtlich nicht abgebaute, aber zum Abbau markierte (ubiquitinylierte) Proteine ansammeln und nicht abgebaut werden können. (siehe Abb. 20 A))



**Abbildung 20 A), B) und C):** Ubiquitin, DDAH-1 und DDAH-2 für Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden



### **B) Menge an DDAH-1**

Für die Darstellung der Expression von DDAH-1 zeigen sich die signifikanten Werte ebenfalls für die Mg 132-Konzentrationen 0,1µM mit  $p=0,034$  ( $0,665\pm 0,032$ ), 1µM mit  $p<0,001$  ( $0,477\pm 0,030$ ) und 10µM mit  $p<0,001$  ( $0,451\pm 0,039$ ). Hier findet sich allerdings eine durchgehende Erniedrigung der DDAH-1-Werte im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle ( $0,771\pm 0,029$ ) (siehe Abb. 20 B)).

### **C) Menge an DDAH-2**

Eine signifikante Erniedrigung – wie bei der Menge der DDAH-1 beschrieben – findet sich bei den Werten der Expression der DDAH-2 nicht ( $0,771\pm 0,079$  für 1 µM Mg 132 im Vergleich zu DMSO mit  $0,922\pm 0,079$  mit  $p=0,211$ ) (vgl. Abb. 20 C)).

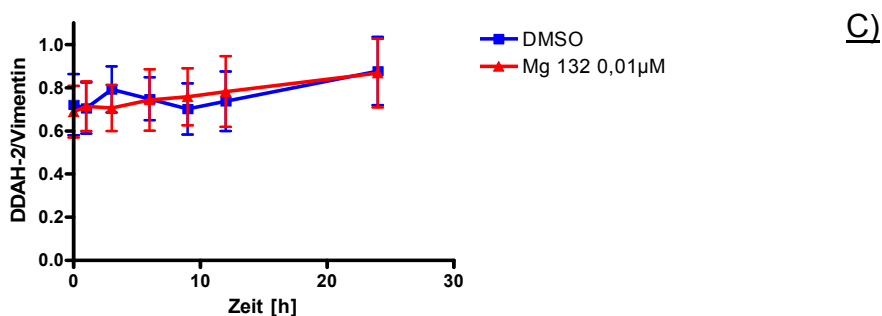
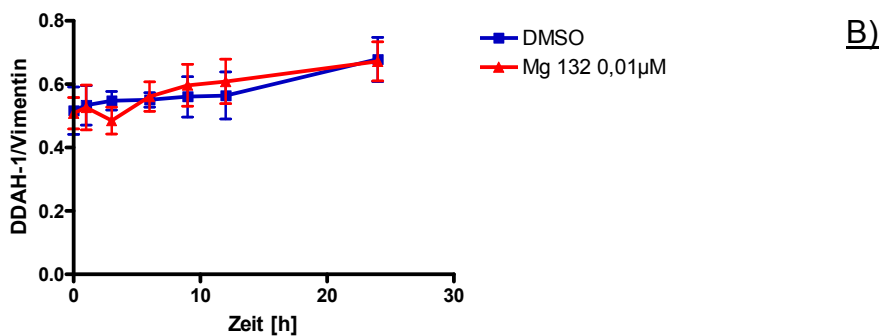
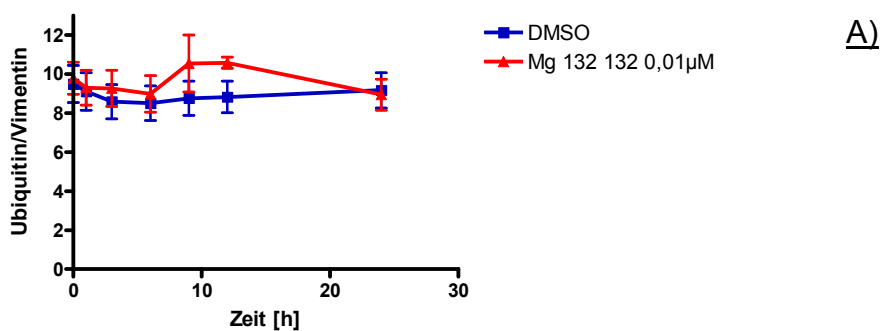
### **4.6.3 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 0,01 µM über verschiedene Zeiträume**

#### **A) Menge an ubiquitinylierten Proteinen**

Betrachtet man die graphische Darstellung der im Zeitverlauf aufgetragenen Werte aus der gelelektrophoretischen Messung der Proteinproben, die während des Zellversuches mit Mg 132 in der Konzentration 0,01 µM über mehrere Stunden gewonnen wurden, so zeigen sich im Vergleich zur zugehörigen Kontrolle keine signifikanten Werte. Die Darstellung der ubiquitinylierten Proteine zeigt zwar zwischenzeitlich einen Anstieg nach Hemmung durch 0,01 µM Mg 132 (zum Vergleich: nach 12 Stunden  $10,571\pm 0,698$  bei 0,01 µM Mg 132 in Relation zur DMSO-Kontrolle von  $8,823\pm 1,986$ ), dieser fällt aber nach 24 Stunden wieder nahezu auf den Ausgangswert ab (siehe Abb. 21 A)).

**B) Menge an DDAH-1**

Bei der Darstellung der Expression der ADMA-abbauenden Enzyme DDAH-1 zeigt sich zwar ein Anstieg im Laufe der verschiedenen Zeitpunkte, welcher sich aber nicht signifikant von dem Anstieg der mitgeführten Kontrolle unterscheidet (vgl.: Mg 132 Stunde 0  $0,509 \pm 0,121$ , Stunde 12  $0,609 \pm 0,171$ ; DMSO Stunde 0  $0,517 \pm 0,183$ , Stunde 12:  $0,565 \pm 0,190$  mit  $p=0,982$  in der Interaktion) (vgl. Abbildung 21 B)).



**Abbildung 21 A), B) und C): Ubiquitin, DDAH-1 und DDAH-2 für Mg 132 in der Konzentration 0,01 µM über verschiedene Zeiträume**

### **C) Menge an DDAH-2**

Auch bei der Auswertung der Menge an DDAH-2 nach der Proteasomhemmung mittels Mg 132 in der Konzentration 0,01  $\mu\text{M}$  zeigt sich keine signifikante Veränderung (vgl.: Mg 132 Stunde 0  $0,689\pm 0,291$ , Stunde 12  $0,783\pm 0,403$ ; DMSO Stunde 0  $0,722\pm 0,248$ , Stunde 12  $0,737\pm 0,339$  mit  $p=0,100$  in der Interaktion) (vgl. ebenfalls Abb. 21 C)).

#### **4.6.4 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume**

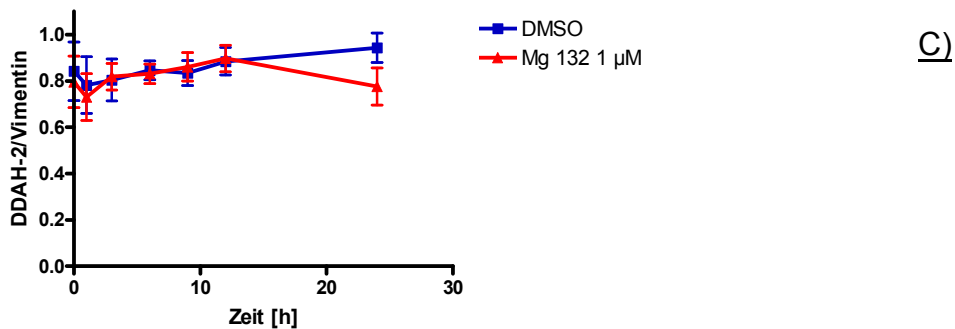
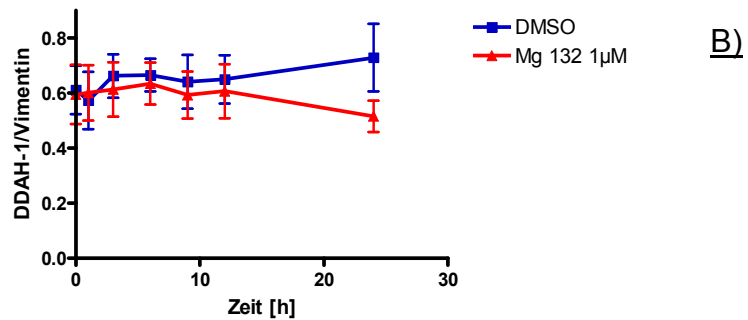
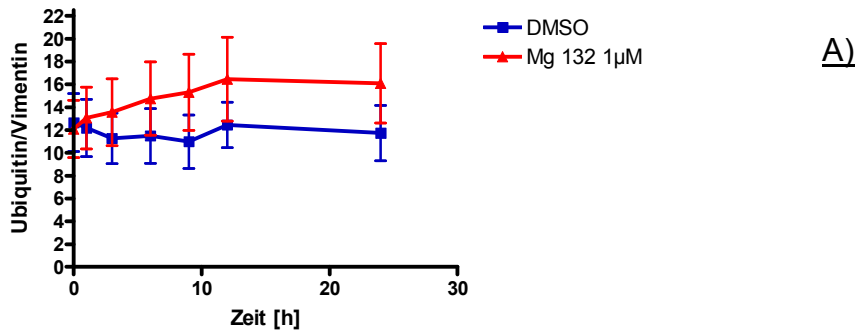
##### **A) Menge an ubiquitinylierten Proteinen**

Bei den mittels Western Blot ermittelten Werten aus den im Zellversuch gewonnenen Proteinproben der Mg 132 Konzentration 1  $\mu\text{M}$  über mehrere Stunden, zeigt sich über die Zeit eine Anhäufung ubiquitinylierter Proteine (siehe Abb. 22 A)). Aufgrund der starken Streuung der 6-fach-Messung wird die festgesetzte Signifikanzschwelle jedoch nicht überschritten und es kann nicht von einer erfolgreichen Proteasomhemmung gesprochen werden (vgl.: Mg 132 Stunde 12  $16,449\pm 8,978$ ; DMSO Stunde 12  $12,441\pm 4,883$ ).

##### **B) Menge an DDAH-1**

Mit der Auswertung und Analyse der Daten zur Menge der vorhandenen Enzyme DDAH-1 verhält es sich ebenso wie mit der Menge an ubiquitinylierten Proteinen (vgl.: Mg 132 Stunde 12  $0,607\pm 0,240$ ; DMSO Stunde 12  $0,650\pm 0,214$  mit  $p=0,100$  in der Interaktion) (siehe Abb. 22 B)). D.h. die Signifikanzschwelle wird nicht überschritten.

## Ergebnisse



**Abbildung 22 A), B) und C): Ubiquitin, DDAH-1 und DDAH-2 für Mg 132 1 µM über verschiedene Zeiträume**

### C) Menge an DDAH-2

In der graphischen Darstellung der Werte der DDAH-2-Menge ist ein Abfall nach 24 Stunden Proteasomhemmung zu erkennen (siehe Abbildung 22 C)), die allerdings nicht signifikant ist (vgl.: Mg 132 Stunde 24  $0,776 \pm 0,196$ ; DMSO Stunde 24  $0,943 \pm 0,155$  mit  $p=0,914$  in der Interaktion).

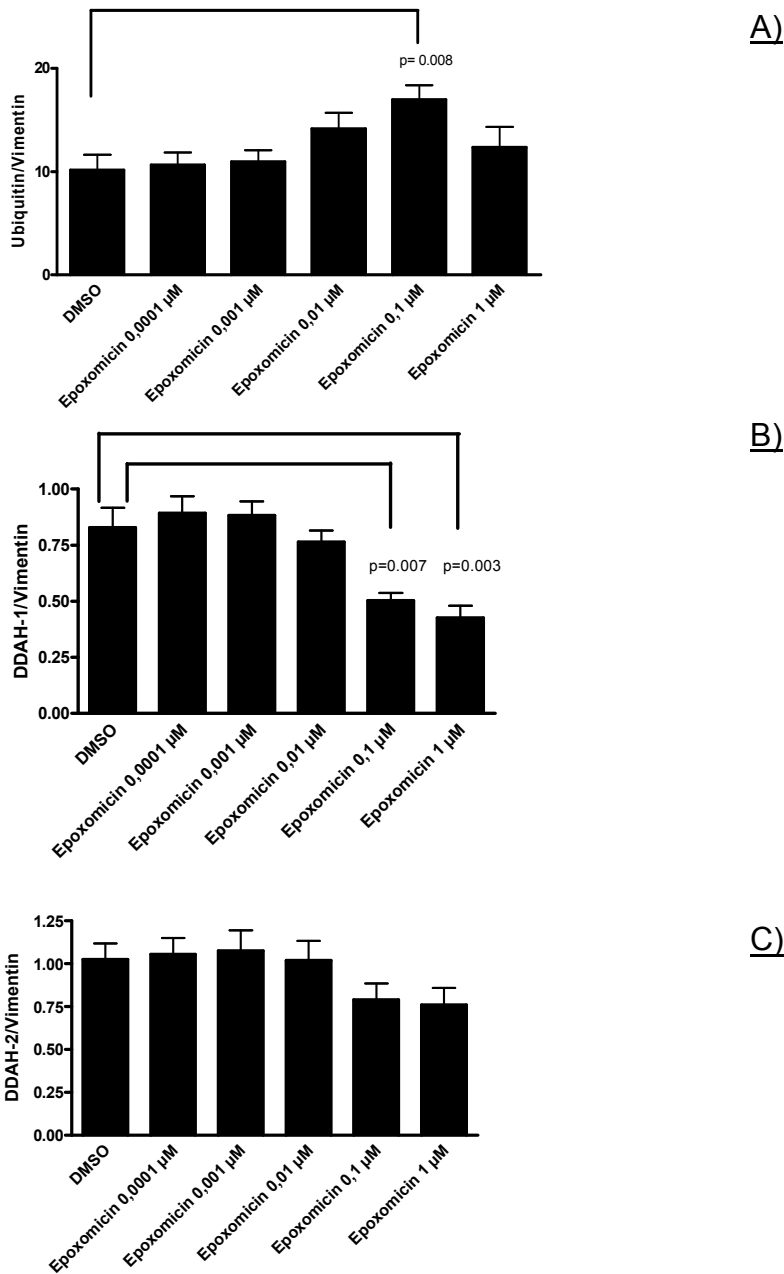
#### **4.6.5 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden**

##### **A) Menge an ubiquitinylierten Proteinen**

Bei den mittels Western Blot ermittelten und entsprechend ausgewerteten Daten, die aus dem Zellversuch mit dem Proteasomhemmer Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden resultierten, zeigen sich bei der Analyse signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle für die Akkumulation ubiquitinylierter Proteine bei der Konzentration 0,1  $\mu\text{M}$  Epoxomicin ( $p=0,008$ ). Auch für die Konzentration 0,01  $\mu\text{M}$  ist in der graphischen Darstellung ein Anstieg der markierten Proteine zu erkennen, der aber die festgelegte Signifikanzschwelle nicht überschreitet (siehe Abbildung 23 A)). Die Werte für die Epoxomicin-Konzentrationen 0,0001  $\mu\text{M}$  und 0,001  $\mu\text{M}$  zeigen wiederum ein der Kontrolle sehr ähnliches Bild in der Darstellung der Menge an ubiquitinylierten Proteinen (vgl.  $10,153\pm 3,571$  bei 0,01  $\mu\text{M}$  und  $14,153\pm 3,757$  bei 0,1  $\mu\text{M}$  gegen DMSO  $16,950\pm 3,497$ ).

##### **B) Menge an DDAH-1**

Die Auswertung der Menge des ADMA-abbauenden Enzyms DDAH-1 zeigt mit  $p=0,007$  bei der Epoxomicin-Konzentration 0,1  $\mu\text{M}$  ( $0,503\pm 0,035$ ) und  $p=0,003$  bei 1  $\mu\text{M}$  Epoxomicin ( $0,426\pm 0,054$ ) einen statistisch signifikanten Unterschied der Menge an DDAH-1. Es handelt sich dabei um einen Abfall der DDAH-1 Menge im Vergleich zur Kontrolle ( $0,828\pm 0,089$ ) (siehe Abbildung 23 B)).



**Abbildung 23 A), B) und C): Ubiquitin, DDAH-1 und DDAH-2 für Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden**

### C) Menge DDAH-2

Der schon bei der Auswertung der Menge an DDAH-1 zu erkennende Abfall zeigt sich auch bei der Darstellung der Menge an DDAH-2 (vgl. ebenfalls Abb. 23 C)), allerdings ist dies nicht statistisch signifikant (vgl. Epoxomicin 0,1 µM  $0,790 \pm 0,096$ ; DMSO  $1,025 \pm 0,093$  mit  $p=0,109$ ).

#### **4.6.6 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,0001 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume**

##### **A) Menge an ubiquitinylierten Proteinen**

Bei der Analyse der graphischen Darstellung der aus den Proteinproben des Versuches mit Epoxomicin 0,0001  $\mu\text{M}$  über mehrere Stunden gewonnenen Daten lässt sich im Bezug auf die Menge an ubiquitinylierten Proteinen kein signifikanter Unterschied erkennen (vgl.: Epoxomicin Stunde 12  $14,319 \pm 8,045$ ; DMSO Stunde 12  $13,301 \pm 7,069$  mit  $p=0,100$  in der Interaktion) (vgl. Abb. 24 A)).

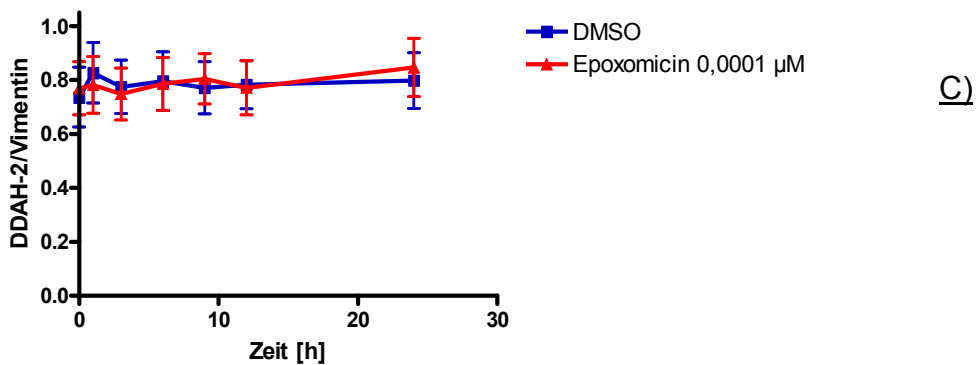
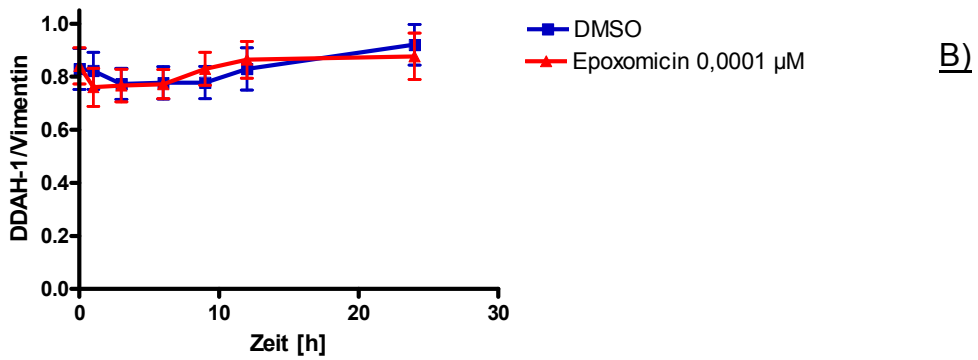
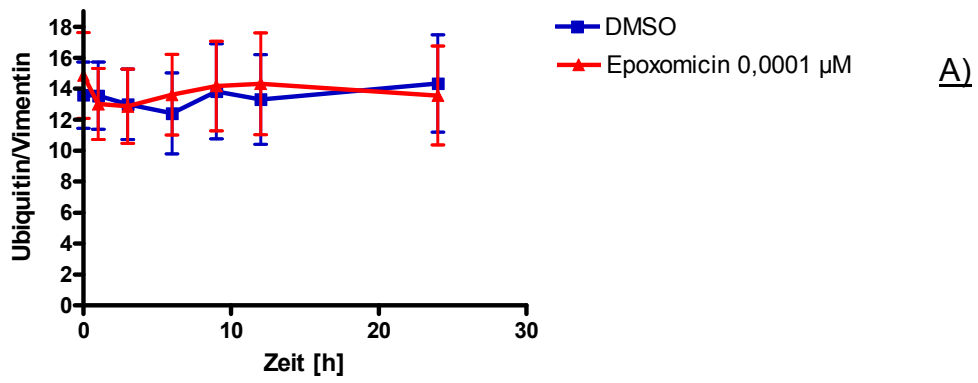
##### **B) Menge an DDAH-1**

Die Auswertung der Menge an DDAH-1 zeigt genau wie die Menge an ubiquitinylierten Proteinen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle (vgl.: Epoxomicin Stunde 12  $0,865 \pm 0,171$ ; DMSO Stunde 12  $0,830 \pm 0,200$ ) (vgl. Abb. 24 B)).

##### **C) Menge an DDAH-2**

Auch die Auswertung der Menge an DDAH-2 nach der Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in der Konzentration 0,0001  $\mu\text{M}$  über verschiedene Zeiträume zeigt keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (vgl.: Epoxomicin Stunde 12  $0,771 \pm 0,247$ ; DMSO Stunde 12  $0,782 \pm 0,218$ ) (vgl. Abb. 24 C)).

# Ergebnisse



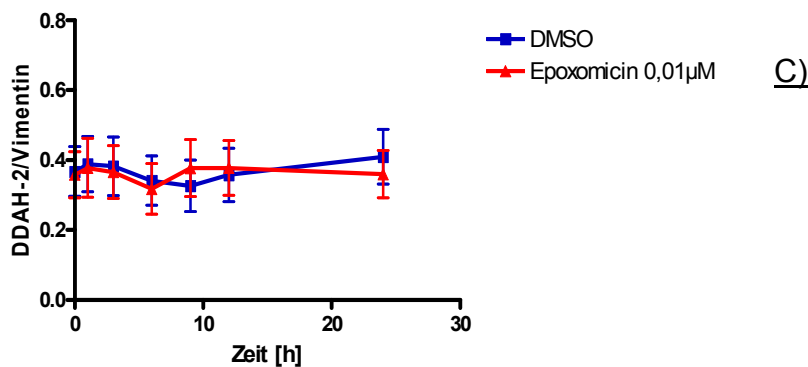
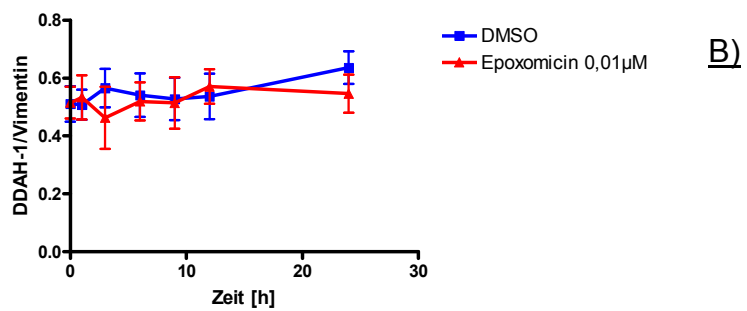
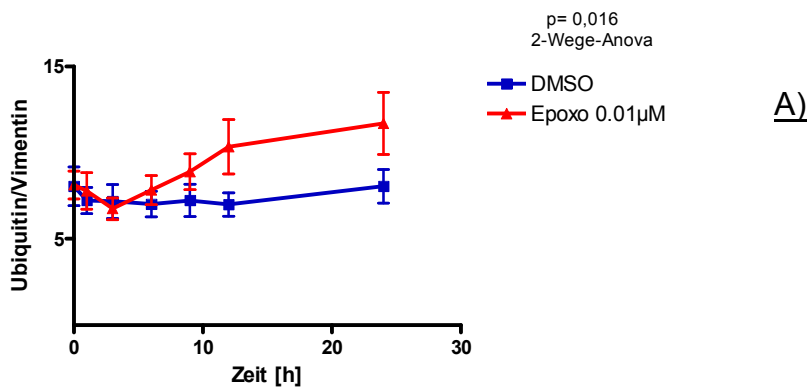
**Abbildung 24 A), B) und C): Ubiquitin, DDAH-1 und DDAH-2 für Epoxomicin 0,0001 µM über verschiedene Zeiträume**



#### 4.6.7 Ergebnisse nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin bei einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{M}$ über verschiedene Zeiträume

##### A) Menge an ubiquitinylierten Proteinen

Bei den aus Zellkulturversuchen gewonnenen Proteinproben mit Epoxomicin in der Konzentration 0,01  $\mu\text{M}$  (z.B. Stunde 9:  $8,896 \pm 2,533$ ) zeigt sich im Vergleich zur jeweils zugehörigen Kontrolle (Stunde 9:  $7,231 \pm 2,308$ ) eine Signifikanz mit  $p=0,016$  im Bezug auf die Menge an akkumulierten markierten Proteinen (siehe Abb. 25 A)).



**Abbildung 25 A), B) und C):** Ubiquitin, DDAH-1 und DDAH-2 für Epoxomicin in der Konzentration 0,01  $\mu\text{M}$  über verschiedene Zeiträume

### **B) Menge an DDAH-1**

Trägt man die ermittelte Menge der ADMA-abbauenden Enzyme DDAH-1 auf, so finden sich entgegen der Ergebnisse der Menge an ubiquitinylierten Proteinen keine statistisch relevanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (vgl. z.B. Epoxomicin Stunde 9  $0,514 \pm 0,217$ ; DMSO Stunde 9  $0,528 \pm 0,179$ ) (siehe Abb. 25 B)).

### **C) Menge an DDAH-2**

Auch die Auswertung der Menge an DDAH-2 lässt keine signifikante Veränderung nach der Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in der Konzentration  $0,01 \mu\text{M}$  (z.B. Stunde 9:  $0,377 \pm 0,199$ ) im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle (hier erneut exemplarisch zur Stunde 9:  $0,326 \pm 0,180$  mit  $p=0,100$  in der Interaktion) erkennen (vgl. Abb. 25 C)).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Einleitung zur Diskussion**

ADMA ist ein endogener Inhibitor der NO-Synthase und weist bei zahlreichen Herz-Kreislauf-Erkrankungen erhöhte Konzentrationen auf (vgl. Punkt 2.6).

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sollten die Frage klären, inwieweit die Konzentration von ADMA durch Hemmung des Proteasoms in Zellkulturversuchen beeinflusst werden kann.

Aufgrund der Rolle des Proteasoms im Protein-Stoffwechsel und der vermutlichen Entstehung von ADMA als Abbauprodukt im Zuge des regulären Abbaus methylierter Proteine, stellt diese Arbeit eine mögliche Idee eines Eingriffs in den ADMA-Stoffwechsel dar und es wurde mittels zwei verschiedener Hemmstoffe die Arbeit des Proteasoms gehemmt.

### **5.2 Diskussion zu den Ergebnissen der Proteinbestimmung nach LOWRY**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellen nach Hemmung des Proteasoms erfolgte nach der Lowry-Methode.

Bei einer Hemmung des Proteasoms wäre aufgrund des gestoppten bzw. verminderten Abbaus von Proteinen eine Erhöhung der Proteinkonzentration in den Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, die einen regulären Stoffwechsel innerhalb der Zellen erlauben sollte, zu erwarten. Die Ergebnisse zeigten jedoch entweder keine Erhöhung oder das genaue Gegenteil: eine Erniedrigung der Proteinkonzentration (so z.B. bei Mg 132 in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  und Epoxomicin in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$ ). Isoliert betrachtet, überrascht dieses Ergebnis; es muss aber im Kontext mit der ebenfalls durchgeführten LDH-Zytotoxizitäts-Messung (Ergebnisse unter Punkt 4.2) gesehen werden. Diese zeigte nach 24 Stunden eine sichtbar erhöhte zellschädigende Wirkung für die Konzentrationen Mg 132 10  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  und Epoxomicin 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle.

Als Positiv-Kontrolle mit deutlich zytotoxischer Wirkung wurde 2% Triton-X 100 verwandt. Die gemessenen Werte dieses Stoffes liegen weit über allen anderen und übertreffen auch die oben angeführten, vermutlich zellschädigenden Konzentrationen der Proteasomhemmstoffe. Da bei Verwendung des Kits keine Schwelle angegeben wird, die deutlich macht, ab welchem Wert tatsächlich eine Zytotoxizität eines Stoffes vorliegt, ist nicht geklärt, ob die erwähnten Konzentrationen der Hemmstoffe tatsächlich toxisch sind oder inwiefern sie ihre hemmende Wirkung auf das Proteasom entfalten. Die angegebenen Signifikanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit im Vergleich zu der in den Versuchen verwendeten Kontrolle, die als unschädlich gilt, und nicht im Vergleich mit der ‚High Control‘ ermittelt.

Beschäftigt man sich mit Literatur zur Verwendung des LDH-Assay als Möglichkeit, die Zytotoxizität von verwendeten Substanzen zu ermitteln, so lässt sich vermehrt die Aussage finden, dass der LDH-Assay im Versuch mit verschiedenen Zelllinien und Substanzen im Vergleich mit anderen Assays geringere Sensitivität besitzt (Fotakis G et al; 2006 und Pohjala L et al; 2007). Inwiefern dies die Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen beeinflusst, ist nicht geklärt.

Das unerwartete Ergebnis der niedrigen Proteinkonzentration wäre zum einen durch eine zellschädigende Wirkung der einzelnen Konzentrationen der Hemmstoffe erklärbar; zumal bei Mg 132 in der Konzentration 10  $\mu$ M nach 24 Stunden Inkubationszeit mit dem Proteasomhemmer eine große Zahl toter Zellen unter dem Mikroskop sichtbar war. Zum Anderen besteht aber auch die Möglichkeit, dass die angestauten Proteine – was die Messung der Menge an ubiquitylierten Proteinen veranschaulicht (siehe Punkt 4.6.2) – über einen der anderen Protein-Abbauwege einer Zelle (z.B. lysosomale Proteasen oder Caspasen) eliminiert werden. Allerdings ist sowohl bekannt, dass zumindest Mg 132 auch lysosomale Proteasen inhibiert (Lee Dh et al; 1998) und zum anderen, dass das Proteasom mit 80–90% den größten Teil der Proteine abbaut (Gronostajski RM et al; 1985). Natürlich kann es durch eine Hemmung des Proteasoms und somit des Haupt-Abbauweges dazu kommen, dass verstärkt einer der anderen Abbauwege einer Zelle in Anspruch genommen wird. Für eine zellschädigende Wirkung von Mg 132 könnte sprechen, dass Proteasomhemmer in der Therapie von Krebs und anderen Krankheiten

eingesetzt werden (z.B. Velcade beim Multiplem Myelom; Bross PF et al; 2004), was nicht für eine zellschonende Wirkung sprechen dürfte. Andererseits ließen sich auch keine anderen Arbeiten finden, die die These der Zytotoxizität von Mg 132 in den hier verwendeten Konzentrationen unterstützt.

Epoxomicin inhibiert bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  keine Proteasen, die nicht dem Ubiquitin-Proteasom-System angehören (Meng L et al; 1999), wobei bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die Hemmung des Proteasoms als gesichert gilt (Schwarz K et al; 2000). Die Frage, ab welcher Konzentration Epoxomicin sicher toxische Wirkungen entfaltet, ließ sich nicht eindeutig klären.

Zusammenfassend kann bezüglich der Zytotoxizität der verwendeten Stoffe und des Grunds für die verminderte Proteinkonzentration nach Hemmung des Proteasoms keine sichere Aussage getroffen werden.

Außerdem stellt sich die Frage, ob man das Proteasom überhaupt hemmen kann, ohne dabei die Zellen zu schädigen.

### **5.3 Diskussion zu den Ergebnissen der Bestimmung der ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand**

Die Messwerte für die ADMA-Konzentration wurden isoliert betrachtet und bewertet.

Nach Auswertung der Versuche mit Zugabe eines Proteasomhemmers für 24 Stunden konnte für Mg 132  $\mu\text{M}$  in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  ein signifikanter Abfall der ADMA-Konzentration im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle (DMSO) ermittelt werden. Das gleiche gilt auch für den Proteasom-hemmstoff Epoxomicin in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ .

Ebenso finden sich signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle für Mg 132 in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$  über verschiedene Zeiträume. Diese Konzentrationen sind jedoch identisch mit denjenigen, die sich bei der Zytotoxizitäts-Messung als eventuell zellschädigend herausstellten. Es könnte möglich sein, dass die Erniedrigung der ADMA-Konzentration nicht aus einer

Hemmung des Proteasoms und einhergehend einer verminderten Entstehung des Abbauproduktes ADMA resultiert, sondern das Ergebnis einer zellschädigenden Wirkung der angeführten Konzentrationen der Proteasomhemmstoffe ist. Dagegen und im Zuge dessen für eine erfolgreiche Proteasomhemmung spricht allerdings eine 2006 in Gießen veröffentlichte Arbeit. Ihr Ziel war zwar die Analytik der Proteinmethylierung, im Rahmen dessen fanden sie allerdings auch heraus, dass die ADMA-Konzentration durch eine Proteasomhemmung in A549-Zellen (humane Lungenepithel-Zelllinie) mit Mg 132 in der Konzentration 5  $\mu\text{M}$  signifikant erniedrigt wurde während die SDMA-Konzentration sich nicht veränderte (Bulau P et al; 2006). Dies unterstützt das in dieser Arbeit angestrebte Ziel: Eine Erniedrigung der ADMA-Konzentration durch Hemmung des Proteasoms. Einen Erklärungsansatz bzgl. der Tatsache, dass sich nur die ADMA-Konzentration, nicht aber die SDMA-Konzentration verringerte, sahen Bulau P et al darin, dass womöglich nicht unbedingt das Proteasom gehemmt wurde, sondern eine der PRMTs; in diesem Fall die PRMT I.

Epoxomicin in der Konzentration 0,0001  $\mu\text{M}$  stellt sich wiederum anders dar: in keinem der mit diesem Hemmstoff in dieser Konzentration durchgeführten Versuche ist ein Unterschied zur mitgeführten Kontrolle sichtbar. Da auch die Messung der Zytotoxizität keinerlei Unterschiede zur Kontrolle erkennen lässt, kann hier davon ausgegangen werden, dass diese Konzentration zwar nicht zellschädigend ist, allerdings mit großer Wahrscheinlichkeit auch keine hemmende Wirkung auf das Proteasom ausübt. Dazu passt, dass Epoxomicin in anderen Zellversuchen mit Konzentrationen bis zu 75  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurde (Meng L et al; 1999) und z.B. 0,0001  $\mu\text{M}$  im Vergleich dazu wohl eher als sehr niedrig angesehen werden kann.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der ADMA-Konzentration nach Hemmung des Proteasoms muss außerdem auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass infolge einer eventuellen Schädigung der verwendeten EAhy-Zellen im Zuge der Zellersetzung vermehrt ADMA freigesetzt wird.

Dagegen sprechen allerdings die unter Punkt 5.4 diskutierten Ergebnisse der SDMA-Konzentration nach Proteasomhemmung. Diese verändern sich praktisch nicht. Das Ergebnis ist somit ähnlich dem von Bulau P et al (s.o.).

### ***5.4 Diskussion zu den Ergebnissen der SDMA-Konzentration und zur Erstellung des Quotienten aus ADMA und SDMA***

Die Darstellung der Werte der SDMA-Konzentration nach Proteasomhemmung mittels Mg 132 für 24 Stunden zeigen keine Signifikanz, was bedeutet, dass diese offenbar weder durch eine mögliche Proteasomhemmung noch durch etwaige Zytotoxizität beeinflusst werden. Letztere kann nahezu ausgeschlossen werden, da sich bei einer Zellschädigung nicht nur die ADMA-, sondern auch die SDMA-Werte ändern müssten, was nicht der Fall ist.

Die Werte der SDMA-Konzentration nach Proteasomhemmung mittels Epoxomicin für 24 Stunden zeigen eine signifikante Erniedrigung für die SDMA-Werte im Vergleich zur Kontrolle für Epoxomicin 0,1  $\mu\text{M}$ . Dies geht einher mit den in der Konzentration erniedrigten ADMA-Werten und könnte – anders als bei Mg 132 – auf eine Zytotoxizität hinweisen oder einfach für eine funktionierende Proteasomhemmung sprechen.

Die Auswertung des ADMA/SDMA-Quotienten zielte in erster Linie darauf ab, ein Maß für die DDAH-Aktivität zu erhalten. Eine Signifikanz des ADMA/SDMA-Quotienten könnte u.U. auf eine erhöhte DDAH-Aktivität und damit einen erhöhten ADMA-Abbau zurückzuführen sein. So fanden Jacobi J et al 2005 heraus, dass eine Überexpression der DDAH zu deutlich reduzierten ADMA-Plasmaleveln bei Mäusen führte. Auf der anderen Seite führte eine Löschung des DDAH-1-Gens zu einer Anhäufung von ADMA (Leiper J et al; 2002).

Betrachtet man die Darstellungen der Ergebnisse des ADMA/SDMA-Quotienten, so lässt sich ein signifikanter Wert im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle nur nach der Inkubation mit Mg 132 in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$  nach 24 Stunden

feststellen. Eine mögliche Zytotoxizität oder deren Ausschluss wurde oben bereits besprochen.

Das gleiche gilt für die Proteasomhemmung mittels Epoxomicin, für die sich ein signifikanter Unterschied des ADMA/SDMA-Quotienten in Bezug zur Kontrolle in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  nach 24 Stunden findet.

Allerdings scheint die Menge der DDAHs (ob nun erniedrigt oder erhöht) eher nicht für eine signifikante Erniedrigung der ADMA-Konzentration nach Inkubation verantwortlich zu sein, da sich – zumindest für DDAH-1 – ihre Menge erniedrigt, was unter dem folgenden Punkt besprochen wird.. Somit bleiben vermutlich nur entweder eine tatsächliche Hemmung des Proteasoms und damit eine Auswirkung auf die ADMA-Konzentration in der Zelle (siehe ebenfalls Punkt 5.5) oder eine (zusätzliche) zellschädigende Wirkung der einzelnen Konzentrationen. In dem Fall müssten sich aber ADMA und SDMA gleich verändern.

Ebenfalls in Betracht gezogen werden muss die Möglichkeit einer isolierten Hemmung nicht des Proteasoms, sondern einer der PRMTs, wie schon Bulau P et al 2006 vermuteten (siehe Punkt 5.3). Doch liegen auch hierfür keine klaren Beweise vor.

Der Quotient aus ADMA und SDMA lässt im Zusammenhang mit den bereits unter Punkt 5.3 besprochenen Ergebnissen der ADMA-Konzentrationsmessung auch noch an einen anderen Aspekt denken.

Ein Quotient kann im Vergleich zum Ausgangswert (hier die Kontrolle DMSO) durch drei Mechanismen in seinem Wert verringert werden: Zum einen dadurch, dass sich sowohl der oben stehende als auch der unter dem Bruch stehende Wert verringern. Zum anderen dadurch, dass sich der obere Wert verringert, während der untere Wert größer wird. Die 3. Möglichkeit besteht darin, dass sich nur der obere Wert verringert, während der untere Wert bestehen bleibt.

Auf die Informationen angewandt, die in dieser Arbeit von ADMA und SDMA bekannt sind, würde dies bedeuten, dass sich SDMA z.B. wie die ADMA-Konzentration nach Zugabe eines Proteasomhemmers verringert, oder dass nur die ADMA-Konzentration von einer eventuellen Hemmung des Proteasoms oder auch von einer zellschädigenden Wirkung des Stoffes beeinflusst wird, während die SDMA-Konzentration im Vergleich zum



Kontrollwert gleich bleibt. Eine andere Möglichkeit wäre eine getrennte Elimination von ADMA und SDMA. Es ist bekannt, dass ADMA sowohl durch die DDAH als auch über die Nieren abgebaut wird, während SDMA ausschließlich renal eliminiert wird (Achan V et al; 2003). Eventuell herrscht in einzelnen Zellen ein ähnlicher Mechanismus vor.

Da in dieser Arbeit (so gut wie) keine Änderung der SDMA-Konzentration (im Gegensatz zu ADMA) zu verzeichnen ist, könnte dies auf eine funktionierende Proteasomhemmung hindeuten. Diese würde darauf hinauslaufen, dass ADMA und SDMA zwar nicht mehr durch Hilfe des Proteasoms entstehen (siehe Punkt 2.3), ADMA aber noch über die DDAH abgebaut werden kann (der Quotient erniedrigt sich).

### ***5.5 Diskussion zu den Ergebnissen der Gel-Elektrophorese / Western Blot***

#### **5.5.1 Betrachtung der Vorgehensweise**

Betrachtet man die Ergebnisse der Gel-Elektrophorese, so zeigen sich einige Signifikanzen. Bei der Auswertung muss allerdings die Durchführung des Versuches beachtet werden. Da bei der Verwendung der Gele nicht ausreichend Platz zur Verfügung stand, um einen kompletten Versuch mit einem Gel auszuwerten, mussten für einen Versuch im Schnitt sechs Gele angefertigt werden (siehe Punkt 3.8). Auch wenn immer eine Versuchsreihe auf ein Gel aufgetragen wurde – wobei sechs Gele den sechs Messungen der Versuche mit den Proteasomhemmstoffen in der Zellkultur entsprechen – und alle Gele nach der gleichen Methode behandelt wurden, so gibt es Faktoren, die variieren. Dies ist z.B. die unterschiedliche Menge der einzelnen Proben, die auf ein Gel aufgetragen wurden. Es wurden zwar immer 10 µl als Probenmenge angesetzt, doch ist es nicht immer möglich, die gesamte Menge aus den Eppendorfgefäßen auf das Gel zu übertragen, sodass durchaus Abweichungen auftreten können.

Um die Ergebnisse der gesamten Gele trotzdem standardisieren zu können, wurde immer ein Ladungsmarker (Anti-Vimentin) mitgeführt. Dieser erlaubte durch ein Gegenrechnen der einzelnen Proben gegen den Ladungsmarker später einen Ausgleich der Unterschiede und eine genauere Auswertung.

### **5.5.2 Diskussion der Ergebnisse nach der Proteasomhemmung mittels Mg 132 in verschiedenen Konzentrationen über verschiedene Zeiträume**

Die Auswertung der Menge ubiquitinylierter (markierter) Proteine nach den Zellversuchen mit dem Proteasomhemmstoff Mg 132 über 24 Stunden zeigt einen signifikanten Anstieg für die Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ . Dies lässt den Schluss zu, dass die Hemmung des Proteasoms in diesen Konzentrationen des verwendeten Hemmstoffs funktioniert hat, da sich hierbei ubiquitinylierte Proteine ansammeln, die nicht mehr vom Proteasom abgebaut werden. Dies passt zu den anderen Versuchen, die ähnliche Ergebnisse ermitteln konnten. So führt z.B. eine 10-minütige Exposition von dopaminergen neuronalen Zellen in Zellkultur mit 5  $\mu\text{M}$  Mg 132 zu einer drastischen Erniedrigung der Proteasomaktivität und einer Ansammlung ubiquitinylierter Proteine (Sun F et al; 2006). Allerdings wurde auch deutlich, dass Konzentrationen von 2 bis 10  $\mu\text{M}$  von Mg 132 zu einer Zeit- und Dosis-abhängigen Zytotoxizität führten (Sun F et al; 2006).

So muss auch bei den Ergebnissen dieser Arbeit beachtet werden, dass die Menge an ubiquitinylierten Proteinen bei 10  $\mu\text{M}$  Mg 132 zwar signifikant höher ist, als bei der mitgeführten Kontrolle (DMSO), allerdings im Vergleich zur nächst niedrigeren Konzentration des Hemmstoffes wieder abfällt. Dies könnte zumindest für die höchste Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) erneut auf eine zellschädigende Wirkung hinweisen. Meiners et al fanden allerdings auch heraus, dass sowohl toxische als auch nichttoxische Konzentrationen des Proteasomhemmers Mg 132 eine Akkumulation ubiquitinylierter Proteine nach 24 Stunden Inkubationszeit induzieren (Meiners S et al; 2006). Dies würde die signifikante Ansammlung ubiquitinylierter Proteine erklären, obwohl eine Zytotoxizität bestimmter Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden kann.

Betrachtet man die Menge der ADMA-abbauenden Enzyme DDAH-1 und DDAH-2, so wird deutlich, dass die angestrebte Hemmung des Proteasoms an der Menge der DDAH-2 nicht signifikant etwas ändert. Aus diesen Werten ist kein sicherer Rückschluss möglich, ob speziell die DDAH-2 an einer Änderung der ADMA-Konzentration beteiligt ist, ob die Proteasomhemmung funktioniert hat, oder ob die oben bereits besprochenen Zell-Schädigungen aufgetreten sind.

Die Menge der DDAH-1 zeigt einen signifikanten Abfall für die Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ . Dies entspricht den Konzentrationen, bei denen auch schon ein Anstieg der Menge an ubiquitinylierten Proteinen nachzuweisen war. Der Abfall der Menge an DDAH-1 entspricht allerdings nicht den Erwartungen, dass eine Verringerung der ADMA-Konzentration auf einen Anstieg der DDAH-1-Konzentration zurückzuführen sein könnte.

Wären die ADMA-abbauenden Enzyme verantwortlich für den Abfall der ADMA-Konzentration, so müsste ihre Menge ansteigen. Dass die Menge an DDAH-1 hier sinkt, könnte z.B. bedeuten, dass sie nicht mit den vereinzelt, unter Punkt 4 beschriebenen, Abfällen der ADMA-Konzentration in Zusammenhang stehen.

Sowohl für Mg 132 in der Konzentration 0,1  $\mu\text{M}$  als auch in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$  finden sich keine signifikanten Ergebnisse. Daher lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob das Proteasom nicht gehemmt wurde, oder ob eine oben diskutierte zellschädigende Wirkung des Stoffes eine Rolle spielt.

Eine funktionierende Proteasomhemmung lässt sich somit nur aus der signifikanten Ansammlung ubiquitinylierter Proteine erschliessen.

### **5.5.3 Diskussion zu den Ergebnissen nach der Proteasomhemmung mittels Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen über verschiedene Zeiträume**

Die Ergebnisse der Gel-Elektrophorese nach der Proteasomhemmung durch Epoxomicin für 24 Stunden zeigen einen signifikanten Anstieg der Menge an ubiquitinylierten Proteinen für Epoxomicin 0,1  $\mu\text{M}$ . Vergleichend hierzu zeigt die

Auswertung der nächst höheren, in den Zellversuchen verwendeten, Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) einen erneuten Abfall. Literaturangaben zeigen, dass Epoxomicin bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  als sicherer Inhibitor des Proteasoms anzusehen ist (Schwarz K et al; 2000). Das Ergebnis kann somit den Schluss zulassen, dass die Hemmung des Proteasoms funktioniert.

Da aber auch die Konzentration 0,01  $\mu\text{M}$  Epoxomicin nach der Zytotoxizitätsmessung nicht als komplett unschädlich definiert werden kann, ist eine sichere Aussage nicht möglich. Dies gilt auch für die Ergebnisse für die Menge an ADMA-abbauenden Enzymen in dieser Versuchsreihe. Während bei der Darstellung der DDAH-2 keine Änderung deutlich wird, so zeigt sich ein signifikanter Abfall der Menge an DDAH-1 bei den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  Epoxomicin. Dies könnte bedeuten, dass auch hier die DDAH-1 keinen erhöhten Einfluss auf den Abbau von ADMA hat.

Die Auswertung der Ergebnisse aus der Gel-Elektrophorese nach der Proteasomhemmung durch Epoxomicin in der Konzentration 0,0001  $\mu\text{M}$  über verschiedene Zeiträume zeigt weder für die Menge der ubiquitinylierten Proteine noch für die der DDAHs eine Signifikanz. Dies geht konform mit den Erkenntnissen aus der Protein-, ADMA- und Zytotoxizitätsmessung, die zeigen, dass bei Epoxomicin in dieser Konzentration vermutlich keinerlei hemmende Wirkung auf das Proteasom vorliegt.

Bei den aus Zellkulturversuchen gewonnenen Proteinproben mit Epoxomicin in der Konzentration 0,01  $\mu\text{M}$  zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Menge an ubiquitinylierten Proteinen im Vergleich zur zugehörigen Kontrolle. Dies lässt erkennen, dass die Hemmung des Proteasoms in dieser Epoxomicin-Konzentration erfolgreich gewesen sein könnte.

Die ermittelten Mengen der ADMA-abbauenden Enzyme DDAH-1 und DDAH-2 zeigen aber keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle, was vermutlich bedeutet, dass die DDAH-Menge bei dieser Hemm-Konzentration in keiner Relation zu etwaigen Veränderungen der ADMA-Konzentrationen stehen kann. Damit konform zeigt sich, dass die ADMA-Konzentration in diesem Versuch keine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrolle erkennen lässt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Verwendung bestimmter Konzentrationen der Hemmstoffe Mg 132 und Epoxomicin zwar signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen auftraten, aber nicht eindeutig definiert werden kann, ob sie auf die Hemmung des Proteasoms zurückzuführen sind.

Da die Messung der Menge an DDAHs nicht den Erwartungen eines erhöhten Abbaus von ADMA durch diese Enzyme entspricht, kann hier die Aussage getroffen werden, dass die ADMA-abbauenden Enzyme nicht zur Erklärung etwaiger Änderungen der ADMA-Konzentration herangezogen werden können.

Zudem muss angenommen werden, dass die verwendeten Hemmstoffe Mg 132 und Epoxomicin in einer definitiv nicht zellschädigenden Konzentration das Proteasom nicht oder nicht ausreichend hemmen können.

### **5.6 Zusammenfassung der Diskussion**

Zusammenfassend lässt sich zu den Ergebnissen dieser Arbeit sagen, dass sich die Proteinkonzentration nach Zugabe und Inkubation mit den Proteasomhemmern Mg 132 und Epoxomicin in verschiedenen Konzentrationen und über unterschiedliche Zeiträume entgegen der eigentlichen Erwartungen erniedrigt. Eine Erhöhung wurde erwartet, da sich durch eine Hemmung des Proteasoms – und somit Hemmung eines natürlichen Abbauges methylierter Proteine – eigentlich vermehrt Proteine ansammeln müssten. Dieses Ergebnis könnte mit einer möglichen Zytotoxizität der Proteasomhemmer in bestimmten Konzentrationen zusammenhängen, wobei hier jedoch im Rahmen eines durchgeführten LDH-Zytotoxizitäts-Assays kein eindeutiges Ergebnis gefunden werden konnte. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, dass sich tatsächlich vermehrt Proteine ansammeln, jedoch über einen der anderen Abbauege einer Zelle abgebaut werden.

Die ADMA-Konzentration und damit das eigentliche Ziel dieser Arbeit zeigt in bestimmten Konzentrationen der Proteasomhemmer signifikante

Erniedrigungen im Vergleich zur Kontrolle. Lässt man eine auch besprochenen Zytotoxizität der Proteasomhemmer außen vor, so lässt dies vermutlich auf eine funktionierende Proteasomhemmung schließen.

Dies wird unterstützt von den Werten der SDMA-Konzentrationsmessung, die (so gut wie) keine signifikante Veränderung zeigt, was bei einer Zellschädigung der Fall sein müsste, da hier auch SDMA betroffen wäre.

Der Quotient aus ADMA und SDMA zeigte zudem, dass ein vermehrter Abbau durch die ADMA-abbauenden Enzyme DDAH-1 und DDAH-2 vermutlich nicht der Grund für die erniedrigte ADMA-Konzentration sein kann, da dies nicht zu den Ergebnissen der DDAH-Konzentrationen nach Proteasomhemmung passen würde.

Im Western Blot zeigt sich durch den Nachweis vermehrt auftretender ubiquitinylierter Proteine eine funktionierende Proteasomhemmung nach Zugabe der Proteasomhemmer in verschiedenen Konzentrationen. Im Zuge dieser Messung zeigt sich zudem keine Veränderung der Menge an DDAH-2, was zu den Erkenntnissen des ADMA/SDMA-Quotienten passt. Die Menge der DDAH-1 zeigt hingegen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle nach Inkubation mit den Proteasomhemmern. Da sich die Menge der DDAH-1 erniedrigt, entspricht dies nicht den eigentlichen Erwartungen und kann nicht als Grund für eine u.U. auftretende Erniedrigung der ADMA-Konzentration in Betracht gezogen werden.

Da die Proteasomhemmung alleine aber nicht der einzige Grund für eine Erniedrigung der ADMA-Konzentration sein kann, SDMA dazu noch gleich bleibt, ist der Grund für die ADMA-Erniedrigung im Zusammenhang mit einer Hemmung des Proteasoms nicht eindeutig geklärt. Die Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems führt zu weniger ADMA, aber offenbar auch zu weniger DDAH. Ein möglicher Grund könnte sein, dass durch den verminderten Proteinabbau weniger ADMA freigesetzt wird. Da das SDMA gleich bleibt, ist dies nicht eindeutig. Eventuell spielen hier andere Mechanismen eine Rolle (z.B. eine fälschlicherweise isolierte Hemmung eine der PRMTs).

## 6 Zusammenfassung

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der NO-Synthase. Es entsteht im Zuge des regulären Proteinabbaus in den Körperzellen, wobei an der endgültigen Freisetzung von ADMA durch den Abbau methylierter Proteine u.a. das Proteasom beteiligt sein könnte. Dies ist ein Proteinkomplex, der sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma entsprechend markierte (ubiquitinylierte) Proteine zu Fragmenten abbaut. ADMA wird entweder renal eliminiert oder über die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolasen abgebaut. Es wurde nachgewiesen, dass die ADMA-Konzentration im Zusammenhang mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen erhöht ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die ADMA-Konzentration durch Hemmung des Proteasoms in EAhy-Zellen beeinflusst bzw. verringert werden kann.

Die Verwendung zweier verschiedener Proteasomhemmstoffe in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen zeigte nach Auswertung der Proteinkonzentrationen einen teilweise signifikanten Abfall der Konzentrationen, was nicht zu den Erwartungen passt, da nach einer Hemmung des Proteasoms die Menge der Proteine durch den nicht oder nur noch eingeschränkt stattfindenden Abbau eigentlich erhöht sein müsste. Dies gilt auch für die Menge an ADMA-abbauenden Enzymen. Während die DDAH-2 keine signifikante Änderung zeigt, so gibt es bei der DDAH-1 bei verschiedenen Konzentrationen einen signifikanten Abfall. Wären die ADMA-abbauenden Enzyme an einer Verringerung der ADMA-Konzentration beteiligt, so müsste ihre Menge eher erhöht als erniedrigt sein. Eine Auswertung der ADMA-Konzentration im Vergleich mit der Konzentration des – auf ähnlichem Weg wie ADMA entstehenden, aber nicht durch DDAHs abgebauten – symmetrischen Dimethylarginins (SDMA) zeigte keine abweichenden Ergebnisse.

Die ADMA-Konzentration selber entsprach genau wie die Menge an ubiquitinylierten, aber nicht abgebauten, Proteine den Erwartungen. So fand sich bei der ADMA-Konzentration teilweise eine Verringerung nach der

Hemmung des Proteasoms, während die Menge an ubiquitylierten Proteinen in eben diesen Konzentrationen erhöht nachzuweisen war. Dies lässt zwar den Schluss zu, dass die Proteasomhemmung in diesen Konzentrationen offenbar funktioniert hat, jedoch könnten auch zellschädigende Prozesse stattgefunden haben. So müssen diese Ergebnisse im Zusammenhang mit einer ebenfalls durchgeführten Zytotoxizitätsmessung dieser Stoffe gesehen werden, deren Sensitivität und Bedeutung aber als kritisch zu betrachten ist.

Ebenso müssen die Werte der SDMA-Konzentration nach Hemmung des Proteasoms betrachtet werden. Bei einer erfolgreichen Hemmung müssten diese sich ebenso wie ADMA verringern. Die SDMA-Konzentration bleibt jedoch gleich. Dies spricht sowohl gegen eine erfolgte Proteasomhemmung als auch gegen eine Zytotoxizität der eingesetzten Hemmstoffe, da die SDMA-Werte bei einer Zellschädigung ebenso betroffen sein müssten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein zweifelsfreier Mechanismus des Wirkzusammenhangs zwischen den verwendeten Proteasomhemmstoffen Mg 132 und Epoxomicin und der ADMA-Konzentration nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Bei niedriger Konzentration der Hemmstoffe war keine Signifikanz zu verzeichnen, bei höherer Konzentration besteht zumindest die Gefahr der Zell-Schädigung.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
CAT	Kationischer Aminosäure-Transporter
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolasen
DMSO	Dimethylsulfoxid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent Assay
°C	Grad Celsius
hsp	heat shock protein
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie-Methode
L, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
µmol	mikromol
µM	mikromolar
µg	mikrogramm
min	Minute
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	Phosphatpuffer
PRMT	Proteinmethyltransferasen
SDMA	Symetrisches Dimethylarginin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan

## 8 Literaturverzeichnis

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P  
Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans  
and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 1455-1459

Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven  
GM, Tsao PS  
Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients  
with type 2 diabetes  
Metabolism 2002; 51: 843-846

Böger GI, Maas R, Schwedhelm E, Bierend A, Benndorf R, Kastner M, Steenpaß A,  
Böger RH  
Improvement of endothelium dependent vasodilatation by simvastatin is potentiated by  
combination with L-arginine sustained release in patients with elevated ADMA-levels  
J Ann Coll Cardiol 2004; 34: 525A

Böger RH  
The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor  
Cardiovasc Res 2003; 59: 824-833

Böger RH  
Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from  
prospective clinical trials  
Vasc Med 2005; 10: 19-25

Böger RH  
Prävention mit L-Arginin: ADMA- ein Marker altersbedingter Veränderungen des  
Herz-Kreislauf-Systems  
Prevention and anti aging 2006; 2: 178-184

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; 98: 1842-1847

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC

Biochemical Evidence for Impaired Nitric Oxide Synthesis in Patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease

Circulation 1997; 95: 2068-2074

Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP

An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes

J Am Coll Cardiol 2000; 36: 2287-2295

Böger RH, Zoccali C

ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease

Atherosclerosis Supplements 2003; 4: 23-28

Bode-Böger SM, Muke J, Surdacki A, Brabant G, Böger RH, Frölich JC

Oral L-Arginine improves endothelial function in healthy individuals older than 70 years

Vasc Med 2003; 8: 77-81

Bross PF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, Bradley S, Gobburu

JV, Goheer A, Lee SL, Leighton J, Liang CY, Lostritto RT, McGuinn WD, Morse DE,

Rahmann A, Rosario LA, Verbois SL, Williams G, Wang YC, Pazdur R

Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma

Clin Cancer Res 2004; 10: 3954-3964

Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska K, Wardega B, Kreuder J, Eickelberg O

Quantitative assessment of arginine methylation in free versus protein-incorporated amino acids in vitro and in vivo using protein hydrolysis and high-performance liquid chromatography

Biotechniques 2006; 40: 305-310

Chen JW, Hsu NW, Wu TC, Lin SJ, Chang MS

Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition reduces plasma asymmetric dimethylarginine and improves endothelial nitric oxide bioavailability and coronary microvascular function in patients with syndrome X

Am J Cardiol 2002; 90: 974-82

Cooke JP, Dzau VJ

Nitric Oxide Synthase: role in the genesis of vascular disease

Ann Rev Med; 48: 489-509

Dayal A, Lentz SR

ADMA and hyperhomocysteinemia

Vasc Med 2005; 10: 27-33

Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB

Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization

Proc Nat Acad Sci 1983; 80: 3724-3737

Eid HM, Eritsland J, Larsen J, Arnesen H, Seljeflot I

Increased levels of asymmetric dimethylarginine in population at risk for atherosclerotic disease: Effects of pravastatin

Atherosclerosis 2003; 166: 279-284

Fotakis G, Timbrell JA

In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride

Toxicol Lett 2006; 2: 171-177

Furchtgott RE, Zawadzki JV

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine

Nature 1980; 288: 373-376

Gosh SK, Paik WK, Kim S

Purification and molecular identification of two protein methylases from calf brain  
Myelin basic protein- and histonic-specific enzyme  
J Biol Chem 1988; 263: 19024-19033

Gronostajski RM, Pardee AB, Goldberg AL

The ATP dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts  
J Biol Chem 1985; 260: 3344-3349

Hamel FG, Upward JL, Siford GL, Duckworth WC

Inhibition of proteasome activity by selected amino acids  
Metabolism 2003; 52: 810-814

Jacobi J, Sydow K, Degenfeld von G, Zhang Y, Dyoub H, Wang B, Patterson AJ, Kinoto M, Blau HM, Cooke JP

Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolases reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis  
Circulation 2005; 111: 1431-1438

Kakimoto Y, Akazawa S

Isolation and Identification of NG, NG-and NG, N'G-Dimethylarginine, N-Mono, Di- and Trimethyllysine, and Glucosylgalactosyl- and Galaktosyl- $\alpha$ -hydroxyllsine from human urine  
J Biol Chem 1970; 245: 5751-5758

Kielstein JT, Bode-Böger SM, Klein G, Graf S, Haller H, Fliser D

Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure  
Eur J Clin Invest 2003; 33: 361-362

Kielstein JT, Bode-Böger SM, Frölich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D

Asymmetric Dimethylarginine, Blood Pressure and Renal Perfusion in Elderly Subjects  
Circulation 2003; 107: 1891-1895

Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F

Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase

Brain Res Bull 2004; 62: 505-515

Lee Dh, Goldberg AL

Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists

Trends in cell biology 1998; 8: 397-403

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 2002; 99: 13527-13532

Leiper JM, Santa Maria J, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GStJ, Vallance P

Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases

Biochem J 1999; 343: 209-124

Lin WJ, Gary JD, Yang MC, Clarke S, Herschmann HR

The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukaemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase

J Biol Chem 1996; 271: 15034-15044

Maas R

Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA)

Vasc Med 2005; 10; 49-57

Maas R, Dentz L, Schwedhelm E, Thoms W, Kuss, O, Hiltmeyer N, Haddad M, Klöss T, Standl T, Böger RH

Elevated plasma concentrations of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine predict adverse events in patients undergoing noncardiac surgery

Crit Care Med 2007; 35: 1-6

MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P  
Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase  
Br J Pharmacol 1996; 119: 1533-1540

Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L  
Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells  
Physiol Rev 2003; 88: 699-710

McDermott JR  
Studies on the catabolism of NG-methylarginine, NG, NG-dimethylarginine and NG, NG-dimethylarginine in the rabbit  
Biochem J 1976; 154: 179-184

Meiners S, Ludwig A, Lorenz M, Dreger H, Baumann G, Stangl V, Stangl K  
Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells  
Free Radic Biol Med 2006; 40: 2232-2241

Meng L, Mohan R, Kwok BHB, Eloffson M, Sin N, Crews CM  
Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo anti-inflammatory activity  
Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:10403-10408

Meyer GP, Drexler H  
Rolle von Stamm- und Progenitorzellen bei koronarer Herzkrankheit  
Dtsch med Wochenschr 2004; 129: 2497-2502

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; 99: 1141-1146

Morimoto H, Nakao K, Fukuoka K, Sarai A, Yano A, Kihara T, Fukuda S et al  
Long term use of vitamin E-coated polysulfone membrane reduces oxidative stress markers in haemodialysis patients  
Nephrol Dial Transplant 2005; 20: 2775-2782

Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality

Clin Nutr 2003; 22; 23-30

Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K

Metabolism of NG, NG- and NG, N'-G-dimethylarginine in rats

Arch Biochem Biophys 1987; 252: 526-537

Patterson C, Douglas C

Welcome to the machine, a cardiologists introduction to protein folding and degradation

Circulation 2002; 106: 2741-2746

Pohjala L, Tammela P, Samanta SK, Yli-Kauhaluoma J, Vuorela P

Assessing data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays

Anal Biochem 2007; 2: 221-228

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T

Asymmetric Dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease

Circ Res. 2005; 97: 53-59

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH

Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay

Clin Chem Lab Med 2004; 42: 1377-1383

Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Böger RH

Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects

Eur J Clin Invest 2005; 35: 622-626



Schwarz K, Giuli de R, Schmidtke G, Kosta S, Broek van den M, Kim KB, Cews CM, Kraft R, Groettrup M

The selective proteasome inhibitors Lactastatin and Epoxomicin can be used to either up- or down-regulate antigen presentation at non-toxic doses

J Immunol 2000; 164: 6147-6157

Schwedhelm E, Tan-Andresen J, Maas R

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric dimethylarginine in human plasma

Clin Chem 2005; 51: 1268-1271

Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH

High throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma

J Chromatogr 2007; 851: 211-219

Selley ML

Increased concentrations of homocysteine and asymmetrical dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with Alzheimer's disease

Neurobiol Aging 2003; 24: 903-907

Stamler JS, Mendelsohn ME, Amarante P, Smick D, Andon N, Davies PF, Cooke JP, Loscalzo J

N-Acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor

Circ Res 1989; 65: 789-795

Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS

Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor

JAMA 2002; 287: 1420-1426

Sun F, Anantharam V, Zhang D, Latchoumycandane C, Kanthasamy A, Kanthasamy AG

Proteasome inhibitor Mg 132 reduces dopaminergic degeneration in cell culture and animal models

Neurotoxicology 2006; 5: 807-815

Sydow K, Mondon CE, Cooke JP

Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA

Vasc Med 2005; 10: 35-43

Teerlink T

ADMA metabolism and clearance

Vascular Medicine 2005; 10: 73-81

Tsao PS, Wang B, Buitrago R, Shyy JY, Cooke JP

Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1

Circulation 1997; 96: 934-940

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S.

Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure

Lancet 1992; 339:572-575

Verhoeven MO, Teerlink T, Kenemans P, Vogelvang TE, van der Mooren MJ

Effects on asymmetric dimethylarginine of HMR 3339, a novel selective estrogen receptor modulator: a 12-week, randomized, placebo-controlled, double-blind, dose-ranging study in healthy postmenopausal women

Menopause 2007; 14: 235-242

## 9 Materialien

### 9.1 Zellen

- EAhy. 926

(Hybrid aus HUVEC (**H**uman **U**mbilical **V**ein **E**ndothelial **C**ells) und einer humanen Atemwegsepithel-Zelllinie)

### 9.2 Zellkulturmedien

Reguläres Nährmedium:

Dulbeco's **M**odification of **E**agle's **M**edium (DMEM)  
mit 10% **F**etal **C**alf **S**erum (FCS, Kälberserum-fötal)  
& 50x **H**ypoxanthin **A**minopterin **T**hymidin (HAT)

Hungermedium für die Versuche:

DMEM mit 1% FCS und 5x HAT

### 9.3 Substanzen

1-Buthanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Albumin Fraktion V, pulver bovine (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Ameisensäure (HCOOH)	Merck (Darmstadt)
Ammoniak (NH <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt)

## Materialien

Ammoniumpersulfat (APS)	Bio Rad (Hercules, USA)
anti-DDAH 1-Antikörper	Calbiochem / EMD (San Diego, USA)
anti-DDAH 2-Antikörper	Calbiochem / EMD (San Diego, USA)
anti-Maus sec. Antikörper, (pox-mouse)	Dianova (Hamburg)
anti-Maus-Antikörper	Dianova (Hamburg)
β-Mercaptoethanol	Sigma (Steinheim)
Bis-Acrylamide, 40%	Bio Rad (Hercules, USA)
Cytotoxicity Detection-Kit	Roche (Mannheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
anti-Ziege IgG-Antikörper aus dem Esel	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, USA)
Dithiothreitol (DTT), 100x	Sigma (Steinheim)
Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG (Berlin)
ECL-Reagenzien(Western Blotting Substrate, Detection Kit)	Pierce (Rockford, USA)
Epoxomicin (Synthetic)	Calbiochem / EMD (San Diego, USA)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, NL)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
HAT-Supplement (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)	Gibco (Karlsruhe)
Instant Dry Milk	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Kälberserum, fötal	Gibco (Karlsruhe)
L-Arginin (Hydrochlorid)	Sigma (Steinheim)

## Materialien

Lowry-Reagenzien	Pierce (Rockford, USA)
Methanol, pro analysis	Merck (Darmstadt)
Mg 132	Calbiochem / EMD (San Diego, USA)
Monoclonal anti-Vimentin, clone V9	Sigma (Steinheim)
Maus monoclonal Antikörper, FK 2	Biomol (Hamburg)
Natriumazid	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	J.T. Baker (Deventer, NL)
N <sup>G</sup> , N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin (ADMA)	Sigma (Steinheim)
N <sup>G</sup> , N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin (SDMA)	Sigma (Steinheim)
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Phosphate Buffered Saline (PBS), Pulver zum Auflösen	Biochrom AG (Berlin)
Plasma, human	unbekannter Spender
Ponceau Rot	Sigma (Steinheim)
Protein-Standard (Precision Plus Protein Dual Color)	Bio Rad (Hercules, USA)
Salzsäure (HCL)	Merck (Darmstadt)
Salzsäure, rauchend	Merck (Darmstadt)
Sample Buffer (Laemmli Sample Buffer Kit)	Bio Rad (Hercules, USA)
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma (Steinheim)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Merck (Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris base, 99,9%)	Sigma (Steinheim)

Triton-X, 100 fach	Merck (Darmstadt)
Trypsin, EDTA	Gibco (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasser, doppelt destilliert (Aqua bidest)	Aus der eigenen Wasseraufbereitungsanlage Millipore (Schwalbach)
Whatman-Papier	Whatman (Kent, UK)

## **9.4 Puffer und Lösungen**

### **Lysierpuffer:**

1,5 ml 20% SDS  
1,25 ml upper Tris  
4,0 ml 50% Glycerin  
0,1 ml DTT (100x)  
ad 10 ml mit Aqua bidest

### **für Western Blot:**

#### **5% Blocking-Puffer**

2,5 g Instant Dry Milk  
ad 50 ml mit 1x TBST

#### **Trenngel (7,5%) für 2 Gele, 1,00mm**

2,84 ml 40% Bis-Acrylamid  
3 ml 2 M Tris pH 8.8  
9,17 ml Aqua bidest  
75 µl 20% SDS  
7,5 µl TEMED  
75 µl 10% APS

**Sammelgel (für 2 Gele)**

600 µl 40% Bis-Acrylamid  
1600 µl 0,5 M Tris pH 6.8  
3,8 ml Aqua bidest  
30 µl 20% SDS  
3 µl TEMED  
30 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS)

**Laufpuffer (5x)**

15 g Tris  
72 g Glycin  
25 ml 20% SDS  
ad 1000 ml mit Aqua bidest  
pH eingestellt auf 8,3

**Laufpuffer (1x)**

200 ml 5xLaufpuffer  
ad 1000 ml mit Aqua bidest

**Transferpuffer (10x)**

144,2 g Glycin  
30,3 g Tris  
10 ml 20% SDS  
ad 1000 ml mit Aqua bidest  
pH eingestellt auf 8,3

**Transferpuffer (1x)**

100 ml 10x Transferpuffer  
100 ml Methanol (pro analysis)  
ad 1000 ml mit Aqua bidest

Antikörper-Lösungen für Western Blot:

**DDAH-1**

**1. AK:** 1:10 000

1 µl DDAH-1 AK

0,1 g Dry Milk Powder (= 1%)

ad 10 ml mit 1x TBST

**2.AK:** 1:2000

5µl anti-Ziege IgG-AK aus dem Esel

0,1 g Dry Milk Powder (=1%)

ad 10 ml mit 1xTBST

**DDAH-2**

**1.AK:** 1: 3000

3,3 µl DDAH-2 AK

0,2 g BSA (= 2%)

0,4 g Dry Milk Powder (= 4%)

ad 10 ml mit 1x TBST

**2.AK:** 1:2000

5 µl anti-Ziege IgG AK aus dem Esel

0,1 Dry Milk Powder (= 1%)

ad 10 ml mit 1x TBST

**Ubiquitin**

**1.AK:** 1:50 000

1µl Maus monoclonal AK, FK 2

1 g BSA (= 2%)

1,5 g Dry Milk Powder (=3%)

ad 50 ml mit 1x TBST



**2.AK:** 1:20 000

0,5µl anti-Maus sec. AK (pox-mouse)

0,5 g Dry Milk Powder

ad 10 ml mit 1x TBST

### **Vimentin**

**1.AK:** 1:10 000

1 µl monoclonal anti-Vimentin, clone V9

0,5 g Dry Milk Powder (=5%)

ad 10 ml mit 1x TBST

**2.AK:** 1:2000

5 µl anti-Maus AK

0,1 g Dry Milk Powder

ad 10 ml mit 1x TBST

### **Lösungen für die ADMA-Messung:**

100 µl NH<sub>3</sub> (Ammoniak)

50 µl HCOOH (Ameisensäure)

ad MeOH : H<sub>2</sub>O 50 : 50

pH 4 bis 4,5

### **Sonstige Lösungen:**

#### **10x TBS (Tris Buffered Saline)**

24,2 g Tris

80 g NaCl

Ad 1000ml mit Aqua bidest

pH mit HCL auf 7,6 einstellen

**1x TBS**

100 ml 10x TBS  
ad 1000 ml mit Aqua bidest

**1x TBST**

100 ml 10x TBS  
1 ml Tween 20  
ad 1000 ml mit Aqua bidest

**2M Tris pH 8,8**

242,28g Tris  
600 ml Aqua bidest  
pH 8,8 mit HCL (rauchend) einstellen  
ad 1000 ml Aqua bidest

**0,5M Tris pH 6,8**

60,57 g Tris  
600 ml Aqua bidest  
pH 6,8 mit HCL (rauchend) einstellen  
ad 1000 ml mit Aqua bidest

**20% SDS**

100 g SDS  
ad 500 ml mit Aqua bidest

**10% APS**

100 mg Ammoniumpersulfat (Bio Rad)  
ad 1ml mit Aqua bidest

**Upper Tris pH 6,8 (4x)**

6,06g Tris HCL  
2 ml SDS 20%  
ad 100 ml mit Aqua bidest

### 9.5 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Schale (Tissue Culture Plate, Flat Bottom With Lid, steril)	Sarstedt (Nümbrecht)
96-Well-Schale (Nuncleon Surface, steril)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
96-Well-Schale (Immuno-Plate F96 MaxiSorp)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
96-Well-Schale, beschichtet	Wesemann (Syke)
96-Well-Schale (MultiScreen, for research)	Millipore (Schwalbach)
Abdeckmatte für MegaBlock, 1,2 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
EppendorfgeläÙe (1.5 / 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Falconröhrchen (15 / 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Filme (Fuji Medical X-Ray Film)	Fujifilm (Düsseldorf)
Gummischaber (Cell Scraper)	Sarstedt (Nümbrecht)
Küvetten (10x4x45 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
pH-Indikatorstäbchen, nicht blutend (pH 2.0 bis 9.0)	Merck (Darmstadt)
Pipettenspitzen (gesteckt und ungesteckt)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rührspatel	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten, Kunststoff (1 / 2 / 5 / 10 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask, 25cm <sup>2</sup> , Canted Neck, Polysterene)	Sarstedt (Nümbrecht)

## 9.6 Geräte

8-Kanal-Pipette	Eppendorf (Hamburg)
Analysewaage	Sartorius (Göttingen)
Autoklav	H+P (Oberschleißheim)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Digitalwaage	Sartorius (Göttingen)
Eismaschine	Scotsman (Vernon Hills, USA)
ELISA-Lesegerät Safire	Tecan (Männedorf; Schweiz)
Kamm, Mini-Protean-comb (15-well, 1.00mm)	Bio Rad (Hercules, USA)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühltruhe (-20°C)	Liebherr (Ochsenhausen)
LC-MS/MS	Varian (Palo Alto, USA)
Magnetrührer, MR 3002	Heidolph (Kelheim)
Mikroskop, Axiovert 25	Zeiss (Göttingen)
Mini-Protean-System, Western Blot	Bio Rad (Hercules, USA)
pH-Meter, digital	Knick (Berlin)
Photometer, SmartSpec 3000	Bio Rad (Hercules, USA)
Pipetten, 0.5–10µl / 10–100µl / 100–1000µl / 1000–5000µl	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenkassette, Curix MR 200	Agfa Gevaert (Köln)
Schüttler (Schaukel), Titramax 101	Heidolph (Kelheim)
Short Plates	Bio Rad (Hercules, USA)
Sicherheitswerkbank, HeraSafe S2	Heraeus (Hanau)

## Materialien

---

Spacer Plates (1.00mm)	Bio Rad (Hercules, USA)
Thermoblock	Bioblock Scientific (Illkirch Cedex, Frankreich)
Thermomixer, 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Voltmeter	Bio Rad (Hercules, USA)
Vortexer, Reax Top	Heidolph (Kelheim)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Schwalbach)
Zentrifuge, Centrifuge 5414D	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge, Centrifuge 5180R	Eppendorf (Hamburg)

## **10 Anhang**

### ***10.1 Danksagung***

Herrn Prof. Dr. T. Eschenhagen danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie diese Arbeit anfertigen zu können. Herrn Prof. Dr. R. Böger möchte ich für die Überlassung des Themas, die Anleitung und fortwährende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Schulze, der mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt hat, indem er mir immer die Möglichkeit gab, Fragen zu stellen. Ebenso danke ich ihm für die Diskussionsbereitschaft, die immer neuen Anregungen und selbstverständlich für die außerordentlich schnelle Erstkorrektur dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern des Institutes danke ich für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft. Dabei danke ich stellvertretend besonders Anna Steenpaß, Mariola Kastner, Cornelia Wörmann und Edzard Schwedhelm, die mir bei der Durchführung der Versuche immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Schlussendlich möchte ich auch meiner Familie und dabei insbesondere meinem Vater danken, der mich während aller Phasen dieser Arbeit uneingeschränkt unterstützt und fortwährend motiviert hat.

## 10.2 Lebenslauf

<b><u>Persönliche Daten</u></b>	
Vorname	Laura
Name	Fischer
Geburtsdatum	21. August 1984
Geburtsort	Düsseldorf – Kaiserswerth
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
<b><u>Schulbildung und Abschluss</u></b>	
1990 – 1994	Christian Morgenstern – Grundschule in Ratingen Homberg
1994 – 1998	Geschwister – Scholl – Schule (Gymnasium) in Ratingen
1998 – 2003	Carl Friedrich von Weizsäcker – Gymnasium in Ratingen
2003	Abitur
2003	Beginn des Humanmedizin-Studiums an der Universität HH
2006	Abschluss des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
<b><u>Praktische Erfahrungen</u></b>	
1999	zweiwöchiges Praktikum bei einer Tierärztin
2003	60-tägiges Pflegepraktikum am Ev. Krankenhaus Mettmann
2004	30-tägiges Pflegepraktikum am Ev. Fachkrankenhaus Ratingen
2006	30-tägige Famulatur in einer hausärztlichen Praxis in HH
2008	30-tägige Famulatur in der Anästhesie; UKE
2008	30-tägige Famulatur in der Augenheilkunde; UKE
2008	30-tägige Famulatur in der Chirurgie; Kaiserin Elisabeth-Spital, Wien
2009	Wahlfach-Tertial des Praktischen Jahres in der Augenheilkunde; UKE
2009	Chirurgie-Tertial des Praktischen Jahres; AK Barmbek
2009	8-wöchiges Tertial der Inneren Medizin in der Onkologie; AK Altona
<b><u>Promotion</u></b>	
2007	Beginn einer experimentellen Doktorarbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Universitäts- klinikum Eppendorf, AG Klinische Pharmakologie

### **10.3 Erklärung**

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

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....