

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Die Metabolisierung der Dimethylarginine
durch die Enzyme AGXT2 und DDAH1
und deren Anwendung für den Prozess der Drug Discovery**

Dissertation

*zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften*

*Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg*

vorgelegt von

Isabel Berges

Hamburg, Mai 2014

1. Gutachterin: Prof. Dr. Elke Oetjen
2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Böger

Tag der Disputation: 24. Oktober 2014

Unsere Fehlschläge sind oft erfolgreicher als unsere Erfolge.

Henry Ford

Isi, Mama & Papa

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	L-Arginin und der NO-Stoffwechsel	1
1.2	Die Dimethylarginine	2
1.2.1	Entstehung und Transport der Dimethylarginine	2
1.2.2	Dimethylarginine und der NO-Stoffwechsel	4
1.2.3	SDMA Symmetrisches Dimethylarginin	5
1.2.3.1	Klinische Relevanz und aktueller Forschungsstand	5
1.2.3.1.1	SDMA als renaler Marker	5
1.2.3.1.2	SDMA als kardiovaskulärer Marker	6
1.2.3.1.3	Genom-weite Assoziationsstudie mit SDMA	8
1.2.3.2	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2 (AGXT2)	13
1.2.3.3	Hypothese und Zielsetzung	14
1.2.4	ADMA Asymmetrisches Dimethylarginin	15
1.2.4.1	Klinische Relevanz und aktueller Forschungsstand	15
1.2.4.1.1	Erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen	15
1.2.4.1.2	Erniedrigte ADMA-Plasmakonzentrationen	16
1.2.4.2	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)	17
1.2.4.2.1	DDAH als therapeutisches Target	19
1.2.4.3	Zielsetzung	22
1.3	Erklärungen spezieller Bezeichnungen der Wirkstoff-Entwicklung	24
1.4	Einordnung der für die Dimethylarginine verantwortlichen Enzyme AGXT2 und DDAH1 in den zeitlichen Prozess der <i>Drug Discovery & Developments</i>	26
2	Methoden	29
2.1	SDMA und AGXT2	29

2.1.1	Zellbiologische Methoden	29
2.1.1.1	Verwendete Zelllinien	29
2.1.1.2	Kultivierung der Zellen.....	29
2.1.1.3	Induktion der Proteinexpression	30
2.1.1.4	Lagerung, Einfrieren und Auftauen von Zellen	31
2.1.2	Immunhistologische Untersuchungen.....	31
2.1.2.1	Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen.....	31
2.1.2.2	Nierenschnitte	32
2.1.3	RNA- und DNA-Analysen	33
2.1.3.1	RNA-Isolierung.....	33
2.1.3.2	Umschreiben von RNA auf cDNA durch Reverse Transkription	34
2.1.3.3	Durchführung der qPCR	35
2.1.3.4	Agarose-Gel.....	37
2.1.4	Proteinanalytik.....	37
2.1.4.1	Proteinbestimmung.....	37
2.1.4.2	Western Blot	38
2.1.4.2.1	Probenvorbereitung.....	38
2.1.4.2.2	SDS-PAGE.....	39
2.1.4.2.3	Blotten	40
2.1.4.2.4	Blocken	41
2.1.4.2.5	Inkubation mit Antikörpern.....	41
2.1.4.2.6	Detektion	42
2.1.4.3	Etablierung des AGXT2-Aktivitätsassays.....	43
2.1.4.3.1	Verwendete Proteine	43
2.1.4.3.1.1	Humane Rekombinante AGXT2.....	43
2.1.4.3.1.2	Zellfraktionierung	43
2.1.4.3.1.3	Zell-Lysate	44

2.1.4.3.2	Durchführung der Enzymmessung	45
2.1.4.3.2.1	Ablauf	45
2.1.4.3.2.2	Schritt I Probenvorbereitung und Reaktionsstart.....	47
2.1.4.3.2.3	Schritt II Stoppen der Reaktion und Überführung in die 384- Wellplatte	50
2.1.4.3.2.4	Schritt III Detektion	50
2.1.4.3.2.4.1	Vorbereitung der Reagenzien	50
2.1.4.3.2.4.2	Spektroskopische Messung und Auswertung	51
2.2	ADMA und DDAH1	54
2.2.1	Institut für Lebensmittelchemie Universität Hamburg.....	54
2.2.1.1	Humane rekombinante DDAH1 (rhDDAH1)	54
2.2.2	Institut für Klinische Pharmakologie Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf (UKE)	55
2.2.2.1	Aktivitätsassay Mechanismus.....	56
2.2.2.2	Kinetische Messung der rhDDAH1-Aktivität	57
2.2.3	European Screening Port Hamburg	58
2.2.3.1	Compounds Substanzbibliotheken	58
2.2.3.2	High-Throughput Screening	59
2.2.3.2.1	Messung der rhDDAH1-Aktivität durch Endpunktbestimmung.....	59
2.2.3.2.2	Präparation der Lösungen	59
2.2.3.2.3	HTS-Anlage	60
2.2.3.2.3.1	Vorbereitung der HTS-Platten	64
2.2.3.2.3.2	Kalibrierung der Dispenser	65
2.2.3.2.3.3	HTS-Protokoll	67
2.2.3.2.3.4	Verbrauch	69
2.2.3.2.4	Auswertung	69
3	Ergebnisse.....	72
3.1	SDMA und AGXT2.....	72

3.1.1	Expression der AGXT2	72
3.1.1.1	Organ-spezifische Lokalisation der AGXT2 auf mRNA-Ebene.....	72
3.1.1.1.1	Nierenschnitte	73
3.1.1.2	Subzelluläre Lokalisation der AGXT2	75
3.1.2	Proteinquellen der AGXT2.....	77
3.1.2.1	Humane rekombinante AGXT2	77
3.1.2.2	AGXT2-überexprimierende HEK-Zellen und deren Fraktionierung.....	77
3.1.3	AGXT2-Aktivitätsassay	81
3.1.3.1	Der Methode zugrunde liegende Mechanismus.....	81
3.1.3.2	Etablierung und Optimierung des Assays	82
3.1.3.2.1	Vergleich verschiedener Negativkontrollen.....	83
3.1.3.2.2	Volumenreduktion des Reaktionsansatzes	85
3.1.3.2.3	Substratkonzentrationen.....	86
3.1.3.2.3.1	Glyoxylat als Aminogruppen-Akzeptor	86
3.1.3.2.3.2	L-Alanin als Aminogruppen-Donator	87
3.1.3.2.3.2.1	Absorptionsmessung von L-Alanin mit Mitochondrienfraktion	88
3.1.3.2.3.2.2	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m mit Mitochondrienfraktion.....	89
3.1.3.2.3.2.3	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m mit Zell- Lysat.....	90
3.1.3.3	SDMA als Substrat der AGXT2	92
3.1.3.3.1	Der Reaktion zugrunde liegende Mechanismus.....	92
3.1.3.3.2	Abbau von SDMA durch die AGXT2.....	94
3.1.3.3.3	Vergleich der Umsätze zwischen den Dimethylargininen SDMA und ADMA	95
3.1.3.4	Einfluss der Mutation rs37369 auf die AGXT2-Aktivität.....	97
3.1.3.4.1	Aktivitätsmessung mit SDMA als Substrat	97
3.1.3.4.2	Aktivitätsmessung mit L-Alanin als Substrat	100

3.2	ADMA und DDAH1	104
3.2.1	Vorversuche Eignung als HTS-Assay UKE.....	104
3.2.1.1	Aktivitätsmessung mit humaner rekombinanter DDAH1.....	104
3.2.1.2	DMSO-Toleranz	105
3.2.1.3	Interaktionen mit CPM.....	106
3.2.1.4	Volumenreduktion.....	108
3.2.2	Anpassung des Aktivitätsassays.....	109
3.2.2.1	rhDDAH1-Titration	109
3.2.2.2	Substrat-Sättigungskurve mit SMTC Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m	111
3.2.2.3	Zeitspanne der Linearität	112
3.2.2.4	DDAH-Inhibitor Ebselen als Positivkontrolle Bestimmung des IC_{50} -Wertes	114
3.2.2.5	Herstellung frischer Puffer und Lösungen	116
3.2.3	Überführung des Aktivitätsassays zum European Screening Port	118
3.2.3.1	Substrat-Sättigungskurven im Vergleich.....	118
3.2.3.2	Optimierung des Aktivitätsassays zur Durchführung eines High-Throughput Screenings	119
3.2.3.2.1	Kinetische- versus Endpunktbestimmung.....	119
3.2.3.2.2	Umstellung der Messung auf eine Endpunktbestimmung	122
3.2.3.2.3	Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Positivkontrolle im 90 μ l-Format.	125
3.2.3.2.4	Volumenreduktion in ein 10 μ l-Format mit Ebselen.....	127
3.2.3.3	Durchführung des High-Throughput Screenings	128
3.2.3.3.1	Marker Library Pilot Screen	128
3.2.3.3.2	Primary Screen High-Throughput Screening	131
3.2.3.3.3	Hit Confirmation Bestätigung der Hits	141
3.2.3.3.4	Hit Profiling Konzentrations-Wirkungskurven	145
3.2.3.3.5	Follow-Up Trockensubstanzen	156

4	Diskussion	158
4.1	SDMA und AGXT2	158
4.1.1	Expression und Funktion der AGXT2.....	158
4.1.1.1	Expression	158
4.1.1.2	Enzymatischer Abbauweg von SDMA	159
4.1.1.3	Einfluss der AGXT2-Mutante rs37369 auf dessen Aktivität	161
4.1.2	Fazit	162
4.1.3	Etablierung des LDH/NADH-basierten AGXT2-Assays	163
4.1.3.1	Eignung der Methode als HTS-Assay.....	166
4.1.4	Ausblick	167
4.1.4.1	Mögliche Funktion der AGXT2 in proximalen Tubuluszellen eine Hypothese	167
4.1.4.2	Klinische Relevanz von SDMA und AGXT2	172
4.1.4.3	Diabetes mellitus	172
4.1.4.4	Entwicklung eines HTS-Assays	173
4.1.4.4.1	Alternative HTS-geeignete Detektionsmethoden.....	174
4.2	ADMA und DDAH1	176
4.2.1	Bewertung der Eignung des rhDDAH1-Assays und des HTS	176
4.2.2	Ergebnis des HTS	178
4.2.2.1	Inhibitoren.....	179
4.2.2.1.1	Ebselen-Mimetika	179
4.2.2.1.2	Derivat des DDAH-Inhibitors SCH202676	181
4.2.2.1.3	Analoge von Thyreostatika	182
4.2.2.1.4	Verschiedenartige Inhibitoren	185
4.2.2.2	Aktivatoren.....	186
4.2.3	Fazit	186

4.2.4	Ausblick	188
4.2.4.1	Charakterisierung der Hits	188
4.2.4.2	DDAH, ADMA und die Schilddrüse	191
4.3	Einordnung der Projekte in den Prozess der <i>Drug Discovery/Developments</i> nach Durchführung der beschriebenen Arbeiten	192
5	Zusammenfassung	194
6	Summary	196
7	Anhang	198
7.1	Abkürzungsverzeichnis	198
7.2	Substanzen Materialien Geräte	204
7.2.1	Substanzen	204
7.2.2	Puffer & Lösungen	209
7.2.2.1	H- und P -Sätze des GHS	213
7.2.3	Materialien	220
7.2.4	Elektrogeräte	224
7.2.5	Software	228
7.3	Abbildungsverzeichnis	229
7.4	Tabellenverzeichnis	242
7.5	Literaturverzeichnis	244
8	Lebenslauf	271
9	Veröffentlichungen	272
10	Erklärung	273
11	Danksagung	274

1 Einleitung

1.1 L-Arginin und der NO-Stoffwechsel

Die zuerst in 1886 (von Schulze und Steiger) entdeckte semi-essentielle Aminosäure L-Arginin (2-Amino-5-guanidinopentansäure) ist nicht nur Bestandteil von Proteinen, sondern auch Vorläufer wichtiger endogener Signalmoleküle. Ihre physiologische Bedeutung wurde erstmals durch dessen Involvierung im Harnstoffzyklus erkannt (Krebs, 1932). Neben der Synthese von Agmatin und L-Ornithin durch die Arginin-Decarboxylase und Arginase, wird L-Arginin vor allem auch als Substrat der NO-Synthase (NOS) zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) benötigt (142, 144). Indirekt ist L-Arginin über weitere nachgeschaltete Enzymwege für die Synthese von Kreatinin, Polyaminen und Glutamat verantwortlich (222).

Von der NOS sind bisher drei Isoformen bekannt (173). Die Benennung erfolgte durch die Zelltypen, in der die jeweilige Isoform zuerst entdeckt wurde. Die neuronale (nNOS) (47, 48) und die endotheliale NOS (eNOS) (121, 144) werden dabei konstitutiv exprimiert, wohingegen die induzierte Form (iNOS) in verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise in Monozyten durch Zytokine induziert wird (173, 187, 188). Neben L-Arginin benötigen die NOS unter anderem Sauerstoff, NADPH¹ und das Redoxsystem Tetrahydrobiopterin (BH₄) / Dihydrobiopterin (BH₂). Bei einem Mangel an BH₄ oder L-Arginin werden die durch Oxidation von NADPH freigesetzten Elektronen auf den Sauerstoff übertragen. Die daraus resultierenden Superoxid-Anionen (O₂⁻) reagieren mit NO zu Peroxynitriten (ONOO⁻), die wiederum BH₄ oxidieren. Die so entkoppelte NOS führt dadurch zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Stickstoffverbindungen (153, 205, 223).

Endothelium-derived-relaxing-factor (EDRF), der später als NO identifiziert wurde (50, 143) ist ein wichtiger Transmitter, der unter anderem für die Funktion des Endothels und der Regulation des Blutgefäßsystems wichtig ist. NO führt als lokaler Mediator nach Diffusion von der Endothelzelle in die Muskelzellen zur Aktivierung der löslichen

¹ Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

Guanylylcyclase, die wiederum cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bildet. Der „second messenger“ cGMP führt über Ca^{2+} -abhängige und-unabhängige Wege zu einer Erschlaffung der glatten Muskelzellen in den Blutgefäßen (4, 8, 83, 174). Hierüber kann u.a. der Gefäßtonus und der Blutdruck reguliert werden. Des Weiteren verhindert NO die Oxidation von Low-Density-Lipoprotein (LDL), die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwände (12, 99, 196), die Proliferation glatter Muskelzellen (51), sowie die Anheftung der Thrombozyten und die Bildung von Mikrothromben (9, 157). Dadurch verhindert NO unter physiologischen Bedingungen die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques.

1.2 Die Dimethylarginine

Von der Existenz der Dimethylarginine wurde erstmals 1970 von Kakimoto und Nakajima berichtet (80, 130). Sie isolierten asymmetrisches (ADMA) und symmetrisches (SDMA) Dimethylarginin aus menschlichem Urin und verschiedenen Histon-Präparationen. Sie vermuteten, dass die Dimethylarginine endogen durch die Methylierung von proteingebundenen L-Arginin-Resten entstehen.

1.2.1 Entstehung und Transport der Dimethylarginine

Wie von Kakimoto und Nakajima richtig vermutet wurde, entstehen ADMA und SDMA durch zweifache Methylierung der beiden Stickstoffatome des Guanidin-Restes von proteingebundenen L-Arginin durch Protein-Arginin-Methyl-Transferasen (PRMT). PRMTs, die für die Methylierung S-Adenosylmethionin (SAM) als CH_3 -Donor benötigen, können in Typ I (PRMT 1,2,3,4,6) und Typ II (PRMT 5,7,8) unterschieden werden (55, 141).

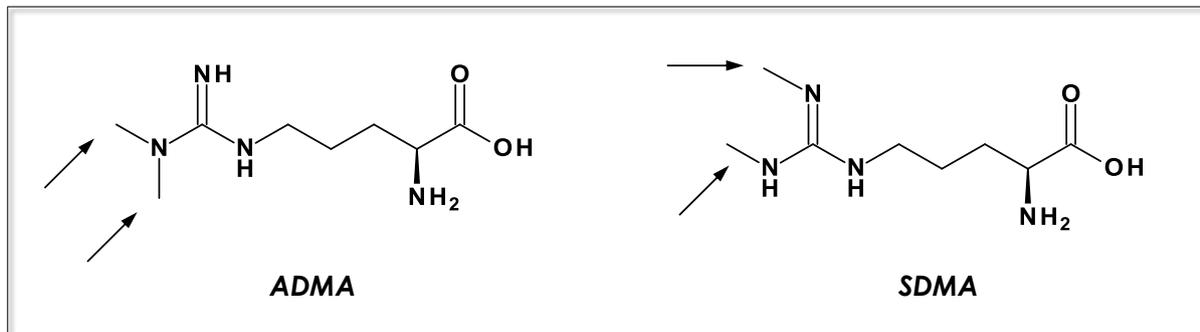


Abbildung 1.1 Derivate der Aminosäure L-Arginin. Asymmetrisches- (ADMA) und symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) werden am Guanidino-Rest durch Protein-Methyltransferasen (PRMT) zweifach methyliert (Pfeile).

Die Bildung der Dimethylarginine erfolgt in zwei Schritten: Zunächst wird N_G -Monomethylarginin durch einfache Methylierung gebildet. Anschließend erfolgt im zweiten Schritt die Methylierung am gleichen N-Atom (zur Bildung von ADMA) oder am gegenüberliegenden N-Atom (SDMA) (**Abbildung 1.1**) und anschließender Freisetzung in den Blutkreislauf. Während die Methylierung von ADMA über PRMT I (159) verläuft, erfolgt die Bildung von SDMA über PRMT II (101, 151).

L-Arginin und seine Derivate werden über die ubiquitär exprimierten kationischen Aminosäure-Transporter (CAT) in die Zelle aufgenommen. Somit kann überall ein ständiger Austausch zwischen Zelle und Plasma gewährleistet werden. Die für L-Arginin, ADMA und SDMA relevanten Transporter sind CAT1 und die beiden Isoformen CAT2A/B (31, 32, 90).

1.2.2 Dimethylarginine und der NO-Stoffwechsel

ADMA und SDMA sind direkt und/oder indirekt an der Regulation der NO-Produktion durch die drei NOS-Formen beteiligt.

ADMA verdrängt *direkt* kompetitiv L-Arginin von der NOS-Bindungsstelle und vermindert somit die Bildung von NO (199). Des Weiteren beeinflusst ADMA *indirekt* die NO-Produktion, da ADMA wie L-Arginin Substrat der CAT-, OCT2² -und MATE1³ -Transporter ist (32, 186). L-Arginin wird vermehrt aus der Zelle geschleust, wodurch der NOS nicht mehr genügend Substrat zur Verfügung steht (32, 186). Die Erniedrigung der NO-Konzentration führt dazu, dass eine adäquate Gegenregulation bei Blutdruckänderungen nicht mehr gegeben ist und pharmakologisch betrachtet auch die anderen protektiven Effekte von NO beeinflusst werden.

Im Gegensatz zu ADMA interferiert SDMA nicht direkt mit der NO-Synthase (199). Allerdings konnte gezeigt werden, dass SDMA ebenfalls auf *indirektem* Wege durch Inhibierung der CAT-Transporter die NO-Produktion negativ beeinflusst (32).

Neben der direkten bzw. indirekten Hemmung der NO-Synthese sollen die Dimethylarginine ebenfalls durch die Verdrängung von L-Arginin den durch die entkoppelte NOS entstehenden nitrosativen und oxidativen Stress provozieren (16, 27, 42).

² Organic cation transporter 2

³ Multidrug and toxin extrusion protein 1

1.2.3 SDMA | Symmetrisches Dimethylarginin

1.2.3.1 Klinische Relevanz und aktueller Forschungsstand

1.2.3.1.1 SDMA als renaler Marker

Auf Grund der hohen unveränderten renalen Ausscheidung (80, 122, 138) wurde SDMA zunächst nur im Zusammenhang mit einer eingeschränkten Nierenfunktion erwähnt. Erste Untersuchungen zeigten, dass erhöhte SDMA-Plasmakonzentrationen stark mit der Kreatinin-Ausscheidung und der glomerulären Filtrationsrate (GFR; das in einer Zeiteinheit gebildete Filtratvolumen als Maß für die Nierenfunktion) korrelierten. Aus diesem Grund wurde SDMA als neuer Marker für die Nierenfunktion diskutiert (46, 58, 87, 117, 148, 199). In einer großen Metaanalyse von 18 Studien mit insgesamt 2136 Patienten wurde letztendlich die starke Korrelation zwischen SDMA und den traditionellen Nierenmarkern wie Inulin, Kreatinin und der GFR bestätigt (88).

Bis dahin hatte sich in der Praxis zur Abschätzung der GFR die Serumkonzentration von Kreatinin als renaler Marker bewährt. Ein Nachteil dieses traditionellen Nierenmarkers ist allerdings, dass der Wert in Abhängigkeit von der Muskelmasse, dem Geschlecht und dem Alter sehr stark schwanken kann und somit interindividuelle Variabilitäten entstehen, die die Abstimmung der Medikation weiter erschweren (16, 88).

SDMA korreliert nicht nur mit Inulin, Kreatinin und der GFR, sondern ist diesen Markern teilweise sogar überlegen, da SDMA weniger stark von individuellen Variabilitäten beeinflusst wird. Des Weiteren hat SDMA den Vorteil, dass es im Vergleich zu Kreatinin innerhalb weniger Stunden ansteigt und somit frühzeitig eine Verschlechterung der Nierenfunktion z.B. nach Nierentransplantation festgestellt werden kann (16, 88, 89).

Da bei SDMA jedoch kein direkter hemmender Effekt auf die NOS nachgewiesen werden konnte (200), wurde es zunächst als biologisch inert angesehen (46, 58, 87, 199).

1.2.3.1.2 SDMA als kardiovaskulärer Marker

Es ist bekannt, dass eine erniedrigte GFR, bedingt durch eine chronisch äingeschränkte Nierenfunktion mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Bluthochdruck, Herzinfarkt, Schlaganfall) assoziiert ist (213). In einer Studie mit KHK-Patienten (koronare Herzkrankheit) konnte gezeigt werden, dass SDMA mit der Nierenfunktion korrelierte und mit dem kardiovaskulären Risiko assoziiert war. In dieser Studie konnte auch experimentell eine Dosis-abhängige reduzierte NO-Synthese und erhöhte ROS⁴-Produktion in HUVEC⁵-Zellen gezeigt werden, was erstmals auf eine mögliche biologische Aktivität von SDMA hindeutete (16).

Bei einem Follow-up von 7,7 Jahren konnte in einer anderen Studie nachgewiesen werden, dass SDMA unabhängig von der Nierenfunktion mit einer erhöhten kardiovaskulären- und Gesamtmortalität assoziiert war (125). Auch in bevölkerungsbasierten Studien konnte gezeigt werden, dass SDMA als Prädiktor für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko und Mortalität unabhängig von der Nierenfunktion angesehen werden kann (59, 84).

In den letzten Jahren wurde die Rolle von SDMA vor allem bei ischämisch-bedingtem Schlaganfall näher untersucht. SDMA-Plasmakonzentrationen sind kurz nach Auftreten des Schlaganfalls stark erhöht und es konnte gezeigt werden, dass SDMA unabhängig von anderen zerebrovaskulären Risikofaktoren mit dem Schweregrad des Schlaganfalls korreliert. SDMA war zusätzlich mit dem Alter, dem Blutdruck und kardio-embolischem Infarkt assoziiert (24). Auch unsere Arbeitsgruppe führte eine Studie mit 137 Patienten mit akut ischämisch-bedingtem Schlaganfall durch, um die Korrelationen von SDMA direkt nach Auftreten des Ereignisses (innerhalb der ersten 30 Tage) zu untersuchen. Dabei war SDMA mit dem Primären Endpunkt (erneuter Schlaganfall, Myokardinfarkt oder Rehospitalisierung) assoziiert. Davon waren vor allem die Patienten betroffen, die ein hohes Alter und eine sehr stark eingeschränkte Nierenfunktion aufwiesen (114). Um den Einfluss von SDMA auf die Langzeitmortalität zu untersuchen, wurden 394 Patienten, die die ersten 30 Tage überlebt hatten für 7,4 Jahre beobachtet. Hier konnte gezeigt werden, dass erhöhte SDMA-Plasmakonzentrationen das Risiko zu sterben, um das 2,4-fache erhöhten. Die Assoziationen waren dabei unabhängig von der Nierenfunktion, so dass die

⁴ Reactive oxygen species

⁵ Human umbilical vein endothelial cells

Vermutung über eine aktive biologische Funktion von SDMA anzunehmen sind (175). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass SDMA nicht nur kurz nach Auftreten des Schlaganfalls, sondern auch langfristig mit der Gesamtmortalität assoziiert ist. Da auch eine Assoziation mit Vorhofflimmern (Risikofaktor für Schlaganfall) gefunden wurde, ist SDMA vor allem als Prädiktor für Schlaganfall geeignet, wohingegen ADMA der bessere Prädiktor für Myokardinfarkt darstellt (114, 175).

Neben KHK und ischämischem Schlaganfall konnten erste Verbindungen zwischen SDMA und Alzheimer (124), Sepsis (71), Diabetes (25, 116) und pulmonaler Hypertonie (156) hervorgebracht werden.

Es stellt sich nun die Frage, über welche molekularen Mechanismen SDMA seine biologische Wirkung hervorbringt. Bisher wurde vermutet, dass SDMA seine *Effekte* vor allem über die *indirekte* Hemmung der NOS über CAT und die Induktion von oxidativem Stress ausübt (16, 24, 32, 84, 125, 210). Durch den Transport über CAT ist ebenfalls die renale Rückresorption von L-Arginin aus der Niere herabgesetzt (195). Dieser Effekt wurde jedoch *in-vitro* bei Konzentrationen im mM-Bereich beobachtet. Ob die *in-vivo* erhöhten SDMA-Konzentrationen über diesen Mechanismen wirken und die kardiovaskuläre Erkrankungen wirklich durch den indirekten Effekt von SDMA auf die NOS entstehen, bleibt weiterhin fraglich (16).

In Monozyten führt eine erhöhte Produktion von ROS NO-unabhängig ebenfalls zu einem Anstieg der SDMA-Konzentration. Dies steht im Zusammenhang mit der zellulären Calcium-Homöostase, die wiederum einen Einfluss auf die kardiale Elektrophysiologie hat (114, 170). Dies könnte neben dem NO-Stoffwechsel eine weitere Erklärung für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko im Zusammenhang mit SDMA sein.

Neben einer eingeschränkten Nierenfunktion lässt sich die *Erhöhung* der SDMA-Plasmakonzentrationen durch eine erhöhte PRMT II-Aktivität (24, 84, 125) erklären, die durch oxidativen Stress und Entzündungsreaktionen induziert wird (22).

1.2.3.1.3 Genom-weite Assoziationsstudie mit SDMA

Auf Grund der wachsenden klinischen Relevanz von SDMA stellte sich neben der Suche nach weiteren NO-unabhängigen Mechanismen die Frage, ob dessen Plasmakonzentrationen pharmakologisch beeinflusst werden können. Um mehr über die Regulation von SDMA zu erfahren und enzymatische Stoffwechselwege zu identifizieren, die als therapeutisches Target genutzt werden könnten, wurde durch unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Dr. V. Ramachandran und Kollegen der Framingham Heart Study eine Genom-weite Assoziationsstudie (GWAS) durchgeführt (Lüneburg et al., in Revision). Die Dimethylarginin-Plasmakonzentrationen der Offspring-Kohorte wurden durch unsere Arbeitsgruppe mittels LC/MS bestimmt (115, 176, 177), die Analyse der genetischen Daten im Zusammenhang mit den Plasmakonzentrationen erfolgte in Framingham durch Statistiker. Hier konnte der genetische Zusammenhang zwischen SDMA-Plasmakonzentrationen und der auf Chromosom 5 lokalisierten Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2 (AGXT2) identifiziert werden (**Abbildung 1.2**).

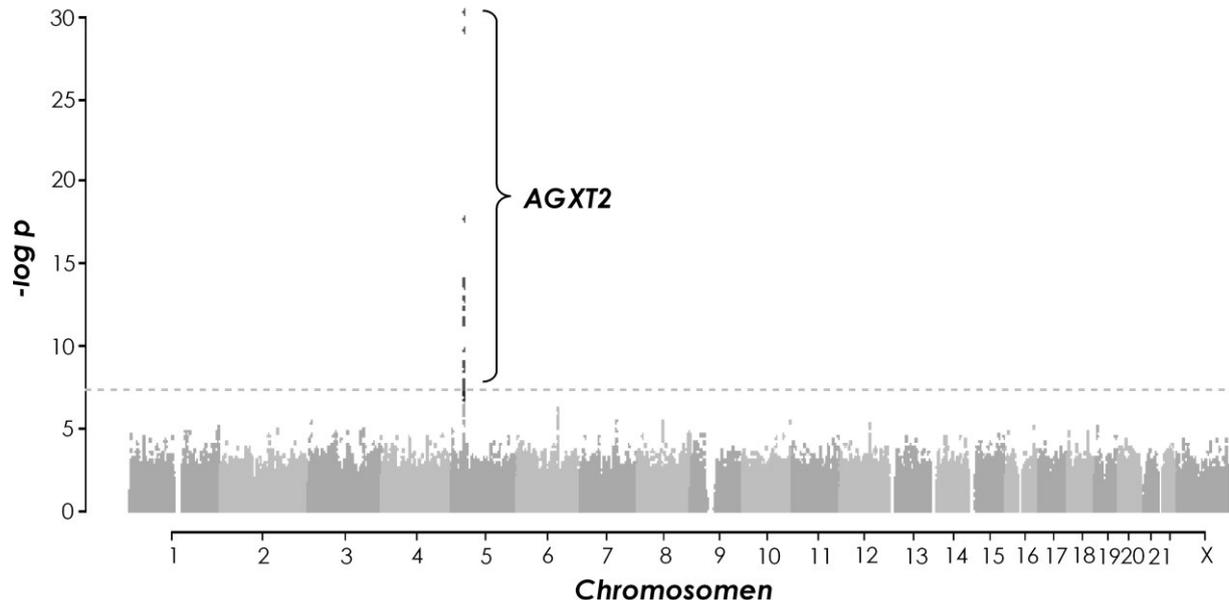


Abbildung 1.2 Manhattan-Plot der durchgeführten Genom-weiten Assoziationsstudie (GWAS) mit der Framingham Heart Study. Die gemessenen Single-nucleotide polymorphisms (SNP) – lokalisiert auf den unterschiedlichen Chromosomen – sind gegen den negativ dekadischen Logarithmus des p-Wertes ($-\log p$) aufgetragen. Es konnten genom-weit signifikante Assoziationen zwischen SDMA-Konzentrationen und mehreren SNP's, die auf dem Gen der AGXT2 (Chromosom 5) lokalisiert sind, gefunden werden.

Außerdem konnten mehrere signifikante SNPs⁶ gefunden werden. Ein in der GWAS identifizierter SNP (rs37369) befindet sich im codierenden Bereich der AGXT2 und stellt eine Missense-Variante dar (**Tabelle 1.1**). Der Einfluss der Variante rs37369 auf die SDMA-Plasmakonzentrationen ist in (**Tabelle 1.2**) wiedergegeben. Es wurde vermutet, dass der SNP die beobachtete Erhöhung der SDMA-Konzentration über eine veränderte AGXT2-Aktivität hervorruft.

⁶ Single-nucleotide polymorphism

Biomarker	SNP	Lokus	SNP-Typ	Identifiziertes Gen	„Minor Allele Frequency“ (MAF)	p-Wert
SDMA	rs37369	5p13	missense	AGXT2	C/T (0,077)	1.95x10 ⁻¹⁴

Tabelle 1.1 Der mit der höchsten Signifikanz ($p=1.95 \times 10^{-14}$) gefundene SNP (rs37369) ist auf Chromosom 5p13 lokalisiert und stellt eine „missense“-Punktmutation dar. Der SNP liegt im codierenden Bereich, bei der die Base Cytosin gegen Thymidin (MAF von 0,077) ausgetauscht ist. SNP = Single-nucleotide polymorphism.

SNP	Mittelwert [µmol/L]	Median [µmol/L]	IQR [µmol/L]	Mittelwert [µmol/L]	Median [µmol/L]	IQR [µmol/L]	Mittelwert [µmol/L]	Median [µmol/L]	IQR [µmol/L]
rs37369	0,390	0,378	0,122	0,425	0,410	0,131	0,469	0,495	0,166
	Kein rezessives Allel			1 rezessives Allel			2 rezessive Allele		

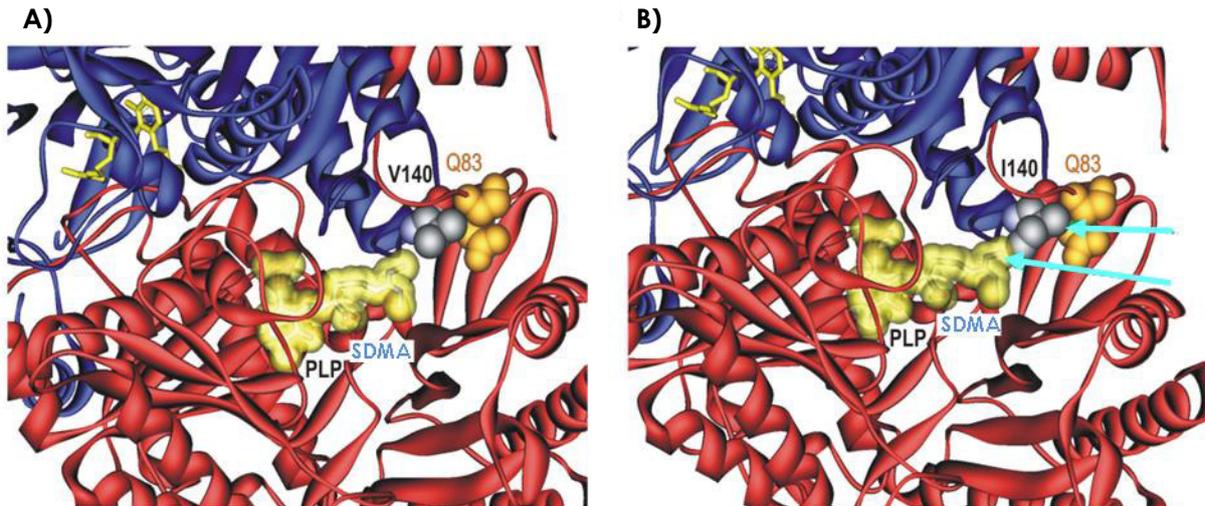
⁷ IQR

Tabelle 1.2 Vergleich der gemessenen SDMA-Plasmakonzentrationen (als Mittelwert, Median und „Interquartile range IQR“, jeweils in µmol/L) unter Einfluss des AGXT2-Wildtyps bzw. der AGXT2-Varianten rs37369 (heterozygote und homozygote Träger) der Framingham-Kohorte der durchgeführten Genomweiten Assoziationsstudie.

⁷ Interquartile range

Bei der Variante rs37369 ist die Aminosäure Valin gegen Isoleucin ausgetauscht. Um zu überprüfen, ob dies einen Einfluss auf die räumliche Struktur des Enzyms hat, wurde ein 3D-Modell der AGXT2 mit SDMA erstellt (**Abbildung 1.3**). Man konnte erkennen, dass das Substrat durch den Basenaustausch nur noch unzureichend im aktiven Zentrum gehalten werden kann. Dieses Ergebnis ließ weiter vermuten, dass die Mutation einen negativen Effekt auf die Enzym-Aktivität hat und somit eine klinische Relevanz bei SDMA-assoziierten Erkrankungen aufweisen könnte. Die Assoziation zwischen AGXT2 und SDMA wurde in derselben Zeit in einer weiteren GWAS entdeckt (181). Die voneinander unabhängig ermittelten Daten zeigten somit auf *genetischer Ebene* deutlich, dass SDMA über einen enzymatischen Stoffwechselweg verfügt und somit die Möglichkeit besteht hierüber Einfluss auf dessen Konzentration und nachteiligen Effekte zu nehmen.

Ein möglicher Zusammenhang von AGXT2 und SDMA konnte bereits in den 80er Jahren in *Ratten* nachgewiesen werden. Ogawa und Kollegen konnten im Urin von ¹⁴C-ADMA/SDMA-injizierter Ratten α -Keto- δ -(N,N⁽¹⁾-dimethylguanidino)-valeriansäure (D⁽¹⁾MGV) als Metabolit, der beim Abbau der Dimethylarginine entsteht, identifizieren (138).



⁸ PLP

Abbildung 1.3 3D-Strukturanalyse der AGXT2 mit dem Co-Faktor Pyridoxalalphosphat (PLP). a) Ansicht des AGXT2-Wildtyps. Dargestellt ist die mögliche Position von SDMA als potenzielles Substrat in der Bindungstasche. Die ebenfalls im aktiven Zentrum vorliegende Aminosäure Valin140 tritt in Wechselwirkung mit dem Glutamin83-Rest, der für die Konformationsänderung des Enzyms essentiell ist. b) Der SNP rs37369 führt im Protein zu einem Austausch von Valin140 gegen Isoleucin140. Durch den größeren Aminosäure-Rest des Isoleucins kann das Substrat nicht in die für die katalytische Umsetzung notwendige Position gebracht werden (sterische Hinderung). Des Weiteren wird ein negativer Einfluss auf die Funktion von Glutamin83 vermutet (Pfeile).

Außer den genetischen Daten aus den beiden GWAS konnte jedoch noch nicht der Abbau von SDMA durch AGXT2 im Menschen nachgewiesen werden. Da die in Tiermodellen erbrachten Ergebnisse nicht unbedingt auf den Menschen übertragen werden können, ist es daher notwendig den Einfluss der AGXT2 und SDMA mit *humanen Zellen* o.ä. nachzuweisen. Grund dafür ist, dass viele Tiermodelle nicht alle Eigenschaften einer Erkrankung vollständig wiedergeben können.

⁸ Pyridoxalalphosphat

1.2.3.2 Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2 (AGXT2)

Die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2 wurde bereits vor langer Zeit identifiziert und stellt neben der AGXT1 die zweite Isoform dar. AGXT1 hat neben der Fähigkeit der Transaminierung zwischen L-Alanin und Glyoxylat eine Serin-Pyruvat-Aminotransferase-Aktivität. Bei der irreversibel verlaufenden Reaktion zwischen L-Alanin und Glyoxylat dient Pyridoxalphosphat (PLP) als Co-Faktor (134, 164, 165). Genetische Varianten der AGXT1 stehen nachweislich mit der autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankung Hyperoxalurie in Zusammenhang (38, 39).

Die zweite Isoform AGXT2 besitzt hingegen keine Serin-Aminotransferase-Aktivität (134). Stattdessen wurden andere unabhängig identifizierte bekannte Enzyme später als AGXT2 identifiziert (β -Alanin-Aminotransferase (95)), 2-Aminoisobutyrat-Aminotransferase (140) und 5-Aminolävulinat-Synthase (204)).

Während die AGXT1 im Menschen nur in den Peroxisomen lokalisiert ist, ist die AGXT2 in den Mitochondrien der Niere und Leber vorzufinden (11, 162). Neben der mitochondrialen Lokalisation innerhalb der Niere und Leber ist über das humane Expressionsmuster der AGXT2 jedoch nichts bekannt.

1.2.3.3 Hypothese und Zielsetzung

Auf Grund der gewonnenen Daten der GWAS stellte sich die Frage, ob der enzymatische Abbauweg über die AGXT2 einen Einfluss auf die mit SDMA assoziierten Erkrankungen im Menschen hat. Es wurde spekuliert, dass eine mögliche Lokalisation im Gehirn und die Aktivität der AGXT2 eine Rolle bei ischämisch-bedingtem Schlaganfall spielt. Des Weiteren lies die GWAS und die 3D-Analyse der entdeckten AGXT2-Variante rs37369 einen negativen Einfluss auf dessen enzymatische Aktivität vermuten.

Die Ziele dieser Arbeit wurden basierend auf diesen Vermutungen aufgestellt:

1. Es sollte das Organ-spezifische Expressionsmuster der AGXT2 im Menschen untersucht werden. Der mögliche Einfluss der AGXT2-Variante rs37369 auf dessen intrazelluläre Lokalisation bzw. Expression sollte dabei berücksichtigt werden.
2. Die durch die GWAS aufgestellte Hypothese über den Abbau von SDMA durch die AGXT2 im Menschen sollte in *humanen Zellen auf Protein-Ebene* mit Hilfe eines AGXT2-Assays gezeigt werden. Auch die vermutete verminderte Aktivität, hervorgerufen durch die Mutation rs37369, sollte nachgewiesen werden.
3. Auf Grund des Potenzials als therapeutisches Target sollte ein Aktivitätsassay im eigenen Labor etabliert und optimiert werden, der eine Grundlage für die zukünftig geplante Durchführung eines High-Throughput Screenings (HTS) darstellt.

1.2.4 ADMA | Asymmetrisches Dimethylarginin

1.2.4.1 Klinische Relevanz und aktueller Forschungsstand

1.2.4.1.1 Erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen

Erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen führen über die Hemmung der NO-Produktion zu einer endothelialen Dysfunktion (82, 149, 227), die als Ursache vieler kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen wird. So konnte Kari et al. (1997) bei Kindern mit chronischer Niereneinschränkung eine inverse Assoziation zwischen ADMA und der endothelialen Funktion zeigen. Auch Zoccali et al. (2001) konnten zeigen, dass eine 3-fach erhöhte ADMA-Plasmakonzentration das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Dialyse-Patienten signifikant erhöht und mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert ist.

Das kardiovaskuläre Risiko (u.a. für Arteriosklerose und Herzinsuffizienz) wird unter anderem durch das metabolische Syndrom drastisch erhöht, das nach der Definition der „International Diabetes Federation“ eine Kombination zwischen viszeraler Adipositas und Diabetes mellitus (bzw. erhöhte Insulinresistenz), Bluthochdruck oder Dyslipidämie darstellt (72). Es konnten Zusammenhänge von erhöhten ADMA-Konzentrationen bei Diabetes bzw. Insulinresistenz (1, 5, 106, 189), Bluthochdruck (49, 120, 149, 212) und Hypercholesterolämie (17–19) nachgewiesen werden.

Dementsprechend konnten auch Korrelationen erhöhter ADMA-Plasmakonzentrationen mit kardiovaskulären Erkrankungen, wie Arteriosklerose beobachtet werden (33, 110, 127). Es wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Dicke der Arterien als Maß für die Entwicklung von Arteriosklerose gemessen wurde. Hier zeigten sich signifikante Korrelationen mit den ADMA-Plasmakonzentrationen (127). Neben der Herzinsuffizienz (30, 45, 86, 167) konnte auch ein Zusammenhang mit erhöhten ADMA-Konzentrationen und dem Auftreten einer pulmonalen Hypertonie (60, 126, 156, 183), und Präeklampsie (6, 62, 150, 169) festgestellt werden.

Bei der Untersuchung der Assoziationen von erhöhtem ADMA mit erniedrigten NO-Konzentrationen und NOS-Aktivitäten konnte gezeigt werden, dass ADMA ein Risikofaktor für endotheliale Dysfunktion und ein unabhängiger Prädiktor für die kardiovaskuläre- und Gesamtmortalität darstellt (19–21, 133, 227).

1.2.4.1.2 Erniedrigte ADMA-Plasmakonzentrationen

In den letzten Jahren konnten allerdings auch Assoziationen von erniedrigten ADMA-Konzentrationen gezeigt werden. Beispielsweise sind bei der Alzheimer-Erkrankung erhöhte NO- und ROS-Konzentrationen (184) zu messen. Die Synthese erfolgt vorwiegend durch die Induktion der iNOS (64, 207). Obwohl ADMA bei schwer erkrankten Alzheimer-Patienten im Plasma erhöht war (7, 179), konnten hingegen im Hirnliquor eine um 30-48% reduzierte Konzentration gemessen werden. Dabei waren die erniedrigten ADMA-Konzentrationen mit dem kognitiven Denken und dem Schweregrad der Krankheit assoziiert (2, 7). Die im Plasma gleichzeitig auftretenden erhöhten ADMA-Konzentrationen könnten durch die Induktion einer endothelialen Dysfunktion zu einer eingeschränkten Mikroperfusion im Gehirn führen, die ebenfalls das Krankheitsbild negativ beeinflusst (7). Somit wird vermutet, dass sowohl erhöhtes als auch erniedrigtes ADMA, die durch die Bluthirnschranke getrennt sind, zur Erkrankung beitragen.

Des Weiteren wurde der Einfluss von ADMA bei Tumorerkrankungen untersucht. So konnte beispielsweise bei C6-Glioma-Zellen und im Gewebe von Hirntumoren erniedrigte ADMA-Konzentrationen mit gleichzeitig auftretenden erhöhten NO-Konzentrationen in Verbindung gebracht werden. Diese waren mit dem *in-vivo* beobachteten erhöhten Zelltumorstadium und einer Neovaskularisierung (erhöhte Blutperfusion) assoziiert (96–98).

Vor allem aber bei kardiopulmonalen Erkrankungen wird die Rolle des ADMA/NO-Stoffwechsels kontrovers diskutiert (113). So konnte in einem Tiermodell der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) gezeigt werden, dass eine Erhöhung der ADMA-Konzentrationen in der Lunge (durch Inhibierung des ADMA-abbauenden Enzyms) der Entwicklung einer IPF entgegen gewirkt werden konnte (77), wohingegen bei Patienten mit Pulmonaler Hypertonie erhöhte ADMA-

Konzentrationen mit einer erhöhten Mortalität assoziiert waren (85). Die ursächliche Pathophysiologie der Erkrankung scheint hier entscheidend für die Wirkung von ADMA zu sein.

1.2.4.2 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)

In den 80er Jahren wurden bereits ADMA-abbauende Enzyme durch Ogawa et al. erstmals identifiziert (137, 138). Dieser konnte nachweisen, dass ein Großteil von ADMA durch das Enzym N^G-N^G-Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) metabolisiert wird. DDAH baut ADMA zu Citrullin und Mono-/Dimethylamin (MMA & DMA) ab. Ein sehr kleiner Teil wird in der Niere durch die AGXT2 metabolisiert (162).

Von der DDAH sind zwei Isoformen bekannt – DDAH1 und DDAH2. Sie zeigen eine unterschiedlich ausgeprägte Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation auf, was auf unterschiedliche bzw. abweichende Funktionen vermuten lässt (15, 104). Während DDAH1 (~45 kDa) sowohl im Cytosol als auch im Nukleus und zum Teil auch membrangebunden in der Zelle vorliegt, konnte DDAH2 (~38 kDa) nur im Cytosol nachgewiesen werden (15). Beide Isoenzyme werden gewebespezifisch im Körper exprimiert. DDAH1 wird vor allem sehr stark in der Niere exprimiert und überwiegt im Vergleich zur DDAH2 in Gehirn und Leber. Die Expression der DDAH2 findet vor allem im Herzen statt und ist mehr als die DDAH1 in Plazenta und Lunge vorzufinden (104). Beobachtungen zufolge werden DDAH und CAT mit den NOS-Isoformen co-exprimiert. Dadurch ist eine kontinuierliche Bereitstellung des Substrats für die Bildung von NO gewährleistet (123, 195).

Dass eine veränderte DDAH-Expression bzw. -Aktivität einen Einfluss auf die ADMA-Konzentrationen nehmen kann, wurde in zahlreichen Zell- und Tier-Experimenten gezeigt. Die Überexpression von DDAH1 in endothelialen und glatten Muskelzellen führte dabei durch den erhöhten ADMA-Abbau zu einer erhöhten Synthese von NO (40, 198). Gleiche Effekte konnten *in-vivo* in tgDDAH1⁹-Mäusen beobachtet werden (40, 76, 119). Teilweise konnte die Auswirkung von ADMA anhand eines veränderten Blutdrucks gemessen werden (40, 67). Umgekehrt konnten bei einer Deletion der

⁹ Transgene DDAH1-Mäuse

endothelialen DDAH1 (endo-DDAH1-KO¹⁰-Mäuse) oder durch die Maskierung der DDAH1 (z.B. mittels siRNA¹¹) gegenteilige Effekte erzielt werden (66, 67, 211). Während bei tgDDAH2-Mäusen reduzierte ADMA- und erhöhte NO-Konzentrationen gemessen werden konnten (61), wurde bei der Ausschaltung des DDAH2-Gens mittels siRNA in Ratten kein Einfluss auf ADMA beobachtet (211). Auch in HUVEC-Zellen, bei der die DDAH2 stillgelegt wurde, konnten keine Effekte auf ADMA beobachtet werden (66).

Eine erhöhte DDAH-Expression konnte dementsprechend in den mit erniedrigtem ADMA-assoziierten Erkrankungen detektiert werden. Beispielsweise wiesen maligne Prostatazellen eine erhöhte DDAH2-Expression auf. Es wurde vermutet, dass die erhöhte DDAH-Aktivität über NO eine Neovaskularisierung induziert (203). Eine erhöhte DDAH1-Expression führte in C6-Glioma-Zellen zu 2-fach erhöhten Konzentrationen von NO (96–98). Auch bei Alzheimer konnte neben den veränderten ADMA- und NO-Konzentrationen eine Überexpression der Zink-abhängigen DDAH1 entdeckt werden. Die Vermutung des negativen Einflusses von ADMA/DDAH bei Alzheimer wurde durch die Tatsache bestärkt, dass sich die Alzheimer-Symptome bei Supplementation von Zink verschlechtern (DDAH wird durch Zink gehemmt) (94, 185). Auch bei IPF konnten die beobachteten erniedrigten ADMA-Konzentrationen auf eine Überexpression der DDAH zurückgeführt werden (77). Bei den mit erhöhten ADMA-Konzentrationen assoziierten Erkrankungen konnten dementsprechend erniedrigte Expressionen oder Aktivitäten der DDAH im Tiermodell oder humanen Gewebeproben detektiert werden (30, 106, 126, 156).

Auch wenn die DDAH2 teilweise Effekte auf NO und ADMA zeigte, wird jedoch die Isoform 1 für das für ADMA hauptverantwortliche Enzym gehalten. Grund dafür ist die kürzlich generierte globale DDAH1-KO-Maus (66) und zwei durchgeführte GWAS ((181), Lüneburg et al., in Revision). Die globalen DDAH1-KO-Mäuse, die eine moderate Erhöhung des Blutdrucks aufwiesen, zeigten keine DDAH1-Expression. Eine veränderte DDAH2-Expression als Kompensationsmechanismus fand jedoch nicht statt. Es konnte keine DDAH-Aktivität gemessen werden, die Konzentrationen von ADMA waren in den gemessenen Organen (Lunge, Niere, Leber) erhöht. Die dadurch erniedrigte Synthese von NO konnte im Urin und Plasma gemessen werden.

¹⁰ Knock-Out

¹¹ Small interfering RNA

Unter physiologischen Bedingungen konnte somit *in-vivo* kein wichtiger Beitrag der DDAH2 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte in den zwei unabhängig voneinander durchgeführten GWAS eine Assoziation von ADMA-Plasmakonzentrationen mit der DDAH1 – jedoch nicht mit der DDAH2 – im gesunden Probandenkollektiv bzw. in Assoziation mit kardiovaskulären Ereignissen gezeigt werden.

1.2.4.2.1 DDAH als therapeutisches Target

Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass die DDAH einen entscheidenden Einfluss auf die NO-Konzentration nimmt. Anhand unterschiedlicher Experimente konnte gezeigt werden, dass die Synthese von NO durch Manipulation des DDAH/ADMA-Stoffwechselweges beeinflusst werden kann (siehe **Punkt 1.2.4.2**). Dies ließ die Überlegung zu, die DDAH als pharmakologische Intervention für Erkrankungen, die mit einer veränderten DDAH- oder NOS-Aktivität assoziiert sind, zu nutzen (103, 218).

Da vor allem die Assoziationen mit pathophysiologisch *erhöhten* ADMA-Konzentrationen gefunden wurden, wurden bereits einige Versuche angestellt die Aktivität oder Expression der DDAH zu erhöhen. Beispielsweise konnte herausgefunden werden, dass im DDAH1-Gen auf Intron 1 ein FXR¹²-response element (FXRE) lokalisiert ist, das mit Farnesoid-X-Rezeptoren der Klasse NR1H4 ein Heterodimer bildet. Durch den FXR-Agonisten GW4064 konnte dosis-abhängig eine 6-fache Steigerung der DDAH1-Expression bewirkt werden. Dementsprechend konnten erniedrigte ADMA- und erhöhte NO-Konzentrationen gemessen werden (65). Kürzlich konnte in Salz-sensitiven Dahl-Ratten gezeigt werden, dass auch der FXR-Agonist INT-747, der wie GW4064 ein Analog der Gallensäure darstellt, teilweise durch Aufrechterhaltung der hepatischen DDAH1-Expression die Insulin-Sensitivität erhöhen konnte. Allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, inwieweit die beobachtete Veränderung auf die Insulin-Resistenz alleine durch die DDAH hervorgerufen wurde (54).

¹² Farnesoid-X-Rezeptor

Des Weiteren konnte in murinen Endothelzellen gezeigt werden, dass all-trans-Retinolsäure die DDAH2-Expression und Promoter-Aktivität ohne Veränderung der NOS-Expression erhöhte. Die daraus resultierenden veränderten ADMA- und NO-Konzentrationen konnten durch den DDAH-Inhibitor 4124W wieder rückgängig gemacht werden (3). Der protektive Einfluss der Säure auf die DDAH2-Expression konnte in undifferenzierten Pheochromozytom-Zellen (PC12) bestätigt werden (216).

PPAR¹³-γ-Agonisten, wie die oralen Antidiabetika Pioglitazon und Rosiglitazon zeigten ebenfalls in Tier-Experimenten einen Einfluss auf die Expression von DDAH. Spontan hypertensive Ratten, die mit Pioglitazon behandelt wurden, zeigten erniedrigte ADMA-Plasmakonzentrationen und eine erhöhte renale Ausscheidung der NO-Metaboliten, bedingt durch die Induktion der DDAH2-Expression auf Transkriptionslevel (209). In einer klinischen Studie mit gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Rosiglitazon neben der Erhöhung der Insulinsensitivität auch die Konzentrationen von ADMA senkte (189).

Da der Einfluss auf Transkriptionsebene viele unterschiedliche Gene und somit auch die Expression verschiedener Proteine beeinflussen kann, ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten unerwünschter Off-Target-Effekte sehr hoch. Dies konnte beispielsweise bei Rosiglitazon, das für die Behandlung von Diabetes Typ 2 entwickelt wurde, beobachtet werden. Auf Empfehlung des Ausschusses für Humanarzneimittel (CHMP) wurde der Wirkstoff Rosiglitazon im Jahre 2010 durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) vorerst vom Markt genommen. Das ungünstige Nutzen-Risiko-Verhältnis ist neben dem kardiovaskulärem Risiko vor allem auf das stark erhöhte Frakturrisiko bei Frauen zurückzuführen (78, 168).

Um Nebeneffekte möglichst gering zu halten, wären selektive Induktoren der Gen-Expression erforderlich. Die Nutzung der Gen-Therapie stellt eine Möglichkeit dar, um therapeutisch in den DDAH/ADMA/NO-Stoffwechsel einzugreifen. Allerdings sind hierzu weitere klinische Studien nötig, um den DDAH-Einfluss, den Nutzen und das Risiko abzuwägen.

¹³ Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

Eine weitere Möglichkeit die DDAH therapeutisch zu nutzen, ist die Veränderung der Enzym-Aktivität mit *small molecules* – niedermolekularen Substanzen. Dieser Ansatz stellt neben der Expressionsinduktion eine hoffnungsvolle pharmakologische Möglichkeit für Erkrankungen, die mit erniedrigten NO-Konzentrationen assoziiert sind, dar. In den letzten Jahren wurde bereits begonnen durch High-Throughput Screenings nach DDAH-Aktivatoren zu suchen. Auf Grund der Schwierigkeit Substanzen zu finden, die eine höhere Aktivität als das natürliche Substrat aufweisen oder die über eine andere Bindungsstelle dessen Aktivität beeinflussen, konnte bisher kein Aktivator gefunden werden. Dass aber die Suche nach einem Aktivator dennoch möglich ist, konnte Dr. Mochly-Rosen (*Universität Stanford, School of Medicine, Department of Chemical and Systems Biology*) beweisen, die einen allosterischen Aktivator der ALDH2 (mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase) gefunden hat (29).

Auf Grund der entdeckten Assoziationen *erniedrigter* ADMA-Konzentrationen mit der Überproduktion von NO, ist die Suche nach DDAH-Inhibitoren genauso wichtig wie die für Aktivatoren. Die Identifizierung DDAH-hemmender Stoffe stellte sich bisher als einfacher heraus. Die bisher aussichtsreichsten DDAH-Inhibitoren stellen die L-Arginin-Derivate N_G-(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257) (103, 163), Cl-NIO¹⁴ (217), Protonen-Pumpen-Hemmer (PPI) (53) und das kürzlich identifizierte Ebselen dar. Ebselen war dabei der erste effektive humane DDAH-Inhibitor, der strukturell von ADMA abweicht und mit seinem Sulfhydryl-Rest kovalent an den Cystein-Rest im aktiven Zentrum der DDAH bindet (108). Da im NO-Stoffwechsel die DDAH, NOS und Arginase (produziert L-Arginin als Substrat der NOS) direkt miteinander im Zusammenhang stehen, wird v.a. die Selektivität des DDAH-Inhibitors gegenüber der beiden anderen Enzyme als wichtige Eigenschaft angesehen (103).

¹⁴ N-(5)-(1-imino-2-chloroethyl)-L-ornithine

1.2.4.3 Zielsetzung

Es wurden bereits Substanzen identifiziert, die die DDAH hemmen und somit weiter chemisch optimiert werden könnten. Allerdings schaffen die wenigsten Strukturen den Sprung in die klinische Testung auf Grund fehlender Wirksamkeit, Toxizität oder anderer Probleme. Diejenigen Wirkstoffe, die letztendlich in klinischen Studien getestet werden können, schaffen tatsächlich nur 20% den Schritt auf den Markt. Die Wahrscheinlichkeit, dass einer der bisher identifizierten DDAH-Hemmer für die Therapie einer Erkrankung eingesetzt wird, ist daher sehr gering. Des Weiteren vergehen viele Jahre bis eine Leitstruktur so weit optimiert wurde, bis sie die optimalen Eigenschaften eines Wirkstoffes aufweist und somit im Menschen getestet werden kann. Des Weiteren blieb die Identifizierung eines DDAH-Aktivators als bessere Alternative zur Gen-Therapie immer noch erfolglos.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war daher ebenfalls ein High-Throughput Screening durchzuführen, um weitere potenzielle Strukturen für die Wirkstoffentwicklung zu finden. Dieser Teil der Arbeit sollte in Zusammenarbeit mit dem *European Screening Port* (ESP) aus Hamburg durchgeführt werden. Der ESP wurde in Form einer öffentlich-privaten Partnerschaft gegründet und führt im Auftrag der akademischen Forschung u.a. virtuelle- und High-Throughput Screenings durch. Des Weiteren sind sie u.a. bei der Entwicklung und Validierung der dafür vorgesehenen HTS-Assays beteiligt. Durch die Abdeckung des ersten Abschnittes des *Drug Discovery/Developments* stellen sie das Verbindungsstück zwischen akademischer Grundlagenforschung und der pharmazeutischen Industrie bzw. Klinischen Forschung dar.

Die zur Hit Identification durchzuführenden Aufgaben/Ziele waren:

1. Die Etablierung, Validierung und Testung eines HTS-tauglichen DDAH1-Aktivitätsassays im eigenen Labor (UKE) und dessen Überführung in das Labor des ESP, an der sich die Durchführung eines *Pilot Screens* anschließt. Als Assay sollte die von *Fast & Linsky* entwickelte Aktivitätsmessung mit S-Methylthiocitrullin verwendet werden (107). Neben der Eignung als HTS-Assay sollte auch die Qualität der rekombinant hergestellten hDDAH1 im Labor des UKE ausgetestet werden. Ein weiterer Grund für die Überführung der Methode war, dass neben der bereits etablierten Isotopen-basierten DDAH1-Aktivitätsmessung mittels LC/MS eine schnell durchführbare Alternative zur Verfügung stehen sollte.
2. Die Durchführung des *High-Throughput Screenings* mit ~ 50.000 *Compounds*.
3. Die Überprüfung der *Hits* und *Cherry Picking* (Erklärung siehe **Tabelle 1.3**) repräsentativer Strukturen für die weitere Optimierung zur Leitstruktur.

1.3 Erklärungen spezieller Bezeichnungen der Wirkstoff-Entwicklung

Da die Entwicklung von Wirkstoffen in Zusammenarbeit mit international tätigen Firmen stattfindet, werden die für diesen Prozess gängigen Begriffe meist nur in englischer Sprache verwendet. Da es hierfür oft keine geeigneten bzw. unbefriedigende deutsche Übersetzungen gibt, werden in dieser Arbeit ebenfalls englischen Begriffe (*kursiv*) verwendet. Die wichtigsten Begriffe der Wirkstoff-Entwicklung sind in folgender **Tabelle 1.3** erläutert. In den entsprechenden Abschnitten der Arbeit erfolgt dann teilweise eine nähere Erklärung.

Begriffe	Erklärung
Allgemein	
Assay	Messmethode zur Bestimmung der Enzym-Aktivität.
Compound	Stellen die chemischen Strukturen der Substanzbibliotheken dar, die im Screening auf ihre biologische Aktivität bezüglich des Targets getestet werden.
Hit	(Potenzielle) positive Treffer (Inhibitoren/Aktivatoren) eines Screenings.
Cherry-Picking	Auswahl der Hits aus den Ergebnissen der Screenings durch Definition der Schwellenwerte (als Hemmung/Aktivierung in %).
Lead Struktur/Candidate	Molekulare Struktur, die eine Aktivität für das gewünschte Target zeigt und am Ende der Hit Identification ausgewählt wird. Sie dient in der folgenden Hit Optimization als Grundlage zur Entwicklung eines Wirkstoffes mit verbesserten Eigenschaften.
Small molecules	Niedermolekulare Moleküle, die unter anderem bei einem Screening getestet werden. Ein niedriges Molekulargewicht stellt neben weiteren Punkten eine Eigenschaft eines guten Wirkstoffes dar (Eigenschaften sind u.a. durch Lipinsky's Rules of 5 definiert).
Gain & Loss of Function Study	Biochemische oder tierexperimentelle Methoden, bei der z.B. die Funktion eines Targets an -oder ausgeschaltet wird, um die über das Target aufgestellte Hypothesen/ Fragestellungen zu untersuchen (durch Knock-In/Out, Inhibitoren/Aktivatoren, Einführung von Mutationen).
Target	Biomolekül (Enzym, Rezeptor, Ionenkanal), an das eine Struktur (Wirkstoff) bindet und dadurch die Funktion / Aktivität des Biomoleküls beeinflusst.
Hit Region	Die Ergebnisse eines Screenings (die gemessenen Compounds) werden im Scatter Plot dargestellt. Die Hit Region ist der Bereich des Scatter Plots, der die Compounds, die durch vordefinierte Schwellenwerte als Hit ausgewählt wurden, beinhaltet.
Drug Development/Discovery	
Drug Development/Discovery	Umfasst die Identifizierung des Targets, die Entwicklung eines Wirkstoffes, die klinische Prüfung bis zur Zulassung des Medikaments.
Target Identification/Validation	Identifizierung und nähere Untersuchung eines Targets. Nähere Erklärung siehe Punkt 1.3 (folgender Abschnitt).
Hit Identification	Umfasst die Schritte der Assay-Entwicklung bis zur Überprüfung der Hits im Secondary Assay (siehe Hit Identification im unteren Teil der Tabelle).
Lead Optimization	Nach einer ersten Charakterisierung der Lead-Struktur bezüglich ihrer Toxizität und anderen Eigenschaften in-vitro und/oder in-vivo, wird sie durch chemische Modifikation verbessert. Dabei werden funktionelle Gruppen ausgetauscht, um u.a. die Potenz zu steigern.
Structure-based Drug Design	Die bei der Lead Optimization durchgeführte strukturelle Modifizierung der Lead-Struktur. Es werden mehrere neue Strukturen basierend auf der Substanz neu synthetisiert und ausgetestet.
Hit-to-Lead-Candidate	Der Prozess, der die Auswahl der Hits bis zur Lead – Struktur beinhaltet. Dazu zählen Secondary Assays und weitere biochemische oder tierexperimentelle Methoden zur Charakterisierung der Eigenschaften der Hits (Toxizität etc.).
HTS-Prozess / Hit Identification	
Pilot Screen/Marker Library	Zur Austestung des Assays unter realen HTS-Bedingungen (d.h. unter der Benutzung der vollautomatischen HTS-Anlage). Es wird eine kleine Auswahl willkürlich ausgewählter Compounds gemessen, bevor das eigentliche Screening beginnt.
Primary Screen	Das eigentliche Screening (Hauptscreening) von ≥ 10.000 Compounds. Die Messungen erfolgen üblicherweise als Einfachbestimmung.
Hit Confirmation	Die wiederholte Messung der Hits des Primary Screens in Dreifachbestimmung. Richtige Hits sollten reproduzierbar sein.
Hit Profiling	Nähere Charakterisierung der Hits der Hit Confirmation durch Aufstellung der Konzentrations-Wirkungskurven (Dreifachbestimmung).
Follow-Up	Wiederholte Messung der Hits des Hit Profiling mit neuen/frisch gelösten Compounds.
Hit Validation	Zusammenfassung der Hit Confirmation, -Profiling und des Follow-Ups.
Orthogonal Assay/Secondary Assay	Aktivitätsassay, der auf einem anderen Mechanismus beruht. Hits sollten mit unterschiedlichen Methoden reproduzierbar sein. Als Enzymquelle wird rekombinantes Protein und/oder Homogenate, Zellen o.ä. von Säugetieren verwendet.

Tabelle 1.3 Erläuterung allgemeiner Begriffe der Wirkstoff-Entwicklung.

1.4 Einordnung der für die Dimethylarginine verantwortlichen Enzyme AGXT2 und DDAH1 in den zeitlichen Prozess der *Drug Discovery & Developments*

Um einen Wirkstoff für eine bestimmte Erkrankung entwickeln zu können, muss zunächst ein geeignetes Target identifiziert und validiert werden, das pharmakologisch manipuliert werden kann (**Abbildung 1.4**). Während bei der *Target Identification* des neuen klinisch relevanten Targets erste Zusammenhänge zwischen veränderten Gen- und Proteinexpressionen und der Erkrankung aufgezeigt werden, erfolgt in der Phase der *Target Validation* die ausführlichere Untersuchung. Hier müssen viele Daten generiert werden, die die Relevanz des Targets in der zu untersuchenden Erkrankung aufzeigen. Dazu gehören klinische Studien und Analysen zur Aufklärung molekularer Signalwege. Idealerweise wird die Eignung des Targets durch *Gain & Loss of Function Studies* mit Hilfe von biochemischen Assays, Zell- oder Tiermodellen (Kock-In/-Out, Aktivierung/Hemmung) belegt.

Darauf folgt der eigentliche Schritt in den *Drug Development/Discovery* Prozess (*Hit Identification*) durch die Etablierung eines geeigneten Assays und Durchführung von High-Throughput Screenings. Hier sollen Strukturen identifiziert werden, die mit dem Target in ausreichendem Maße interagieren. Bei der Durchführung eines HTS werden mehrere tausend *Compounds* (chemischer und natürlicher Herkunft) mit dem identifizierten Target getestet. Nur einige wenige repräsentative Strukturen werden in der anschließenden *Lead Optimization* weiter analysiert (Untersuchung der Selektivität, Effektivität, Potenz, Löslichkeit, Toxizität etc.) und durch chemische Veränderung optimiert. Nach dem Prozess der Optimierung stehen letztendlich nur noch wenige Stoffe zur Auswahl, die in den *Präklinischen- und Klinischen Studien* weiter auf ihre pharmakodynamischen und-kinetischen Eigenschaften *in-vivo* untersucht werden. Die bei einem HTS getesteten *Compounds* (ca. 10.000-200.000) werden im Laufe der Wirkstoffentwicklung auf 1-3 Kandidaten zur klinischen Testung reduziert.

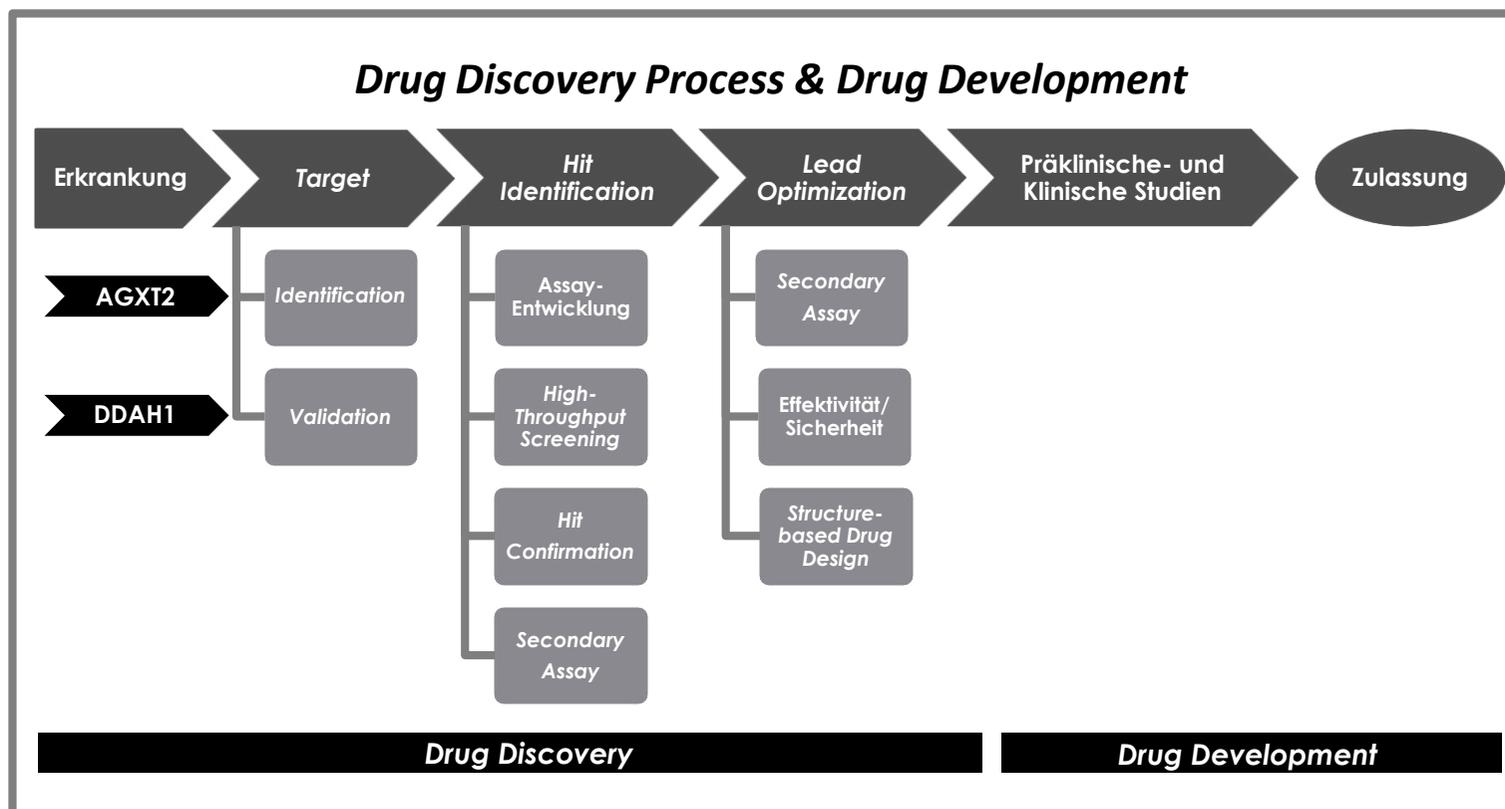


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung des Verlaufs der Wirkstoff-Entwicklung (Drug Discovery Process/Development). Einordnung der Enzyme AGXT2 (Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2) und DDAH1 (Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1) als potenzielle therapeutische Targets. Die Begriffe werden in **Tabelle 1.3** näher erläutert.

Durch die ersten klinischen Studien, die die Relevanz von SDMA mit diversen Erkrankungen aufweist und den genetischen Zusammenhang durch die GWAS befindet sich die AGXT2 noch in der Anfangsphase der *Target Identification*. In dieser Arbeit sollen weitere Daten für die *Target*-Phase von AGXT2 generiert werden. Durch die gleichzeitige Entwicklung eines geeigneten Aktivitätsassays und die spätere Durchführung eines HTS können nicht nur bereits mögliche potenzielle *Lead-Strukturen*, sondern auch biochemische Tools identifiziert werden, die für die folgende *Target Validation* eingesetzt werden können (Hemmer/Aktivatoren für *Gain & Loss of Function Studies*).

Durch die bereits jahrelang durchgeführten Untersuchungen der Assoziationen von ADMA und DDAH, befindet sich das Enzym bereits am Ende der Phase der *Target Validation*. Wie in diesem Abschnitt beschrieben, wurden zahlreiche klinische Studien und Tier-Experimente durchgeführt, die die Eignung der DDAH1 als therapeutisches Target für die Behandlung ADMA-assoziiierter Erkrankungen beweisen. In dieser Arbeit sollte die Phase der *Hit Identification* durchgeführt werden. Am Ende der Arbeit sollte eine kleine Auswahl an Strukturen identifiziert werden, die in der darauf folgenden *Lead Optimization* weiter analysiert werden sollen.

2 Methoden

2.1 SDMA und AGXT2

2.1.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die Analysen wurden HEK293¹⁵-Zellen (immortalisiert und adhärent wachsend) verwendet, die die humane AGXT2 überexprimierten. Die AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen wurden uns freundlicherweise durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Maas und Anja Kittel (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden die HEK-Zellen mit einem pcDNA 3.1-Grundvektor, der die kodierenden Sequenzen des AGXT2 Wildtyps bzw. die Variante rs37369 enthielt, stabil transfiziert. Zellen, die mit dem leeren pcDNA 3.1-Vektor transfiziert wurden, dienten in allen Experimenten als Negativkontrolle. Die Zellen wurden mit Genitacin selektiert (siehe **Punkt 2.1.1.2**). Die Überexpression der AGXT2 wurde mittels qPCR auf mRNA-Ebene als auch mit Western Blot überprüft (siehe **Punkte 2.1.3.3** und **2.1.4.2**).

2.1.1.2 Kultivierung der Zellen

Die drei verschiedenen Zelllinien (Leervektor, AGXT2 Wildtyp, AGXT2 rs37369) wurden je nach Fragestellung im 6-Wellformat oder in Zellkulturflaschen (25 cm²/75 cm²/160 cm², versehen mit Filter) (jeweils Fa. Sarstedt AG & Co.) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Es wurde DMEM¹⁶ GlutaMAXTM-I-Nährmedium (Fa. GIBCO Invitrogen; 1 g/L D-Glucose, 110 mg/L Natriumpyruvat) mit Zusatz von 10% FBS¹⁷ (Fa. GIBCO Invitrogen) und 1% Pen/Strep-Lösung (Fa. GIBCO Invitrogen; 10.000 U/ml Penicillin G mit 10.000 µg/ml Streptomycin) verwendet. Zur Selektionierung wurde dem Medium außerdem 0,8 mg/ml Genitacin (Fa. GIBCO Invitrogen; G-418) frisch hinzugegeben. Das

¹⁵ Human embryonic kidney

¹⁶ Dulbecco's Modified Eagle Medium

¹⁷ Fetal bovine serum

Wechseln des Mediums bzw. das Splitten der Zellen bei einer Konfluenz von 80%-90% erfolgte alle 2-3 Tage. Zum Splitten der Zellen wurde das alte Nährmedium vorsichtig abgesaugt und zum Entfernen von restlichem Medium mit warmen 1xPBS¹⁸ Dulbecco's Phosphat-Puffer (Fa. Merck KGaA; 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,15 g/L Na₂HPO₄, 0,2 g/L KH₂PO₄, ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Das Lösen der Zellen von der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes erfolgte mittels Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. GIBCO Invitrogen; 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA¹⁹, 100 mmol/L NaCl). Hierzu wurden ca. 50 µl/pro cm² Trypsin für ca. 1-3 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch leichtes Klopfen oder durch Schwenken der Zellkulturflaschen gelöst. Die Trypsinreaktion wurde zügig mit Nährmedium gestoppt und anschließend bei 440xg für 4 Minuten zentrifugiert. Je nach verwendetem Kulturgefäß wurde das Pellet bzw. eine bestimmte Zellzahl in frischem Nährmedium resuspendiert und auf die Zellkulturgefäße verteilt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte manuell mit einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Karl Hecht GmbH & Co. KG). Hierzu wurden ca. 10-15 µl der Zellsuspension in die Kammer gegeben. Für die Zellzahl wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops (Axiovert 25C, Fa. Carl Zeiss Microscopy) vier quadratische Felder ausgezählt. Die Berechnung wurde mittels folgender Gleichung berechnet: Zellzahl x 10⁴/4=n Zellen pro ml.

2.1.1.3 Induktion der Proteinexpression

Zur Erhöhung der Proteinexpression wurden die Zellen vor den Versuchen mit Natriumbutyrat (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) induziert. Butyrat soll durch Hemmung der Histon-Deacetylasen die Expression von rekombinantem Protein verstärken. Anfangs wurden die Zellen mit 10 mmol/L für 24 Stunden (h) inkubiert (Angaben durch unseren Kooperationspartner). Im Verlauf der Etablierung der Zelllinie im Labor wurden zur Ermittlung der idealen Butyrat-Konzentration Konzentrationsreihen von 0-10 mmol/L mit verschiedenen Induktionszeiten (8 h, 16 h, 24 h) ausgetestet. Die maximale Erhöhung der AGXT2-Proteinexpression (ermittelt mit Western Blot) wurde mit 2,5 mmol/L Butyrat und 16 h Inkubationszeit erreicht. Diese Konzentration und Inkubationszeit wurde für die Etablierung des Assays und die weiteren Analysen verwendet.

¹⁸ Phosphate buffered saline

¹⁹ Ethylenediaminetetraacetic acid

2.1.1.4 Lagerung, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die pelletierten Zellen einer 25cm²-Zellkulturflasche in 500 µl Nährmedium mit Hilfe einer 1 ml-Eppendorf-Pipette (Fa. Eppendorf AG) resuspendiert. Nach tropfenweiser Zugabe von 500 µl Einfriermedium (100 µl Nährmedium, 300 µl FBS und 100 µl DMSO²⁰ (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde die Zellsuspension in ein *CryoPure*[®] Röhrchen (Fa. Sarstedt AG & Co., 1,6 ml) überführt. Zur langsamen Herunterkühlung um 1 °C/min wurden die Kryoröhrchen für 24-48 h in Isopropanol-Behältnissen (Fa. Fisher Scientific GmbH) bei -80 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden vorerst alle Vorbereitungen getroffen, um eine schnelle Überführung der Zellen in frisches Medium zu gewährleisten. Die *CryoPure*[®] Röhrchen wurden zunächst für kurze Zeit mit den Händen angewärmt. Anschließend wurde das gefrorene Zell-Pellet mit frischem 37 °C-warmen Medium durch sehr vorsichtiges Auf- und Abpipettieren aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden stückweise in 10ml Medium überführt, um einen Verdünnungseffekt des zelltoxischen DMSO's zu erreichen. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und in Kultur genommen.

2.1.2 Immunhistologische Untersuchungen

2.1.2.1 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden die AGXT2-Zellen auf kleinen runden Kunststoff-Objektgläsern (Fa. Sarstedt AG & Co., d13mm) kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 80-90% wurden die Zellen mit 100 nmol/L *Mitotracker*[®] Red CMXRos (die Verdünnung wurde mit Nährmedium vorgenommen; Fa. Life Technologies) für 45 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zugabe des Reagenz erfolgte direkt in das Medium. Dabei diffundiert der Farbstoff passiv durch die Zell-Membranen und wird durch die Mitochondrien aufgenommen. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit 1xPBS-Puffer gewaschen. Die Fixierung der Zellen auf den Objektgläsern erfolgte durch 10-minütige Inkubation mit

²⁰ Dimethylsulfoxid

4% Formaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) bei RT, das durch Bildung von Schiff'schen Basen und Methylenbrücken zu einer Quervernetzung der Proteine führt. Der Formaldehyd wurde dann durch dreimaliges Waschen mit 1xPBS-Puffer entfernt. Um die Waschschritte zu vereinfachen, wurden die runden Objektgläser in eine 6-Wellplatte gelegt. Danach wurden die Objektgläser auf große Objektträger (Fa. Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG) überführt und mit einem Fett-Stift (Fa. Daido Sangyo Co., Ltd.) umrundet, um das Verlaufen der Antikörper-Lösungen zu vermeiden. Nach 30 Minuten Inkubation mit einer Block-Lösung (1% BSA²¹ und 10% Eselserum, jeweils Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in einer Histo-Kammer (Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG) (RT) zur Vermeidung unspezifischer Bindungen, erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen AGXT2 (0,1 mg/ml, Verdünnung von 1:200, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gerichtet und wurden für 24 h bei 4 °C mit den Zellen inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten erneut drei Waschgänge mit 1xPBS-Puffer, bevor die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper (AlexaFluor 488® F(ab')₂ Fragment of Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, 1:1000; Fa. Life Technologies) für 120 Minuten (RT) inkubiert wurden. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI²² (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Hierzu wurden die Zellen für 10 Minuten (RT) mit DAPI inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Waschen mit 1xPBS-Puffer entfernt. Im letzten Schritt wurde das Entwicklungsreagenz *PromoFluor® Antifade Reagent* (Fa. PromoCell GmbH) auf die Zellen appliziert. Die Objektgläser (mit den Zellen nach unten gerichtet) wurden auf die Objektträger gebracht und bei -20 °C gelagert. Die Analyse erfolgte mit dem konfokalen Mikroskop *TCS SP5* und der Software *Leica LAS* (Fa. Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) der Microscopy Imaging Core Facility des Campus Forschung.

2.1.2.2 Nierenschnitte

Für die Untersuchung der Lokalisation der AGXT2 in der Niere wurden humane Schnitte verwendet, die uns freundlicherweise von Prof. Schumacher aus dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt wurden. Die Durchführung der immunhistochemischen Färbung der Nierenschnitte wurde ebenfalls dem Institut für

²¹ Bovine serum albumine

²² 4',6-Diamidino-2-phenylindole

Anatomie in Auftrag gegeben. Für den AGXT2-Antikörper (Fa. Sigma-Aldrich Chemie) wurde eine Verdünnung von 1:50 verwendet. Der mit alkalischer Phosphatase-konjugierte Anti-Rabbit-Sekundärantikörper (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde 1:200 verdünnt. Zur Anfärbung der AGXT2-markierten Zellen wurde ein Farbstoff (Permanent Red-System) verwendet, der mit der alkalischen Phosphatase des Sekundär-Antikörpers interagiert.

2.1.3 RNA- und DNA-Analysen

2.1.3.1 RNA-Isolierung

Um die Expression von AGXT2 auf mRNA²³-Ebene messen zu können, musste zunächst eine RNA-Isolierung (*nach der Zweikomponenten-Methode von Chomczynski & Sacchi*) aus den AGXT2-Zellen durchgeführt werden. Hierfür wurden die Zellen im 6-Wellformat kultiviert. Die Zellen wurden mit 1x PBS-Puffer gewaschen, pro Well mit 800 µl RNAzol[®] B (Fa. WAK-Chemie Medical, Guanidinothiocyanat/Phenol-Gemisch, keine Angaben über Mengen) versetzt, durch Auf- und Abpipettieren lysiert und in 2 ml-Eppendorf-Gefäße (Fa. Eppendorf AG) überführt. Hierbei werden die Zellen durch die denaturierende Wirkung des chaotropen Salzes Guanidinothiocyanat zerstört und gleichzeitig Enzyme wie RNAsen inaktiviert. Durch das Phenol wird die zu isolierende RNA gelöst. Der Zellsuspension wurden anschließend 200 µl Chloroform (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hinzugefügt und intensiv für 30 Sekunden mit dem Vortexer (Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) gemischt. Nach Inkubation für 15 Minuten auf Eis wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 4 °C und 12.000xg zentrifugiert. Während der durch Zentrifugation erfolgenden Phasentrennung wird die RNA in die obere wässrige Phase überführt. Die DNA dagegen liegt in der weißen Interphase und die Proteine in der organischen Phase vor. Vorsichtig wurde die wässrige Phase abgenommen und in neue Eppendorf-Gefäße überführt, die 1ml Isopropanol (Fa. Merck KGaA) enthielten und bei -20 °C über Nacht gelagert. Die RNA wird dabei durch Verringerung ihrer Löslichkeit im Wasser-Alkohol-Gemisch gefällt. Am nächsten Tag wurde die präzipitierte RNA abzentrifugiert (4 °C, 30 Minuten, 12.000xg) und mit 70%igem Ethanol (Fa. Merck KGaA) gewaschen, um Salze und restliche Lösungsmittel zu entfernen. Nachdem der restliche Alkohol

²³ Messenger ribonucleic acid

verdampft war bzw. mit einem Wattestäbchen (Fa. Karl Beese Verbandstoffe GmbH & Co.) entfernt wurde, wurde das Pellet in 20 µl Wasser (für Injektionszwecke, Fa. Baxter Healthcare SA) gelöst und eine Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit Hilfe des *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH) durchgeführt. Die Isolierung wurde mit sterilen Materialien, auf Eis und unter dem Abzug durchgeführt. Die Reinheit der RNA wird anhand des OD_{24260}/OD_{280} -Quotienten bestimmt. Quotienten unter 1,8-2,0 weisen auf eine Verunreinigung mit Protein hin. Alle Proben wiesen einen OD_{260}/OD_{280} -Quotienten über 1,8 auf, so dass mit der cDNA²⁵-Synthese fortgesetzt werden konnte.

2.1.3.2 Umschreiben von RNA auf cDNA durch Reverse Transkription

Das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA durch Reverse Transkription erfolgte mit dem *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis KIT* (Fa. Fisher Thermo Scientific GmbH). In ein PCR-Gefäß (Fa. Sarstedt AG & Co.) wurden 2 µg der isolierten RNA, 1 µl Oligo-(dT)₁₈-Primer und Nuklease-freies Wasser (im Kit enthalten) in einem Volumen von 12 µl vorgelegt. Danach erfolgte die Zugabe von 8 µl eines Master-Mixes, der 2 µl *dNTP's*²⁶ (10 mol/L), 1 µl *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (200 U/µl), 1 µl *RiboLock RNase-Inhibitor* (20 U/µl) und 4 µl *4x Reaction Buffer* enthielt (keine weiteren Angaben durch den Hersteller). Der Reaktionsmix wurde vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert. Die cDNA-Synthese erfolgte für 60 Minuten bei 42 °C, dem Temperatur-Optimum der RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die Reaktion wurde durch 5-minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt. Die cDNA wurde entweder direkt für die quantitative Real-Time PCR²⁷ (qPCR) verwendet oder bei -20 °C gelagert. Alle Arbeiten wurden mit RNase-freien Materialien und auf Eis durchgeführt.

²⁴ Optische Dichte

²⁵ Complementary desoxyribonucleic acid

²⁶ Desoxyribonukleosidtriphosphat

²⁷ Polymerase chain reaction

2.1.3.3 Durchführung der qPCR

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression wurde eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Neben der Vervielfältigung der cDNA mit einer thermostabilen Polymerase erfolgt dabei eine Quantifizierung der RNA bzw. DNA in Echtzeit (*Real-Time*). Dies erfolgt in der exponentiellen Phase der Amplifikation mit Hilfe von *FRET*²⁸-Sonden. Hier wurden *TaqMan*-Primer verwendet, die am 3'-Ende ein mit Licht anregbares Fluorophor (FAM)²⁹ enthalten, das seine Energie an den am 5'-Ende befindlichen Quencher abgibt. Während der PCR hybridisiert die Sonde an die DNA, das Fluoreszenz-Signal des Fluorophors wird durch den Quencher unterdrückt. Bei der Synthese des DNA-Gegenstranges durch die *Taq*³⁰-Polymerase vergrößert sich der Abstand zwischen Quencher und FAM, so dass das Fluoreszenz-Signal nicht mehr unterdrückt werden kann. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der synthetisierten PCR-Produkte zu. Die Verwendung des *Housekeeping*-Gens GAPDH³¹ wird dabei als interne Kontrolle verwendet, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Mit Hilfe dieses Referenz-Gens kann außerdem eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Zusätzlich können passive interne Referenzen (ROX³²) verwendet werden.

Für die qPCR wurden 2 µl der 1:8-verdünnten cDNA-Proben in eine transparente 384-Well *Multiply*® PCR-Platte (Fa. Sarstedt AG & Co.) vorgelegt (auf Eis). Anschließend wurden mit Hilfe einer Multipipette 8 µl Mastermix (5 µl *Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix*, (Fa. Fisher Thermo Scientific GmbH); 0,5 µl *TaqMan*® *Gene Expression Assay* AGXT2 bzw. GAPDH, 2,5 µl Wasser; jeweils Fa. Applied Biosystems Inc.) hinzugefügt. Zur Überprüfung von Verunreinigungen wurden Negativkontrollen ohne cDNA verwendet. Die Platte wurde vor der Messung kurz zentrifugiert und mit einer Klebefolie (Fa. Sarstedt AG & Co.) versiegelt. Die qPCR wurde mit dem *ABI PRISM*® *7900HT Sequence Detection System* (Fa. Applied Biosystems Inc.) laut Herstellerhandbuch durchgeführt. Die Amplifizierung der jeweiligen Gen-Abschnitte erfolgte nach folgendem Schema (**Tabelle 2.1**):

²⁸ Förster-Resonanzenergietransfer

²⁹ 6-Carboxyfluorescein

³⁰ *Thermus aquaticus*

³¹ *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase*

³² 6-Carboxyl-X-Rhodamin

	Temperatur [°C]	Dauer	
	50	2 Minuten	
	95	10 Minuten	
Denaturierung	95	15 Sekunden	} 40 Zyklen
Annealing	60	1 Minute	

Tabelle 2.1 Zur Bestimmung der Expressionsstärke der AGXT2 in den AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen wurde eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Für die PCR wurde das dargestellte Temperatur- und Zeitschema verwendet.

Während zu Beginn jedes Zyklus die DNA bei 95 °C denaturiert und in ihre Einzelstränge getrennt wird, erfolgt in der zweiten Phase die Hybridisierung der FRET-Primer an die DNA und die Synthese des Gegenstranges durch die DNA-abhängige Taq-Polymerase. Jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung und wurde mit der SDS 2.4 Software (Fa. Applied Biosystems) ausgewertet. Die Berechnung der relativen AGXT2-Expression zu GAPDH erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Zur Überprüfung der Organ-spezifischen Expression der humanen AGXT2 wurden *Multiple Tissue cDNA Panels*[®] (Fa. Clontech Laboratories) verwendet, die auf unterschiedliche *Housekeeping*-Gene normalisiert sind. Als Positivkontrolle wurde ein ca. 1 kb³³-Fragment des GAPDH-Gens verwendet. Die Negativkontrolle enthielt die GAPDH-Primer und Wasser anstelle von cDNA. Für die Vervielfältigung der *Multiple Tissue cDNA Panels*[®] wurden die gleichen *TaqMan*[®] Gene Expression Assays von AGXT2 und GAPDH verwendet, wie für die Bestimmung der relativen Expression.

³³ Kilobase

2.1.3.4 Agarose-Gel

Um das Organ-spezifische AGXT2-Expressionsmuster in humanem Gewebe gut visuell vergleichen zu können, wurde ein Agarose-Gel mit jeweils 5 µl der mittels qPCR amplifizierten cDNA der *Multiple Tissue cDNA Panels*[®] hergestellt. Hierfür wurde 1,2% Agarose-Gel (Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG) mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 1xTAE³⁴-Puffer (40 mmol/L Tris-Acetat, 1 mmol/L EDTA, jeweils Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hergestellt und die cDNA in den mit TAE-Puffer befüllten *Wide Mini-SUB*[®] *Cell GF* Gel-Kammern (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Anlegung einer Gleichspannung von 5-10 Volt (V) pro cm Gel-Länge wandern die DNA-Fragmente auf Grund der negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Geschwindigkeit und Wegstrecke zwischen den unterschiedlichen DNA-Fragmenten wird durch deren Molekülgröße und Konformation beeinflusst. Als Molekulargewichtsmarker wurde der *Gene Ruler DNA Ladder Mix*[®] (Fa. Fisher Thermo Scientific GmbH) verwendet. Durch das Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird, konnten die Banden mit dem *ChemGenius*² *Bioimaging System* und der Software *GeneSnap 7.12* sichtbar gemacht und detektiert werden (Fa. SynGene).

2.1.4 Proteinanalytik

2.1.4.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach *Bradford*. Zunächst wurde eine BSA-Standardreihe (2 mg/ml in 0,9% NaCl und 0,05% Natriumazid; Fa. Fisher Thermo Scientific GmbH) von 0µg/µl-5µg/µl Endkonzentration hergestellt. Die Protein-Proben wurden mit 1xPBS-Puffer im Verhältnis 1:3-1:30 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der Standardreihe bzw. der Proben in Doppelbestimmung in eine transparente 96-Wellplatte (Fa. Greiner BIO ONE GmbH) pipettiert. Das *Bradford*[®]-Reagenz (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) besteht aus dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 und zeigt in seiner kationischen Form ein Absorptionsmaximum von 470 nm. Durch die Interaktion mit

³⁴ Tris-Acetat-EDTA

Proteinen wird der zunächst rote Farbstoff in seine anionische Form überführt. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm. Von dem Reagenz wurde mit 1xPBS-Puffer eine frische 1:4-Verdünnung hergestellt. Davon wurden 200 µl zu den Proben gegeben und mit Hilfe einer Pipettenspitze gut vermischt, so dass eine homogene Farbe entsteht. Die photometrische Endpunktbestimmung bei 595 nm erfolgte nach 5-minütiger Inkubation mit dem *Tecan Safire II-Basic*[®] (Fa. Tecan). Für die Auswertung wurde mit Hilfe der Standardreihe eine Geradengleichung ($y=mx+b$) ermittelt, mit der die Proteinkonzentration unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren berechnet werden konnte.

2.1.4.2 Western Blot

2.1.4.2.1 Probenvorbereitung

Neben den unter **Punkt 2.1.4.3.1** verwendeten Protein-Proben wurden für den in **Abbildung 3.6** und **Abbildung 3.7** dargestellten Western Blot die AGXT2-Überexprimierenden Zellen im 6-Wellformat kultiviert und nach den Angaben unseres Kooperationspartners für 24 h bei 10 mmol/L Natriumbutyrat induziert. Für die Probenvorbereitung wurden pro Well jeweils 100 µl Lysis-Puffer (40% SDS³⁵ in 1xPBS-Puffer inkl. Protease-Hemmer; beides Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hinzugegeben und mit einem Zellschaber (Fa. Sarstedt AG & Co.) von der Oberfläche geschabt. Die Protein-Lösung wurde in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und auf Eis gestellt. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurden Insulinspritzen mit Sterican-Kanülen[®] (Gr. 20-G 27 x 3/4" / Ø 0,40 x 20 mm-grau; Fa. Braun Melsungen AG) verwendet. Die Lösung wurde dabei mehrfach durch die Kanüle gezogen, um die restlichen Zellen durch die einwirkenden Scherkräfte zu zerstören. Anschließend wurde die Protein-Lösung bei 13.000xg (4 °C) für 10 Minuten zentrifugiert und eine Protein-Konzentrationsbestimmung nach *Bradford* durchgeführt.

³⁵ Sodium dodecyl sulfate

Für den Western Blot wurden die auf Eis aufgetauten Proben (jeweils 20-30µg Protein) zusammen mit 1-2 µl Load-Mix (50% Glycerol, Fa.Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 50% wässrige Bromphenolblau-Lösung, Fa. Merck KGaA) zur erleichterten Beladung des Gels und 6-8 µl Proben-Puffer (10% Glycerol, 3% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, Fa. Merck KGaA; 0,5 mol/L Tris (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, pH 6,8) mit einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Einzelbestimmung für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Durch die Zugabe des anionischen Detergenz SDS erhalten die Proteine negative Ladungen, so dass die spätere Auftrennung im Gel ausschließlich über das Molekulargewicht erfolgt. β-Mercaptoethanol wurde zur Reduzierung der Disulfid-Brücken hinzugefügt.

2.1.4.2.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung der einzelnen reduzierten und denaturierten Proteine der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE³⁶. Das Sammel- und Trenngel unter dem Abzug hergestellt. Für das 10%ige Trenngel wurden ein Glycerol-Wasser-Gemisch (50%) mit 40% Bis-/Acrylamid (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) und 4xUpper Tris-Lösung (0,4% SDS und 0,5 mol/L Tris³⁷, pH 6,8) unter Rühren auf dem Magnetrührer (Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) vermischt. Die Zugabe von TEMED³⁸ (Fa Merck KGaA) und APS³⁹ (Fa. SERVA Electrophoresis GmbH) initiiert die Quervernetzung von Bisacrylamid und Acrylamid. Die polymerisierende Lösung wurde danach mit Hilfe einer 1ml-Pipette direkt in die Gel-Glaskammer (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) gegeben und mit destilliertem Wasser bedeckt, um eine gerade Linie des Gels zu erzielen, damit der Startpunkt für die Auftrennung der Proteine im gesamten Gel gleich ist. Nach Polymerisation wurde das Sammelgel (4%) – bestehend aus Wasser, 40% Acrylamid und 4xLower Tris-Lösung (0,4% SDS und 1,5 mol/L Tris, pH 8,8) – über das Trenngel geschichtet und mit einem Taschen-Kamm versehen.

³⁶ Polyacrylamid-Gelelektrophorese

³⁷ Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

³⁸ N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin

³⁹ Ammoniumpersulfat

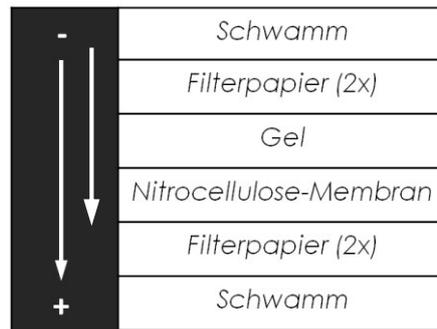
Nach Fertigung der Gele wurden diese in die mit Lauf-Puffer (0,1% SDS und 25 mmol/L Tris, 0,2 mol/L Glycin, pH 8,3; Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG) gefüllte Elektrophorese-Kammer (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) eingesetzt. Die Kämme wurden entfernt und die Taschen mit Hilfe einer 1 ml-Pipette mit Lauf-Puffer gut durchspült. Mit einer Hamilton-Pipette® (Fa. Hamilton Bonaduz AG, 50 µl) wurden 10 µl des *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladders* (Fa. Fisher Thermo Scientific GmbH) sowie die 20 µl der Protein-Proben in die Taschen gegeben. Die Elektrophorese lief in den ersten 15-30 Minuten bei 70 V bis die Proben das Sammelgel verlassen hatten. Die Auftrennung erfolgte dann bei 150 V in einem Zeitraum von ca. 1,5 h.

2.1.4.2.3 Blotten

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel, die hier verwendete Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) sowie Filterpapier (beides Fa. Ge Healthcare Europe GmbH) und Schwämme der Apparatur in Transfer-Puffer (20% Methanol, das die Bindung der Proteine an die Membran unterstützt und das Aufquellen des Gels verhindert; Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG; 25 mmol/L Tris, 0,2 mol/L Glycin) für ca. 5 Minuten äquilibriert. Für den Transfer wurde die Membran, die Schwämme und Filterpapiere wie in **Tabelle 2.2** beschrieben, übereinander gelegt. Dabei war sicherzustellen, dass keine Luftbläschen zwischen Gel und Nitrocellulosemembran vorhanden waren, um einen vollständigen Transfer zu gewährleisten. Das „Sandwich“ wurde zusammen mit einem Kühl-Akku in die mit dem Puffer befüllte Transfer-Apparatur gesetzt. Auf dem Weg durch das elektrische Feld wurden die negativ geladenen Proteine auf die Membran transferiert. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 100 V.

Der Erfolg des Transfers wurde mittels Ponceau-Rot-Färbung (0,2% in 5% Essigsäure, jeweils Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) überprüft. Hierzu wurde der Blot für 10 Minuten in der Lösung geschwenkt und anschließend mehrmals mit deionisiertem Wasser gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren. Die Membran wurde dann mit einem scharfen Messer (Fa. Bayha GmbH) zurechtgeschnitten und die Ponceau-Färbung wieder durch Schwenken in TBST⁴⁰-Lösung (20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl, Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG; 0,1% Tween-20®, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 5 Minuten entfernt.

⁴⁰ *Tris buffered saline (inkl. Tween-20)*

**Tabelle 2.2**

Western Blot: Die für den Transfer verwendeten Schwämme und Membranen wurden in dargestellter Reihenfolge übereinander gelegt.

2.1.4.2.4 Blocken

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran und somit ein Hintergrund-Rauschen zu vermeiden, wurde der Blot in Block-Lösung (3% fettfreies Milchpulver, Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG; 1% BSA in TBST-Puffer) für 30 Minuten bei RT unter ständigem Schwenken inkubiert. Durch unspezifische Absorption der Antikörper an Agglomerate des Milchpulvers können auf dem Blot störende schwarze Punkte entstehen. Um dies zu verhindern, wurde die Lösung vor dem Blocken filtriert.

2.1.4.2.5 Inkubation mit Antikörpern

Das Immunblotting wurde entweder bei 4 °C über Nacht oder für 1 h bei RT unter ständigem Schwenken durchgeführt. Dabei wurden die Blots in den jeweiligen Primärantikörper-Lösungen inkubiert. Die Primärantikörper wurden, wie **Tabelle 2.3** beschrieben, in Block-Lösung verdünnt.

Antikörper	Verdünnung	Größe	Wirt, Klonalität	Firma	Artikel- nummer
AGXT2	1:500	52 kDa	Rabbit, polyklonal	Sigma Aldrich	HPA037382-100µl (0,1 mg/ml)
GAPDH (FL-335)	1:1000	37 kDa	Rabbit, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology	Sc-25778 (200 µg/ml)
COX IV (Isoform 1)	1:250	16 kDa	Rabbit, polyklonal	Antibodies- online.com	ABIN730967 (40 µg)

Tabelle 2.3 Die bei den Western Blots verwendeten Primärantikörper. GAPDH diente dabei als interne Ladungskontrolle, COX IV⁴¹ als Mitochondrien-Marker.

Vor der Inkubation mit einem HRP⁴²-konjugiertem Sekundärantikörper wurden die Blots 3x5 Minuten in TBST-Lösung gewaschen, um überschüssige Primärantikörper von der Membran zu entfernen. Die Inkubation erfolgte mit einem Anti-Rabbit-Antikörper (Anti-Rabbit IgG, 1:2000-Verdünnung; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 1 h bei RT unter ständigem Schwenken. Bevor die Proteinbanden detektiert wurden, wurde der Blot 2x10 Minuten in TBST- und 1x10 Minuten in TBS-Lösung gewaschen.

2.1.4.2.6 Detektion

Zur Detektion der Proteinbanden wurde das *Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) oder *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate[®]* (Fa. Fisher Thermo Scientific GmbH) für die Mitochondrien-Fraktionen verwendet. Die Blots wurden mit der nach Herstellerangaben vorbereiteten Lösung benetzt und für 3 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Dabei oxidiert die am Sekundärantikörper fixierte Meerrettich-Peroxidase das Luminol aus der Lösung. Danach wurden die Blots von überschüssiger Luminol-Lösung befreit, luftblasenfrei in Klarsichtfolie gelegt und mit Hilfe des *ChemiGenius² Bioimaging System* analysiert. Die Belichtungszeit betrug 1-10 Minuten. Die bei der Reaktion freigesetzte Chemielumineszenz macht dabei die Protein-Banden sichtbar, die dann detektiert und mit der freien Software *Quantity One[®]* (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, Basissoftware) quantifiziert wurden.

⁴¹ Cytochrome C oxidase

⁴² Horseradish peroxidase

2.1.4.3 Etablierung des AGXT2-Aktivitätsassays

2.1.4.3.1 Verwendete Proteine

Für die Etablierung des AGXT2-Aktivitätsassays wurde humanes rekombinantes AGXT2-Protein verwendet. Für die weiteren Analysen wurde zunächst mit Fraktionen der AGXT2-überexprimierenden Zellen, im späteren Verlauf die gesamten Zell-Lysate genutzt.

2.1.4.3.1.1 Humane Rekombinante AGXT2

Das humane rekombinante AGXT2-Protein wurde uns freundlicherweise durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Fischer mit seinen Mitarbeitern Dr. Gräwert und Abdulrahman Alburni (Lebensmittelchemie der Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Expression erfolgte dabei in ArcticExpress (DE3)-Zellen. Da die Aufreinigung zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt werden konnte, wurde das Rohextrakt für die Etablierung des AGXT2-Assays verwendet.

2.1.4.3.1.2 Zellfraktionierung

Mit Hilfe der Isolierung der Mitochondrien aus den HEK-Zellen sollte eine Anreicherung von AGXT2-Protein erreicht werden, um die Aktivität des Enzyms (inklusive der Variante rs37369) mit SDMA als Substrat zu messen. Hierzu wurden die AGXT2-Zellen in 160 cm²-Flaschen bis 90% Konfluenz kultiviert und für 16 h mit 2,5 mmol/L Natriumbutyrat induziert. Die Fraktionierung wurde mit dem *Mitochondria Fractionation Kit* (Fa. Active Motif®) durchgeführt. Für die Fraktionierung (die Durchführung wurde im Verlauf der Arbeit abgewandelt) wurden die Zellen anschließend mit warmen 1xPBS-Puffer gewaschen, mit 3ml Trypsin-Lösung gelöst und 5 Minuten bei 600xg zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde anschließend mit 10 ml kaltem 1xPBS-Puffer resuspendiert und gewaschen. Das nach Zentrifugation erhaltene Zell-Pellet wurde anschließend mit 500 µl gekühltem hypotonem *Cytosolic Buffer* (keine Angaben über die Zusammensetzung) resuspendiert und zum Quellen für 15 Minuten

auf Eis inkubiert. Die unter dem Lichtmikroskop sichtbar aufgeblähten Zellen wurden in 2 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und mit Hilfe des Polytrons (Fa. KINEMATICA GmbH) lysiert. Dies erfolgte auf Stufe 2 für ca. 10 Sekunden (bzw. durch eine 10-malige Auf- und Abbewegung). Während der Zell-Lyse wurde das Eppendorf-Gefäß in ein mit Eis gefülltes kleines Becherglas gehalten, um eine Erwärmung der Protein-Lösung zu verhindern. Der Erfolg der Zell-Lyse wurde mit dem Lichtmikroskop überprüft. Um grobe Zelltrümmer und die Zellkerne von den Mitochondrien zu trennen, wurde das Zell-Lysat für 30 Minuten bei 800xg zentrifugiert (4 °C). Dieser Schritt (Lyse und Zentrifugation des Pellets) wurde ein zweites Mal wiederholt, um die Ausbeute an Mitochondrien zu maximieren. Danach wurde das Pellet (Nukleusfraktion) nochmals mit 500 µl *Cytosolic Buffer* gewaschen, um dieses von allen Bestandteilen der Mitochondrien- und Zytosolfraction zu reinigen. Das Pellet wurde am Ende in Abhängigkeit von der Ausbeute in 60-100 µl *Cytosolic Buffer* resuspendiert. Die vereinten Überstände, die die Mitochondrien enthielten wurden ebenfalls ein zweites Mal für 10 Minuten zentrifugiert, um restliche Zelltrümmer zu entfernen. Der in frische Eppendorf-Gefäße überführte Überstand (insgesamt 1000 µl) wurde dann für 30 Minuten bei 10.000xg (4 °C) zentrifugiert, um die Mitochondrien-Fraktion zu erhalten. Das Pellet wurde nochmals mit 100 µl *Cytosol Buffer* gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde letztendlich in 40-70 µl *Mitochondrial Buffer* (keine Angaben) resuspendiert und nach Herstellerangaben für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Da die Aktivität des Enzyms durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen stark reduziert wurde, wurden die Nukleus- und Mitochondrien-Fractionen nach der Bestimmung der Protein-Konzentration in 5 µl-Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert. Für eine gleichbleibende Aktivität der Proteinlösung wurden die Aliquots nicht wieder eingefroren.

2.1.4.3.1.3 Zell-Lysate

Im späteren Teil der Arbeit wurde der Aktivitätsassay schließlich mit ganzem Zell-Lysat durchgeführt. Die Herstellung wurde mit Hilfe der im *Mitochondrial Fractionation Kit* vorhandenen Puffer durchgeführt. Die Gewinnung und das Waschen der Zellen wurde wie unter **Punkt 2.1.4.3.1.2** beschrieben durchgeführt. Das gewaschene Zell-Pellet wurde nun in 300 µl *Cytosolic Buffer* resuspendiert, in 2ml-Eppendorf-Gefäße überführt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lysierung der Zellen erfolgte

ebenfalls mit dem Polytron 20x mit Stufe 2. Das Zell-Lysat wurde anschließend wie bei der Fraktionierung für 30 Minuten bei 10.000xg zentrifugiert (4 °C). Der Überstand, der lediglich die zytosolischen Bestandteile, sehr kleine Proteine und niedermolekulare Substanzen enthielt, wurde verworfen. Das Pellet wurde in 70 µl *Mitochondrial Buffer* resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.1.4.3.2 Durchführung der Enzymmessung

2.1.4.3.2.1 Ablauf

Die Durchführung des Aktivitätsassays lief nach in **Abbildung 2.1** dargestelltem ablaufendem Schema ab. Zuerst wurde der Reaktionsmix, bestehend aus Enzym, Co-Faktor, Substraten und Puffer in einem Eppendorf-Gefäß auf Eis vermengt und anschließend auf einem Heizblock bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Inaktivierung wurden von diesem Reaktionsmix je 10 µl in eine transparente 384-Wellplatte (Fa. Corning Optical Communications GmbH & Co. KG) überführt. Nach Zugabe des Detektionsreagenz, bestehend aus einer NADH⁴³/LDH⁴⁴-Lösung (jeweils Fa. Roche Diagnostic), erfolgte eine kinetische Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 340 nm mit dem *Tecan Safire II-Basic*[®] (number of reads 1x alle 2 ms).

⁴³ Nicotinamidadenindinukleotid

⁴⁴ Lactat-Dehydrogenase

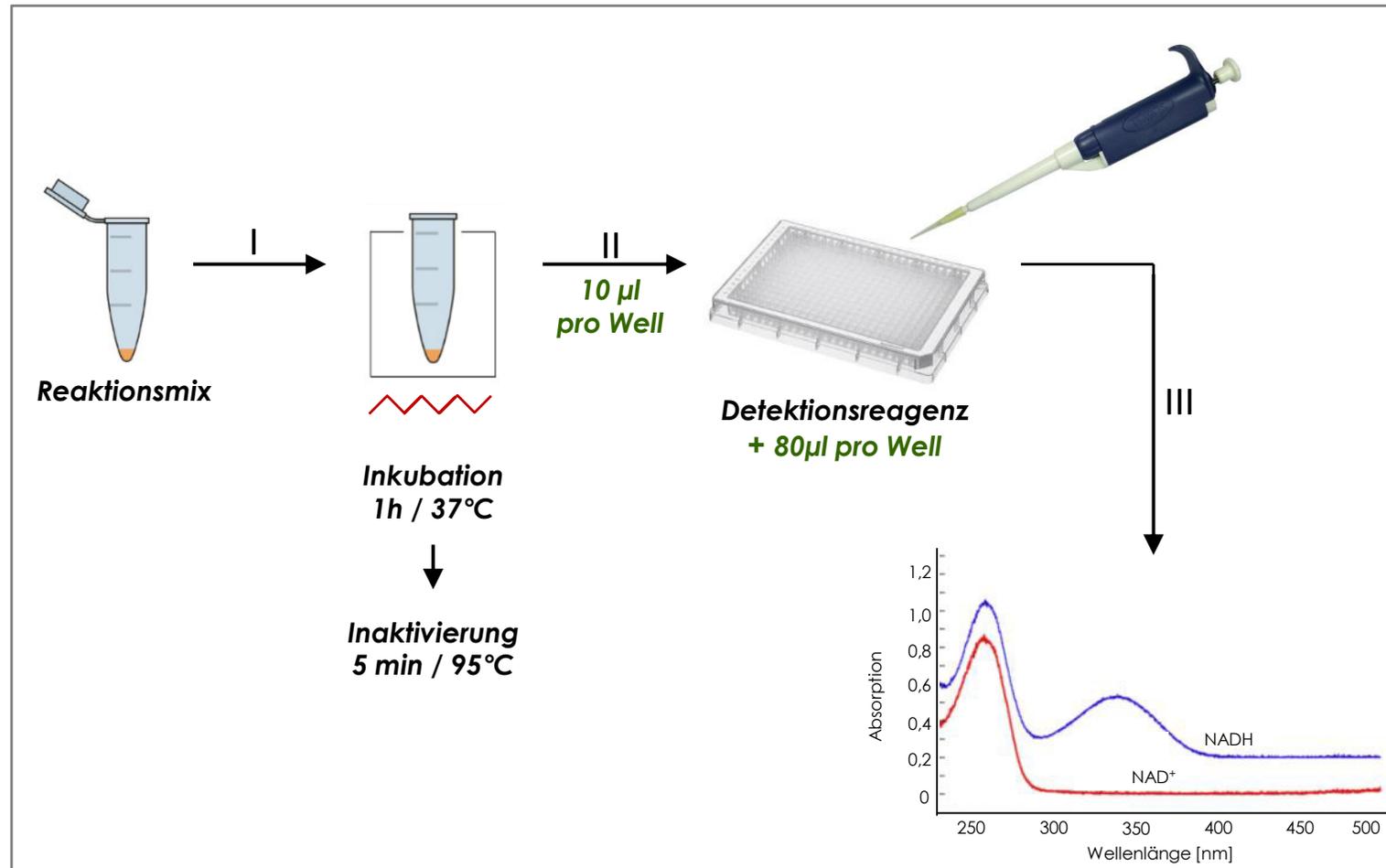


Abbildung 2.1 Durchführung des AGXT2-Aktivitätsassays: Die für die Reaktion verwendeten Lösungen wurden in einem Eppendorf-Gefäß zusammengefügt und bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitze-Inaktivierung des Enzyms. Zu 10 µl des Reaktionsansatzes wurden 80 µl des Detektionsreagenzes (dieser enthielt das Hilfsenzym Laktat-Dehydrogenase und NADH) hinzugefügt. Bestimmung der Aktivität durch Messung der Absorption des in der Indikatorreaktion umgesetzten NADH.

2.1.4.3.2.2 Schritt 1 | Probenvorbereitung und Reaktionsstart

Die Probenvorbereitung für den Aktivitätsassay erfolgte auf Eis, um einen vorzeitigen Start der Reaktion zu vermeiden. Die wässrigen Stammlösungen wurden dabei bei -20 °C gelagert, um ein Degradieren der Substanzen über einen längeren Zeitraum zu verhindern. Mit Ausnahme des Proteins wurden bei der Probenvorbereitung alle Substanzen zusammengefügt, mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt und kurz zentrifugiert. Zum Start der Reaktion wurde die entsprechende Menge des Proteins dem Ansatz zügig hinzugefügt. Um das Protein gut darin zu verteilen, wurde die Spitze des Eppendorf-Gefäßes vorsichtig mehrfach mit dem Finger „angetippt“ und direkt in den Heizblock (Fa. Eppendorf AG) gesetzt. Da das Protein nicht gleichzeitig zu allen Proben hinzugegeben werden konnte, wurden diese hintereinander gestartet und in den Heizblock gesteckt. Um gleiche Inkubationszeitspannen zwischen den Proben zu gewährleisten, wurde für das Starten/Stoppen eine Stoppuhr verwendet. Die Proben wurden alle 30 Sekunden gestartet und dementsprechend jeweils 30 Sekunden später gestoppt. Die Proben wurden unter Schütteln (ca. 400 rpm) für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Kapitel-Nummer	Versuch	Protein	Co-Faktor	Donor	Akzeptor	Puffer	
1.3.2.1	120 µl-Assayformat	0,7 µg/µl rhAGXT2	0,05 mmol/L	2 mmol/L L-Alanin	0,45 mmol/L Glyoxylat	1xPBS- Puffer	Etablierung des AGXT2 – Assays & L-Alanin SDMA – Substrat der AGXT2 Aktivität AGXT2 rs37369
1.3.2.2	Reduktion auf 30 µl-Assayformat		0,35 mmol/L	10 mmol/L L-Alanin	2,5 mmol/L Glyoxylat		
1.3.2.3.1	Glyoxylat- Konzentrationsreihe	0,1 mmol/L	0-10 mmol/L Glyoxylat				
1.3.2.3.2.1	L-Alanin Mitochondrienfraktion	0,3 µg/µl Mitochondrien- fraktion	0,05 mmol/L	0-200 mmol/L L-Alanin	10 mmol/L Glyoxylat	50 mmol/L HEPES- Puffer	
1.3.2.3.2.2	K _m L-Alanin (1)						
1.3.2.3.2.3	K _m L-Alanin (2)						
1.4.2	SDMA-Nukleusfraktion	1,7 µg/µl Nukleusfraktion	0,05 mmol/L	20 mmol/L SDMA bzw. ADMA	0,5 mmol/L Pyruvat	50 mmol/L HEPES- Puffer	
1.4.3	SDMA vs. ADMA				0,5 mmol/L Glyoxylat		
1.5.1	Mutante rs37369 (1)	1,7 µg/µl Zell-Lysat	0,05 mmol/L	60 mmol/L L-Alanin	10 mmol/L Glyoxylat	50 mmol/L HEPES- Puffer	
1.5.2	Mutante rs37369 (2)	0,3 µg/µl Zell-Lysat					

⁴⁵ HEPES

Tabelle 2.4 Dargestellt sind die verwendeten Konzentrationen der Protein- und Substratlösungen während der Etablierung des AGXT2-Assays sowie der Analyse der AGXT2-Variante und SDMA als Substrat.

⁴⁵ 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Der Assay wurde mit einem Reaktionsmix-Volumen von 120 µl gestartet und zu Beginn der Arbeit auf 30µl reduziert. Während der Etablierung des Assays wurden die Konzentrationen der Substrate optimiert. Je nach Fragestellung und Substrat wurden unterschiedliche Proteinquellen verwendet. Die verwendeten Konzentrationen (Endkonzentration im Reaktionsansatz) und Proteinressourcen der einzelnen Schritte dieser Arbeit sind in **Tabelle 2.4** zusammengefasst. Die endgültigen Assay-Bedingungen als Grundlage zur Weiterentwicklung eines HTS-geeigneten Screenings sind in **Tabelle 2.5** dargestellt.

Reagenz	Konzentration
Zell-Lysat*	
L-Alanin	10 µg
SDMA	50 µg
Co-Faktor PLP	50 µmol/L
Substrat	
L-Alanin	60 mmol/L
SDMA bzw. ADMA	20 mmol/L
Amino-Akzeptor	
Glyoxylat (L-Alanin)	10 mmol/L
Glyoxylat (SDMA)	0,5 mmol/L
Pyruvat (SDMA)	0,5 mmol/L
HEPES-Puffer, pH 8.0	50 mmol/L
Gesamtvolumen	30 µl
Tris-Puffer, pH 8,0	2,5 mol/L

* Eingesetzte µg muss der Aktivität angepasst werden in Abhängigkeit von der Stärke der Überexpression

Tabelle 2.5 Entgültige Assay-Bedingungen des AGXT2-Aktivitätsassays. In der Tabelle sind die Konzentrationen der verwendeten Lösungen am Ende der Assay-Etablierung dargestellt.

2.1.4.3.2.3 Schritt II | Stoppen der Reaktion und Überführung in die 384-Wellplatte

Nach einstündiger Inkubation wurden die Proben nacheinander bei 95 °C für 5 Minuten unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde dabei durch Denaturierung des Enzyms gestoppt. Bei der Reaktion von L-Alanin mit Glyoxylat (jeweils Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) entsteht Pyruvat und Glycin. Da bei dieser Reaktion zwei Substrate der LDH nebeneinander vorlagen, wurde nach der Reaktion das überschüssige Glyoxylat entfernt. Hierzu wurden 5 µl Tris-Lösung (2,5 mol/L, pH 8,0) zum Ansatz hinzugefügt. Tris komplexiert dabei Glyoxylat, so dass nur noch Pyruvat im Reaktionsansatz vorliegt und von der LDH verbraucht wird. Da bei der Reaktion von SDMA (Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc.) nur eines der beiden Amino-Akzeptoren im Reaktionsansatz vorliegt, war hier keine Komplexbildung mit Tris-Lösung nötig. Stattdessen wurden dem Ansatz 5 µl deionisiertes Wasser hinzugefügt, um die gleichen Bedingungen wie mit L-Alanin beizubehalten. Die Eppendorf-Gefäße wurden anschließend bei 4 °C für 1 Minute bei 13.000xg zentrifugiert. Je nach verwendeter Proteinquelle waren gröbere Zell-Agglomerate oder Partikel im Ansatz enthalten, die die photometrische Messung hätten stören können. Diese wurden durch den Zentrifugationsschritt beseitigt. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen. Je 10 µl wurden vom Reaktionsvolumen in eine transparente 384-Wellplatte überführt.

2.1.4.3.2.4 Schritt III | Detektion

2.1.4.3.2.4.1 Vorbereitung der Reagenzien

Während der Inkubation der Proben wurden die Reagenzien für die Detektionsreaktion vorbereitet. Um eine gleichbleibende Aktivität zu gewährleisten, wurden diese Lösungen für die an einem Tag durchgeführten Assays frisch hergestellt. Im Assay-Format mit 120 µl Reaktionsvolumen wurden 60 µl der Reaktionslösung und 30 µl der LDH/NADH-Lösung verwendet, während bei dem späteren 30 µl-Format 10 µl Probe und 80 µl LDH/NADH-Lösung verwendet wurden. Durch die Verwendung des größeren Volumens von NADH/LDH im 30 µl-Format war die Handhabung (v.a. das Vermischen) einfacher. Während die Proben gestoppt und zentrifugiert wurden, wurde die entsprechende Menge der LDH- (in 3,2 mol/L

Ammoniumsulfat, Fa. Merck KGaA) und NADH-Lösung (in 95 mmol/L Natriumhydrogencarbonat, pH 8,7; Fa. Merck KGaA) zubereitet und auf Eis gelagert. Vor Start der Reaktion wurden die Einstellungen am *Tecan Safire II-Basic*[®] zur kinetischen Messung eingestellt. Zum Starten der Reaktion wurden nun 30 µl bzw. 80 µl zu den Proben gegeben. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen. Durch zweimaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde das Gemisch vermengt. Die Zugabe der LDH/NADH-Lösung und das Vermischen musste zügig durchgeführt werden, da die Reaktion bereits gestartet hatte. Die für die jeweiligen Formate und Substrate verwendeten LDH/NADH-Konzentrationen sind in **Tabelle 2.6** wiedergegeben.

	LDH	NADH
120 µl-Format L-Alanin und Glyoxylat	0,2 U/ml	0,6 mol/L
30 µl-Format L-Alanin und Glyoxylat	0,2 U/ml	0,2 mmol/L
30 µl-Format SDMA und Pyruvat	0,04 U/ml	
30 µl-Format SDMA und Glyoxylat	1,0 U/ml	

Tabelle 2.6 Die bei der Assay-Etablierung verwendeten Konzentrationen der Detektionsreagenzien LDH (Laktat-Dehydrogenase) und NADH in Abhängigkeit des Assay-Formats (Gesamtvolumen) und der verwendeten Substrate.

2.1.4.3.2.4.2 Spektroskopische Messung und Auswertung

Die Absorptionsmessung wurde bei 340 nm bei einer Temperatur von 25 °C ± 1 °C durchgeführt. Direkt nach Zugabe des Detektionsreagenz wurde die Platte in den Plate-Reader gegeben und die Absorption alle 2 Minuten (für insgesamt 10-20 Minuten) gemessen. Für die Messung wurde die Software *Magellan 5.03* (Fa. Tecan) und die weitere Auswertung *GraphPad Prism*[®] 5.02 (Fa. GraphPad Software, Inc.) verwendet.

Zur Auswertung wurden die Absorptionen (dimensionslos) gegen die Zeit (in Minuten) aufgetragen. Zur Bewertung des NADH-Umsatzes der LDH bzw. der Pyruvat-Produktion durch AGXT2 wurden aus den Geraden die Steigungen (1/min) ermittelt und miteinander verglichen. Zur Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante K_m wurden die Werte auf den Zeitpunkt 0 basiert und eine Nicht-lineare Regression durchgeführt (Funktion *Michaelis-Menten Equation*), bei der die ermittelten Steigungen gegen die Substrat-Konzentrationen (mol/L) aufgetragen und gleichzeitig die K_m bzw. V_{max} ⁴⁶ ermittelt wurden.

Zur Berechnung der Spezifischen AGXT2-Aktivität wurden neben den Proben Konzentrationsreihen von Glyoxylat bzw. Pyruvat vermessen. Auch für die Eichgeraden wurden zunächst die Steigungen ermittelt und gegen die Konzentration ($\mu\text{mol/L}$) aufgetragen, um eine Geradengleichung ($y=mx+b$) zu erhalten. Mit Hilfe der Geradengleichung und den Steigungen der Proben konnten die jeweiligen Pyruvat/Glyoxylat-Konzentrationen ermittelt werden.

Im Fall von SDMA bzw. ADMA wurde die überschüssige Pyruvat/Glyoxylat-Konzentration im Ansatz ermittelt. Um die verbrauchte Menge zu erhalten, wurde die Differenz zur pcDNA-Kontrolle berechnet. Bei der Berechnung der Spezifischen Aktivität mit L-Alanin wurde ebenfalls die Differenz zur pcDNA-Kontrolle genommen, um endogenes – nicht durch die AGXT2 produziertes Pyruvat abzuziehen. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren konnte dann die Aktivität ($\mu\text{mol/min}=\text{Unit}$) bzw. unter Einbeziehung der verwendeten Proteinmenge die Spezifische Aktivität (Unit/mg) berechnet werden.

Während für den Vergleich zweier Gruppen ein ungepaarter zweiseitiger *t-Test* mit einem Konfidenzintervall von 95% verwendet wurde, wurde für den Vergleich mehrerer Gruppen der *1way-ANOVA-Test* (95% Konfidenzintervall) angewandt. Um alle Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde der *Bonferroni's Post Test*, bei Vergleich der Gruppen mit der Kontrolle der *Dunnnett's Post Test* verwendet. Bei den in dieser Arbeit dargestellten Geraden wurde eine Lineare Regression zur Beurteilung der Anpassungsgüte (R^2) durchgeführt.

⁴⁶ Maximale Geschwindigkeit (Velocity)

Für die Bestimmung der Expressionsstärke der AGXT2-überexprimierenden Zellen wurde die n-fache Expression mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt. Die Differenz der C_t -Werte von AGXT2 zu GAPDH wurde dabei von der Differenz der C_t -Kontrollwerte (pcDNA) abgezogen (**Tabelle 2.7**).

Verwendete Formeln
$n - \text{fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$
$n - \text{fache Expression (AGXT2 zu pcDNA)} =$ $[(Ct \text{ AGXT2} / \text{AGXT2}) - (Ct \text{ AGXT2} / \text{GAPDH})]$ $- [(Ct \text{ pcDNA} / \text{GAPDH}) - (Ct \text{ pcDNA} / \text{GAPDH})]$

Tabelle 2.7 Formel der $\Delta\Delta C_t$ -Methode zur Bestimmung der n-fachen Expression von AGXT2 in den AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen mittels Real-Time PCR.

2.2 ADMA und DDAH1

2.2.1 Institut für Lebensmittelchemie | Universität Hamburg

2.2.1.1 Humane rekombinante DDAH1 (rhDDAH1)

Die humane rekombinante DDAH1 wurde im Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg in Zusammenarbeit mit Prof. Fischer, Sonja Sarge und Alexandra Schädling hergestellt. Das DDAH1-Gen enthaltende Expressionsplasmid *pReceiver-B13* (Fa. Genecopoeia™2011) wurde dabei in *E.Coli*-Zellen des Typs ArcticExpress(DE3) transformiert. Das Plasmid enthielt einen T7-Promoter zur Induktion der Proteinexpression und ein His⁴⁷₆-SUMO⁴⁸ tag (N-terminal) für eine bessere Löslichkeit und Aufreinigung des rekombinanten Proteins. Die Selektion erfolgte mit Ampicillin (170 mg/L). Die Wirtszellen wurden in LB⁴⁹-Medium kultiviert und mit 1 mmol/L IPTG⁵⁰ induziert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie. Nach einem zusätzlichen Reinigungsschritt durch Gelfiltration wurde die Protein-Lösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Lösung enthielt 50 mmol/L Tris (pH 8,0), 250 mmol/L NaCl und 25 µmol/L DTPA⁵¹. DTPA fängt als Komplexbildner von Schwermetallen u.a. Zink²⁺-Ionen ab, die die Aktivität und Stabilität der DDAH1 herabsetzen (94). In **Abbildung 2.2** ist das Ergebnis der durch die Lebensmittelchemie durchgeführten SDS-PAGE der (un-) gereinigten rhDDAH1-Lösungen dargestellt. Das Enzym wurde durch eine Bande bei ~48 kDa identifiziert. Die rhDDAH1-Lösung war sehr rein und war für die Durchführung des HTS geeignet. Die genaue Herstellung, Reinigung und Analyse ist in der Diplomarbeit von Alexandra Schädling mit dem Titel „*Expression, Purifikation und Charakterisierung von verschiedenen Enzymen des Folsäure-Biosyntheseweges sowie des Arginin-Stoffwechsels mittels unterschiedlicher proteinbiochemischer Methoden – von der Klonierung zum aktiven Enzym*“ beschrieben.

⁴⁷ Histidin

⁴⁸ Small ubiquitin-like modifier (involviert in Transport, Regulation der Transkription, Stabilität des Proteins)

⁴⁹ Lysogeny broth

⁵⁰ Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (Induktor des Lactose-Operons)

⁵¹ Diethylene triamine pentaacetic acid

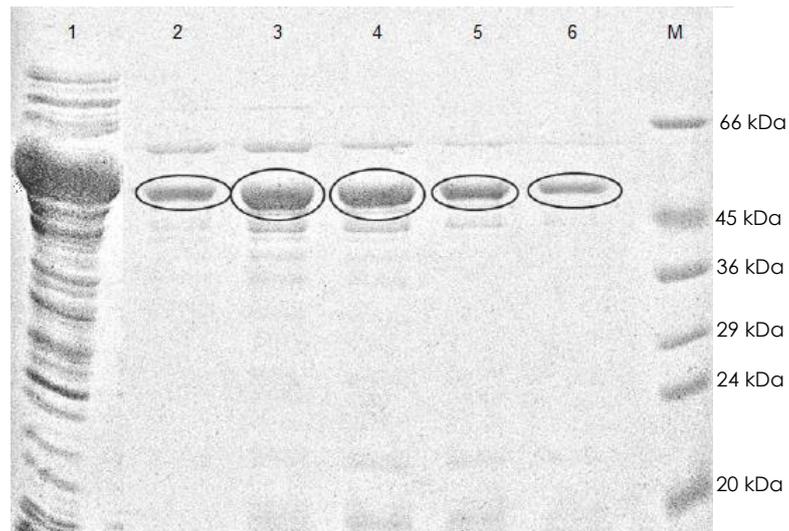


Abbildung 2.2 SDS-PAGE der Fraktionen bei der Herstellung des rekombinanten humanen DDAH1-Proteins. Die ungereinigte Protein-Lösung wurde zur Bewertung der Reinheit verwendet (Reihe 1). M=Marker. Reihen 2 bis 6 stellen Fraktionen der aufgereinigten Enzym-Lösungen dar. Die Bande der rhDDAH1 war bei ~48 kDa zu finden. Der Blot wurde von der Lebensmittelchemie der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt und stellt kein Ergebnis dieser Arbeit dar.

2.2.2 Institut für Klinische Pharmakologie | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

Der in dieser Arbeit verwendete DDAH-Aktivitätsassay basiert auf einer jetzt publizierten Methode von Dr. Fast und seiner Arbeitsgruppe (Associate Professor of Pharmacy, Medicinal Chemistry Division, College of Pharmacy and Graduate Program in Biochemistry, University of Texas, Austin) für ein rhDDAH1-Screening mit niedrigem Durchsatz (2446 Compounds). Anstelle des in den veröffentlichten Ergebnissen verwendeten DNTB⁵²s wurde von der Gruppe nachträglich CPM⁵³ als Detektionsreagenz verwendet (siehe nächster **Punkt 2.2.2.1**) (107). In dem durchgeführten Screening wurde der bereits in **Kapitel 1.2.4.2.1** erwähnte DDAH-Inhibitor Ebselen identifiziert.

⁵² 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenoic acid)

⁵³ 7-Dimethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin

2.2.2.1 Aktivitätsassay | Mechanismus

Für den Fluoreszenz-basierten rhDDAH1-Aktivitätsassay wurde S-Methylthio-L-citrullin (SMTC) verwendet, das sich auf Grund der Molekül-Struktur sehr ähnlich wie das physiologische Substrat ADMA verhält. Bei dem Abbau durch rhDDAH1 entsteht anstelle von Dimethylamin das S-Analogon Methanthiol als Nebenprodukt (**Abbildung 2.3**).

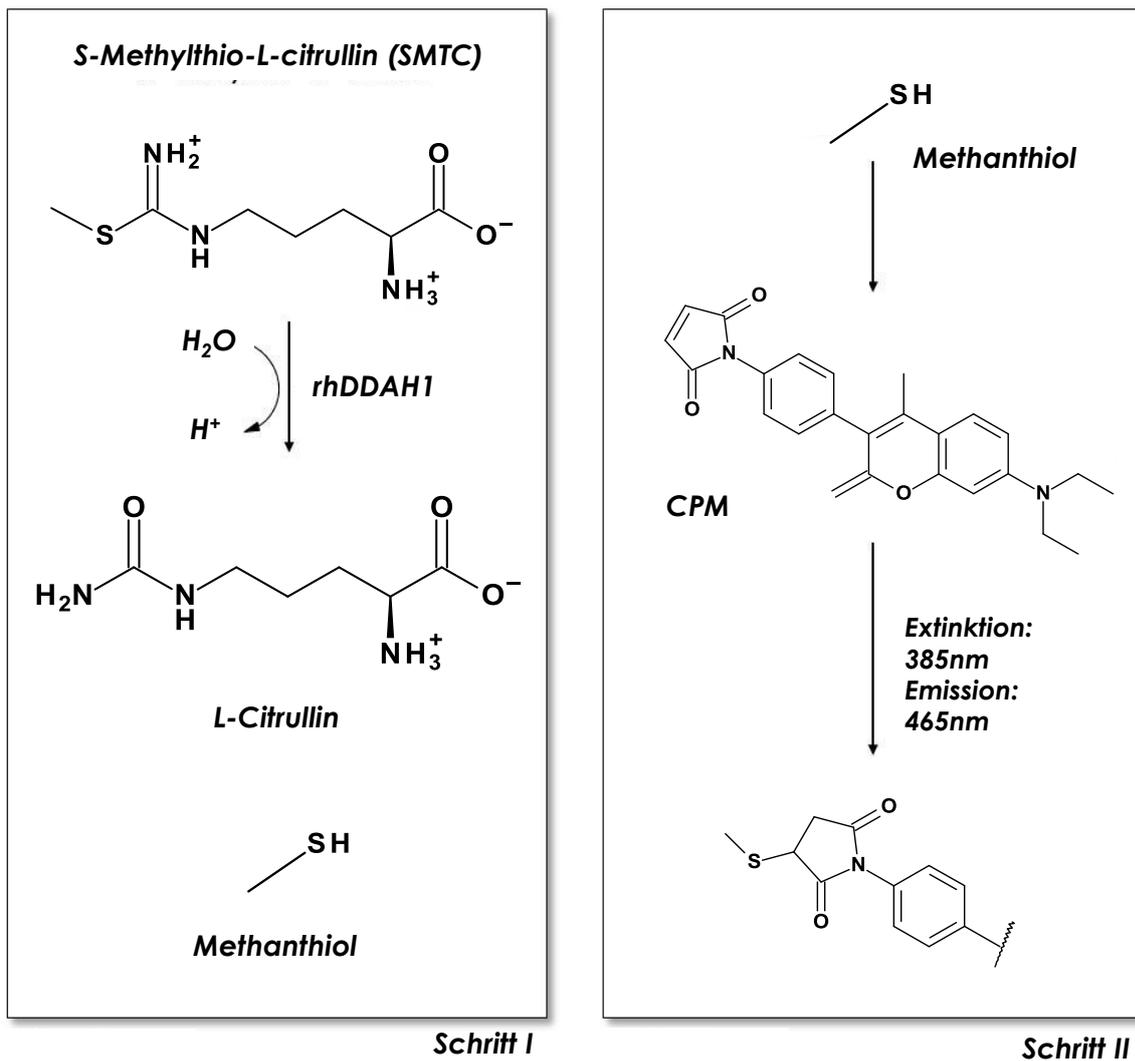


Abbildung 2.3 Reaktionsschema des DDAH1-Aktivitätsassays, der für die Durchführung des High-Throughput-Screenings verwendet wurde. Schritt 1: S-Methylthio-L-citrullin wird zu L-Citrullin abgebaut. Als Nebenprodukt entsteht Methanthiol. Schritt 2: Methanthiol reagiert mit der Maleimidyl-Gruppe des Fluoreszenzmarkers CPM (7-Dimethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin).

Im zweiten Schritt erfolgt die nukleophile Addition an den Maleimidyl-Rest von CPM. Durch die Entstehung des daraus resultierenden fluoreszierenden Produktes können Rückschlüsse auf den SMTC-Abbau und die Aktivität des Enzyms gezogen werden. Wenn die rhDDAH1-Aktivität beispielsweise durch einen Inhibitor gehemmt wird, so sinkt die Fluoreszenz auf Grund der verringerten Bildung von Methanthiol.

2.2.2.2 Kinetische Messung der rhDDAH1-Aktivität

Der Assay wurde von *Fast & Linsky* für ein 384-Wellformat mit einem Endvolumen von 90 µl entwickelt. Die beiden Reaktionen liefen dabei simultan in einem Ansatz ab. Somit war eine *direkte* und *kontinuierliche* Produktmessung möglich.

Für den Versuch wurde jeweils eine Enzym- und Substrat-Lösung in Eppendorf-Gefäßen hergestellt. Der Puffer der SMTC/CPM-Lösung (beides Fa. Sigma-Aldrich) bestand aus jeweils 5 mmol/L KH_2PO_4 ⁵⁴ und KCl ⁵⁵ (beides Fa. Merck KGaA). Um eine Adsorption der Bestandteile an den Wänden der 384-*OptiPlate*[®] -Wellplatte (Fa. Perkin Elmer, schwarz) zu verhindern, wurde der Lösung ebenfalls 0,02% des Detergenz Tween-20[®] (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hinzugefügt. Bei pH-Werten $\geq 8,0$ unterliegt CPM schnell einer alkalischen Hydrolyse. Um das Substrat für längere Zeit stabil und gut löslich zu halten, wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt. Die Konzentrationen von CPM und SMTC in der Stammlösung betragen 7,1 µmol/L und 0,75-2,80 µmol/L. Die Enzym-Lösung, die 50-80 nmol/L rhDDAH1 enthielt, beinhaltete ebenfalls 0,02% Tween-20[®]. Die Konzentrationen von $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ betragen jeweils 344 mmol/L. Zur Erhöhung der Enzymstabilität wurden 4,0 mmol/L EDTA hinzugefügt. Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Bei den Messungen des inhibitorischen Effektes von Ebselen (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc.) wurden der Enzym-Lösung Konzentrationen von 0-4,5 µmol/L Ebselen zugesetzt. Das Ebselen wurde dabei in DMSO gelöst (die Endkonzentration von DMSO in 90 µl betrug $\leq 1\%$). Nachdem die Lösungen auf Eis zubereitet und durch vorsichtiges Invertieren gemischt wurden, wurden 45 µl der CPM/SMTC-Lösung in die schwarze 384-Wellplatte vorgelegt. Um die Reaktion nun zu starten, wurden ebenfalls 45 µl der rhDDAH1-Lösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wies dann einen pH-Wert

⁵⁴ Kalium-dihydrogenphosphat

⁵⁵ Kaliumchlorid

von 8,0 auf und wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut vermengt. Um störende Luftblasen zu entfernen, wurde die Platte anschließend für ca. 1 Minute bei 1000xg zentrifugiert. Die Endkonzentrationen von CPM und SMTC in 90 µl betragen nun 3,55 µmol/L und 0,375-1,40 µmol/L, die von Ebselen und rhDDAH1 0-25 µmol/L und 25 nmol/L (Charge #1) bzw. 40 nmol/L (Charge #2).

2.2.3 European Screening Port | Hamburg

2.2.3.1 Compounds | Substanzbibliotheken

Die für das HTS verwendeten *Compounds* wurden aus der ENAMINE-Kollektion (1.800.000 große Substanzbibliothek der Firma ENAMINE LLC, NY, USA) verwendet. Der Teil der ENAMINE-Bibliothek vom European Screening Port beinhaltet insgesamt 200.000 *Compounds*. Diese wurden durch einen Medizinalchemiker sorgfältig nach unterschiedlichen Eigenschaften, u.a. basierend auf den *Lipinsky's Rules of Five* (109), mit deren Hilfe die Eignung eines potenziellen Wirkstoffs abgeschätzt werden kann, ausgewählt. 70.000 *Compounds* der Bibliothek des ESP stellen Strukturen dar, die eine potenzielle Aktivität gegen bereits gut definierte Targets (Typ I GPCRs⁵⁶, Kinasen, Ionen-Kanäle, Proteinasen etc.) aufweisen. Weitere 30.000 *Compounds* für weniger bekannte Targets (Protein-Protein-Interaktionen) wurden ausgewählt, denen weniger strenge Anforderungen an die „Druglikeness“ gestellt wurden (alle Moleküle, die ein $\text{clogP} > -6$ oder $< 7,25$, $\text{CaCo} - 2 > 25$, $\text{logS} > -8$ aufwiesen, wurden in die Auswahl mit einbezogen). Die restlichen 100.000 Moleküle stellen weitere *strukturell diverse Compounds* dar und wurden nach strengeren Bedingungen gefiltert ($\text{CaCo} - 2 > 100$, $\text{clogP} < 4,2$, $\text{logS} > -7$, Molekulargewicht < 460 und > 100 g/mol). Somit wurden *Compounds* mit einer zu hohen potenziellen Toxizität, einer sehr geringen Zell-Permeabilität oder einer hohen Lipophilie ausgeschlossen. Reaktive und instabile Moleküle wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Für das Screening wurden dann willkürlich 52.096 *Compounds* ausgewählt und getestet.

⁵⁶ G proteine-coupled receptor

2.2.3.2 High-Throughput Screening

2.2.3.2.1 Messung der rhDDAH1-Aktivität durch Endpunktbestimmung

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei der gesamten Durchführung des HTS als Endpunktbestimmung. Die absoluten Fluoreszenzwerte wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem *EnVision® Multifunction Plate Reader* (Fa. Perkin Elmer; **Abbildung 2.4 | A** und **Abbildung 2.6 | h + j**) gemessen. Die erste Messung erfolgte direkt nach Zugabe der Substrat-Lösung (Zeitpunkt t=0 min). Die zweite Messung wurde nach einer Inkubationszeit von 60-120 Minuten durchgeführt.

2.2.3.2.2 Präparation der Lösungen

Im Verlauf der Assay-Optimierung wurden die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile als auch das Reaktionsvolumen verändert. Während die Endkonzentrationen der Puffer und von CPM (3,55 µmol/L) konstant blieben, wurden hier SMTC-Konzentrationen von 0-15 µmol/L gemessen. Die endgültige Konzentration während des HTS betrug 4,5 µmol/L. Von der rhDDAH1 wurden Endkonzentrationen von 0-800 nmol/L getestet, die Konzentration des Enzyms bei dem Screening betrug 200 nmol/L. Die Konzentrations-Wirkungskurven von Ebselen wurden von 0-10 µmol/L durchgeführt, die Konzentration im HTS als Negativkontrolle lag bei 4,0 µmol/L. Das Volumen der Enzym- und Substrat-Lösungen wurde für das HTS auf jeweils 5 µl reduziert (Gesamtvolumen von 10 µl). Die Lösungen wurden auf Eis in 50 ml Falcon-Gefäßen hergestellt. Die Präparation der Lösungen erfolgte für die Optimierung als auch bei der Durchführung des HTS manuell. Die Platten wurden nach Starten der Reaktion ebenfalls bei 1000xg zentrifugiert, eine vorherige Vermischung der beiden Lösungen mit Hilfe der Pipetten erfolgte jedoch nicht. Der Assay wurde mit schwarzen *384-Well Microplates Small Volume™* (Fa. Greiner BIO ONE GmbH, solid bottom ≤150 µm) durchgeführt. Die erniedrigte Höhe der Wells machte die Messung im 10 µl-Format möglich.

2.2.3.2.3 HTS-Anlage

Die *in-vitro* Screening-Plattform des European Screening Ports besteht aus vier Arbeitsstationen. Drei davon wurden für das in dieser Arbeit durchgeführte Screening verwendet (**Abbildung 2.4**). Die „*Compound Workstation*“ wird zur Präparation und Lagerung der HTS-Platten verwendet. Die „*Hotel Workstation*“ erlaubt die Zugabe von Lösungen und die Inkubation der in den Platten ablaufenden Reaktionen. Die Messung erfolgt schließlich durch die „*Reader Workstation*“.

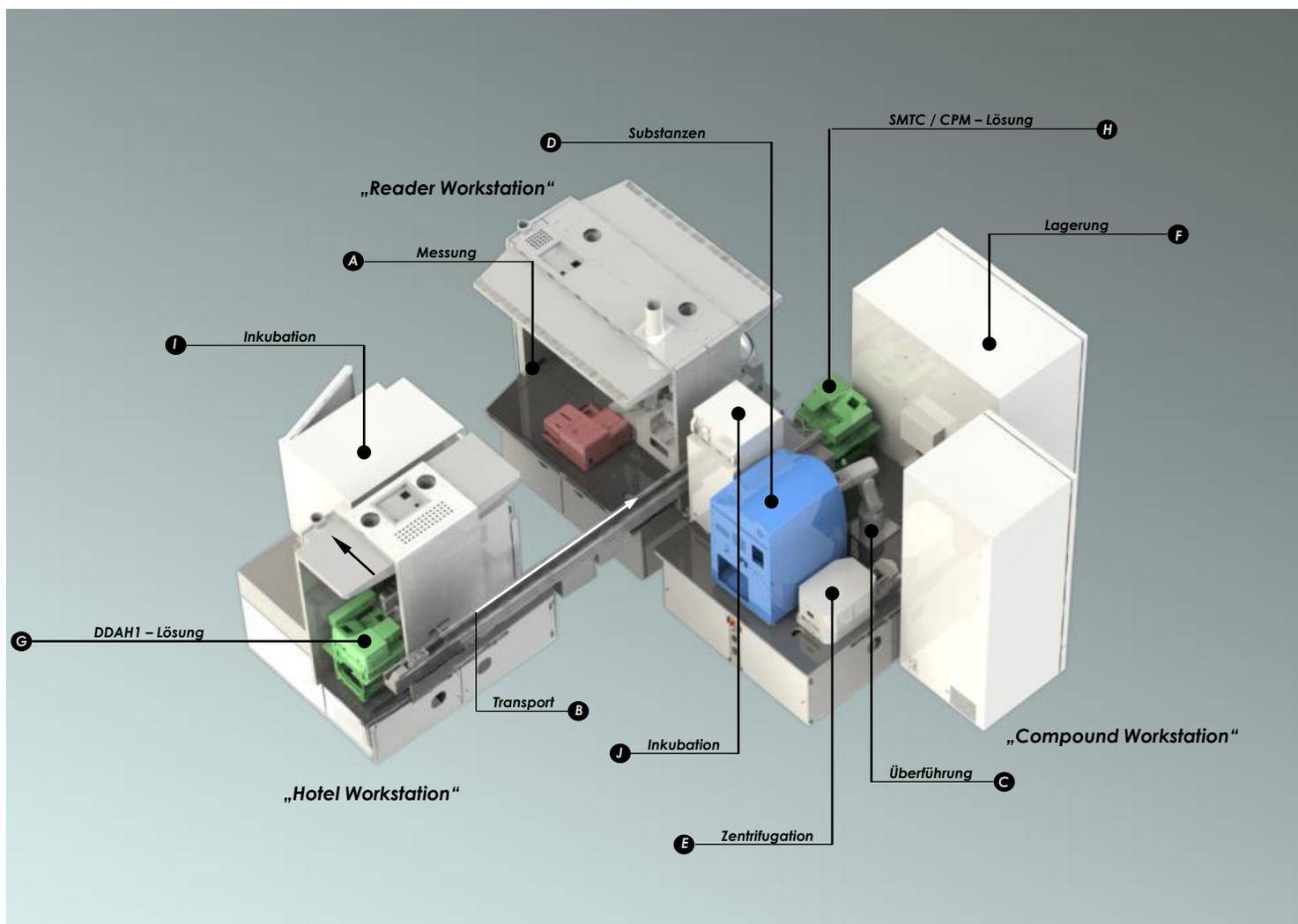
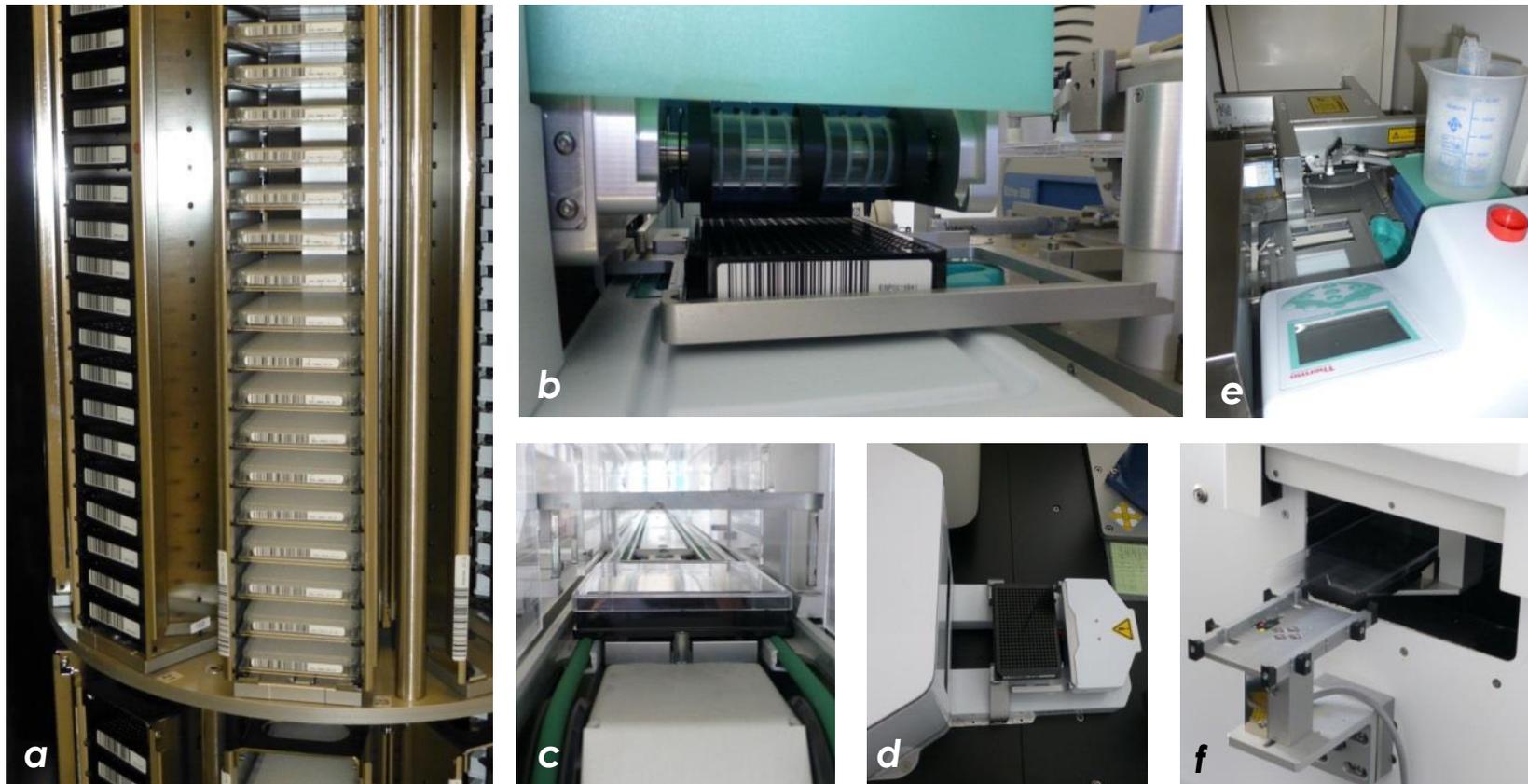


Abbildung 2.4 Das High-Throughput Screening (HTS) wurde mit der vollautomatischen HTS-Anlage des European Screening Ports (Hamburg) durchgeführt. Dargestellt sind die für das durchgeführte Screening relevanten Arbeitsbereiche der Anlage. Abb. vom European Screening Port, modifiziert.



- a) Lagerung der mit Barcode versehenen HTS-Platten.
 b) Beladung der Platten mit Substrat -bzw. Enzym-Lösung mit Hilfe des Multidrop® Combi Dispensers.
 c) Transport der Platten über die Brücke.
 d) Zentrifugation der Platten nach Beladung mit den zu testenden Compounds.
 e) Die auf Eis gelagerte rhDDAH1-Lösung wird über die Schläuche des Multidrop® Combi Dispensers auf die Platten gegeben, die durch den Rotationsteller weiter zur Inkubationskammer geleitet werden.
 f) Die Platten werden aus/in das HTS-Platten-Lager überführt.

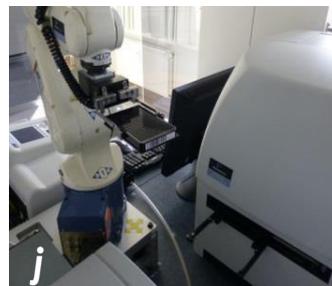
Abbildung 2.5 Teil I – Zur besseren Veranschaulichung sind die verwendeten Geräte und Arbeitsbereiche der HTS-Anlage dargestellt.

Der Transport der Platten zwischen der „Hotel Workstation“ und den anderen Bereichen erfolgt über ein Laufband (**Abbildung 2.4 | B** und **Abbildung 2.5 | c**). Die Überführung der Platten zwischen den einzelnen Kompartimenten der jeweiligen Arbeitsbereiche wird durch den *Plate::Handler II™* (Fa. Perkin Elmer LAS GmbH; **Abbildung 2.4 | C** und **Abbildung 2.6 | j - k**) und durch *Turn::Tables™* (Fa. Perkin Elmer LAS GmbH; **Abbildung 2.6 | j**).



g) Compound Workstation

h) Reader Workstation



i) Zugabe der Substrat-Lösung zu den Platten. Durch den Rotationsteller des Dispensers werden die Platten zu den nächsten Stationen weitergeleitet.

j) Die Platten werden nach 0min und 60min Inkubation zur Messung in die Halterung des EnVision® Multifunction Plate Readers gegeben.



k) Transparente Lager-Platten, die die Stammlösungen der Compounds enthalten.

l) Diese werden zur Beladung der HTS-Platten mittels Ultraschall in den Echo® 550 Liquid Handler mit den Öffnungen nach unten gestellt.

Abbildung 2.6 Teil II – Zur besseren Veranschaulichung sind die verwendeten Geräte und Arbeitsbereiche der HTS-Anlage dargestellt.

2.2.3.2.3.1 Vorbereitung der HTS-Platten

Die 384-Wellplatten wurden zunächst mit Barcodes versehen, die die Koordination der Platten während des HTS durch die Anlage möglich macht. Zur Vorbereitung des Screenings mussten die ausgewählten *Compounds* der Bibliotheken in die HTS-Platten vorgelegt werden. Die Stammlösungen sind in Lager-Platten | *Echo™ Qualified 384-Well Source Microplates* (Fa. Labcyte) mit einer Konzentration von 2 mmol/L bei -20 °C gelagert. Die *Compounds* sind dabei in DMSO gelöst. Die Lager-Platten wurden mit Hilfe ihrer Identifikationsnummern aus dem Lager genommen und bei RT aufgetaut. Anschließend erfolgte die Beladung der HTS-Platten mit 50 nl der *Compound*-Lösung mit Hilfe des *Plate::Handlers II™* und dem *Echo® 550 Touchless Liquid Transfer Handler* (Fa. Labcyte) (**Abbildung 2.4 | D**), das einen kontaktlosen Transfer der Lösungen mittels Ultraschall ermöglicht (**Abbildung 2.7**).

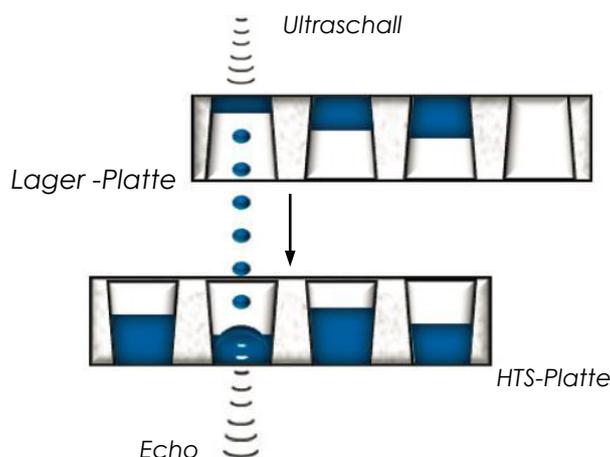


Abbildung 2.7 Die im Screening getesteten *Compounds* wurden von den Lager-Platten auf die HTS-Platten mittels Ultraschall beladen: Schematische Darstellung des Transfers mit Hilfe des *Echo® 550 Touchless Liquid Transfer Handler* (Abb. von Fa. Labcyte).

Für den Transfer der Lösung wird die Platte, die die Stammlösungen der *Compounds* beinhaltet, mit der geöffneten Seite nach unten gerichtet (**Abbildung 2.6 | k - l**). Die Ausstoßung kleiner Tröpfchen erfolgt durch die Fokussierung der akustischen Wellen auf die Unterseite des Wells. Dabei werden die ausgesendeten Wellen wie ein Echo von der HTS-Platte ausgestoßen, die die Höhe des Flüssigkeitsspiegels bzw. das

Volumen der Lösung reflektieren. Durch den kontaktlosen Transfer kleinster Mengen (bis zu 2,5 nl) wird das Risiko für Kontaminationen vermindert und eine hohe Präzision erreicht (keine Anheftung der Proben an Pipetten wie bei traditionellen Dispensern). Anschließend wurden die HTS-Platten mit der HTS-Zentrifuge *Agilent VSpin™ Spin Down Station* (Fa. Agilent Technologies GmbH & Co. KG; **Abbildung 2.4 | E** und **Abbildung 2.5 | d**) zentrifugiert und manuell in die HTS-Platten-Halterungen gesetzt. Diese wurden in den Lager-Schrank *STX1000* (Fa. LiCONiC AG) der HTS-Anlage (**Abbildung 2.4 | F** und **Abbildung 2.5 | a**) eingesetzt. Während des Screenings wurden dann die jeweiligen Platten mit Hilfe des *Plate::Handlers II™* aus dem Lager genommen und zur Messung weiter transportiert (**Abbildung 2.5 | f**). Die Endkonzentration der *Compounds* in dem 10µl-Reaktionsvolumen bei der Messung der *Marker Library*, der Durchführung des *Primary Screens* und der *Hit Confirmation* betrug 10 µmol/L. Bei dem *Hit Profiling* und dem *Follow-Up* wurden Endkonzentrationen von 1-50 µmol/L verwendet.

2.2.3.2.3.2 Kalibrierung der Dispenser

Zur weiteren Vorbereitung gehörte die Kalibrierung des *Multidrop® Combi Dispenser* (Fa. Thermo Electron LED GmbH); **Abbildung 2.4 | G + H**, **Abbildung 2.5 | b + f** und **Abbildung 2.6 | i**) sowie deren Inkubation mit den Reaktionslösungen. Für die Befüllung der Wells standen 8 Schläuche pro *Multidrop® Combi Dispenser* (Silikon, d⁵⁷0,4mm) zur Verfügung. Bei einer 384-Wellplatte mit 16 Reihen waren daher zwei Durchläufe notwendig. Die Befüllung erfolgte mit einer Schlauch-Pumpe innerhalb weniger Sekunden mit hoher Genauigkeit (innerhalb 5 Sekunden mit einer CV ≤ 5% für 2 µl). Um die Schläuche mit den Lösungen zu sättigen, wurden diese für ca. 30 Minuten miteinander inkubiert. Da die Silikon-Schläuche durch Kontakt mit Flüssigkeit aufquellen, kann deren Durchmesser variieren. Um abweichende Auswürfe an Flüssigkeit zwischen den einzelnen Schläuchen auszuschließen, mussten diese im Anschluss kalibriert werden. Dafür wurden jeweils 5x10 µl pro Well pro herausnehmbarem *Stripe* (bestehend aus 12 Wells) einer 96-Well ELISA Platte (Fa. Greiner BIO ONE GmbH, 8xF12 *Stripes*) befüllt. Die einzelnen *Stripes* wurden

⁵⁷ Durchmesser

anschließend mit einer Präzisionswaage gewogen und die ausgeworfenen Volumina miteinander verglichen (**Tabelle 2.8**). Bei einer zu starken Abweichung des Volumens konnte der Durchmesser der Schläuche am Kopfteil des *Multidrop® Combi Dispensers* über kleine Schraubchen reguliert werden. Die maximale erlaubte Abweichung betrug 0,1 µl.

Schläuche	Gewicht/Stripe, leer [mg]	Gewicht/Stripe, voll [mg]	Durchschnittliches Volumen pro well [µl]
1	4393,0	5004,0	$= (F13 - E13) / 5 / 12$
2	4365,1	4975,3	10,17
3	4352,6	4968,5	10,27
4	4354,2	4966,4	10,20
5	4353,8	4969,8	10,27
6	4351,6	4965,2	10,23
7	4330,6	4948,8	10,30
8	4315,2	4933,7	10,31
Durchschnittliches Volumen/Platte [µl]			10,24
Maximale Differenz [µl]			0,07

Tabelle 2.8 Kalibrierung der Dispensier-Schläuche der HTS-Anlage: jeweils 5x10 µl pro Well pro herausnehmbarem Stripe (bestehend aus 12 Wells) einer 96-Well ELISA-Platte wurden befüllt. Die einzelnen Stripes wurden anschließend mit einer Präzisionswaage gewogen und die ausgeworfenen Volumina miteinander verglichen. Die Abweichung der Volumina durfte nicht >0,1 µl betragen.

2.2.3.2.3.3 HTS-Protokoll

Nach Beendigung der Vorbereitungen zu Beginn des Tages (Präparation der beiden Reaktionslösungen, Inkubation und Kalibrierung der Schläuche) konnte die eigentliche Durchführung der Screenings beginnen. Zu welchen Zeitabständen die einzelnen HTS-Platten gestartet werden sollten, die Dauer der Inkubationsschritte, die Anzahl der Messungen und die Reihenfolge der durchzuführenden Aktionen wurde durch ein vorprogrammiertes Protokoll mit der Software *Plate::Works* (Fa. Perkin Elmer LAS GmbH) definiert. Die einzelnen Schritte des Screenings liefen folgendermaßen ab:

Zuerst wurden die mit den *Compounds* bereits beladenen HTS-Platten durch den *Plate::Handler II™* aus dem Lager genommen und über die *Turn::Tables™* und das Transportband (Fa. Perkin Elmer LAS GmbH) zur „*Hotel Workstation*“ transportiert (**Abbildung 2.4** | **C/F** → **B** → **G**). Dort wurden 5µl der rhDDAH1-Lösung pro Well (diese wurden während des Screenings in einem mit Eis befüllten Becherglas aufbewahrt) durch den *Multidrop® Combi Dispenser* in die 384-Wellplatte gegeben und in den Inkubationsschrank I30 (Fa. Perkin Elmer LAS GmbH) (**G** → **I**) zu einer 10-minütigen Inkubation (25 °C) geführt. Dies sollte eine vollständige Interaktion des Enzyms mit den jeweiligen *Compounds* gewährleisten. Daraufhin wurde mit Hilfe eines weiteren *Multidrop® Combi Dispensers* die Reaktion durch Zugabe der SMTC/CPM-Lösung gestartet (**I** → **B** → **H**). Danach erfolgte der Transport der Platte zur „*Reader Workstation*“, um die Fluoreszenz zum Zeitpunkt t=0 min mit dem *EnVision Multifunction Plate Reader®* (Fa. Perkin Elmer LAS GmbH) zu messen (**H** → **A**). Die 60-minütige Inkubationszeit erfolgte in dem Inkubationsschrank I30 (Fa. Perkin Elmer LAS GmbH) der „*Compound Workstation*“ (**A** → **J**). Nach 60 Minuten wurden die Platten wieder entnommen und zur zweiten Messung in die „*Reader Workstation*“ geführt. Nach Beendigung der gesamten Messung wurde die HTS-Platte zurück in den Vorratsschrank geleitet. Die Reihenfolge der durchgeführten Aktionen und die schematische Darstellung des Protokolls von *Plate::Works* ist in **Abbildung 2.8** dargestellt.

HW	• Hotel Workstation
LW	• Liquid Workstation
RW	• Reader Workstation
Incubator I189 (F)	• Get new plate
Barcode Reader	• Read barcode
De-Lidder	• Remove lid
Multidrop Combi (G)	• Dispense Enzyme 5 µL in rows 1-24
De-Lidder	• Replace lid
Incubator (I)	• Incubate 10 minutes at 25 °C, 90% room hydr.
De-Lidder	• Remove lid
Multidrop Combi (H)	• Dispense Substrate 5 µL in rows 1-24
Centrifuge (E)	• Centrifuge 30 Sekunden at 1000xg
De-Lidder	• Replace lid
De-Lidder	• Remove lid
Reader (EnVision)	• Read FI* with protocol: H* 9.3 mm, G* 80, FI* 5, Ex* (16%) 340 nm, Em* (100%) 460 nm
De-Lidder	• Replace lid
Incubator I30 (I30)	• Incubate 60 minutes at 25 °C, 90% room hydr
De-Lidder	• Remove lid
Reader (EnVision)	• Read FI* with protocol: H* 9.3 mm, G* 80, FI* 5, Ex* (16%) 340 nm, Em* (100%) 460 nm
De-Lidder	• Replace lid
Incubator I1000 (STX1000)	• Waste plate

*FI⁵⁸ – H⁵⁹ – G⁶⁰ – FI⁶¹ – Ex⁶² – Em⁶³

Abbildung 2.8 Die von der HTS-Anlage durchzuführenden Aktionen wurden durch ein vorprogrammiertes Protokoll definiert.

Der zeitliche Abstand der gestarteten Platten betrug 5 Minuten. Im *Primary Screen* wurden an 3 Tagen insgesamt ca. 150 Platten vermessen. Dies machte hohe Volumina an Reaktionslösungen (ca. 350 ml) erforderlich. Um die Stabilität der Lösungen aufrecht zu erhalten, wurden Volumina von je 50ml erstellt und während des Screenings mehrfach nachgefüllt.

⁵⁸ Fluorescence intensity

⁵⁹ Height

⁶⁰ Gain

⁶¹ Flashes

⁶² Extinction

⁶³ Emission

2.2.3.2.3.4 Verbrauch

Die in dem gesamten HTS-Prozess (von *Marker Library* bis *Hit Profiling*, auf Grund des geringen Verbrauchs wird das *Follow-Up* vernachlässigt) gemessenen HTS-Platten und der ungefähre Verbrauch der jeweiligen Reaktionslösungen inkl. rhDDAH1-Menge sind in folgender **Tabelle 2.9** zusammengefasst.

Screenings	384-Wellplatte (n)	~ Verbrauch Lösungen	~ Verbrauch rhDDAH1
<i>Marker Library</i>	18	60 ml	745 µg
<i>Primary Screen</i>	148	1,05 L	20 mg
<i>Hit Confirmation</i>	6	20 ml	250 µg
<i>Hit Profiling</i>	15	40 ml	500 µg
Gesamt	187	1,2 L	21,5 mg

Tabelle 2.9 Zusammenfassung der Anzahl der gemessenen Platten und den dafür benötigten ungefähren Verbrauch der jeweiligen Reaktionslösungen und der Menge an rhDDAH1.

2.2.3.2.4 Auswertung

Die Messung der Aktivität bzw. der Fluoreszenz-Intensitäten erfolgten kinetisch (über einen Zeitraum von 0 bis 250 Minuten) oder als Endpunktbestimmung (nach 60 Minuten Reaktionszeit) mit dem *TECAN Safire II-Basic*[®] (Bandwidth 20 nm, G 80, Fl 1 alle 150 ms, Z-Position 10.800 µm) und dem *EnVision Multifunction Plate Reader*[®] (H 9,3 mm, G 80, Fl 5) mit der Software *Magellan 5.03* (Fa. Tecan) bzw. *Wallac EnVision Manager 1.12* (Fa. Perkin Elmer LAS GmbH). Bei den kinetischen Messungen wurden für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs dementsprechend die Fluoreszenzwerte (RFU⁶⁴) gegen die Zeit (min) aufgetragen. Die Bewertung der rhDDAH1-Aktivität erfolgte über die Ermittlung der daraus resultierenden Steigungen (RFU/min). Die Ermittlung der Steigung erfolgte zwischen 30-60 Minuten nach dem Starten der Reaktion. Für die Endpunktbestimmung wurden die absoluten Fluoreszenzwerte (RFU) zur 60. Minute zur Bewertung der rhDDAH1-Aktivität verwendet.

⁶⁴ Relative fluorescence units

Für die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante K_m (mol/L) und der maximalen Geschwindigkeit V_{max} (RFU/min) als Maß der Reaktionsgeschwindigkeit wurden wie unter **Kapitel 2.1.4.3.2.4.2** beschrieben, berechnet. Die berechneten Steigungen [RFU/min] bzw. die max. Fluoreszenzwerte [RFU] wurden gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen [mol/L] (Substrat-Sättigungskurve) aufgetragen.

Für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurve mit dem rhDDAH-Inhibitor Ebselen erfolgten auf gleiche Weise (die Steigungen bzw. absoluten Fluoreszenzwerte wurden gegen die entsprechend gemessenen Konzentrationen aufgetragen). Dabei wurden die Werte ebenfalls auf den 0-Wert bezogen (niedrigste eingesetzte Konzentration). Für die Bestimmung des IC_{50}^{65} -Wertes wurde zum Erhalt der dafür typisch auftretenden sigmoidalen Kurve der dekadische Logarithmus der Konzentration verwendet. Die minimalen Fluoreszenzwerte (*Bottom* der sigmoidalen Kurve) wurden auf einen Wert von 100% Inhibition, die maximalen Werte (*Top*) auf 0% Inhibition normalisiert. Der IC_{50} -Wert bezeichnet die Konzentration des Inhibitors, bei dem das Enzym zu 50% gehemmt ist (Bereich des Wendepunktes des sigmoidalen Verlaufs) und stellt somit ein Maß für die Wirkstärke des Inhibitors dar. Für die Bestimmung des $(\log)IC_{50}$ -Wertes wurde die „Log (*inhibitor*) vs. Normalized response“-Gleichung mit *variabler Hill-Steigung/Koeffizient* verwendet (**Tabelle 2.10**). Der Hill-Koeffizient beschreibt dabei den Anteil an Makromolekül (Enzym), der mit Substrat gesättigt ist (als Funktion der Substrat-Konzentration). Bei einem Wert von 1,0 erfolgt die Bindung unabhängig von anderen vorliegenden Substraten. Die Bindung an das Makromolekül kann aber auch durch die bereits gebundenen Substrate verstärkt oder vermindert werden, was als *kooperative Bindung* bezeichnet wird. In diesem Fall erhöht/erniedrigt sich der Wert. Ein Koeffizient von 1,0 ist für die Kontrolle verwendeten Inhibitor wünschenswert, da hier der berechnete IC_{50} -Wert die höchste Präzision aufweist. Koeffizienten von 1,0-3,0 liegen im akzeptablen Bereich.

Für die statistische Auswertung wurden die Standardabweichung SD^{66} (RFU/min bzw. RFU) und der Variationskoeffizient CV^{67} (%) berechnet. Bei der Durchführung einer (Nicht-) Linearen Regression wurde zusätzlich der Korrelationskoeffizient R^2 angegeben. Für die Etablierung und Optimierung des HTS-Assays wurden die Software *GraphPad Prism*® 5.02 (Fa. GraphPad Software Inc.) und *Microsoft Office*

⁶⁵ Half maximal inhibitory concentration

⁶⁶ Standard deviation

⁶⁷ Coefficient of variation

Excel 2010 (Fa. Microsoft GmbH) verwendet. Für die Auswertung der Ergebnisse der Screenings wurden die Softwares *TIBCO™ Spotfire® 6.0* (Ta. TIBCO Spotfire European) und *Activity Base Suite* (Fa. ID Business Solutions Ltd.) verwendet. Zur Bewertung bzw. Identifizierung der *Hits* wurden die Ergebnisse entweder als Inhibition oder Aktivierung (%) basierend auf der Positiv- oder Negativkontrolle angegeben. Dabei wurde auch ein Vergleich der Effekte zwischen Zeitpunkt $t=0$ min und $t=60$ min aufgestellt, um falsch-positive Treffer zu identifizieren. Zur Beurteilung der Korrelation (R^2) zwischen *Primary Screening* und *Hit Confirmation* bzw. *Hit Confirmation* und *Hit Profiling* wurden die jeweiligen Werte als Inhibition (%) gegeneinander aufgetragen. Dies erfolgte ebenfalls für die Bestimmung der Genauigkeit der Dreifachbestimmung bei der *Hit Confirmation*.

Für die Bewertung der Eignung des HTS-Assays wurde anfänglich die Diskrepanz zwischen Negativ- und Positivkontrolle (Signal-Hintergrund-Verhältnis S/H) berechnet. Hierfür wurde der Quotient der Steigungen bzw. absoluten Fluoreszenzwerte beider Kontrollen berechnet.

Für das Screening war neben der Standardabweichung und dem Variationskoeffizient primär der „Z Prime bzw. Z´ Faktor“ ausschlaggebend. Dieser dimensionslose Faktor beurteilt mit Hilfe der Positiv- und Negativkontrolle die Qualität eines HTS-Assays unter Einbeziehung der Variation. Für einen exzellenten Assay sind Z Primes von $\geq 0,5-1$ erforderlich (226) (**Tabelle 2.10**).

Verwendete Formeln
$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \cdot K_i$
$S/H = \frac{MW(K\ pos)}{MW(K\ neg)}$
$Z\ Prime = 1 - \left(\frac{(3 \times SD(K\ pos)) + (3 \times SD(K\ neg))}{(MW(K\ pos) - MW(K\ neg))} \right)$

Tabelle 2.10 Die im rhDDAH1-Teil verwendeten Formeln (über Microsoft Excel 2010 oder die Software GraphPad Prism 5.02 berechnet). S = Substrat, K_m = Michaelis-Menten-Konstante, IC_{50} = inhibitorische Konstante, MW = Mittelwert, Kpos/neg = Positiv-/Negativkontrolle, SD = Standard deviation.

3 Ergebnisse

3.1 SDMA und AGXT2

3.1.1 Expression der AGXT2

3.1.1.1 Organ-spezifische Lokalisation der AGXT2 auf mRNA-Ebene

Es war bereits bekannt, dass die AGXT2 in *Ratten* vorwiegend in den Nieren lokalisiert ist (100). In darauf folgenden Veröffentlichungen wurden zwar richtigerweise Experimente mit *humanen* Nierenzellen durchgeführt (162), allerdings wurde nie der direkte Nachweis erbracht, dass die AGXT2 auch im *Menschen* vorwiegend in der Niere exprimiert wird.

Um diese Lücke zu schließen, wurde die Organ-spezifische AGXT2-Expression im Menschen untersucht. Dazu wurde kommerziell erhältliche standardisierte cDNA verwendet, die aus gesundem menschlichem Gewebe isoliert wurde. Mit der cDNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. In **Abbildung 3.1** ist zu erkennen, dass die humane AGXT2 vorwiegend in Leber und Niere exprimiert ist. Die restlichen Organe zeigten eine geringere mRNA-Expression, wohingegen im Gehirn keine mRNA mit dieser Methode nachweisbar war.

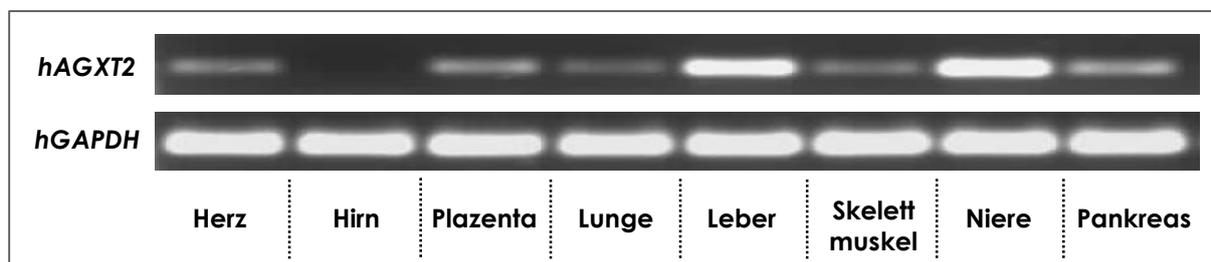


Abbildung 3.1 Organ-spezifische mRNA-Expression von AGXT2 im Menschen. GAPDH wurde als interne Kontrolle verwendet. Gelelektrophorese mit standardisierter cDNA. Organ-spezifische Lokalisation der AGXT2

3.1.1.1.1 Nierenschnitte

Da bereits durch die GWAS der genetische Zusammenhang der AGXT2 mit SDMA bewiesen wurde und SDMA bereits als renaler Marker bekannt ist, wurden weitere Untersuchungen auf die Niere beschränkt. Um ein detailliertes Expressionsmuster innerhalb der Niere zu erhalten, wurden Schnitte von menschlichen Nieren mit einem humanen primären AGXT2-Antikörper immunhistochemisch behandelt. In **Abbildung 3.2** sind die jeweiligen Nierenkompartimente in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen (50 µm und 100 µm) zu sehen. Die Kontrollschnitte wurden nur mit dem Sekundärantikörper behandelt. Bei der Betrachtung der zweiten Vergrößerung sind die unterschiedlichen Kompartimente der Niere gut erkennbar. Die blaue Färbung stellt die Zellkerne dar, wohingegen die rote Färbung die Expression der AGXT2 darstellt. Dies zeigte sehr deutlich, dass die AGXT2 ausschließlich im proximalen Tubulus der Niere exprimiert wurde. Dies ist vor allem im Vergleich mit der Negativkontrolle gut zu erkennen, deren proximaler Tubulus nur eine schwach rote Färbung aufwies.

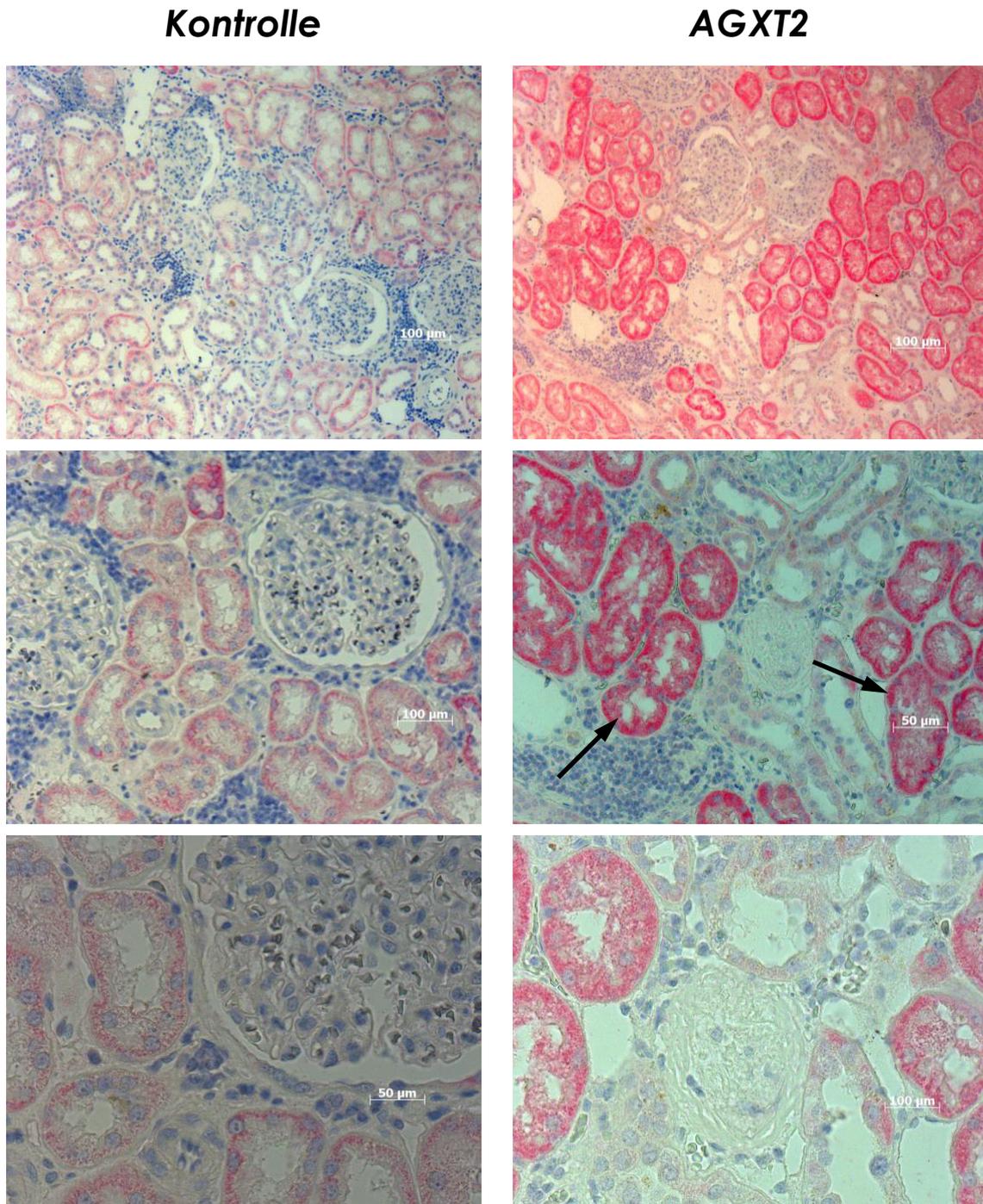


Abbildung 3.2 Lokalisation der humanen AGXT2 in der Niere. Lichtmikroskopische Kryoschnitte mit einer Vergrößerung von 50 µm und 100 µm. Links: Kontrolle ohne AGXT2-Primärantikörper. Rechts: Positivkontrolle mit AGXT2-Primärantikörper. Die AGXT2 ist in den proximalen Tubuluszellen lokalisiert (Pfeile, intensiv rote Färbung).

3.1.1.2 Subzelluläre Lokalisation der AGXT2

Rodionov et al. (162) konnte bereits die Lokalisation der humanen AGXT2 innerhalb der Zelle zeigen. Durch die GWAS konnte eine mutierte Form der AGXT2 – rs37369 – identifiziert werden. Ob die Mutation einen Einfluss auf das Expressionsmuster des Proteins hat, war bisher nicht bekannt.

Dass eine Mutation zu einer fehlerhaften Expression bzw. Lokalisation führen kann, wurde bereits an der Isoform AGXT1 bewiesen (38). Die AGXT1 ist in der menschlichen Leber ausschließlich in den Peroxisomen exprimiert. Durch eine Mutation wird das Enzym jedoch zu den Mitochondrien fehlgeleitet. Die daraus resultierende Fehlfunktion in den Peroxisomen ist die Ursache für die Entwicklung von Primärer Hyperoxalurie – eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, die sich durch einen fehlenden Metabolismus von Glyoxylat und eine hohe Oxalat-Ausscheidung auszeichnet (39).

Um die subzelluläre Lokalisation von AGXT2 in den Mitochondrien zunächst zu bestätigen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen durchgeführt. Es sollte außerdem untersucht werden, ob die AGXT2-Mutante zu einer veränderten Expression führt. Auf Grund eines fehlenden spezifischen Antikörpers gegen die AGXT2-Variante rs37369 wurden hierfür ebenfalls HEK-Zellen, die die Mutante überexprimieren, verwendet. Zur Kontrolle diente der leere Expressionsvektor pcDNA.

Zunächst sind in Reihe 1 die mit DAPI eingefärbten Zellkerne zu sehen (**Abbildung 3.3**). Die Mitochondrien (Reihe 2) wurden rot und die AGXT2 (Reihe 3) grün markiert. Es ist zu erkennen, dass sich die Mitochondrien, als auch die AGXT2 um den Zellkern herum befanden. Bei der Negativkontrolle war keine Expression der AGXT2 zu erkennen. Bei der Überlagerung der einzelnen Bilder in Reihe 4 wird deutlich, dass die Lokalisation von AGXT2 mit der der Mitochondrien übereinstimmte. Dies bestätigte die Aussage, dass AGXT2 in den Mitochondrien exprimiert wird. Bei Vergleich des AGXT2 Wildtyps mit der Mutante war kein Unterschied zu entdecken. Auch hier war das Protein in den Mitochondrien lokalisiert. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Mutation zumindest auf die Verteilung der AGXT2 innerhalb der Zelle keinen Einfluss zu nehmen scheint.

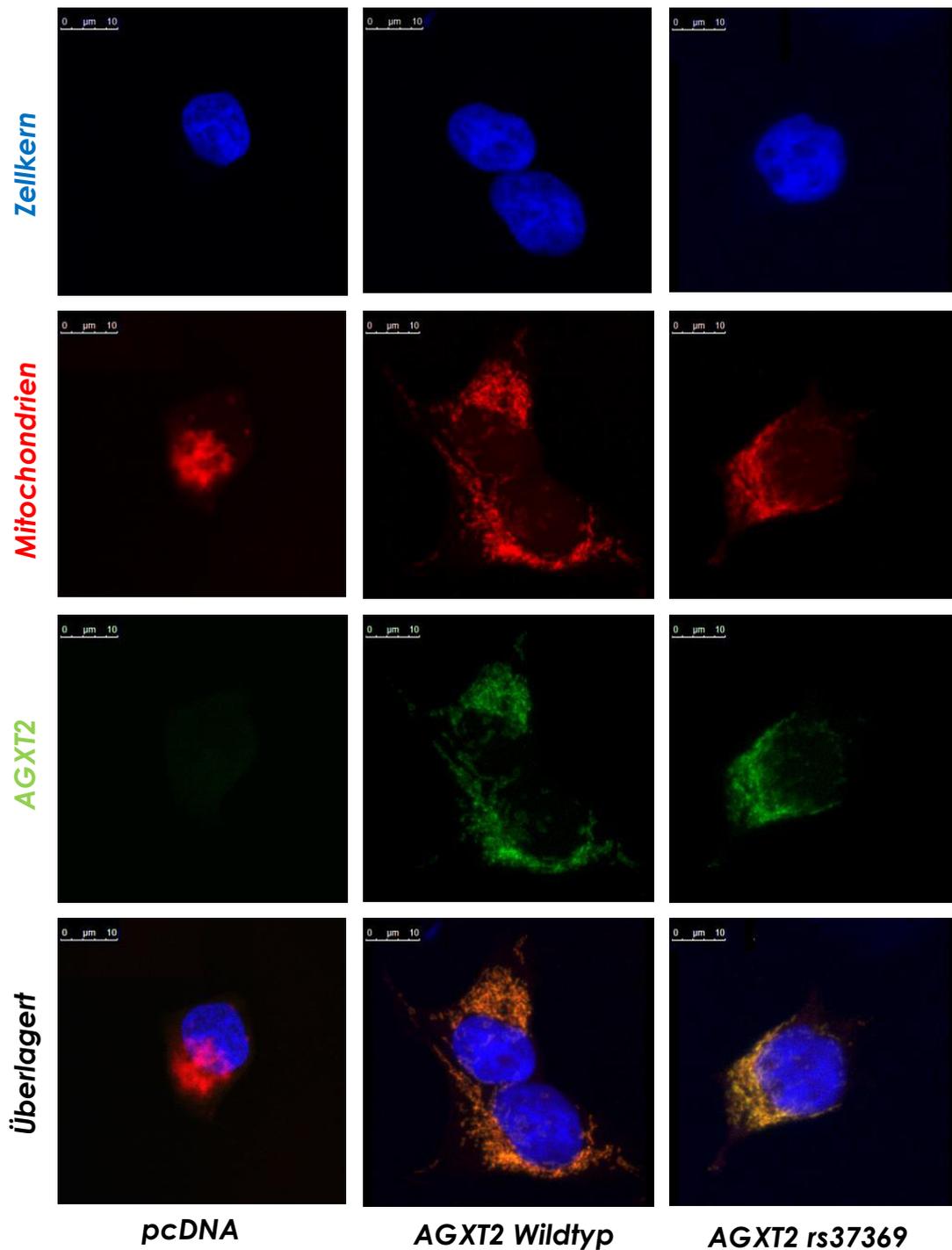


Abbildung 3.3 Subzelluläre Lokalisation der AGXT2 in transfizierten HEK-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung von pcDNA (Kontrollvektor; links), AGXT2-Wildtyp (Mitte) und AGXT2-Variante rs37369 (rechts). Zellkerne sind in blau, Mitochondrien in rot, AGXT2 in grün dargestellt. 10x Vergrößerung.

3.1.2 Proteinquellen der AGXT2

3.1.2.1 Humane rekombinante AGXT2

Um später ein High-Throughput Screening mit der AGXT2 durchführen zu können, wird humanes rekombinantes Protein benötigt. Die Herstellung wurde von der Lebensmittelchemie der Universität Hamburg (Prof. Fischer) durchgeführt. Die in der Arbeit durchgeführten Messungen wurden hauptsächlich mit dem Rohextrakt durchgeführt, da die weitere Entwicklung der rekombinanten Produktion (Löslichkeit und Reinigung) noch nicht abgeschlossen war. Da der zu entwickelnde Aktivitätsassay auch als Grundlage für einen Primär- oder Sekundärassay dienen sollte, wurde die Optimierung der Methode ebenfalls mit dem rekombinanten Protein durchgeführt. Es hatte sich gezeigt, dass das Rohextrakt für die Austestung des Assays ausreichend war. Für die Durchführung eines HTS müsste jedoch erst die Aufreinigung des Proteins erfolgreich durchgeführt werden. Um die Größe des Proteins zu bestimmen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Da das Protein zusätzlich ein 6xHis-Tag zur Aufreinigung beinhaltet, wurde die Bande der AGXT2 auf eine Höhe von ~ 58 kDa anstelle von ~ 52 kDa detektiert (**Abbildung 3.4**).

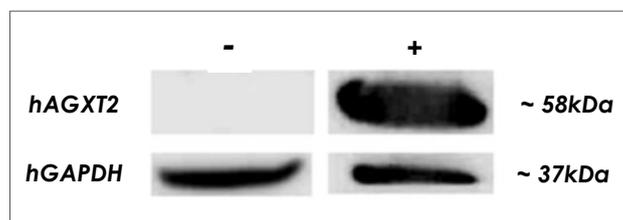


Abbildung 3.4 Identifikation der humanen rekombinant hergestellten AGXT2 (rhAGXT2). Western Blot mit 30 µg Protein. GAPDH (37 kDa) wurde als interne Kontrolle verwendet. Die Bande bei 58 kDa wurde als rhAGXT2 identifiziert.

3.1.2.2 AGXT2-überexprimierende HEK-Zellen und deren Fraktionierung

Da es nicht möglich war rekombinantes Protein der AGXT2-Variante rs37369 zu erhalten, musste für die entsprechenden Versuche eine andere Proteinquelle genommen werden. Daher wurden ebenfalls die HEK-Zellen eingesetzt, die den Wildtyp- oder die Mutante der AGXT2 überexprimierten.

Um die Überexpression des Proteins weiter zu steigern, wurden die Zellen mit Natriumbutyrat induziert. Anfänglich wurde das Protokoll für die Zellkultivierung übernommen und mit 10 mmol/L Natriumbutyrat für 24 h induziert. Da sich die maximale Standardkonzentration von 10 mmol/L Natriumbutyrat jedoch auch hemmend auf die Expression auswirken kann, wurde die Konzentration später auf 2,5 mmol/L und 16 h Inkubation umgestellt. Somit konnte eine maximale Expression erreicht werden. Nach Erhalt der Zellen wurde zunächst die Überexpression der AGXT2-Varianten auf mRNA- und Proteinebene überprüft.

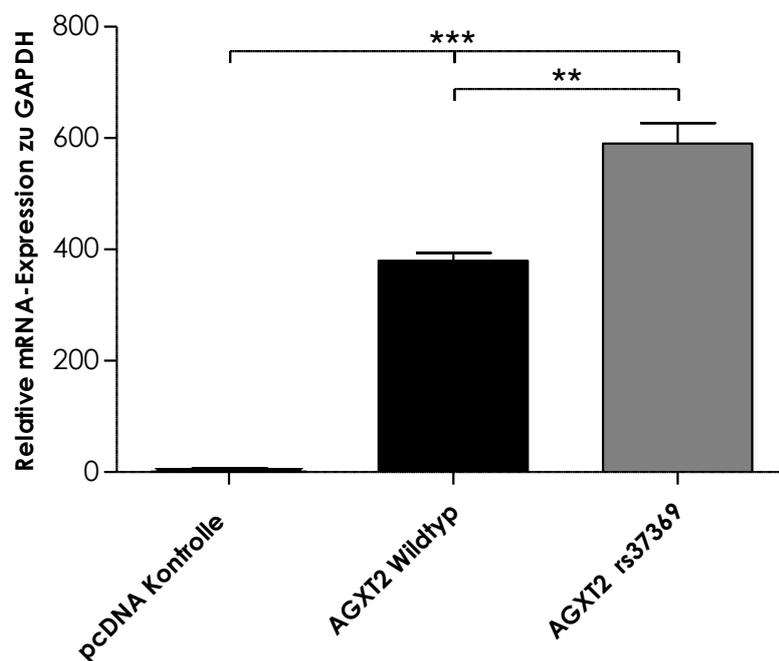


Abbildung 3.5 mRNA-Expressionslevel von AGXT2 in transfizierten HEK-Zellen (Leervektor pcDNA, AGXT2 Wildtyp und AGXT2 rs37369). Real Time-PCR mit GAPDH als interne Kontrolle. $n=3$; 1way ANOVA *** $p<0.0001$.

Abbildung 3.5 zeigt die relative mRNA-Expression der AGXT2 und der Mutante rs37369 in den entsprechenden HEK-Zellen. Das leere Plasmid (pcDNA) diente in allen durchgeführten Experimenten als Negativkontrolle. Es ist zu erkennen, dass die AGXT2 sehr stark überexprimiert wurde. Dabei zeigte jedoch die rs37369-Variante eine noch höhere Expression als der Wildtyp.

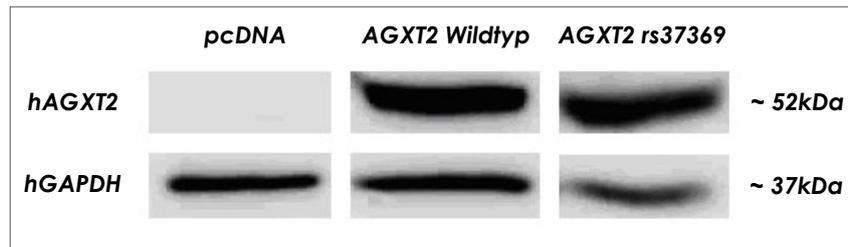


Abbildung 3.6 Western Blot von humaner AGXT2 in transfizierten HEK-Zellen (Leervektor pcDNA, AGXT2-Wildtyp, AGXT2 rs37369). Western Blot mit GAPDH als interne Kontrolle (je 30 µg).

Die Durchführung des Western Blots zeigte, dass beide AGXT2-Varianten auf Proteinebene eine gleiche Expression aufwiesen. In **Abbildung 3.6** ist der Western Blot zu sehen, in dem GAPDH als Kontrollgen bzw. als Ladekontrolle diente. Die Quantifizierung der Bandendichte ist in **Abbildung 3.7** dargestellt. Um eine ungleiche Beladung der Geltaschen bei der Durchführung auszugleichen, wurde das Verhältnis von AGXT2 zu GAPDH ermittelt. AGXT2-Wildtyp und -Mutante zeigten eine 2-fach höhere Proteinexpression im Vergleich zur Negativkontrolle.

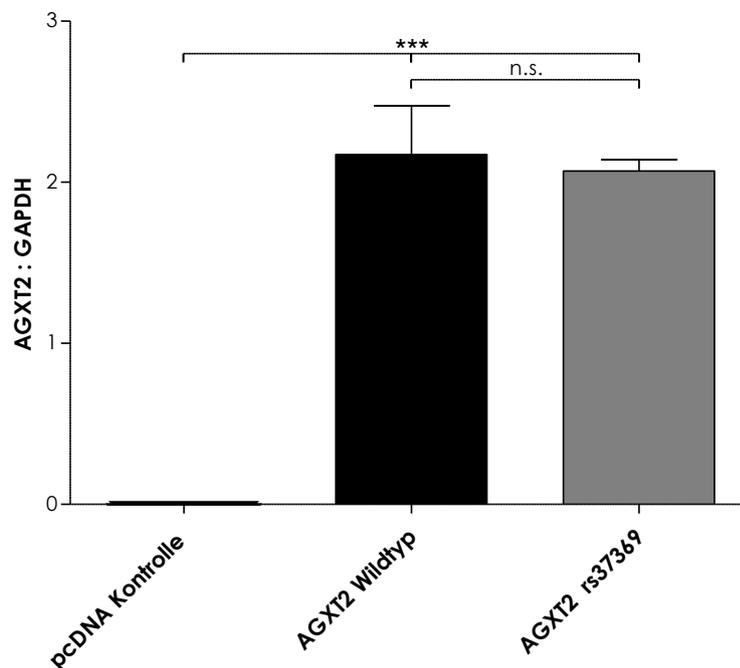


Abbildung 3.7 Quantifizierung des Western Blots der transfizierten HEK-Zellen (Leervektor pcDNA, AGXT2-Wildtyp, AGXT2 rs37369). Die AGXT2-Expression wurde mit GAPDH normiert. n=3; 1way ANOVA mit $p=0.0002$.

Der Einfluss der Mutante sollte jedoch v.a. mit SDMA als Substrat nachgewiesen werden. Der Assay wurde mit Hilfe des natürlichen Substrates LAlanin optimiert, welches eine höhere Affinität zur AGXT2 aufweisen sollte als ein Substrat, das alternativ abgebaut wird. Bisher war noch kein Beweis auf ProteinEbene erbracht worden, dass SDMA ebenfalls durch AGXT2 metabolisiert wird. Es musste bedacht werden, dass die Affinität von SDMA sehr wahrscheinlich eine wesentlich geringere Affinität zum Enzym hat, als das natürliche Substrat. Um sicherzustellen, dass auch ein Substrat mit geringer Affinität detektiert werden kann, wurde reines AGXT2-Protein in hoher Konzentration benötigt. Dadurch konnte im Falle einer fehlenden Enzymaktivität mit SDMA ein falsch-negatives Ergebnis seitens der Reaktionsbedingungen (zu geringe Proteinkonzentration) ausgeschlossen werden.

Da die AGXT2 in den Mitochondrien exprimiert wird, wurde eine Anreicherung der Mitochondrien und Nuklei mit einer gleichzeitigen Aufreinigung durchgeführt. Das Ergebnis hängt stark von dem Zelltyp, und v.a. der Lysierungsmethode ab. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Mitochondrien-Isolierung bei jedem Zelltyp optimal funktioniert. Da die Mitochondrien- und die Nukleusfraktion dennoch von anderen störenden Zellkompartimenten (Zytosol) und den darin enthaltenen Proteinen getrennt und durch zusätzliche Waschschrte weiter aufgereinigt werden konnte, konnten beide Fraktionen als Proteinquelle für den Assay genutzt werden. Ob die Mitochondrien -oder die Nukleusfraktion verwendet wurde, war in diesem Fall somit unbedeutend. Die Fraktionierung wurde mit den HEK-Zellen durchgeführt, die den Wildtyp oder die Mutante der AGXT2 überexprimierten. Der Western Blot in **Abbildung 3.8** zeigt die Mitochondrien-Fraktion einer erfolgreich durchgeführten Isolierung. Der COX IV-Antikörper diente als Mitochondrien-Marker (COX IV ist Bestandteil der inneren Mitochondrien-Membran).

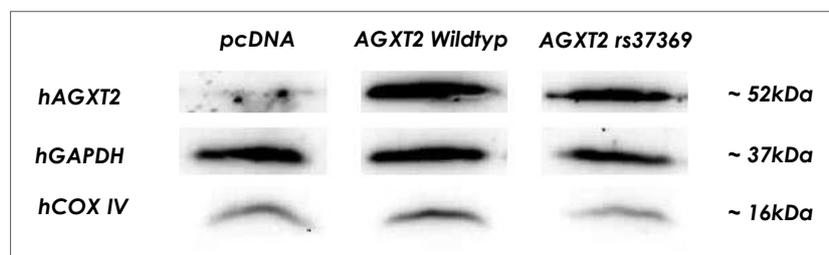


Abbildung 3.8 Western Blot. AGXT2-Proteingehalt in der Mitochondrienfraktion, hergestellt aus den AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen (Kontrolle pcDNA, AGXT2-Wildtyp, AGXT2-Variante rs37369). Western Blot mit GAPDH als interne Ladungskontrolle und COX IV als Mitochondrienmarker (je 30 µg).

Als später eine geeignete SDMA-Konzentration gefunden wurde, konnte die Messung mit SDMA dann auch mit Zell-Lysat ausgetestet werden, da die Herstellung von Lysat einfacher und weniger zeitintensiv war.

3.1.3 AGXT2-Aktivitätsassay

3.1.3.1 Der Methode zugrunde liegende Mechanismus

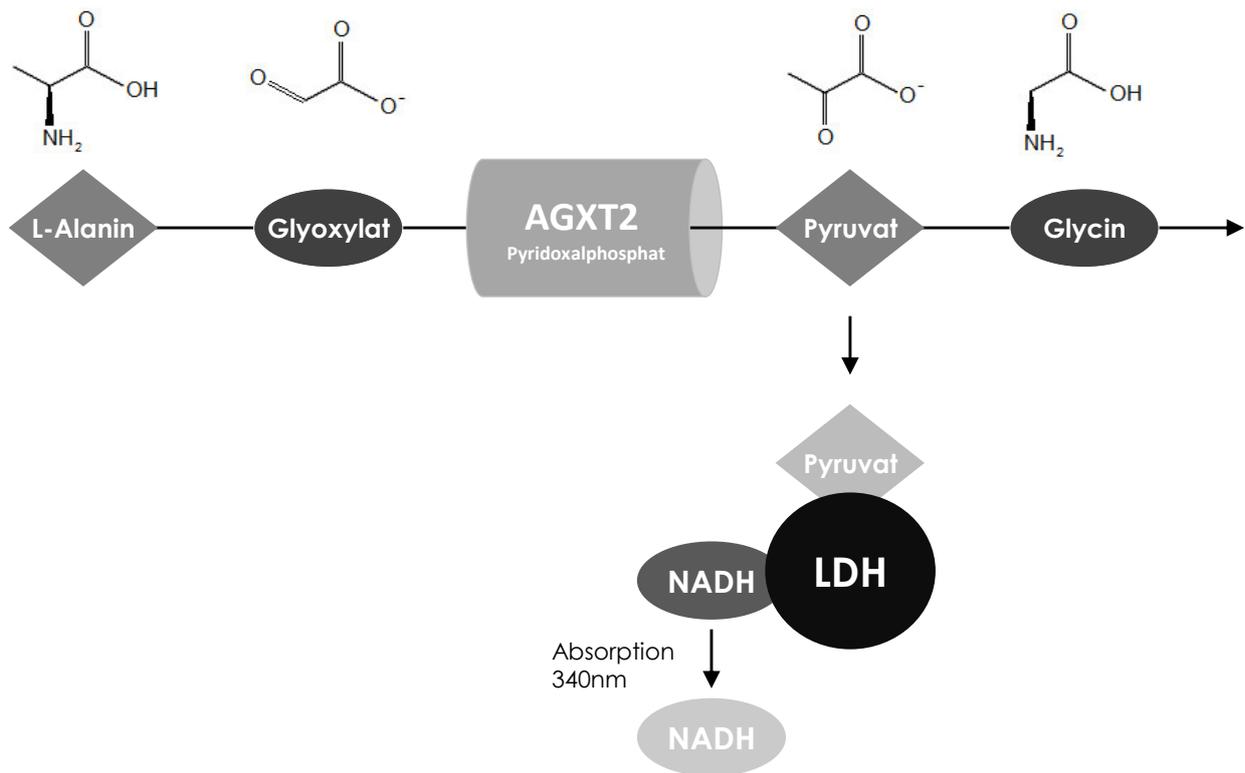


Abbildung 3.9 Schematische Darstellung des AGXT2-Assays mit L-Alanin als Substrat. Die Reaktion von L-Alanin mit Glyoxylat als Amino-Akzeptor ist an eine Indikatorreaktion mit LDH und NADH gekoppelt. Absorptionsmessung des Umsatzes von NADH bei 340 nm. LDH = Laktat-Dehydrogenase.

Bei der Messmethode handelt es sich um einen gekoppelten optisch-enzymatischen Assay (**Abbildung 3.9**). Die Messung der Aktivität erfolgt dabei durch Detektion des während der enzymatischen Reaktion gebildeten Produktes. Bei der Metabolisierung von L-Alanin durch AGXT2 erfolgt eine Transaminierung auf den Amino-Akzeptor Glyoxylat. Pyridoxalphosphat agiert als Co-Faktor der AGXT2. Durch die

Desaminierung von L-Alanin entsteht Pyruvat, das im zweiten Schritt durch die angeknüpfte Indikatorreaktion detektiert wird. Durch die Aufnahme der Aminogruppe erfolgt aus Glyoxylat die Bildung von Glycin als Nebenprodukt. Das im Jahre 1936 vom Nobelpreisträger Otto H. Warburg erfundene Messprinzip der nachgeschalteten Indikatorreaktion basiert auf NAD⁺-abhängigen Oxidoreduktasen, in diesem Fall der Lactat-Dehydrogenase (LDH). LDH baut Pyruvat zu Laktat um. Dabei wird im gleichen stöchiometrischen Verhältnis NADH zu NAD⁺ oxidiert. Im Gegensatz zu NAD⁺ zeigt NADH ein Absorptionsmaximum bei 340 nm. Durch den Verbrauch von NADH nimmt somit die Absorption ab. Je mehr Pyruvat im Ansatz enthalten ist, desto mehr wird von dem Co-Substrat verbraucht. Dies ist durch eine größere negative Steigung der Absorption während der kinetischen Messung erkennbar. Da Glyoxylat ebenfalls ein Substrat der LDH ist, kann die enzymatische- und Indikatorreaktion nicht parallel in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Stattdessen erfolgt im ersten Schritt allein die Bildung des Produkts. Nach Inaktivierung des Enzyms und Entfernung des verbleibenden Edukts mit Tris-Lösung erfolgt anschließend im zweiten Schritt eine kontinuierliche, über einen definierten Zeitraum erfolgende Absorptionsmessung des Produkts durch Messung von NADH.

3.1.3.2 Etablierung und Optimierung des Assays

Ausgangspunkt des zu etablierenden Assays waren verschiedene Veröffentlichungen (35, 140, 162, 165, 191), die bereits die Aktivität der AGXT2 mit L-Alanin als Substrat gemessen hatten.

Erfahrungsgemäß können die Ergebnisse einer Methode in verschiedenen Laboren bedingt durch unterschiedliche Bedingungen, Materialien und durchführender Person zum Teil stark voneinander abweichen. Des Weiteren wurden mit dem optischen Assay bisher nur Homogenate unterschiedlicher Gewebe als AGXT2-Pool verwendet (Leberhomogenat von tgAGXT2-Mäusen, Nieren -oder Leberhomogenate von Ratte, Affe oder Schwein).

Aus diesem Grund musste zunächst der Assay im eigenen Labor etabliert werden. Anfangs wurden verschiedene Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner empirisch getestet. Nachdem die Aktivität erstmals erfolgreich gemessen werden

konnte, erfolgte die Optimierung der Versuchsbedingungen. Die unterschiedlich eingesetzten Proteinquellen (rhAGXT2, Fraktionen, Zell-Lysate) und deren Chargen wurden vor Nutzung der jeweiligen Fragestellung mit dem Assay getestet und mit der vorherigen Charge verglichen. Die eingesetzten Proteinmengen wurden demnach aneinander angepasst, so dass die Aktivität des Enzyms durchgehend konstant war. So konnten die ermittelten Bedingungen während der Optimierung (z.B. Konzentrationen der Substrate) auch auf die nächste Charge übertragen werden.

3.1.3.2.1 Vergleich verschiedener Negativkontrollen

Bei der Verwendung von rekombinanten Proteinen in enzymatischen Assays werden Negativkontrollen verwendet, die entweder kein Enzym, kein Substrat oder inaktiviertes Protein enthalten. Jede Negativkontrolle verhält sich jedoch nicht wie die andere, da Interaktionen zwischen den Reaktionspartnern zu einer veränderten Absorption führen können. Aus diesem Grund war es zunächst wichtig die für diesen Assay zuverlässigste Negativkontrolle zu finden.

In **Abbildung 3.10** ist eine Gegenüberstellung der aus den kinetischen Messungen ermittelten Steigungen gezeigt. Mit allen getesteten Negativkontrollen konnten im Vergleich zur Positivkontrolle signifikante Unterschiede gemessen werden. Die Inaktivierung des Proteins durch Hitze oder dessen komplette Abwesenheit zeigten vergleichbare Werte, wohingegen die Abwesenheit von L-Alanin mehr Einfluss auf die Absorptionsmessung hatte. Um zu verhindern, dass falsch-positive Ergebnisse erzielt werden, wurde die Entscheidung getroffen die „aktivste“ Negativkontrolle (ohne L-Alanin) für darauf folgende Messungen zu verwenden. In **Abbildung 3.11** ist der Verlauf der kinetischen Messung am Beispiel der ausgewählten Negativkontrolle über einen Zeitraum von 20 Minuten abgebildet (zu sehen ist die aus allen Proben gemittelte Gerade). Der Unterschied der beiden Steigungen war signifikant. Für die Analysierung von **Abbildung 3.10** wurden die einzelnen Steigungen (Absorption pro Minute) jeder Probe ermittelt.

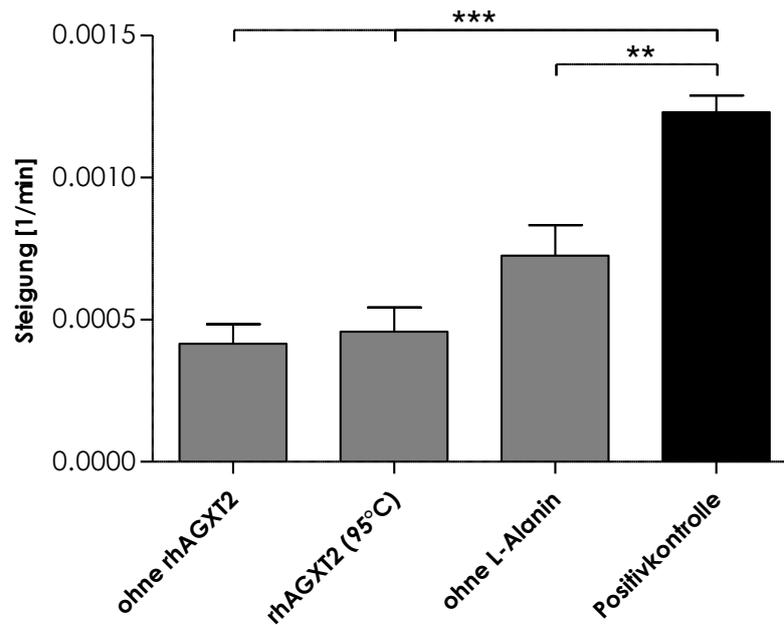


Abbildung 3.10 Vergleich unterschiedlicher Negativkontrollen für den AGXT2-Assay (Von links: ohne rhAGXT2, durch Hitze inaktivierte rhAGXT2, ohne L-Alanin, Positivkontrolle). Es wurden die Steigungen (1/min) aus der kinetischen Absorptionsmessung (aus unterer Abbildung) ermittelt. Die Negativkontrolle ohne L-Alanin wurde für weitere Assays eingesetzt. $n=3$; 1way ANOVA *** $p=0.0004$.

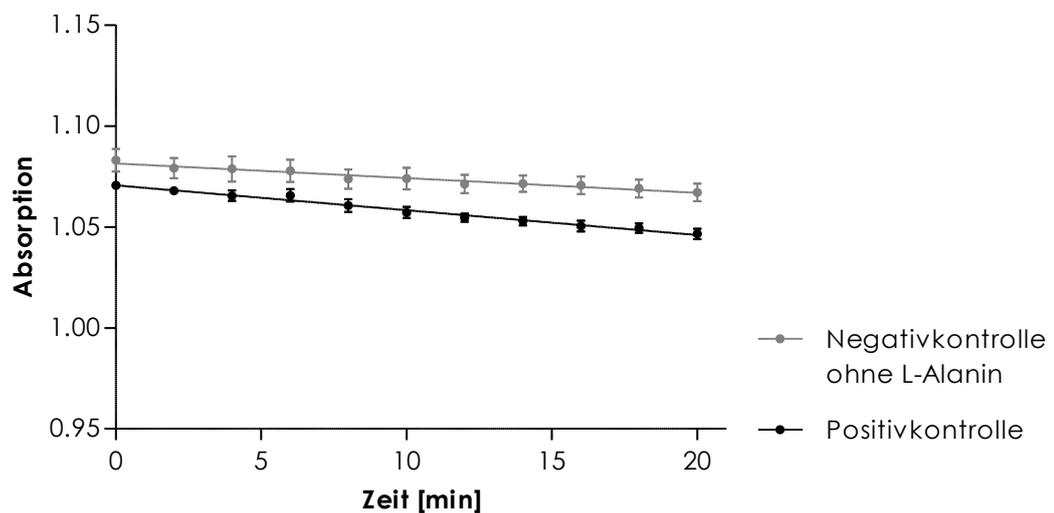


Abbildung 3.11 AGXT2-Assay in 120 μl Reaktionsvolumen (0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ rhAGXT2, 2 mmol/L L-Alanin, 0,45 mmol/L Glyoxylat, 0,05 mmol/L PLP in PBS). Kinetische Messung der Absorption von NADH bei 340 nm über einen Zeitraum von 20 Minuten. $n=3$; Lineare Regression mit $p=0.0279$.

3.1.3.2.2 Volumenreduktion des Reaktionsansatzes

Bei High-Throughput Screenings erfolgt die Durchführung der Reaktion in einem Wellformat mit sehr geringem Reaktionsvolumen, da eine Vielzahl an *Compounds* parallel gemessen werden muss. Durch die Menge an Messungen besteht außerdem ein hoher Bedarf an Material. Die Einsparung an Ressourcen ist daher ein wesentliches Argument für eine Reduzierung des Reaktionsvolumens. Während der Etablierung des Assays wurde der erste Schritt der Reaktion in Eppendorf-Tubes im 120 μ l-Format durchgeführt und erst anschließend für die kinetische Messung auf die Wellplatte überführt. Mit dem Ziel diese Reaktion später ebenfalls in der Wellplatte durchführen zu können, wurde das Reaktionsvolumen auf 30 μ l reduziert (**Abbildung 3.12**).

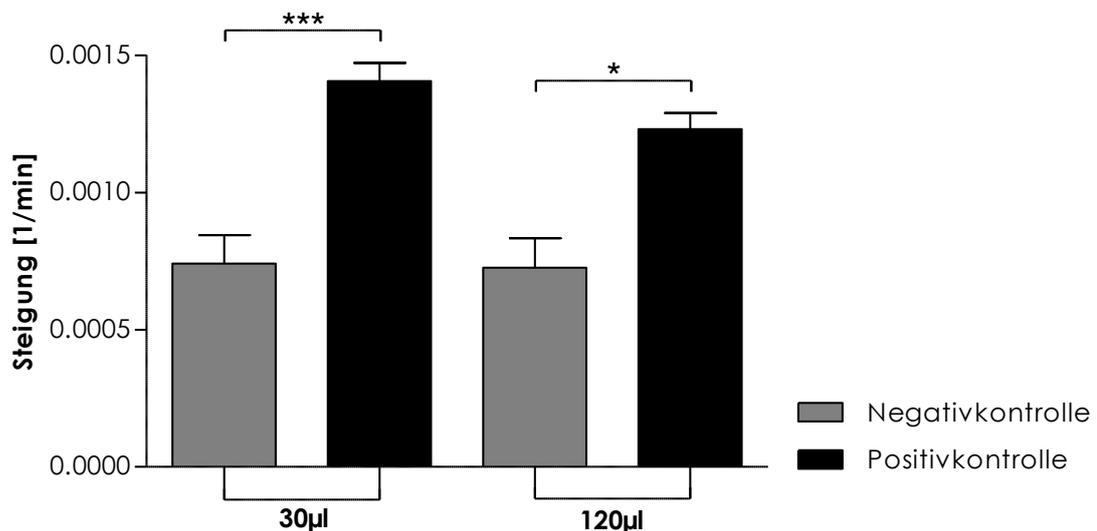


Abbildung 3.12 Volumenreduktion des Reaktionsansatzes von 120 μ l auf 30 μ l des AGXT2-Assays (0,7 μ g/ μ l rhAGXT2, 10 mmol/L L-Alanin, 2,5 mmol/L Glyoxylat, 0,35 mmol/L PLP in PBS im 30 μ l-Format). Vergleich der Steigungen (1/min), die aus der kinetischen Absorptionsmessung von NADH ermittelt wurden. In der Negativkontrolle ist kein L-Alanin enthalten. $n(30\mu\text{l})=7$, $n(120\mu\text{l})=3$; t-Test mit *** $p=0.0002$ (30 μ l) und * $p=0.015$ (120 μ l).

Durch Beibehaltung der Proteinkonzentration, aber gleichzeitiger Erhöhung der Konzentrationen der Reaktionspartner im 30 μ l-Format konnte Protein gespart werden. Außerdem konnte ein gutes „Signal-Rausch-Verhältnis“ erreicht werden, da die Positivkontrolle eine ca. 2-fach höhere Steigung aufwies als die Negativkontrolle.

Nach Abzug der Negativ- von der Positivkontrolle konnte kein signifikanter Unterschied zum 120 μ l-Format festgestellt werden (**Abbildung 3.13**). Das Reaktionsvolumen konnte somit unbedenklich auf 30 μ l reduziert werden.

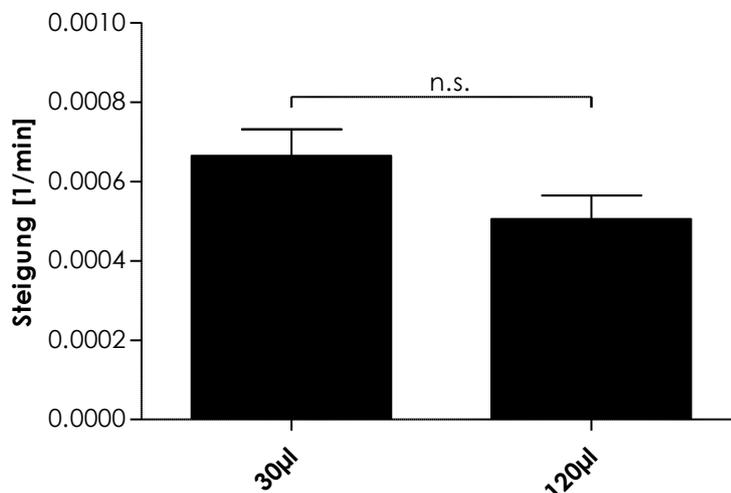


Abbildung 3.13 Direkter Vergleich der Steigungen (1/min) des AGXT2-Assays mit 30 μ l und 120 μ l Reaktionsvolumen basiert auf der Negativkontrolle ohne L-Alanin (aus obiger Abbildung). $n(30\mu\text{l})=7$, $n(120\mu\text{l})=3$; t-Test mit $p=0.1899$.

3.1.3.2.3 Substratkonzentrationen

3.1.3.2.3.1 Glyoxylat als Aminogruppen-Akzeptor

Es wurde eine Konzentrationsreihe mit Glyoxylat aufgestellt (**Abbildung 3.14**), um sicherzustellen, dass es in ausreichendem Maße im Reaktionsansatz vorliegt. Die Produktion von Pyruvat durch AGXT2 konnte mit höheren Glyoxylat-Konzentrationen gesteigert werden, was durch eine höhere Steigung erkennbar ist. Bei einer Konzentration von ≥ 10 mmol/L Glyoxylat näherte sich die Reaktion einem Plateau an, bei der das Enzym gesättigt vorliegt. Die Konzentration von Glyoxylat wurde für die darauf folgenden Messungen daher auf 10 mmol/L festgelegt. Es konnte eine Michaelis-Menten-Konstante K_m von $0,96 \text{ mmol/L} \pm 0,16 \text{ mmol/L}$ und eine V_{\max} von $0,001 \text{ 1/min} \pm 5,716\text{e-}005 \text{ 1/min}$ mit Glyoxylat gemessen werden.

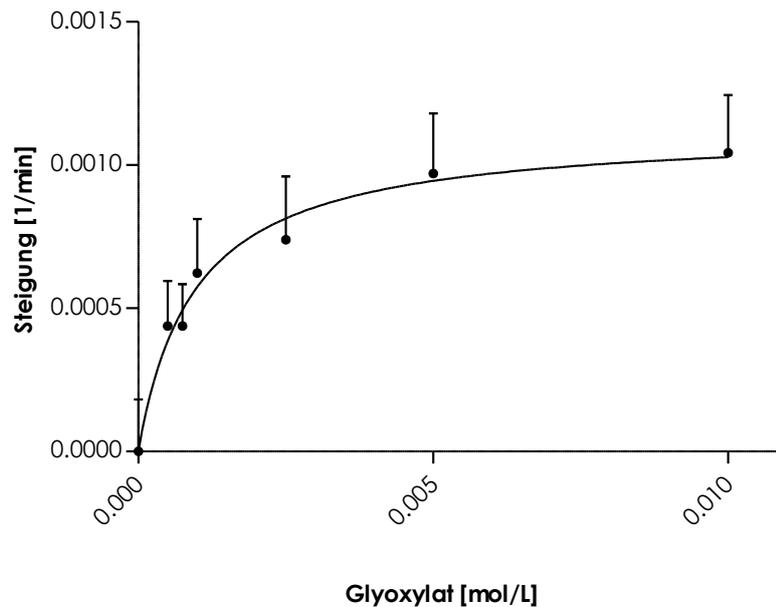


Abbildung 3.14 Ermittlung der Mindestkonzentration von Glyoxylat als Amino-Akzeptor durch Aufstellung einer Konzentrationsreihe mit dem AGXT2-Assay (0,37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ rhAGXT2, 0-10 mmol/L Glyoxylat, 10 mmol/L L-Alanin, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP in PBS). Die aus den kinetischen Messungen ermittelten Steigungen (1/min) wurden gegen die Konzentrationen (mol/L) aufgetragen (Nicht-lineare Regression). $n=3$; $R^2:0.9819$.

3.1.3.2.3.2 L-Alanin als Aminogruppen-Donator

Im Verlauf der Entwicklung wurden neben der Konzentration von Glyoxylat weitere Bedingungen überprüft, um maximale Effekte zu erzielen. Unter anderem wurde die Konzentration des Co-Faktors PLP auf 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ erniedrigt, da sich höhere Konzentrationen hemmend auf die Absorptionsmessung ausgewirkt hatten. Des Weiteren konnte die Reaktion weiter verbessert werden, indem auf HEPES-Puffer umgestellt wurde. Dieser nimmt kaum Einfluss auf die Enzymmessung und vor allem findet keine Komplexbildung zweiwertiger Ionen statt. Daraufhin wurde der Assay außerdem auf die in enzymatischen Assays üblichen Zusätze (DTT⁶⁸, EDTA, zweiwertige Ionen) geprüft. Obwohl die Komplexbildung von Ionen die Reaktion etwas abmilderten, konnte der Zusatz an Ionen keine Verbesserung herbeiführen. Da die Zusätze keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktion hatten, wurde auch weiterhin darauf verzichtet. Am Ende der Optimierung musste nun die Reaktion des eigentlichen Substrats L-Alanin an die Bedingungen angepasst werden.

⁶⁸ Dithiothreitol

3.1.3.2.3.2.1 Absorptionsmessung von L-Alanin mit Mitochondrienfraktion

Zunächst wurde der Assay mit der ursprünglichen L-Alanin-Konzentration von 10mmol/L mit dem neuen AGXT2-Pool (Mitochondrienfraktion) ausgetestet. In **Abbildung 3.15** ist der kontinuierliche Verlauf der Indikatorreaktion zu sehen.

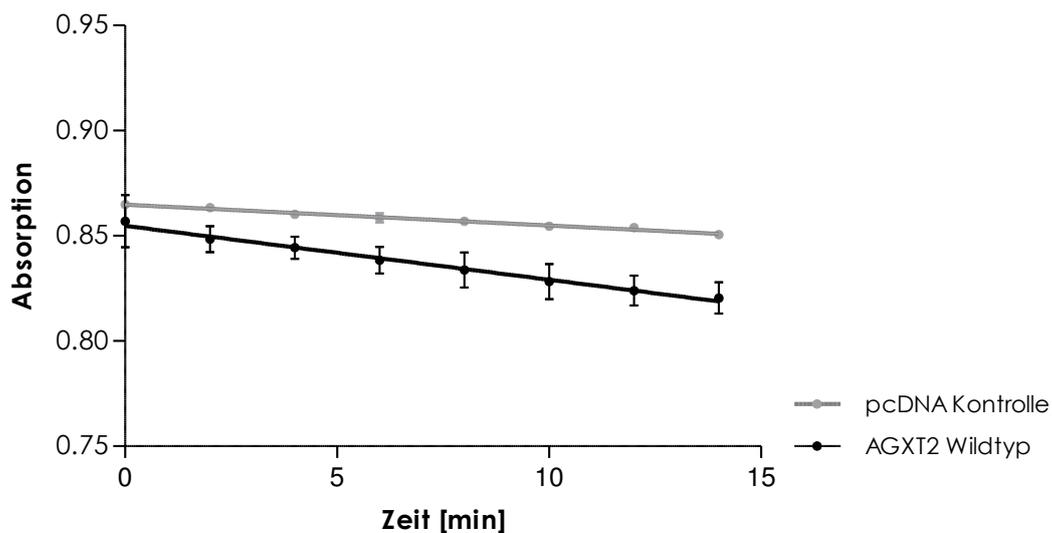


Abbildung 3.15 Kinetische Absorptionsmessung des AGXT2-Aktivitätsassays mit der Mitochondrienfraktion, isoliert aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen (0,3 µg/µl Protein, 10 mmol/L L-Alanin und Glyoxylat, 50 µmol/L PLP in HEPES-Puffer). Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die mit einem Kontrollplasmid (pcDNA) transfiziert wurden. Absorptionsabfall der Positivkontrolle (AGXT2 Wildtyp) im Vergleich zur Negativkontrolle (pcDNA). $n(\text{pcDNA})=3$, $n(\text{AGXT2 Wildtyp})=3$; Lineare Regression mit $p=0.0052$.

Die Gerade der Positivkontrolle zeigte einen steileren Verlauf als die Negativkontrolle. Der Unterschied beider Geraden war signifikant. Für den direkten Vergleich wurden die Steigungen der einzelnen Geraden ermittelt und **Abbildung 3.16** als Balkendiagramm dargestellt.

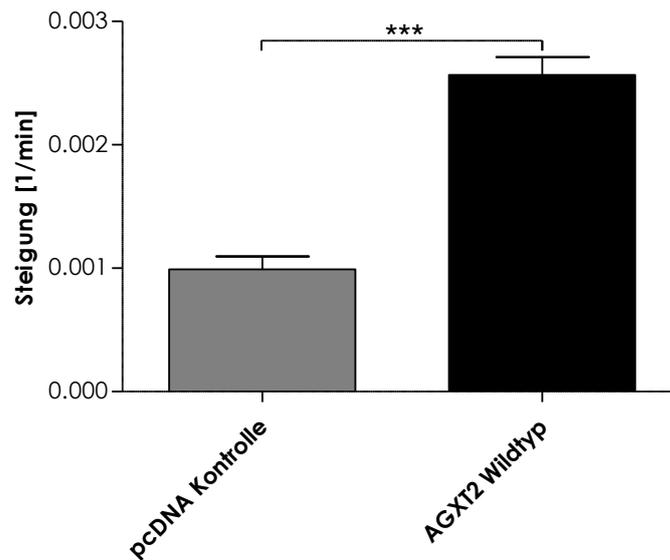


Abbildung 3.16 Vergleich der ermittelten Steigungen (1/min) aus obiger Abbildung. $n(\text{pcDNA})=3$, $n(\text{AGXT2 Wildtyp})=3$; t-Test mit $***p=0.0009$.

Man kann erkennen, dass der Unterschied zwischen Negativ- und Positivkontrolle auch mit der Mitochondrienfraktion stark ausgeprägt war. Die Positivkontrolle wies eine mehr als 2-fach größere Steigung auf, so dass eine gute Unterscheidung zur Negativkontrolle gewährleistet war.

3.1.3.2.3.2.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m mit Mitochondrienfraktion

Mit dem optimierten Assay wurde zu allerletzt eine Konzentrationsreihe von L-Alanin durchgeführt. Es wurden Konzentrationen von 0 mmol/L bis 200 mmol/L vermessen. Mit den aus den kinetischen Messungen erhaltenen Steigungen wurde dann die Michaelis-Menten-Kurve (**Abbildung 3.17**).

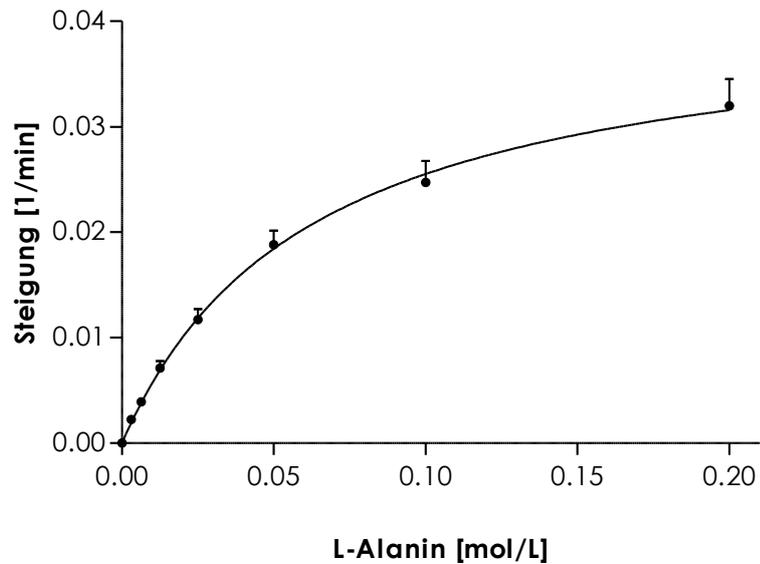


Abbildung 3.17 Messung einer Substrat-Sättigungskurve von L-Alanin und der Mitochondrienfraktion (isoliert aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen) mit dem fertigen Assayformat (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein, 0-200 mmol/L L-Alanin, 10 mmol/L Glyoxylat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die aus den kinetischen Messungen ermittelten Steigungen (1/min) wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen von L-Alanin (mol/L) aufgetragen und eine Nicht-lineare Regression durchgeführt. $n=4$; $R^2:0,9988$.

Es konnte eine K_m von $62,32 \text{ mmol}/\text{L} \pm 3,45 \text{ mmol}/\text{L}$ mit einer V_{max} von $0,04 \text{ 1}/\text{min} \pm 0,001 \text{ 1}/\text{min}$ gemessen werden.

3.1.3.2.3.2.3 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m mit Zell-Lysat

Da die Herstellung von Zell-Lysat weitaus einfacher und schneller ist, wurde dessen Nutzung als Proteinquelle für die Aktivitätsmessung der Substrate und der Mutante im späteren Verlauf angestrebt. Daher wurde die L-Alanin-Konzentrationsreihe und die Bestimmung der K_m ebenfalls mit Zell-Lysat durchgeführt (**Abbildung 3.18**).

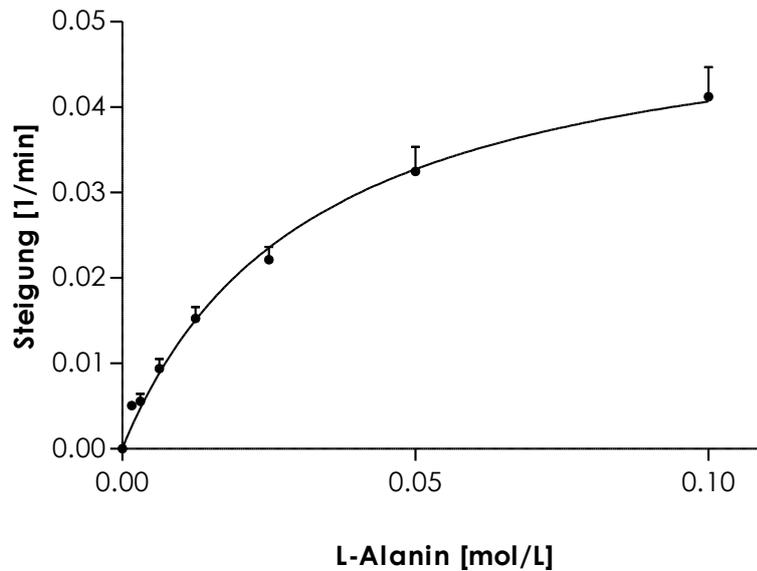


Abbildung 3.18 Messung einer Substrat-Sättigungskurve von L-Alanin und Zell-Lysat – hergestellt aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen – mit dem fertigen Assayformat (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein, 0-200 mmol/L L-Alanin, 10 mmol/L Glyoxylat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die ermittelten Steigungen (1/min) wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen von L-Alanin aufgetragen und eine Nicht-lineare Regression durchgeführt. $n=5$; $R^2:0.9934$.

Hier wurde eine K_m von 32,06 mmol/L \pm 4,08 mmol/L und eine V_{max} von 0,05 1/min \pm 0,003 1/min gemessen. Die K_m -Konstanten beider AGXT2-Pools zeigten ähnliche Werte (die Abweichung darf nicht das 10-fache übersteigen). Für die spätere Messung mit der AGXT2-Mutante wurde die Konzentration von L-Alanin vorerst auf einen Wert von 60 mmol/L (entspricht dem ermittelten K_m -Wert) festgelegt. Mit Festlegung der Substratkonzentration war die Etablierung des Assays somit abgeschlossen. Dieser stellt den Grundstock für die Entwicklung des Primär- oder Sekundärassays dar.

3.1.3.3 SDMA als Substrat der AGXT2

3.1.3.3.1 Der Reaktion zugrunde liegende Mechanismus

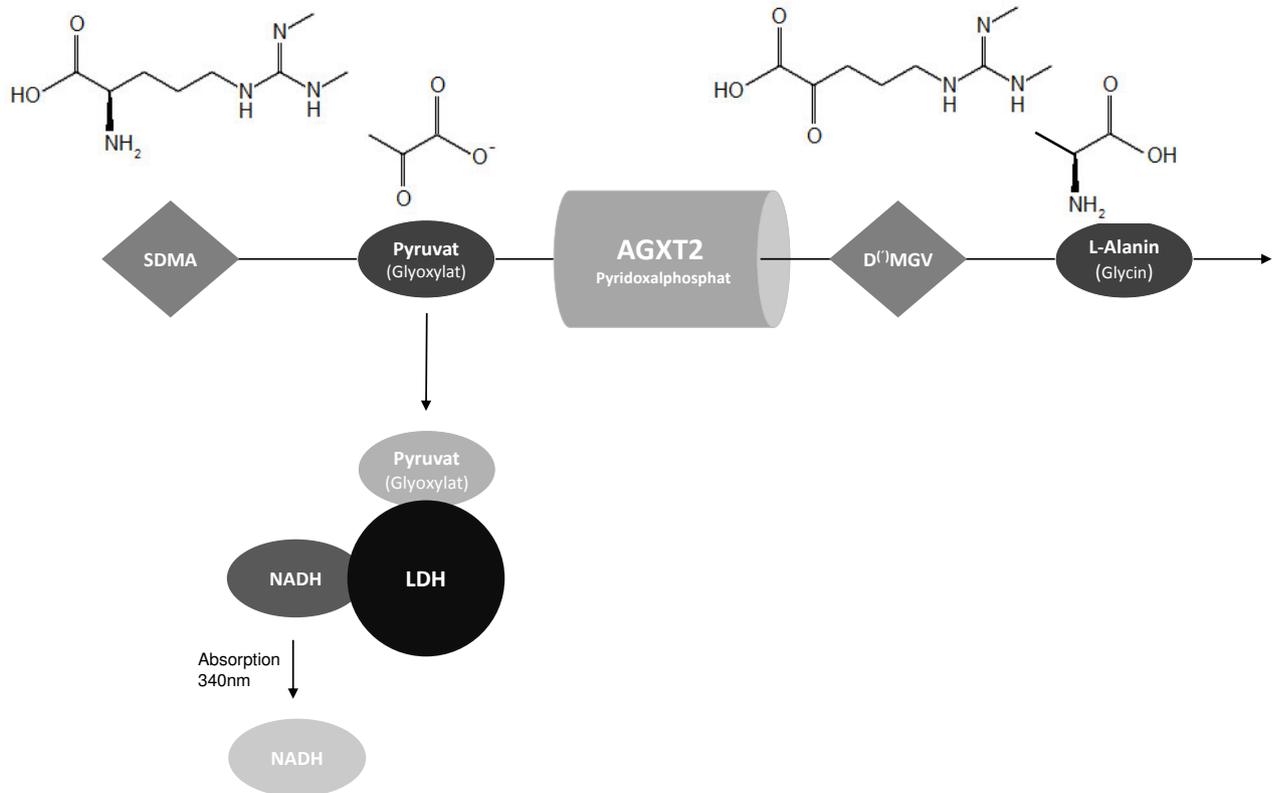


Abbildung 3.19 Schematische Darstellung des AGXT2-Assays mit SDMA als Substrat. Die Reaktion von SDMA mit Glyoxylat oder Pyruvat als Amino-Akzeptor ist ebenfalls an die Indikatorreaktion mit LDH und NADH gekoppelt. Im Gegensatz zu L-Alanin wird hier die verbleibende Menge des Amino-Akzeptors durch die kinetische Absorptionsmessung von NADH bei 340 nm detektiert. LDH = Laktat-Dehydrogenase, D'MGV = α -Keto- δ -(N',N-dimethylguanidino)-valeriansäure.

Nach Optimierung des AGXT2-Aktivitätsassays stand das eigentliche Ziel – der Nachweis der Metabolisierung von SDMA durch AGXT2 – bevor. Hierzu musste der Assay abgewandelt werden (**Abbildung 3.19**). Die Problematik war, dass bei der Übertragung der Aminogruppe von SDMA auf einen Amino-Akzeptor kein Pyruvat entsteht. Durch die Desaminierung entsteht aus SDMA ein Abkömmling der Valeriansäure, das bereits durch Ogawa et al. (137) beschrieben wurde. Bei der Reaktion mit Glyoxylat würde durch Aufnahme der Aminogruppe Glycin entstehen. Es wurde ebenfalls von Ogawa beschrieben, dass Dimethylarginine neben Glyoxylat

auch eine hohe Aktivität mit Pyruvat als Amino-Akzeptor zeigen. L-Alanin hingegen kann nur mit Glyoxylat enzymatisch abgebaut werden. Mit Pyruvat als Edukt würde durch die Transaminierung die Aminosäure L-Alanin entstehen. Im Assay mit SDMA wurde im zweiten Schritt somit das verbleibende Edukt (Glyoxylat oder Pyruvat), welches im ersten Schritt nicht durch die AGXT2 abgebaut wurde, detektiert. Durch Subtraktion der eingesetzten Ausgangsmenge von der gemessenen verbliebenen Menge, konnte die verbrauchte Menge berechnet werden. Somit konnte in einer *indirekten* Weise der Abbau von SDMA nachgewiesen werden. SDMA und Glyoxylat bzw. Pyruvat werden dabei im gleichen stöchiometrischen Verhältnis (1:1) abgebaut. Bei der kinetischen Messung ist jedoch darauf zu achten, dass die Kurven im Vergleich zur Produktmessung *entgegengesetzt* verlaufen. Je aktiver das Enzym ist, desto weniger Edukt sollte am Ende der Reaktion übrig bleiben bzw. detektiert werden. Demnach sollte die Gerade der Positivkontrolle weniger steil verlaufen als die der Negativkontrolle. Da hier die beiden Substrate der LDH nicht nebeneinander vorliegen, konnte auf die Zugabe von Tris verzichtet werden.

3.1.3.3.2 Abbau von SDMA durch die AGXT2

Pyruvat zeigte im Vergleich zu Glyoxylat eine höhere relative Affinität zur AGXT2 (Pyruvat 93% und Glyoxylat 77%) (137) und wurde daher für die Experimente verwendet. Durch Austestung unterschiedlicher SDMA-Konzentrationen mit der aufgereinigten AGXT2-Fraktion konnte letztendlich der Abbau von SDMA durch AGXT2 auf Protein-Ebene gemessen werden. In **Abbildung 3.20** ist der Verlauf der nachgeschalteten Indikatorreaktion zu sehen.

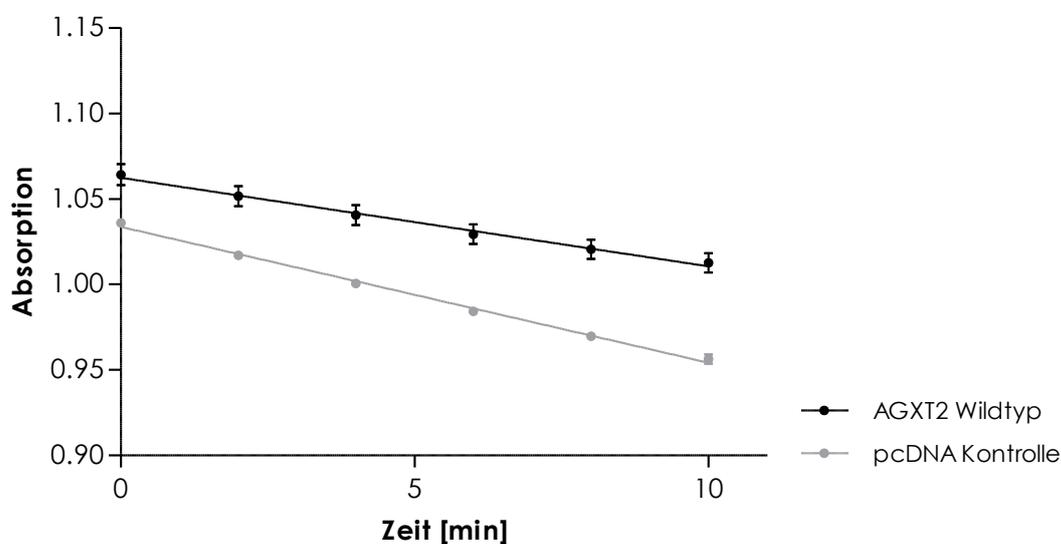


Abbildung 3.20 Kinetische Absorptionsmessung des AGXT2-Aktivitätsassays mit SDMA und aufgereinigter Nukleusfraktion, isoliert aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen (1,7 µg/µl Protein, 20 mmol/L SDMA und 0,5 mmol/L Pyruvat, 50 µmol/L PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Absorptionsabfall der Positivkontrolle (AGXT2 Wildtyp) im Vergleich zur Negativkontrolle (pcDNA). n=6; Lineare regression mit ***p>0.0001.

Hier zeigte die Negativkontrolle einen steileren Verlauf als die Positivkontrolle. Demnach war in der Negativkontrolle mehr Pyruvat enthalten. Dies bedeutet, dass in der Positivkontrolle signifikant mehr Pyruvat bzw. indirekt mehr SDMA verbraucht wurde. Beim Vergleich der Steigungen ist ein großer Unterschied zur Negativkontrolle erkennbar (**Abbildung 3.21**).

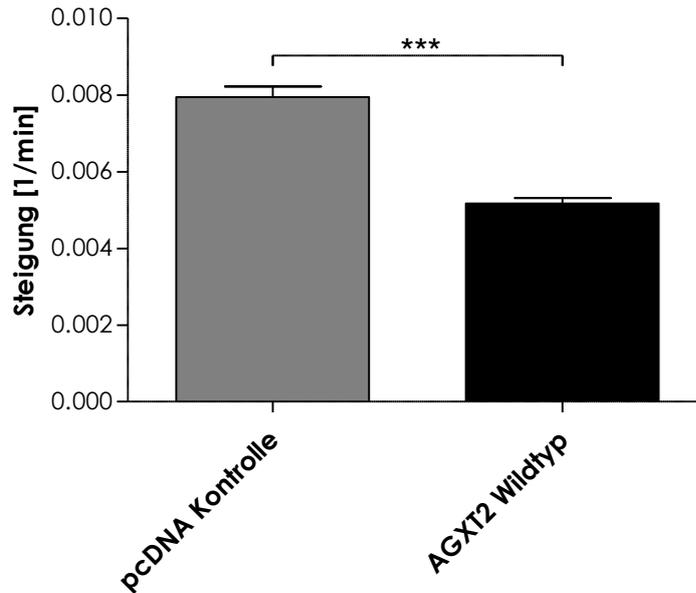


Abbildung 3.21 Vergleich der Positiv- und Negativkontrolle (AGXT2 Wildtyp und pcDNA) mit SDMA als Substrat. Ermittlungen der Steigungen (1/min) aus den kinetischen Messungen aus obiger Abbildung $n=6$; t-Test mit $***p<0.0001$.

3.1.3.3.3 Vergleich der Umsätze zwischen den Dimethylargininen SDMA und ADMA

In der durchgeführten GWAS konnte zwar eine Assoziation zwischen SDMA und AGXT2 auf genetischer Ebene erbracht, ein Zusammenhang zu ADMA konnte jedoch nicht festgestellt werden. Da sich SDMA und ADMA strukturell beinahe identisch sind, liegt dennoch die Vermutung nahe, dass auch ADMA durch AGXT2 abgebaut wird. Andererseits ist bekannt, dass ADMA zum Großteil durch die DDAH abgebaut wird. Man könnte die Schlussfolgerung ziehen, dass ADMA entweder nicht oder nur zu einem geringeren Maß durch AGXT2 abgebaut wird. Rodionov (162) wies schließlich als Erster nach, dass auch ADMA Substrat der Aminotransferase ist. Nach der erfolgreich durchgeführten Messung mit SDMA, wurde mit Hinblick der kontroversen Informationen ein Vergleich des Abbaus von SDMA und ADMA durchgeführt (**Abbildung 3.22**).

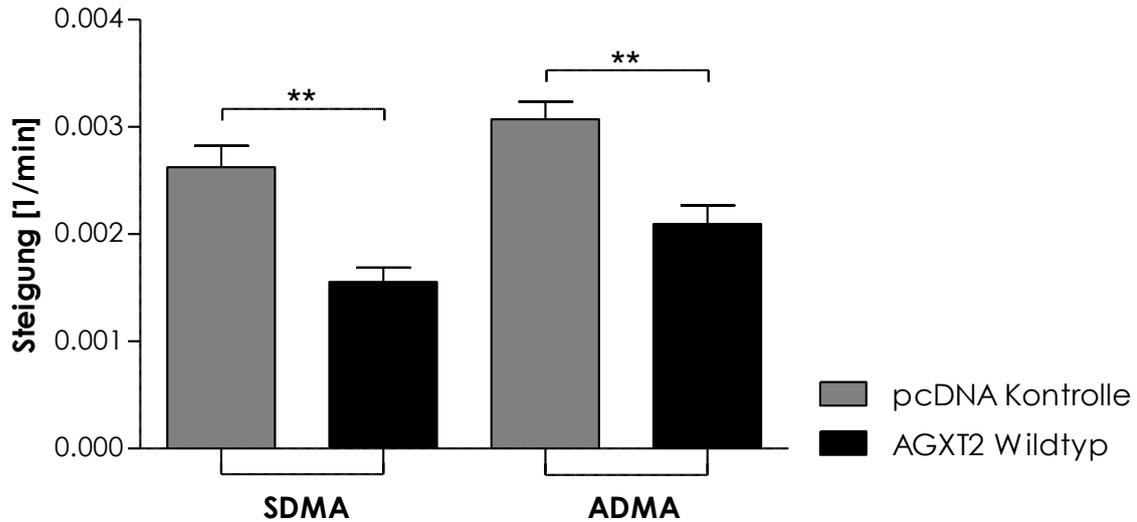


Abbildung 3.22 Vergleich der enzymatischen Umwandlung von SDMA und ADMA (1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Nukleusfraktion, 20 mmol/L SDMA bzw. ADMA, 0,5 mmol/L Glyoxylat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die aus kinetischen Messungen erstellten Steigungen (1/min) von den jeweiligen Positiv- und Negativkontrollen (AGXT2 Wildtyp und pcDNA) werden gegenübergestellt. $n(\text{pcDNA})=4$, $n(\text{AGXT2 Wildtyp})=7$; t-Test mit $**p=0.0013$ (SDMA) und $**p=0.0048$ (ADMA).

In diesem Versuch wurden die gleichen Konzentrationen an Protein und Substrat verwendet. ADMA wurde wie SDMA durch AGXT2 abgebaut. Um einen direkten Vergleich zwischen dem Abbau von SDMA zu ADMA zu erhalten, wurde die Differenz zwischen Negativ -und Positivkontrolle ermittelt (**Abbildung 3.23**). Nach Abzug der endogenen Aktivität konnte kein signifikanter Unterschied vom Abbau der beiden Dimethylarginine gemessen werden.

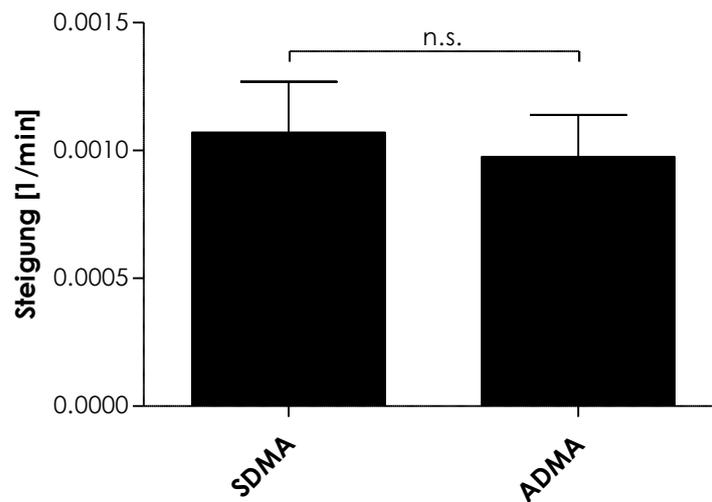


Abbildung 3.23 Direkter Vergleich der Steigungen (1/min) des AGXT2-Assays mit SDMA und ADMA als Substrate basiert auf der Negativkontrolle (pcDNA) (aus obiger Abbildung). $n=4$; t-Test mit $p=0.725$.

3.1.3.4 Einfluss der Mutation rs37369 auf die AGXT2-Aktivität

3.1.3.4.1 Aktivitätsmessung mit SDMA als Substrat

Da erfolgreich nachgewiesen werden konnte, dass SDMA durch AGXT2 abgebaut wird, sollte nun der Einfluss der AGXT2-Variante auf die AGXT2-Aktivität untersucht werden. Da die Assoziation der „Missense“-Mutante in der GWAS mit SDMA identifiziert wurde, wurde die Messung entsprechend zuerst mit SDMA in Zell-Lysat durchgeführt. Um nachfolgend voraussichtlich einen Vergleich mit L-Alanin aufstellen zu können, wurde die Reaktion mit Glyoxylat durchgeführt. Um den gleichen AGXT2-Anteil in der Reaktion vom Wildtyp und der Mutante zu haben, wurden die Western Blots der verwendeten Lysate quantifiziert (**Abbildung 3.24**).

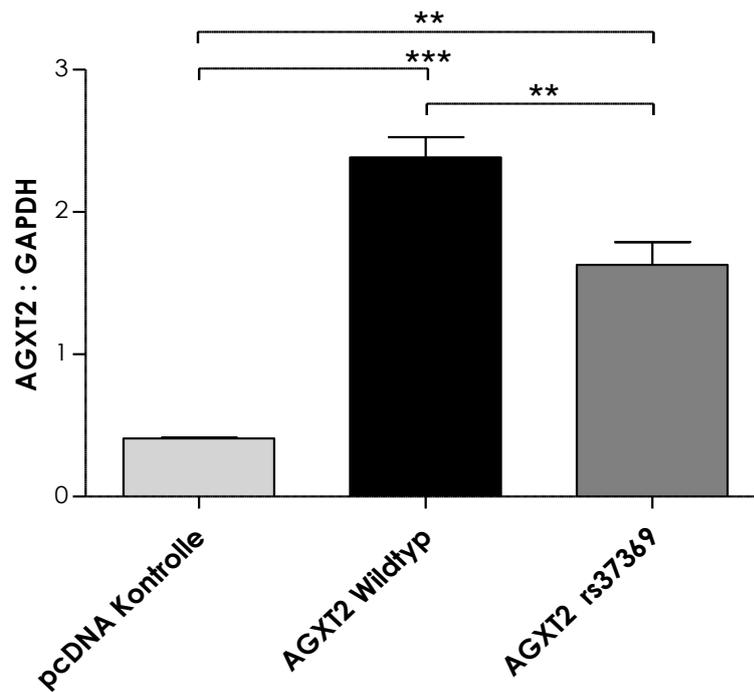


Abbildung 3.24 Quantifizierung Western Blot: eingesetzte Zell-Lysate (aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen) für den AGXT2-Aktivitätsassay mit SDMA als Substrat (Leervektor pcDNA, AGXT2 Wildtyp, AGXT2 rs37369; je 20 µg). Die AGXT2-Expression wurde mit GAPDH normiert. Die Protein-Lösung der Mutante hatte einen niedrigeren AGXT2-Anteil im Vergleich zum Wildtyp. Um einen gleichen AGXT2-Anteil im AGXT2-Assay einsetzen zu können, wurde ein Faktor berechnet, um die benötigte Proteinmenge zu erhalten. Dabei wurde ein Quotient zwischen Wildtyp und Mutante gebildet. $n(\text{pcDNA})=3$, $n(\text{AGXT2 Wildtyp})=6$, $n(\text{AGXT2 rs37369})=4$; 1way ANOVA mit $***p<0.0001$.

Die Negativkontrolle zeigte keine AGXT2-Expression, wohingegen die Lysate des Wildtyps und der Mutante eine starke Expression vorwiesen. Allerdings war auch zu erkennen, dass bei gleich eingesetzter Proteinmenge im Western Blot weniger AGXT2-Protein im Lysat der Mutante vorhanden war als beim Wildtyp. Um bei der Aktivitätsmessung gleiche AGXT2-Anteile zu haben, wurde mit Hilfe des Western Blots ein Faktor berechnet, mit dessen Hilfe die benötigte Proteinmenge ermittelt wurde. Dazu wurde der Quotient zwischen dem AGXT2:GAPDH-Ratios des Wildtyps und dem der Mutante berechnet. Für die Aktivitätsmessung wurde eine Proteinmenge von 50µg per Reaktion verwendet. Mit Hilfe des errechneten Faktors konnte dann die benötigte Menge von 73 µg Protein (50 µg multipliziert mit dem berechneten Faktor) ermittelt werden. In den eingesetzten 73 µg Protein sollte dementsprechend der gleiche AGXT2-Anteil enthalten sein, wie in 50 µg des eingesetzten Wildtyps.

Mit der angepassten Proteinmenge wurde anschließend der Assay durchgeführt. In **Abbildung 3.25** sind die Steigungen der jeweiligen Geraden wiedergegeben.

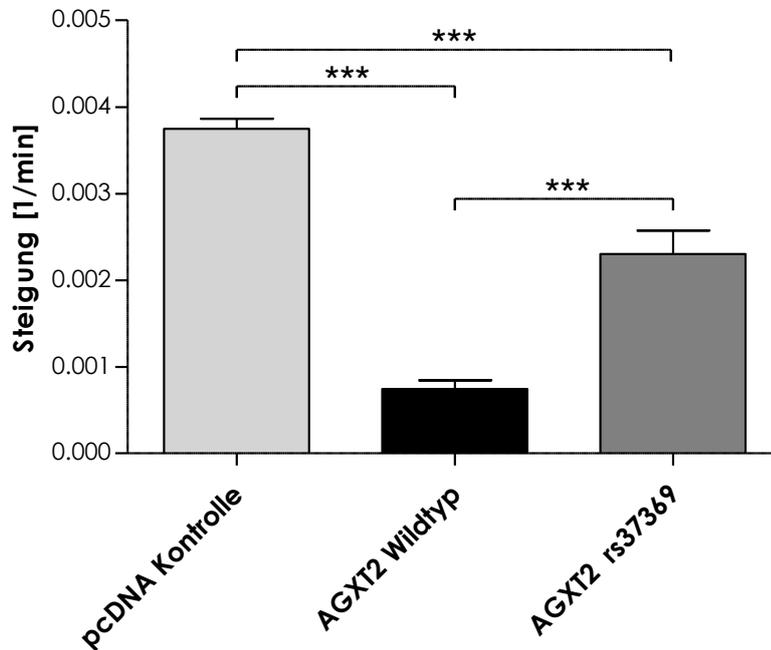


Abbildung 3.25 AGXT2-Aktivitätsassay der Mutante rs37369 mit SDMA als Substrat und den Zell-Lysaten von AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen (1,7 µg/µl pcDNA/Wildtyp, 2,4 µg/µl Mutante, 20 mmol/L SDMA, 0,5 mmol/L Glyoxylat, 50 µmol/L PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die ermittelten Steigungen (1/min) aus den kinetischen Daten werden miteinander verglichen (pcDNA Kontrolle, AGXT2 Wildtyp, AGXT2 rs37369). n=4; 1way ANOVA mit ***p<0.0001.

Wie erwartet wurde in der Negativkontrolle auf Grund des fehlenden Enzyms am meisten Glyoxylat detektiert. Es konnte eine Aktivität mit SDMA im Zell-Lysat gemessen werden. Die mutierte AGXT2 wies eine verringerte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp auf, zeigte aber eine höhere Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

Letzten Endes wurde mit Hilfe einer Glyoxylat-Standardkurve die Spezifische Aktivität der AGXT2 mit SDMA als Substrat bestimmt. Hierzu wurden die mit Hilfe der Eichgerade ermittelten Glyoxylat-Konzentrationen ermittelt. Zur Berechnung des abgebauten Glyoxylats wurden die Werte der Positivkontrollen von der Negativkontrolle abgezogen.

Zur Berechnung der Spezifischen Aktivität wurde die Stoffmenge in μmol auf die Inkubationszeit in Minuten und der eingesetzten Proteinmenge in mg basiert (**Abbildung 3.26**). Die intakte AGXT2 wies eine Spezifische Aktivität von umgerechnet $0,013 \text{ nmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ Protein auf. Die AGXT2-Variante zeigte eine verringerte Aktivität von $0,006 \text{ nmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ Protein. Die Aktivität der Mutante war um $51,9\%$ verringert.

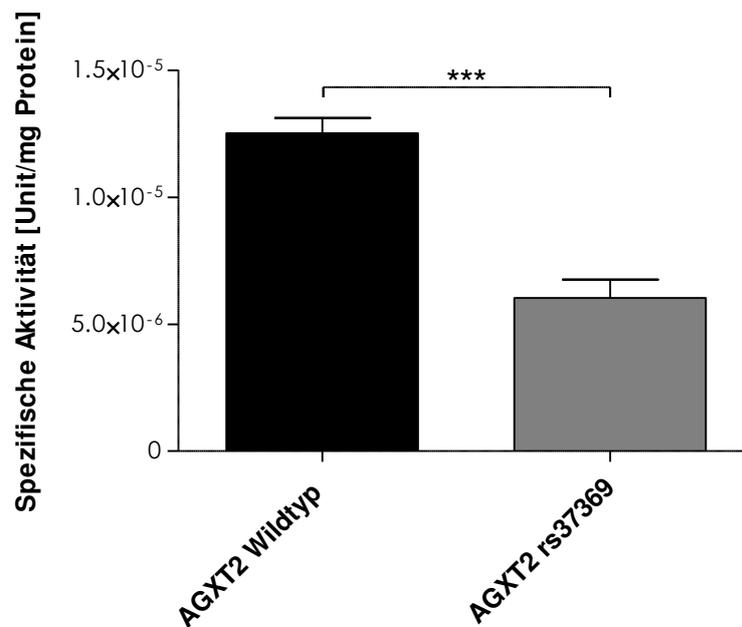


Abbildung 3.26 Darstellung der spezifischen Aktivität (Unit/mg Protein) der AGXT2 mit SDMA als Substrat, ermittelt aus den Steigungen (1/min) aus obiger Abbildung (AGXT2 Wildtyp und AGXT2 rs37369). Hierfür wurden Eichgeraden der Substrate gemessen und die von der AGXT2 umgesetzte SDMA-Konzentration berechnet. Die SDMA-Konzentration wurde auf die eingesetzte Inkubationszeit ($\mu\text{mol pro Minute} = \text{Unit}$) und die Proteinmenge basiert. $n=4$; t -Test mit $***p=0.0005$.

3.1.3.4.2 Aktivitätsmessung mit L-Alanin als Substrat

Nachdem die Beobachtungen der GWAS nun bestätigt waren, stellte sich als letztes die Frage, ob die AGXT2-Mutante auch mit L-Alanin als Substrat eine eingeschränkte Aktivität aufweist. In der GWAS konnte kein Hinweis darauf gefunden werden. Auch hier wurden die Western Blots der Lysate quantifiziert, die im Assay verwendet wurden (**Abbildung 3.27**).

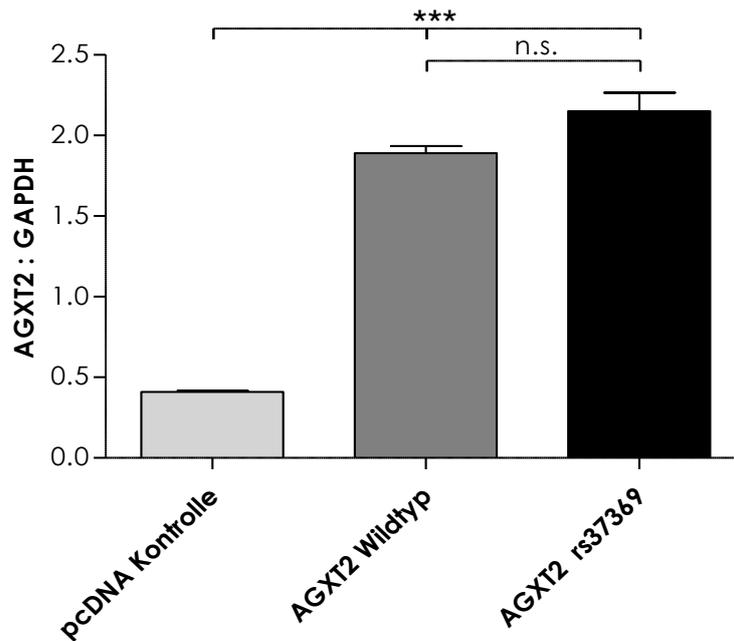


Abbildung 3.27 Quantifizierung des Western Blots der eingesetzten Zell-Lysate (isoliert aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen) im AGXT2-Aktivitätsassay mit L-Alanin als Substrat (Leervektor pcDNA, AGXT2 Wildtyp, AGXT2 rs37369; je 20 µg). Die AGXT2-Expression wurde mit GAPDH normiert. Die Protein-Lösung des Wildtyps hatte einen etwas geringeren AGXT2-Anteil im Vergleich zur Mutante. Um einen gleichen AGXT2-Anteil im AGXT2-Assay einsetzen zu können, wurde ein Faktor berechnet. Dabei wurde ein Quotient zwischen Mutante und Wildtyp gebildet. $n(\text{pcDNA})=3$, $n(\text{AGXT2 Wildtyp})=4$, $n(\text{AGXT2 rs37369})=3$; 1way ANOVA mit $***p<0.0001$.

Im Gegensatz zum Versuch mit SDMA waren hier die AGXT2-Anteile der Proteinquellen besser ausgeglichen. Auch hier wurde ein Faktor errechnet, der sich jedoch nur gering auf die eingesetzte Proteinmenge auswirkte. Vom Wildtyp wurden im Assay dementsprechend 12 µg und von der Mutante 10 µg eingesetzt (**Abbildung 3.28**). Bei der Aktivitätsmessung mit L-Alanin wurden ähnliche Ergebnisse wie mit SDMA ermittelt (**Abbildung 3.29**).

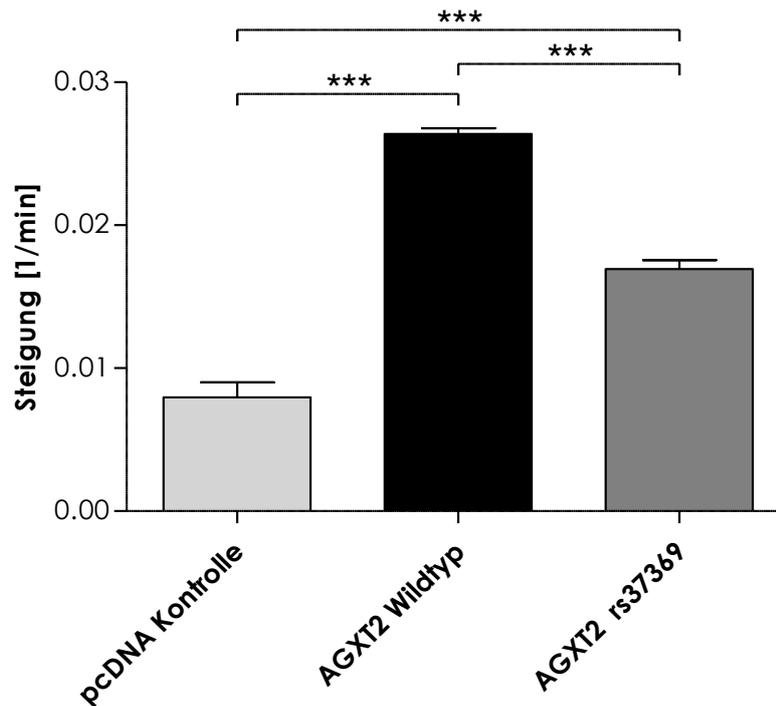


Abbildung 3.28 AGXT2-Aktivitätsassay der Mutante rs37369 mit L-Alanin in Zell-Lysaten aus AGXT2-überexprimierender HEK-Zellen (0,3 µg/µl pcDNA/Mutante, 0,4 µg/µl Wildtyp, 60 mmol/L L-Alanin, 10 mmol/L Glyoxylat, 50 µmol/L PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die ermittelten Steigungen (1/min) aus den kinetischen Messungen werden miteinander verglichen (pcDNA Kontrolle, AGXT2 Wildtyp, AGXT2 rs37369 n=4; 1 way ANOVA mit ***p<0.0001).

Während in der Negativkontrolle kaum Pyruvat als Produkt detektiert werden konnte, wurde in der Reaktion mit der intakten AGXT2 am meisten gemessen. Das mutierte Enzym hingegen wies eine geringere Steigung im Vergleich zur Positivkontrolle auf. Bei Vergleich von AGXT2 Wildtyp- und Mutante mit L-Alanin konnte ebenfalls eine um 51,3% verringerte Spezifische Aktivität ermittelt werden. Während mit der intakten AGXT2 eine Spezifische Aktivität von 59,19 Units/mg Protein gemessen werden konnte, wies die Variante rs37369 eine Spezifische Aktivität von 28,83 Units/mg Protein auf.

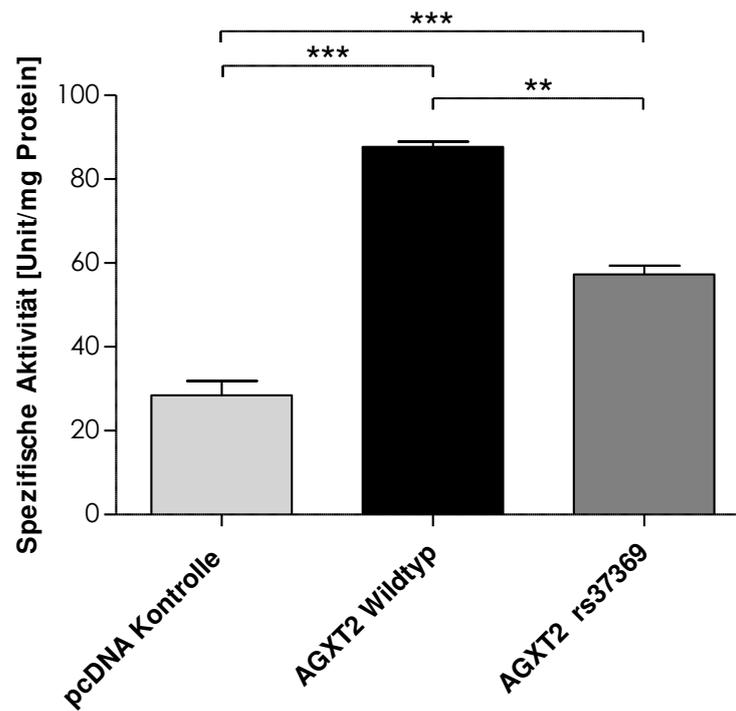


Abbildung 3.29 Darstellung der Spezifischen Aktivität (Unit/mg Protein) der AGXT2 mit L-Alanin als Substrat, ermittelt aus den Steigungen (1/min) aus obiger Abbildung (AGXT2 Wildtyp und AGXT2 rs37369). Hierfür wurden Eichgeraden der Substrate gemessen und die von der AGXT2 umgesetzte L-Alanin-Konzentration berechnet. Die Konzentration wurde auf die eingesetzte Inkubationszeit ($\mu\text{mol pro Minute} = \text{Unit}$) und die Proteinmenge basiert. $n=4$; t-Test mit $***p<0.0001$.

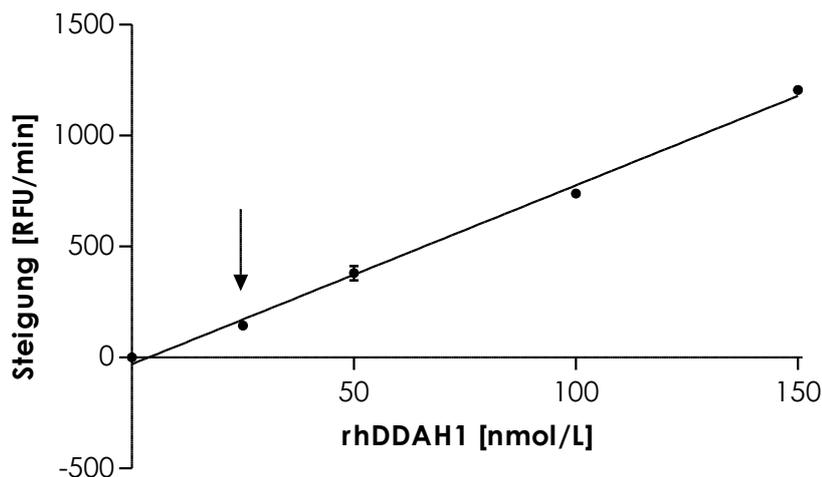
3.2 ADMA und DDAH1

3.2.1 Vorversuche | Eignung als HTS-Assay | UKE

Im ersten Schritt sollte der bereits für Niedrig-Durchsatz etablierte Assay und das rhDDAH1-Enzym auf deren Eignung für ein *High-Throughput Screening* (≥ 10.000 Compounds) geprüft werden.

3.2.1.1 Aktivitätsmessung mit humaner rekombinanter DDAH1

Die Aktivität von rekombinanten Enzymen variiert in Abhängigkeit von der Herstellung und zwischen einzelnen Chargen. Zunächst wurde mit einer kleinen Charge der rhDDAH1 eine Titration durchgeführt, um eine geeignete Konzentration für die Durchführung der Vorversuche zu finden. Hierzu wurden rhDDAH1-Konzentrationen bis zu $1,5 \mu\text{mol/L}$ kinetisch vermessen. **Abbildung 3.30** zeigt einen Ausschnitt der ermittelten rhDDAH1-Konzentrationskurve.

**Abbildung 3.30**

Aktivitätsmessung rekombinanter humaner DDAH1. Ausschnitt (bis 150 nmol/L) der rhDDAH1-Titrationskurve (Charge #1). Die aus kinetischen Fluoreszenzmessungen ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die eingesetzten Konzentrationen von 0-1500 nmol/L rhDDAH1 aufgetragen (0,375 μ mol/L SMTC, 3,55 μ mol/L CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L KH_2PO_4 /KCl-Puffer). Der Pfeil markiert die für die weiteren Analysen ausgewählte rhDDAH1-Konzentration von 25 nmol/L. Doppelbestimmung. R^2 : 0,9943 und SD^{69} : 8,24RFU/min; CV^{70} : 8,59%.

Mit den gegebenen Konzentrationen der Substrate SMTC und CPM zeigte die rhDDAH1 eine Aktivität im niedrigen nanomolaren Bereich. Mit Konzentrationen bis 150 nmol/L zeigte die Reaktion Linearität. Die Vermessung der Reaktion im linearen Bereich ist Voraussetzung für die Bestimmung der Aktivität, da nur hier dem Enzym genügend Substrate zur Verfügung stehen und sich die Reaktion im Gleichgewicht befindet (die Geschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion sind gleich). Für die Messung der Vorversuche wurde die rhDDAH1-Endkonzentration auf 25 nmol/L (90 μ l) festgelegt.

3.2.1.2 DMSO-Toleranz

Die Compounds der Bibliotheken des European Screening Ports, sowie die Substrate CPM und Ebselen wurden in DMSO gelöst. Zu hohe Konzentrationen dieses

⁶⁹ Standard deviation

⁷⁰ Coefficient of variation

Lösungsmittels können die Aktivität des Enzyms negativ beeinflussen. Da bereits durch *Fast & Linsky* auf DMSO-Toleranz getestet wurde, wurden in dieser Arbeit lediglich Konzentrationen von 1% und 2% DMSO geprüft, um einen nachteiligen Effekt von DMSO gänzlich auszuschließen. Der DMSO-Gehalt sollte in den hier durchgeführten Arbeiten und dem HTS einen Wert von 1% nicht übersteigen. Wie in **Abbildung 3.31** zu sehen ist, hatten Konzentrationen bis 2% keinen Effekt auf die Aktivitätsmessung.

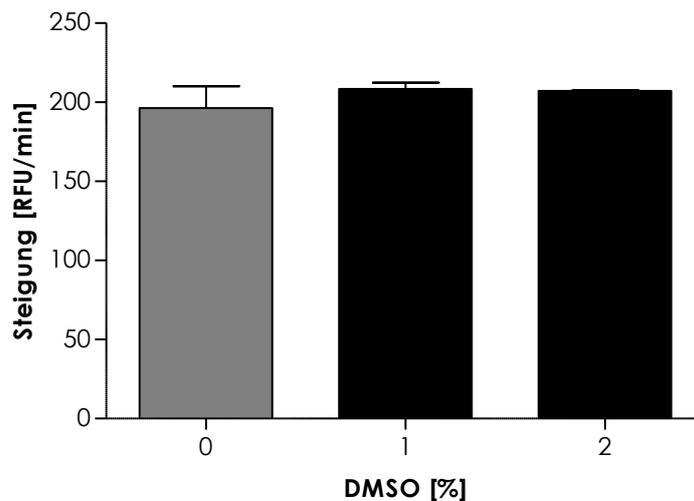


Abbildung 3.31

Analysierung des Einflusses von DMSO auf die rhDDAH1-Aktivität (25 nmol/L rhDDAH1, 0,375 µmol/L SMTC, 3,55 µmol/L CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L KH₂PO₄/KCl-Puffer). Die Negativkontrolle stellt die Reaktion ohne DMSO dar (grau). Vergleich der jeweiligen Steigungen [RFU/min] – ermittelt aus den kinetischen Daten – als Balkendiagramm. Doppelbestimmung.

3.2.1.3 Interaktionen mit CPM

Durch Strukturanalysen wurde nachgewiesen, dass die rhDDAH1 über insgesamt 5-7 freie Cystein-Reste verfügt, zwei davon im aktiven Zentrum des Enzyms (94). Es stellte sich die Frage, ob das Enzym anstelle des Methanthiols mit CPM in Wechselwirkung tritt und so eine falsch-positive Aktivität impliziert werden könnte. Um eine Interaktion unter den Substraten und der rhDDAH1 auszuschließen, wurden verschiedene Kontrollen in einem Zeitraum von ca. 60 Minuten (mit 5-10 minütiger Unterbrechung) gemessen (**Tabelle 3.1**).

	0-30 Minuten	35-60 Minuten
Positivkontrolle		
CPM + SMTC + DDAH1	70,25 ± 12,11	89,50 ± 27,11
Negativkontrolle		
CPM + SMTC – DDAH1	26,10 ± 8,67	16,69 ± 18,86
SMTC-CPM-Interaktion		
CPM + SMTC – DDAH1	19,71 ± 0,80	-
CPM + SMTC + DDAH1	-	35,66 ± 8,28
DDAH1-CPM-Interaktion		
CPM + DDAH1 – SMTC	28,77 ± 0,49	-
CPM + DDAH1 + SMTC	-	74,48 ± 13,99

Tabelle 3.1 Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen den Substraten und rhDDAH1. Wiedergabe der ermittelten Steigungen [RFU/min] aus den kinetischen Messungen des DDAH1-Aktivitätsassays. Neben der Positivkontrolle und Negativkontrolle (ohne DDAH1) wurden zwei Interaktionsansätze (ohne DDAH oder SMTC) gemessen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Reaktionen in den Interaktionsansätzen durch Zugabe der fehlenden Komponente gestartet (25 nmol/L rhDDAH1, 0,375 µmol/L SMTC, 3,55 µmol/L CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L KH₂PO₄/KCl-Puffer). Es findet keine Wechselwirkung zwischen den Reaktionspartnern (CPM+DDAH1 bzw. CPM+SMTC) mit Einfluss auf die Fluoreszenz statt. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin, CPM = 7-Diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methylcoumarin.

Neben der Positivkontrolle wurde eine Negativkontrolle verwendet, die kein Enzym enthielt. Zur Beobachtung einer Wechselwirkung wurde die gleiche zusammengesetzte Negativkontrolle verwendet, die jedoch durch Zugabe von rhDDAH1 nach 30 Minuten Reaktionszeit in eine Positivkontrolle umgewandelt wurde. Umgekehrt wurde eine Probe durch Zugabe von SMTC gestartet, die innerhalb der ersten 30 Minuten nur CPM und rhDDAH1 enthielt. Bei einer auftretenden Interaktion zwischen der rhDDAH1 und den Substraten (v.a. CPM) oder den Substraten untereinander wurde ein im Vergleich zur Negativkontrolle steilerer Anstieg der Fluoreszenzwerte erwartet. In der Abbildung sind die Steigungen der jeweiligen

Proben wiedergegeben. Wie erwartet, zeigte die Positivkontrolle eine wesentlich höhere Steigung als die Negativkontrolle (70,25 RFU/min vs. 26,10 RFU/min). Die Steigungen der beiden Interaktionsgruppen sind in den ersten 30 Minuten vergleichbar mit der Negativkontrolle (19,71 RFU/min und 28,77 RFU/min). Dass die Reaktion erst nach Zugabe des dritten Substrats gestartet wurde, zeigte sich an der Erhöhung der Steigung von 28,88 RFU/min auf 74,48 RFU/min. Eine Interaktion zwischen den Cystein-Resten der rhDDAH1 und CPM konnte somit ausgeschlossen werden.

3.2.1.4 Volumenreduktion

In dem von *Fast & Linsky* (108) durchgeführten Screening wurden insgesamt 2446 *Compounds* in einem Gesamtvolumen von 90 μl gemessen. Der Hochdurchsatz von mindestens 50.000 *Compounds* macht jedoch ein wesentlich geringeres Format erforderlich. Um den Einsatz an Material einzuschränken, sollte das Reaktionsvolumen auf mindestens 10 μl reduziert werden (**Abbildung 3.32**).

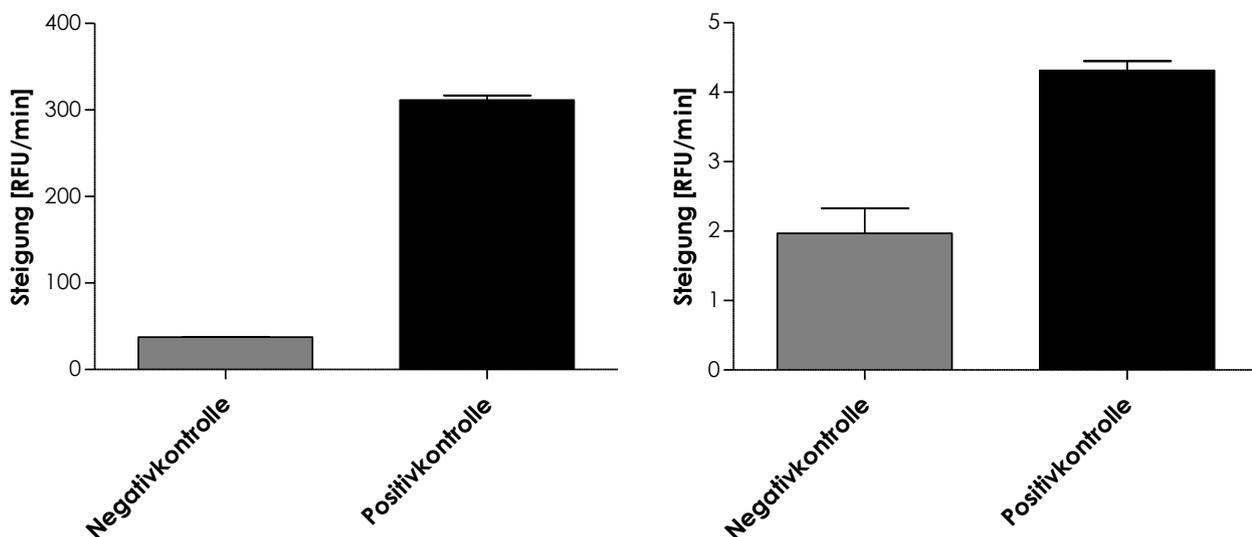


Abbildung 3.32

Volumenreduktion des DDAH1-Aktivitätsassays von 90 μl (links) auf 10 μl (rechts) Gesamtvolumen (Vortest). Vergleich der aus den kinetischen Messungen ermittelten Steigungen [RFU/min] (25 nmol/L rhDDAH1, 0,375 $\mu\text{mol/L}$ SMTc, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Der Ansatz ohne rhDDAH1 diente als Negativkontrolle. Doppelbestimmung.

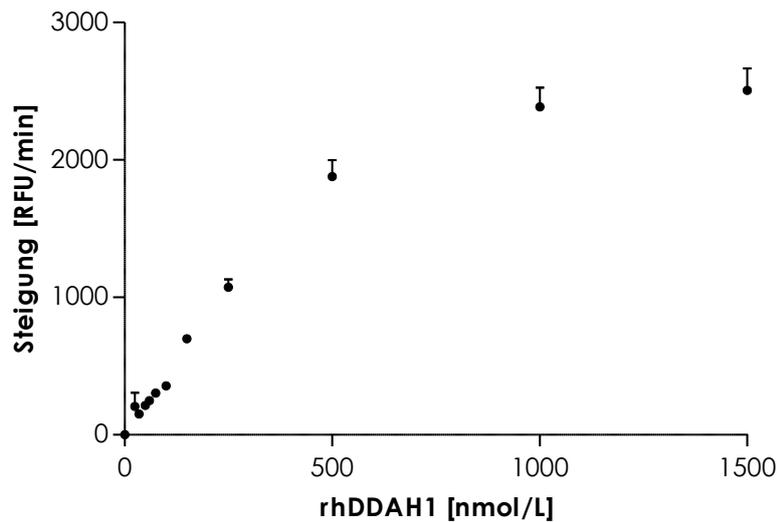
Für die Messung im 10 µl-Format wären spezielle Wellplatten mit niedriger Höhe notwendig gewesen, damit die emittierten Wellenlängen nicht von den schwarzen Wänden der Wells absorbiert werden. In diesem Vorversuch wurde das reduzierte Volumen jedoch neben dem 90 µl-Format in einer Standard-Wellplatte (10,4 mm Tiefe) gemessen. Dennoch konnte das Reaktionsvolumen problemlos von 90 µl auf 10 µl unter Beibehaltung der Endkonzentrationen reduziert werden. Lediglich die Fluoreszenzwerte bzw. Steigungen fielen auf Grund der Wellplatte niedriger aus, dennoch war eine sehr gute Diskrepanz zwischen Negativ- und Positivkontrolle messbar. Um die manuelle Durchführung im Labor des UKE einfach zu halten, wurde für die Anpassung des Assays im nächsten Schritt im 90 µl-Format fortgefahren. Die Reduzierung des Volumens sollte später im Labor des ESP mit dem passenden Equipment erfolgen.

3.2.2 Anpassung des Aktivitätsassays

Nachdem die Methode auf dessen Eignung für einen HTS geprüft wurde, erfolgte im nächsten Schritt die Anpassung bzw. Überführung des Assays an den HTS-Prozess und die Durchführung des HTS. Hierfür standen insgesamt ca. 33,5 mg rhDDAH1 zur Verfügung.

3.2.2.1 rhDDAH1-Titration

Als erster Schritt musste die neue Charge der rhDDAH1 (Charge #2) auf dessen Aktivität getestet und eine Konzentration zur Durchführung des Assays festgelegt werden. Hierzu wurde eine erneute Titrationskurve von 0-1,5 µmol/L (Endkonzentration) rhDDAH1 aufgestellt. Alle weiteren Konzentrationen wurden wieder von dem internen Protokoll übernommen. In **Abbildung 3.33** ist die vollständige rhDDAH1-Konzentrationskurve dargestellt. Die Kurve bzw. die Steigungen näherten sich mit zunehmender Konzentration einem Plateau an. Bei hohen Konzentrationen liegt der Reaktion nicht genügend Substrat und Fluoreszenzfarbstoff zur Verfügung, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt.

**Abbildung 3.33**

Ermittlung der rhDDAH1-Konzentration für den Aktivitätsassay. Messung der Titrationskurve mit Konzentrationen von 0-1500 nmol/L (0,375 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer) mit der neu hergestellten DDAH1- Charge (#2), die für die Durchführung des HTS vorgesehen war. Die aus den kinetischen Daten ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die gemessenen Konzentrationen [nmol/L] aufgetragen. $n=4$; SD: 10,34RFU/min; CV: 4,08%.

Nur mit niedrigen Konzentrationen bis 250 nmol/L liegt das Enzym mit einem Überschuss an Substraten vor, so dass sich ein Gleichgewicht einstellen kann.

Abbildung 3.34 zeigt den linearen Bereich der rhDDAH1-Titrationskurve. Um den Einsatz an rekombinantem Protein weiterhin niedrig zu halten und dennoch ein gutes Signal zu erreichen, wurde die Endkonzentration der rhDDAH1 auf 40 nmol/L festgelegt. Die mit dieser Konzentration erhaltenen Fluoreszenzwerte entsprachen in etwa den Werten der ersten Charge in den Vorversuchen. Das Enzym zeigte somit eine etwas geringere Aktivität, dennoch war eine Messung im niedrigen nanomolaren Bereich möglich. Die hergestellte Charge der rhDDAH1 war somit für die Durchführung des HTS geeignet.

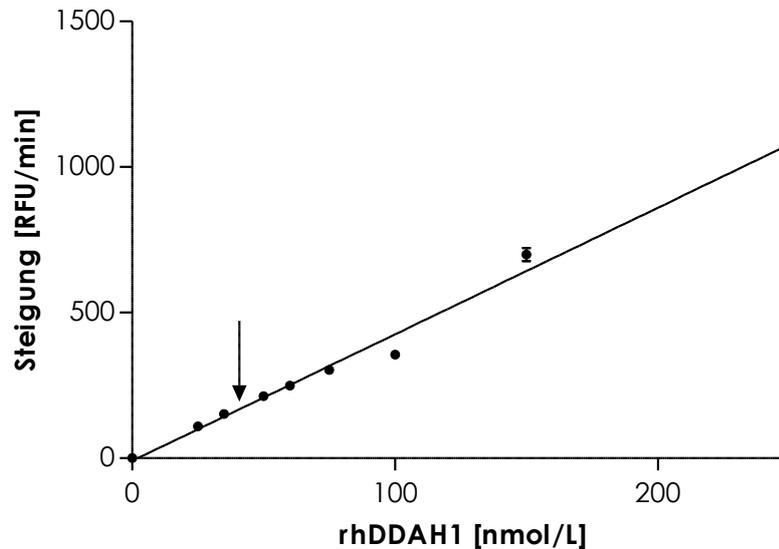


Abbildung 3.34 Linearer Bereich der durchgeführten rhDDAH1-Titration von 0-250 nmol/L aus obiger Abbildung. Der Pfeil kennzeichnet die für die weiteren Messungen ausgewählte Endkonzentration von 40 nmol/L. $R^2: 0.9904$.

3.2.2.2 Substrat-Sättigungskurve mit SMTC | Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m

Mit der ausgewählten rhDDAH1-Konzentration von 40 nmol/L sollte nun die exakte Konzentration von SMTC ermittelt werden. Hierfür wurde eine Substrat-Sättigungskurve mit SMTC-Konzentrationen von 0-20 $\mu\text{mol/L}$ (Endkonzentration) erstellt (**Abbildung 3.35**). Mit zunehmender Konzentration näherten sich die ermittelten Steigungen einem Plateau an, d.h. durch den Substrat-Überschuss lag hier das Enzym vollständig gesättigt vor.

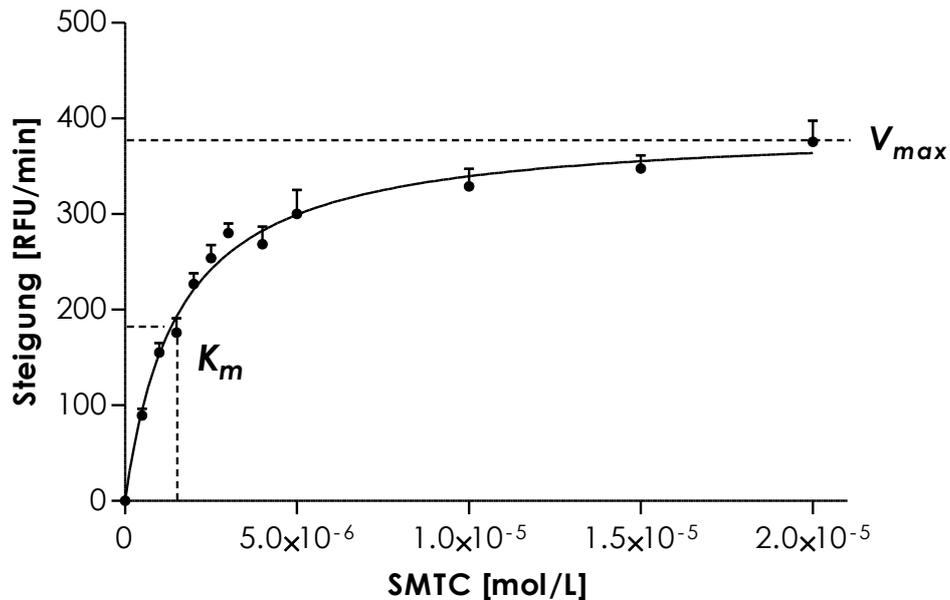
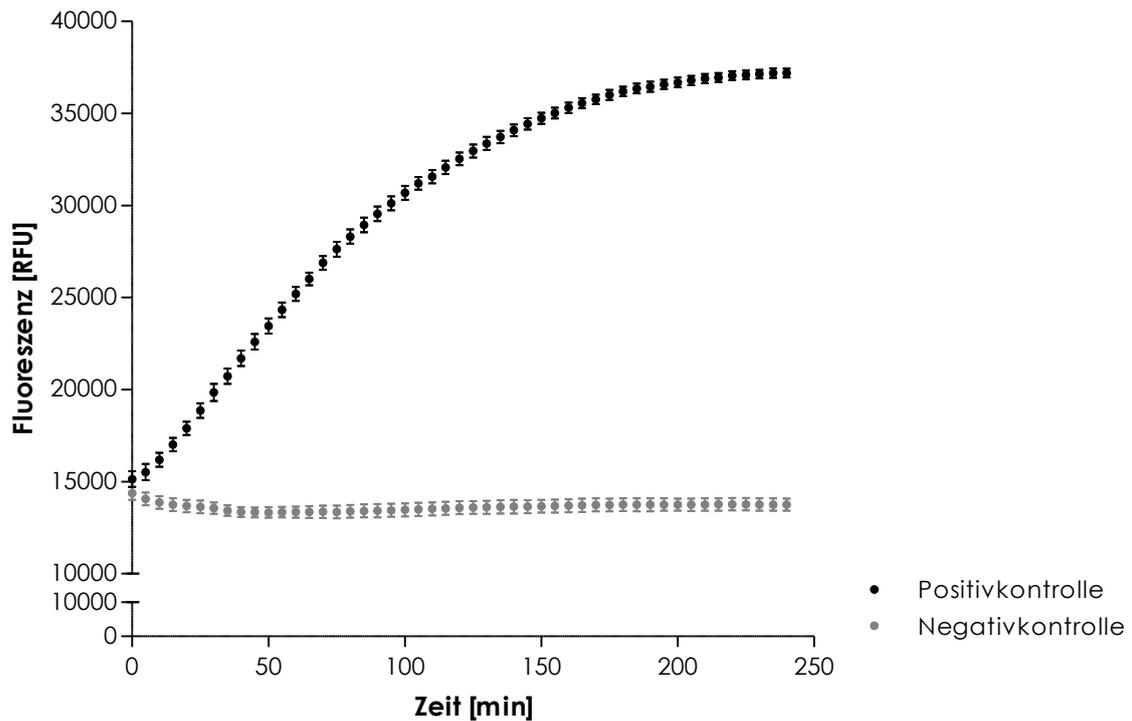


Abbildung 3.35 Substrat-Sättigungskurve von SMTC von 0-20 $\mu\text{mol/L}$ (40 nmol/L rhDDAH1, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer) zur Bestimmung der Konzentration für den entgeltigen Aktivitätsassay. Die ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die Konzentrationen [mol/L] aufgetragen. Zur Ermittlung der SMTC-Konzentration wurde die Michaelis-Menten-Konstante K_m bestimmt. $n=5$, $R^2: 0,9891$, $SD: 14,37\text{RFU/min}$; $CV: 3,3\%$. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin, V_{max} = maximale Geschwindigkeit.

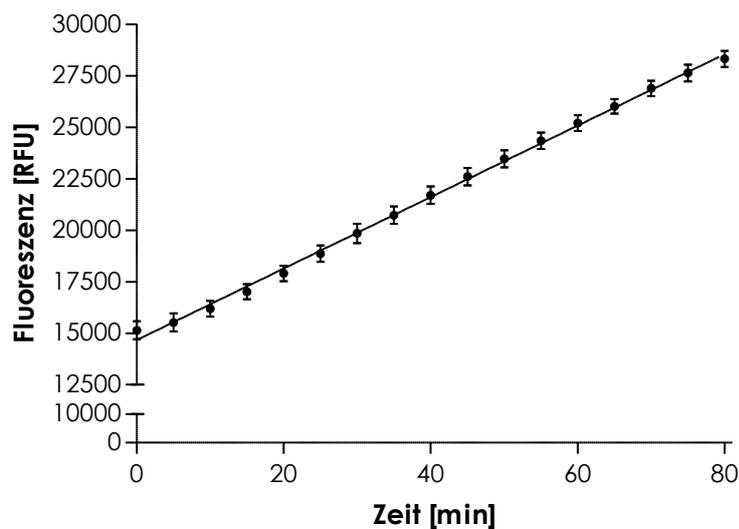
Zur Ermittlung der SMTC-Konzentration wurde die Michaelis-Menten-Konstante K_m , bestimmt. Es wurde eine maximale Geschwindigkeit V_{max} von $392,1 \text{ RFU/min} \pm 9,63 \text{ RFU/min}$ und eine K_m von $1,55 \mu\text{mol/L} \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$ SMTC ermittelt. Für die weiteren Messungen wurde die SMTC-Konzentration des Assays in den Bereich des ermittelten K_m -Wertes festgesetzt.

3.2.2.3 Zeitspanne der Linearität

Bisher wurden die Steigungen nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten ermittelt. Um einen Einblick über das Zeitfenster zu erhalten, in dem sich die Reaktion im linearen Bereich befindet, wurde der Fluoreszenzverlauf in einem Zeitraum von 0-250 Minuten gemessen (**Abbildung 3.36**). Die Fluoreszenz stieg zu Beginn der Reaktion steil an bis sie sich langsam wieder einem Plateau annäherte, bei der sich die Reaktion auf Grund fehlender Substrate verlangsamte.

**Abbildung 3.36**

Kinetische Messung der Fluoreszenz (RFU) bis 250 min ($1,5 \mu\text{mol/L}$ SMTC, $3,55 \mu\text{mol/L}$ CPM, 40 nmol/L rhDDAH1, 2 mmol/L EDTA, $0,02\%$ Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Analysierung des Zeitfensters für die Aktivitätsbestimmung, zu der Linearität der Reaktion besteht. In der Negativkontrolle war kein Enzym vorhanden. $n=3$; SD/CV (Negativkontrolle): $4,3\text{RFU}/0,29\%$; SD/CV (Positivkontrolle): $2,18\text{RFU}/1,05\%$.

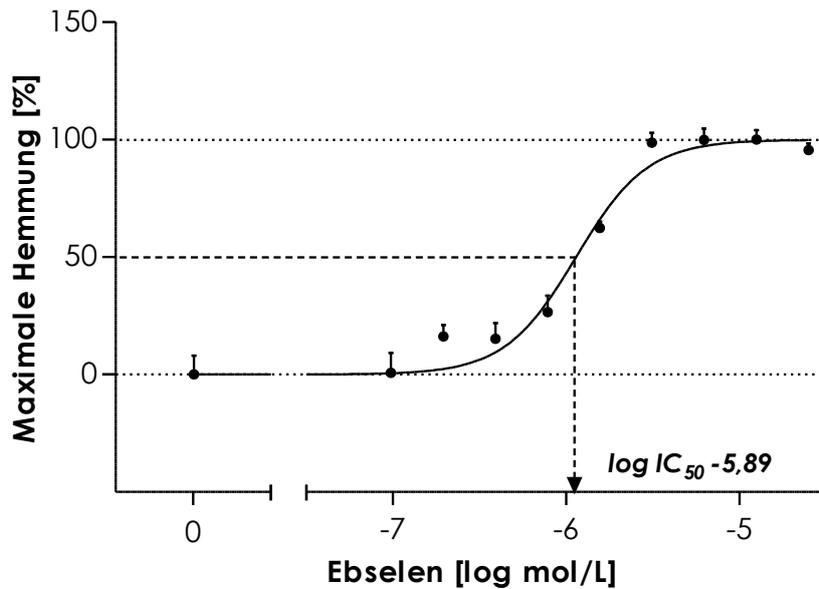
**Abbildung 3.37**

Linearer Bereich der kinetischen Messung von 0-80 min. aus obiger Abbildung. $R^2: 0,9806$.

Abbildung 3.37 zeigt einen Ausschnitt der durchgeführten Messung. Es ist zu sehen, dass die Reaktion einen linearen Anstieg bis zu 80 Minuten aufwies. Dies zeigte, dass auch nach dem Starten der Reaktion genügend Zeit für längere Präparationszeiten, die bei der Durchführung des HTS auftreten können, zur Verfügung stand.

3.2.2.4 DDAH-Inhibitor Ebselen als Positivkontrolle | Bestimmung des IC_{50} -Wertes

Für die Optimierung des HTS-Assays wurde bisher ein Ansatz ohne Enzym als Negativkontrolle verwendet und die normale, vollständig ablaufende Reaktion stellte die Positivkontrolle dar. Bei der Durchführung des HTS sollte diese Reaktion nun als Negativkontrolle verwendet werden (da in diesem Ansatz keine *Compound* enthalten ist, die einen Effekt auf die DDAH1-Aktivität nehmen kann). Für die bessere Beurteilung der zu messenden *Compounds* sind bei der Durchführung eines HTS Positivkontrollen erwünscht, die einen bereits bekannten Aktivator bzw. Inhibitor enthalten. Da bisher keine DDAH1-aktivierende Substanz bekannt ist, konnte für die Beurteilung der potenziellen Aktivatoren keine Positivkontrolle verwendet werden. Als Positivkontrolle zur Beurteilung der potenziellen Inhibitoren wurde die Zugabe des zuvor identifizierten DDAH-Inhibitors Ebselen in Betracht gezogen. Um eine geeignete Konzentration des DDAH-Inhibitors für die Positivkontrolle zu finden, wurde dessen Hemmstärke durch Aufstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve analysiert. Die rhDDAH1-Aktivität wurde mit Ebselen-Endkonzentrationen von 0-25 $\mu\text{mol/L}$ gemessen.

**Abbildung 3.38**

Konzentrations-Wirkungskurve des DDAH-Inhibitors Ebselen bis zu einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/L}$ (40 nmol/L rhDDAH1, 0,375 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Mit den aus den kinetischen Messungen ermittelten Steigungen [RFU/min] wurde die Hemmung [%] gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration [log mol/L] gestellt. Hierbei wurden die maximalen Steigungen auf 100% Hemmung gesetzt, die niedrigen Steigungen auf 0%. Zur Ermittlung der Inhibitor-Konzentration für den DDAH1-Aktivitätsassay (als Positivkontrolle) wurde der IC_{50} -Wert ermittelt. $n=3$, $R^2: 0.9434$.

Abbildung 3.38 zeigt den typischen sigmoidalen Verlauf einer Konzentrations-Wirkungskurve mit dem Inhibitor Ebselen. Dabei konnte ein IC_{50} -Wert von 1,14 $\mu\text{mol/L}$ ermittelt werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass der Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich eine ausreichende Potenz aufweist und somit zur Verwendung als Positivkontrolle geeignet war.

3.2.2.5 Herstellung frischer Puffer und Lösungen

Bevor der Assay zum ESP überführt wurde, wurden zunächst alle Lösungen und Puffer frisch und in ausreichenden Mengen für das Screening und alle damit verbundenen Analysen hergestellt. Der Assay wurde mit den neuen Reagenzien mit SMTC-Endkonzentrationen bis 15 $\mu\text{mol/L}$ wiederholt gemessen (**Abbildung 3.39**).

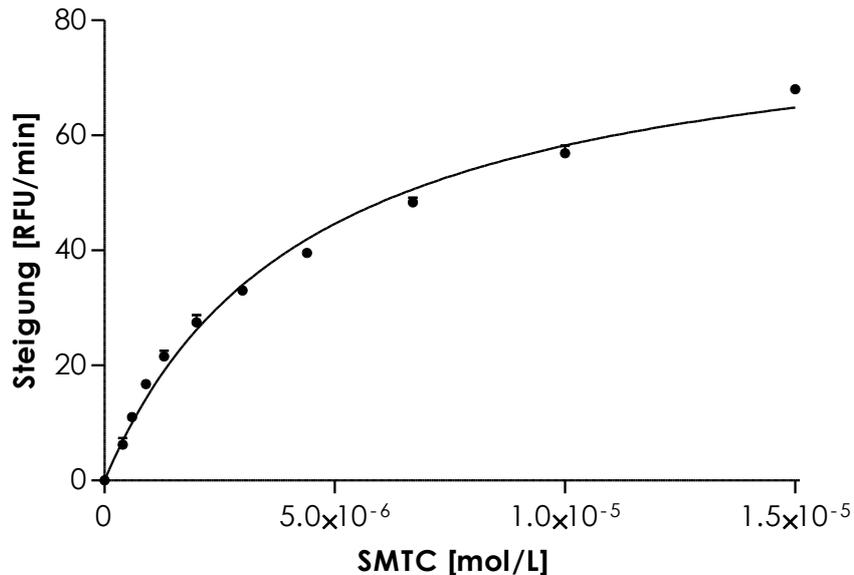
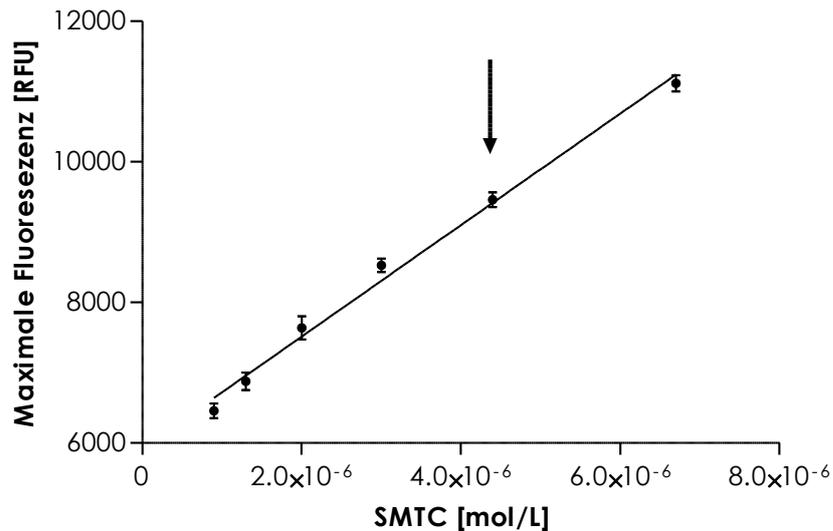


Abbildung 3.39

Wiederholung der Substrat-Sättigungskurve mit SMTC-Konzentrationen bis zu 15 $\mu\text{mol/L}$ (3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 40 nmol/L rhDDAH1, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer) mit den frisch hergestellten Reagenzien nach Fertigstellung der Vorarbeiten mit dem DDAH1-Aktivitätsassay. Die aus den kinetischen Daten ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die Konzentrationen von SMTC [mol/L] aufgetragen. $n=3$, $R^2: 0.9917$, $SD: 5,81\text{RFU/min}$; $CV: 5,39\%$. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin.

Mit einer V_{max} von $83,85 \text{ RFU/min} \pm 3,69 \text{ RFU/min}$ und einer K_m von $4,4 \mu\text{mol/L} \pm 0,46 \mu\text{mol/L}$ konnten die Werte im Vergleich zu den alten Reagenzien ($1,14 \mu\text{mol/L} \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$) gut reproduziert werden (nach Angaben des ESP dürfen K_m - oder IC_{50} -Werte um das 2- bis 4-fache abweichen. Ein ≥ 10 -facher Unterschied hingegen ist nicht akzeptabel).

**Abbildung 3.40**

Ermittlung der Notwendigkeit einer Kalibrierkurve für das High-Throughput Screening. Von der kinetischen Messung (die zur Ermittlung der Substrat-Sättigungskurve in der obigen Abbildung verwendet wurde) sind die Fluoreszenzwerte [RFU] nach einer Reaktionszeit von 120 min gegen die SMTC-Konzentrationen [mol/L] aufgetragen. Der Pfeil zeigt die SMTC-Konzentration an ($4 \mu\text{mol/L}$), die im DDAH1-Aktivitätsassay verwendet wurde. Dieser Punkt liegt im linearen Bereich, so dass auf eine Kalibrierkurve verzichtet werden kann. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin. R^2 : 0.9807, SD: 3,73RFU; CV: 3,16%.

Aus den Messdaten wurden außerdem die maximalen Fluoreszenzwerte [RFU] (nach 120 Minuten Reaktionszeit) entnommen und gegen die eingesetzten SMTC-Konzentrationen [mol/L] aufgetragen. Wenn die im Assay verwendeten Konzentrationen im Bereich der entstehenden Gerade liegen, kann auf eine zusätzliche Messung einer Kalibrierkurve verzichtet werden (**Abbildung 3.40**). Wie zu erkennen ist, befinden sich die SMTC-Konzentrationen von $0,9$ - $6,7 \mu\text{mol/L}$ im linearen Bereich, so dass auf eine zusätzliche Kalibrierung während den Messungen verzichtet werden konnte. Der Pfeil stellt die Konzentration von $4,4 \mu\text{mol/L}$ dar, das dem K_m -Wert entspricht.

3.2.3 Überführung des Aktivitätsassays zum European Screening Port

Mit den ermittelten Substrat- bzw. Enzym-Konzentrationen und der Festlegung der Kontrollen war die Austestung der rhDDAH1-Charge bzw. die Etablierung des Aktivitätsassays im UKE abgeschlossen und konnte in das Labor des European Screening Ports überführt werden.

3.2.3.1 Substrat-Sättigungskurven im Vergleich

Nach der erfolgreichen Messung mit den frischen Reagenzien wurde die Substrat-Sättigungskurve im Labor des ESP wiederholt.

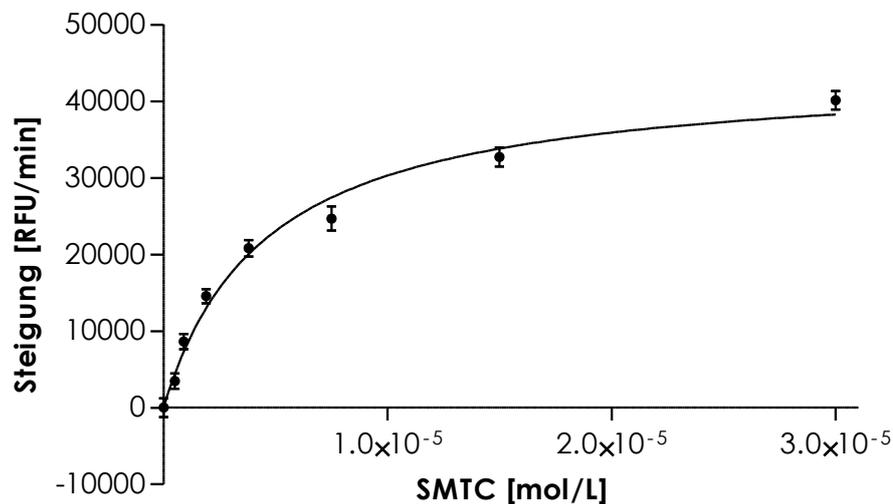


Abbildung 3.41

Wiederholte Messung der SMTC-Substrat-Sättigungskurve mit den frisch hergestellten Puffer-Lösungen im Labor des European Screening Ports zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit (3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 40 nmol/L rhDDAH1, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Die aus den kinetischen Daten ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die gemessenen SMTC-Konzentrationen [mol/L] aufgetragen. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin. $n=5$, $R^2: 0.9872$, $SD: 6,08\text{RFU/min}$; $CV: 3,99\%$.

In **Abbildung 3.41** kann man erkennen, dass die Aktivitätsmessung der rhDDAH1 auch im Labor des ESP erfolgreich verlief. Auf Grund der Anwendung verschiedener Photometer wiesen die Fluoreszenz-Signale hier wesentlich höhere Werte auf. Es wurde eine maximale Geschwindigkeit von $44100 \text{ RFU/min} \pm 2290 \text{ RFU/min}$ und ein K_m -Wert von $4,56 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 0,71 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ermittelt. Die Konstante konnte exakt reproduziert werden, die Überführung des Assays zum ESP war somit erfolgreich. Die für das HTS verwendete SMTC-Konzentration wurde dem ermittelten K_m -Wert gleichgestellt. Bei etwa $4,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$ liegt die rhDDAH1 zu 50% gesättigt vor, somit ist eine Erhöhung/Erniedrigung der Aktivität durch Aktivatoren/Inhibitoren (und somit eine Veränderung der Substratsättigung über/unter 50%) in beide Richtungen gewährleistet.

3.2.3.2 Optimierung des Aktivitätsassays zur Durchführung eines High-Throughput Screenings

3.2.3.2.1 Kinetische- versus Endpunktbestimmung

Die Analyse der Aktivität und anderer enzymatischer Parameter ist mit der direkten Produktmessung über einen bestimmten Zeitraum wesentlich exakter als die Bestimmung der Endkonzentration zu einem festen Zeitpunkt. Aus diesem Grund wurde das Screening der 2446 *Compounds* mit dem kinetischen Messverfahren durchgeführt und der Einfluss auf die Aktivität mit Hilfe der Steigung ermittelt. Während ein Screening mit dieser Anzahl an *Compounds* noch umsetzbar ist, ist diese Art der Analyse für ein HTS von mind. 50.000 *Compounds* undenkbar. Um die Auswertung überhaupt möglich zu machen, war eine Endpunktmessung zur Bestimmung der rhDDAH1-Aktivität erforderlich. Vorgesehen war eine Messung des Fluoreszenz-Signals nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten.

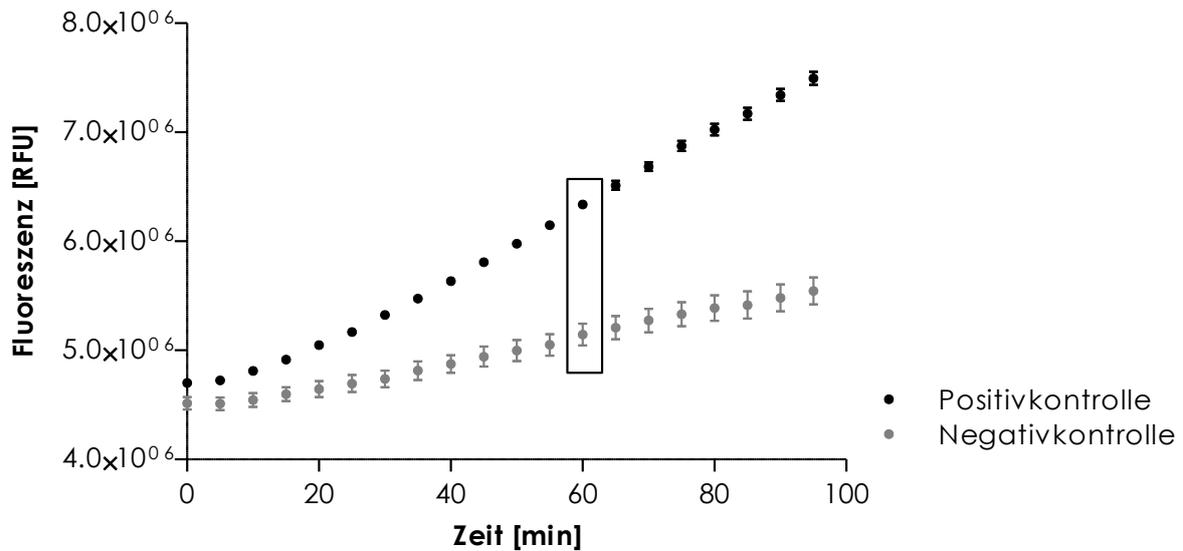
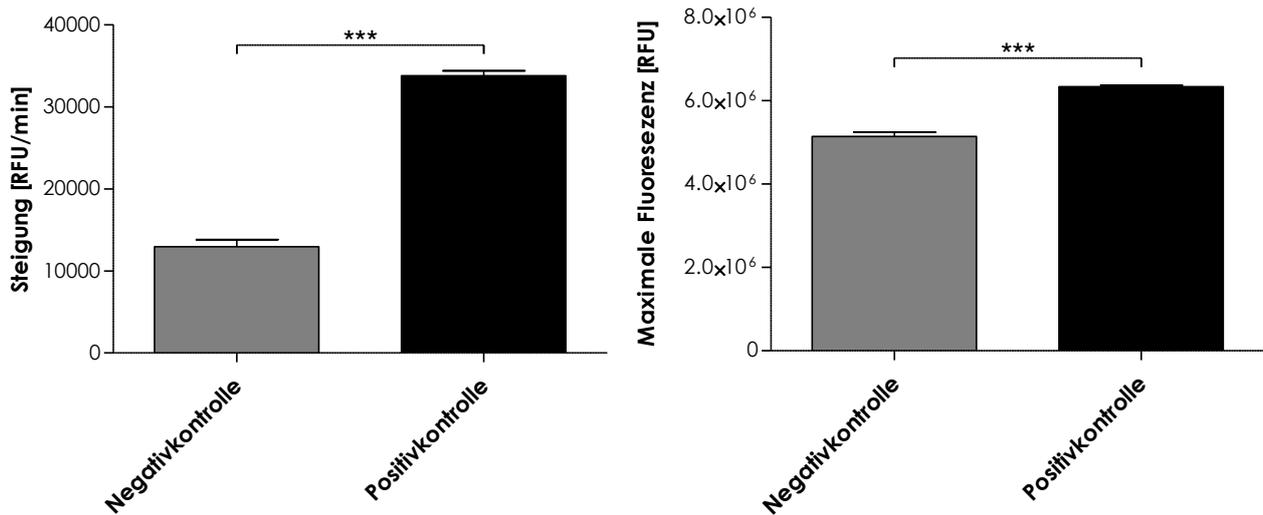


Abbildung 3.42 Kinetische Messung der Fluoreszenz [RFU] des DDAH1-Aktivitätsassays. Darstellung zweier Ansätze der durchgeführten Substrat-Sättigungskurve aus obiger Abbildung. Der Ansatz ohne SMTC wurde als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle diente die Konzentration von $0,38 \mu\text{mol/L}$ SMTC (Nähe des K_m -Wertes). Die Werte zum Zeitpunkt $t=60 \text{ min}$ wurden für die DDAH1-Aktivitätsbestimmung als Endpunktmethode verwendet (siehe nächste Abbildung). $n=5$, SD/CV (Negativkontrolle): $4,06\text{RFU}/0,73\%$; SD/CV (Positivkontrolle): $1,28\text{RFU}/0,27\%$.

In **Abbildung 3.42** ist der Fluoreszenz-Zeitverlauf zweier Ansätze der in **Abbildung 3.41** durchgeführten Substrat-Sättigungskurve zu sehen. In diesem Fall stellte die Negativkontrolle den Ansatz ohne Substrat dar. Als Positivkontrolle wurde die Konzentration ($3,8 \mu\text{mol/L}$) gewählt, die dem K_m -Wert am nächsten war. Um die beiden Messverfahren miteinander zu vergleichen, wurde zum einen die Steigung (30.-60. Minute) als auch der Fluoreszenzwert zur 60. Minute der Positivkontrollen ermittelt und den jeweiligen Negativkontrollen gegenübergestellt (**Abbildung 3.43**).

**Abbildung 3.43**

Vergleich der Steigungen [RFU/min] (links) aus den kinetischen Messungen versus der maximalen Fluoreszenzwerte [RFU] nach 60 Minuten Reaktionszeit (rechts) aus der Endpunktsbestimmung (die Steigung bzw. max. Fluoreszenz wurden aus den Daten der obigen Abbildung genommen). Darstellung als Balkendiagramm. S/H (Steigungen): 2,61; S/H (max. RFU:) 1,23; beide *** $p < 0.0001$.

Wie bei der Wiedergabe der Steigungen (links in **Abbildung 3.43**) zu erkennen ist, herrscht eine hohe Diskrepanz zwischen der Negativ- und Positivkontrolle. Um einen Vergleich mit der Endpunktbestimmung aufstellen zu können, wurde das Verhältnis von Positiv- zur Negativkontrolle berechnet (S/H-Quotient). Die Steigung der Positivkontrolle war um 2,61-fach höher als die der Negativkontrolle. Um ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis zu haben, sollte der Wert bei ca. 2,0 liegen. Somit ist eine bessere Unterscheidung zwischen der Negativ- und Positivkontrolle möglich. Wie man bereits im Balkendiagramm der obigen Abbildung (rechts erkennen kann, fiel das Ergebnis der Endpunktbestimmung trotz des hohen signifikanten Unterschiedes (** $p < 0.0001$)) weniger gut aus. Das Verhältnis zwischen Negativ- und Positivkontrolle lag bei 1,23.

3.2.3.2.2 Umstellung der Messung auf eine Endpunktbestimmung

Der Vergleich der beiden Analyse-Methoden zeigte, dass die für die kinetische Messung ermittelte rhDDAH1-Konzentration nicht für die Endpunktbestimmung geeignet war. Bei der Konzentrationsfindung der rhDDAH1 im UKE waren diese Effekte nicht vorhersehbar. Um die Qualität der Ergebnisse zu verbessern (stärkeres Signal der Positivkontrolle), musste die Konzentration der rhDDAH1 erhöht werden. Es wurde eine erneute rhDDAH1-Titration von 0-800nmol/L (Endkonzentration) gemessen (**Abbildung 3.44**).

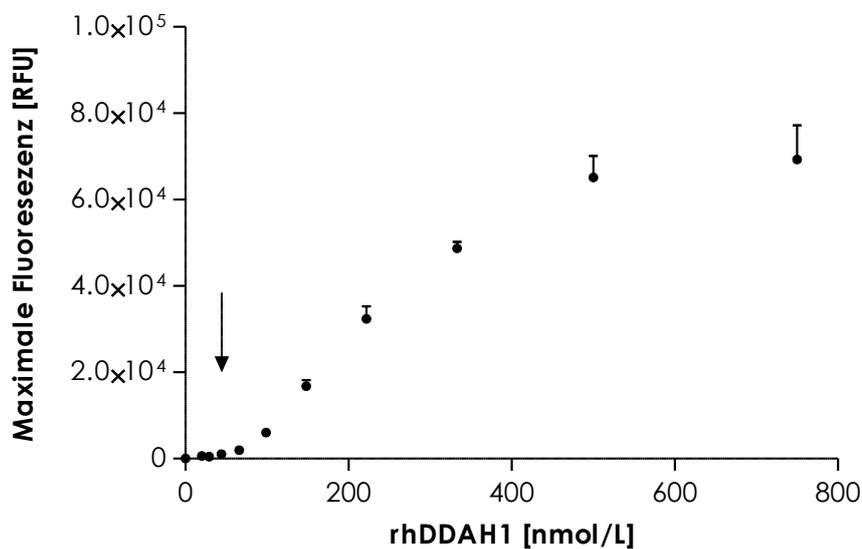


Abbildung 3.44

Aufstellung einer rhDDAH1-Titrationskurve im Labor des European Screening Ports zur Ermittlung der DDAH1-Konzentration für eine Endpunktsbestimmung. Maximale Fluoreszenzwerte [RFU] nach 60 Minuten Reaktionszeit sind gegen die rhDDAH1-Konzentrationen von 0-800 nmol/L (3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 4,5 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer) aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet die bisher für die kinetische Messung verwendete Konzentration von 40nmol/L. $n=3$; SD: 18,08RFU; CV: 8,82%.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, unterschied sich die hier ermittelte rhDDAH1-Konzentrationskurve von den zuvor erstellten Kurven (der hyperbole Verlauf ist versetzt). Mit niedrigen nanomolaren Konzentrationen konnte kein ersichtlicher Unterschied der Fluoreszenzwerte gemessen werden (der Pfeil kennzeichnet die

bisher verwendeten 40 nmol/L). Erst ab Konzentrationen von 99 nmol/L konnten stärkere Unterschiede zur Negativkontrolle (hier ohne rhDDAH1) detektiert werden. Bei Werten von ≥ 5000 RFU machten sich Unterschiede in den Proben weniger bemerkbar als bei allgemein niedrigen Signalen (wie bei dem *TECAN Safire II-Basic*[®] im UKE). **Abbildung 3.45** zeigt einen Ausschnitt der rhDDAH1-Titrationsreihe. Bei Konzentrationen zwischen 99 nmol/L bis 330 nmol/L befand sich die Reaktion im linearen Bereich. Um ein starkes Signal zu erhalten und dennoch an Enzym zu sparen, wurde die neue rhDDAH1-Konzentration auf 200 nmol/L festgelegt.

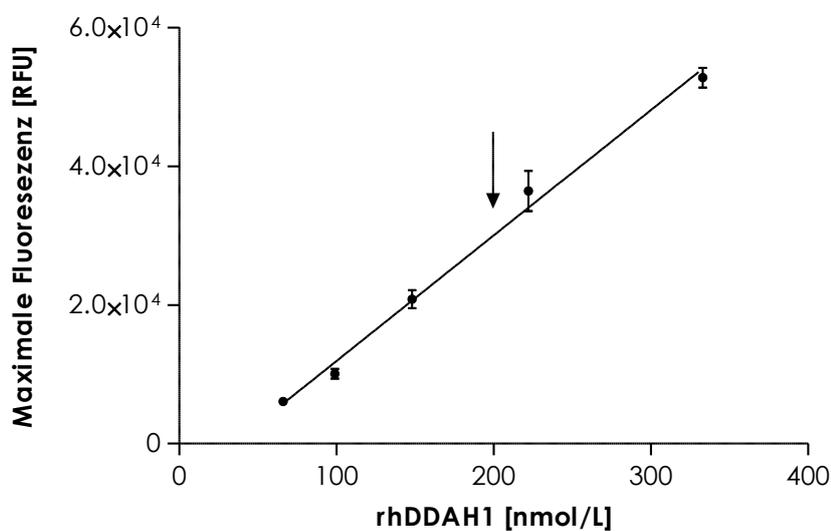
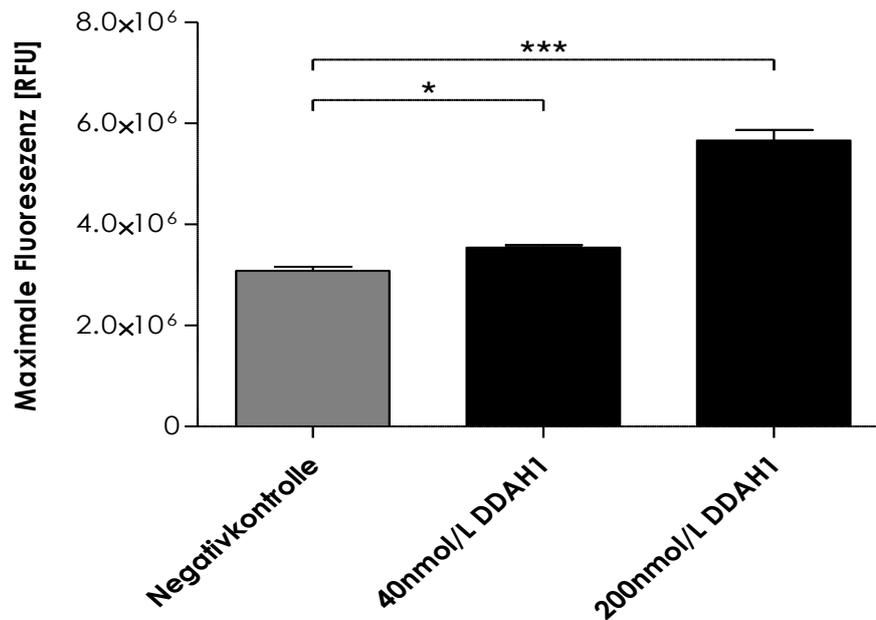


Abbildung 3.45

Linearer Bereich der rhDDAH1-Titrationskurve von 99 nmol/L bis 330 nmol/L aus obiger Abbildung. Der Pfeil kennzeichnet die für die Endpunktbestimmung ausgewählte DDAH1-Konzentration mit 200 nmol/L, die für das High-Throughput Screening verwendet werden soll. $R^2: 0.9606$.

**Abbildung 3.46**

Vergleich der alten und neuen rhDDAH1-Konzentration (40 nmol/L vs. 200 nmol/L; die Werte stammen aus der Messung der obigen Abbildung) bei der Endpunktbestimmung als Balkendiagramm. Die Negativkontrolle enthielt kein Enzym. n=16; Ratio (40 nmol/L): 1,2; Ratio (200 nmol/L): 1,8; 1way ANOVA mit ***p<0.0001.

Mit der neuen Konzentration konnte das Signal-Rausch-Verhältnis wesentlich verbessert werden, das in **Abbildung 3.46** zu erkennen ist. Zum Vergleich sind die Fluoreszenzwerte der alten und neuen rhDDAH1-Konzentration gegenüber gestellt. Während der Ansatz mit 40nmol/L ein 1,2-fach höheres Signal im Vergleich zur Negativkontrolle aufwies, zeigte die neue Konzentration einen 1,8-fach höheren Wert auf. Höhere rhDDAH1-Konzentrationen von 300 nmol/L und 400 nmol/L konnten bei wiederholten Messungen keine weitere Verbesserung des Unterschieds zwischen Negativ- und Positivkontrolle herbeiführen.

3.2.3.2.3 Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Positivkontrolle im 90 μ l-Format

Da nun die endgültige rhDDAH1-Konzentration für die Endpunktbestimmung gefunden wurde, wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve mit Ebselen (das beim HTS als Positivkontrolle der potenziellen Inhibitoren dienen sollte) im 90 μ l-Format erstellt (**Abbildung 3.47**).

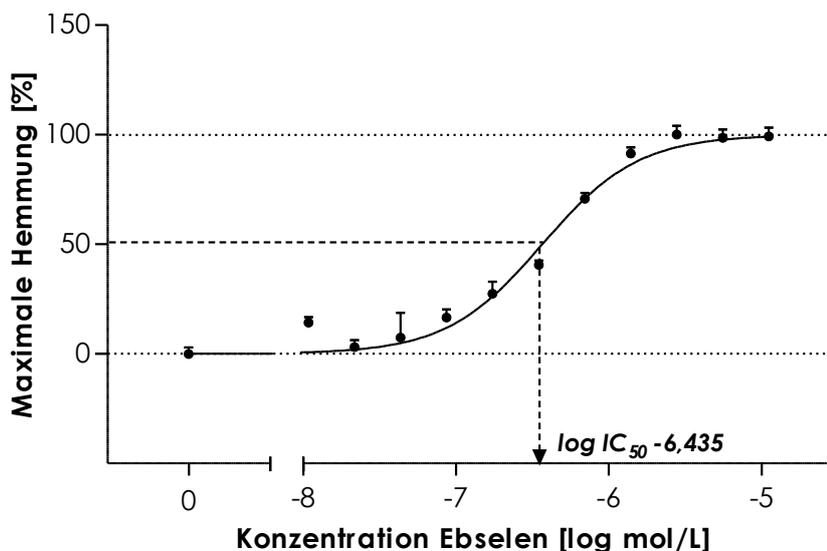


Abbildung 3.47

Aufstellung der Konzentrations-Wirkungskurve mit dem DDAH-Inhibitor Ebselen im Labor des European Screening Ports in 90 μ l Endvolumen (0-10 μ mol/L Ebselen, 200 nmol/L rhDDAH1, 4,5 μ mol/L SMTC, 3,55 μ mol/L CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L KH_2PO_4 /KCl-Puffer). Mit den ermittelten Fluoreszenzwerten [RFU] wurde die Hemmung [%] berechnet. Hierbei wurden die maximalen Werte auf 0% Hemmung gesetzt, die niedrigen Werte auf 100%. Diese sind gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration [log mol/L] aufgetragen. Zur Ermittlung der Inhibitor-Konzentration für den DDAH1-Aktivitätsassay (als Positivkontrolle) wurde der IC_{50} -Wert ermittelt. $n=3$; R^2 : 0,9558; SD: 5,78RFU; CV: 2,99%.

Abbildung 3.47 stellt mit einer Hill-Steigung von 1,39 eine repräsentative Kurve dar. Mit einer SMTC- und rhDDAH1-Konzentration von 4,5 μ mol/L und 200 nmol/L konnte ein IC_{50} -Wert von 380 nmol/L gemessen werden. Ausgehend vom IC_{50} -Wert wurde für die Durchführung des HTS die 10-fache Konzentration des Inhibitors verwendet. In diesem Fall wurde die Endkonzentration von Ebselen auf 4,0 μ mol/L festgelegt.

Abbildung 3.48 zeigt den Vergleich der Fluoreszenzwerte zwischen der Reaktion ohne Ebselen und mit 2,8 $\mu\text{mol/L}$ Ebselen (Konzentration der Titration, die der 10-fachen Menge am nächsten war) aus der in **Abbildung 3.47** erstellten Titrationskurve als Balkendiagramm. Mit Ebselen konnte die Diskrepanz zur Kontrolle mit einem S/H-Quotienten von 2,26 weiter verbessert werden. Der Assay zeigte mit einem Z prime von 0,78 eine hohe Qualität.

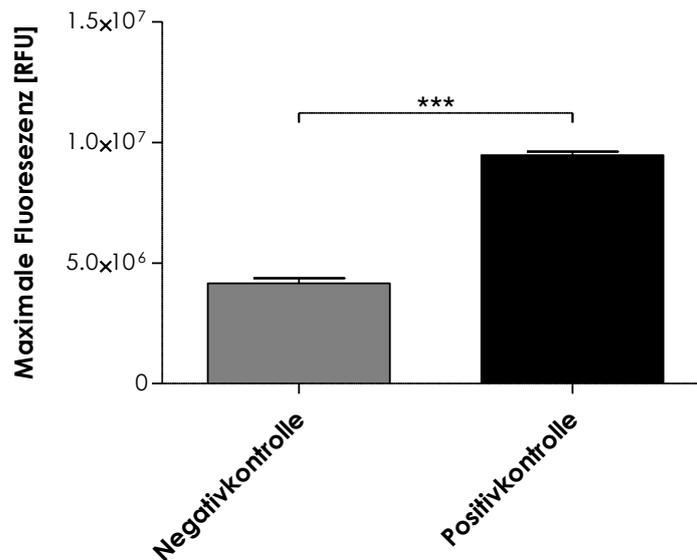


Abbildung 3.48

Vergleich der maximalen Fluoreszenzwerte [RFU] zwischen der Negativkontrolle (normale Reaktion ohne Compound) und der Positivkontrolle mit 2,8 $\mu\text{mol/L}$ Ebselen. Die Fluoreszenzwerte wurden aus den Daten der obigen Abbildung verwendet. Die Ebselen-Konzentration von 2,8 $\mu\text{mol/L}$ liegt der im späteren Screening verwendeten Konzentration von 4 $\mu\text{mol/L}$ am nächsten. S/H: 2,26. Z prime: 0,78. $n=3$; t-Test mit $***p<0.0001$.

3.2.3.2.4 Volumenreduktion in ein 10 µl-Format mit Ebselen

Als letzter Schritt erfolgte nun die Reduktion des Reaktionsvolumens auf 10 µl. Zur Überprüfung des Erfolgs wurde die Ebselen-Titration mit den gleichen Konzentrationen wiederholt.

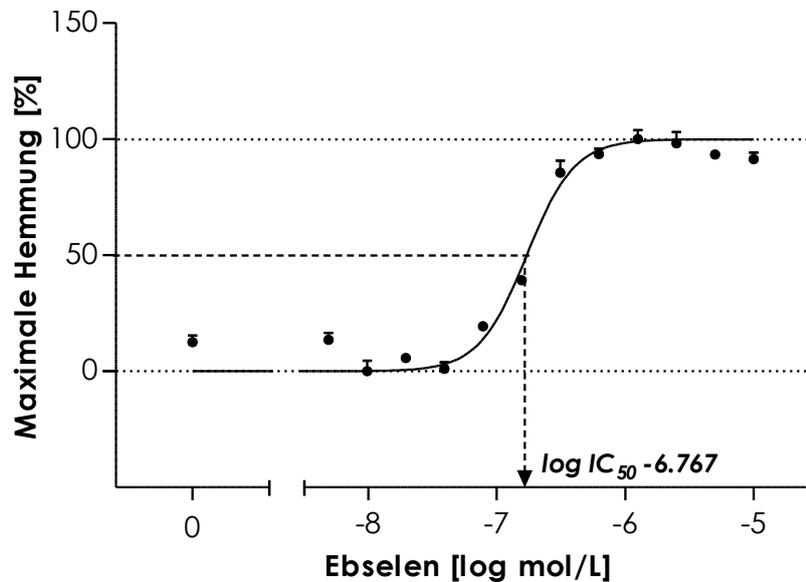


Abbildung 3.49

Zur Messung der Reproduzierbarkeit des DDAH1-Aktivitätsassays nach Reduktion von 90 µl auf ein 10 µl-Format wurde die gleiche Konzentrations-Wirkungskurve von Ebselen wie in **Abbildung 3.47** wiederholt (0-10 µmol/L Ebselen, 200 nmol/L rhDDAH1, 4,5 µmol/L SMTC, 3,55 µmol/L CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L KH₂PO₄/KCl-Puffer). Doppelbestimmung; R²: 0,9682; SD: 3,07RFU; CV: 2,25%.

Abbildung 3.49 zeigt die entsprechende Kurve und Bestimmung der Wirkstärke von Ebselen. Mit dem Erhalt eines IC₅₀-Wertes von 170 nmol/L (Hill Steigung von 2,34) war die Reduzierung des Volumens erfolgreich und die Optimierung des HTS-Assays abgeschlossen.

3.2.3.3 Durchführung des High-Throughput Screenings

3.2.3.3.1 Marker Library | Pilot Screen

Die Präparation und Messung der 384-Wellplatten wurde für die Überführung und Optimierung des HTS-Assays beim ESP manuell durchgeführt. Für das Screening erfolgte die Beladung der Platten mit den Lösungen, das Starten der Reaktion, die Inkubation und Detektion vollautomatisch, um eine hohe Anzahl an *Compounds* mit gleich bleibender Qualität zu messen. Während des HTS-Prozesses befinden sich dabei mehrere Platten gleichzeitig in der HTS-Anlage, wodurch das Screening von 50.000 *Compounds* innerhalb kurzer Zeit möglich wird. Dabei wird das Zusammenspiel der einzelnen Bestandteile der HTS-Anlage (Transportbänder, Inkubatoren, Dispenser, Photometer etc.) durch ein vorinstalliertes Protokoll festgelegt. Bevor das eigentliche Hauptscreening gestartet werden konnte, wurde der Assay zunächst unter realen HTS-Bedingungen unter Nutzung der kompletten Maschinerie inkl. vollautomatischer Multipipette mit einer kleinen Auswahl an *Compounds* ausgetestet (*Marker Library*).

Abbildung 3.51 zeigt eine gemessene Platte der ausgewählten *Compounds*. Die Fluoreszenzwerte wurden mit Hilfe der bedingten Formatierung (*Microsoft Excel 2010*) durch eine Farbskala gefärbt. Hohe Fluoreszenzwerte sind dabei rot, niedrige Werte hingegen grün markiert. In Spalte 24 (A-P) ist die Positivkontrolle mit der 10-fachen Konzentration des IC_{50} -Wertes von Ebselen zu erkennen. Die Beladung der Wells durch die vollautomatische Multipipette erfolgte dabei alternierend (im ersten Schritt wurden die Reihen B, D, F etc. befüllt, im zweiten Durchlauf erfolgte die Zugabe der Enzymlösung in den Reihen A, C, E etc.). Man kann in der Abbildung erkennen, dass die in der ersten Runde befüllten Wells jeweils stärkere Signale aufwiesen. Dadurch ergab sich ein Streifenmuster auf der Platte (links). Der Grund für diesen „Ausschleich-Effekt“ war die Absorption des Enzyms an die Schläuche des *Multidrop® Combi Dispenser* (**Abbildung 3.50**) während der Beladung der Platte. Im Verlauf der Befüllung der Wells nahm daher die Konzentration des Enzyms in der Lösung ab, das sich durch erniedrigte Fluoreszenzwerte bemerkbar machte. Um diesen Effekt zu beseitigen, wurden die Dispensierschläuche vorher mit der Enzymlösung für 30 Minuten inkubiert, um diese mit Enzym zu sättigen. Für die Beladung der Wellplatten wurde dann eine frische Enzymlösung verwendet, um eine gleichbleibende Konzentration zu gewährleisten.

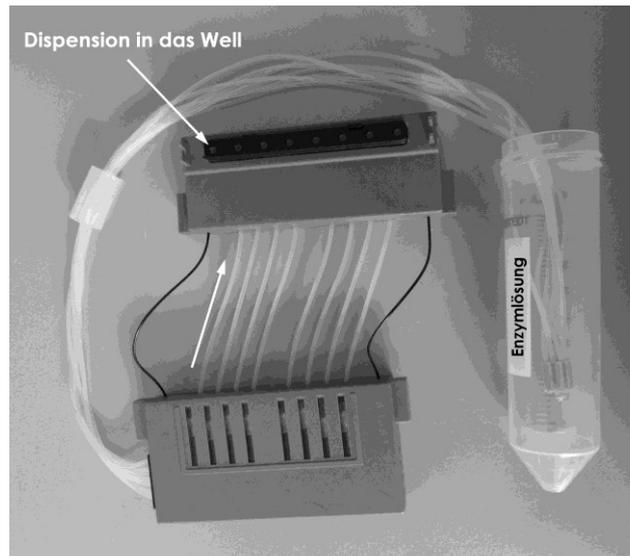


Abbildung 3.50 Ausgebautes Dispensiergerät der HTS-Anlage – bestehend aus 8 Schläuchen. Diese mussten mit der Enzym-Lösung vorinkubiert werden, um den beobachteten „Ausschleich“-Effekt (siehe **Abbildung 3.51**) zu vermeiden.

Des Weiteren konnte während des Screenings der *Marker Library* beobachtet werden, dass die Fluoreszenzwerte auf der linken Seite der Platte allgemein höher waren als auf der rechten Seite (**Abbildung 35.1**). Die Ursache hierfür war eine schiefe Position der Platte in der Halterung des Photometers. Dadurch wurde die Fluoreszenz aus unterschiedlichen Höhen detektiert, was durch unterschiedliche Intensitäten widerspiegelt wurde. Das Phänomen konnte umgangen werden, indem die Höhe des Detektors von 11 mm auf 9 mm erniedrigt wurde. Nachdem die technischen Probleme beseitigt werden konnten, wurde eine *Marker Library* – bestehend aus 1760 *Compounds* – in Doppelbestimmung vermessen (**Abbildung 3.52**).

Das *Pilot Screening* zeigte, dass die Werte reproduzierbar waren und das installierte Protokoll der HTS-Anlage problemlos verlief. Potenzielle Inhibitoren bzw. Aktivatoren konnten anhand der niedrigen (grün) bzw. hohen (rot) Signale identifiziert werden. Die Ergebnisse der getesteten *Marker Library* wurden bei der Auswertung des folgenden *Primary Screens* berücksichtigt. Die Reaktionen in Spalte 23 zeigt die Ebselen-enthaltende Positivkontrolle, die in Spalte 24 ohne Zusatz einer *Compound* ablaufende Reaktion diente als Negativkontrolle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	2253549	2236981	2222289	2236943	2270656	2258158	2231313	2224718	2189523	2160625	2181249	2134570	2096765	2087092	2010147	2037444	1909296	1889372	1803912	1758409	1705030	1695025	1620976	710678
B	2426004	2438041	231004	2342707	2383022	2360923	2379911	2328057	2267100	2255118	2213485	2173583	2126480	2097760	2003090	2018781	1928451	1871500	1846891	1788826	1718101	1666789	1633058	727866
C	2180209	2001135	2069877	2164679	2141955	2141293	2166086	2155812	2080912	2107261	2178533	2052592	2013856	1953351	1944926	1872257	1863570	1830668	1783900	1712648	1709715	1601386	1603415	763762
D	2533103	2393017	2410180	2398479	2388135	2337148	2315492	2330203	2277993	2179072	2250314	2192100	2122587	2099613	2049860	1967704	1944293	1910637	1872569	1639286	1727338	1716689	1596304	754495
E	2194154	2307484	2137495	2183355	2215926	2240781	2171364	2207230	2157671	2157436	2055587	2054164	2025879	2049854	1962706	1925693	1944748	1900450	1829326	1733294	1933273	1730426	1663885	748893
F	2432236	2360789	2408139	2390593	2364742	2337434	2398805	2539961	2219872	2257816	2262629	2206164	2653554	2120269	2072502	1932570	1986893	1896625	1847341	1848954	1761754	1677647	1722626	774793
G	2209375	2173681	2120086	2120679	2179364	2168324	2203178	2150648	2173571	2203842	2138988	2054350	2073195	2090875	1986956	1893556	1944999	1790221	1816768	1752955	1696905	1611956	1735208	771050
H	2273039	2227142	2302631	2319646	2364634	2330423	2301212	2284031	2214302	2181823	2176410	2146666	2105230	2097831	1959131	1843018	1901772	1819446	1860226	1801430	1759820	1671837	1598990	774275
I	2091619	2102148	2106117	2137524	2134975	2135044	2141524	2281846	2128623	2147558	2107915	2100397	2189063	1995629	2044436	1924166	1935707	1936650	1865133	1793547	1766638	1742486	1693203	767895
J	2309146	2244041	2267391	2309872	2303502	2251932	2259660	2225580	2238128	2272897	2187660	2168043	2134258	2104554	2024855	2022907	1985692	1946561	1860622	1812194	1774426	1752327	1726933	806888
K	2083859	2103137	2106232	2138172	2153734	2162167	2140779	2150683	2177791	2125175	2128083	2068921	2125187	2048419	1987493	1956426	1952684	1918938	1865602	1811284	1821385	1792052	1846990	825707
L	2282578	2282438	2255537	2245657	2259229	2298282	2269908	2262450	2216299	2200148	195796	2139384	2113104	2105160	2109174	2060581	1983144	1983038	1911035	1935447	1835471	1836306	1759663	812140
M	2133942	2103929	2088164	2093025	2092310	2106377	2094008	2160982	2116001	2084789	2086872	2024381	2065300	2041287	2018350	1973602	1912660	1957878	1915074	1843413	1818523	1765197	1743883	786966
N	2236467	2235699	2165407	2187053	2208763	2215583	2209137	1995053	2156652	2178513	2142931	2063716	2070971	2042550	2065760	1999616	1929399	1954276	1927876	1876139	1853740	1808105	1786280	798350
O	2061885	2052223	2024935	2078866	2043745	2060741	2052820	2044874	2039355	2039171	2003906	2009755	1977893	1954771	1949400	1960149	1929430	1904246	1895209	1854488	1869092	1808122	1808068	792751
P	2121372	2163107	2179844	2226530	2182667	2210848	2228450	2162002	2098712	2048846	2082166	2019743	2019516	2048516	2051605	2015855	1954356	1959715	1905392	1879049	1855811	1816243	1842493	864487

Abbildung 3.51

Lösen technischer Probleme durch Messung der Marker Library (dargestellt sind die nach 60 Minuten gemessenen Fluoreszenzwerte einer 384-Wellplatte). Der „Ausschleich“-Effekt der Enzym-Lösung, sowie die veränderte Position der Platte in der Halterung des Photometers konnte korrigiert werden (erkennbar an den erhöhten (rot markiert) oder erniedrigten (grün) Fluoreszenzwerten). Spalte 24 stellte die Ebselen-enhaltende Positivkontrolle (4,0 µmol/L) dar. Die Endkonzentrationen der verwendeten Substrate & Puffer des Aktivitätsassays enthielten: 200 nmol/L rhDDAH1, 4,5 µmol/L SMTC, 3,55 µmol/L CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L KH₂PO₄/KCl-Puffer.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	4389398	4416826	4540509	4235340	4618433	4553381	4413860	4800330	4627186	4479158	4653842	4618327	4714626	4867205	4425425	4674164	4773834	4547241	4503576	4929325	4677977	5322430	2083158	4349665
B	4599929	4794826	4526931	3909396	4446243	4522805	4504537	4562446	4754775	5087613	4651524	4749406	4474186	4767745	4495931	4800639	4623654	4032215	5620618	4440513	6733936	4550772	2061331	4362114
C	4250546	3995885	4008415	3852152	4408740	4273085	4357690	4321476	4207133	4045120	4390524	4321677	4279516	4150530	1123641	4588585	3887697	4285935	4326435	4467870	4347033	4337572	2035315	3942735
D	4405716	4266542	4506318	4350321	6886992	4594405	4558273	4135038	4430898	4600461	4738378	4461457	4375546	4380364	4228056	4712138	4366001	4492808	4354765	4383747	3798712	4157616	2037074	4217848
E	4190063	4351253	4116516	5512985	4354226	4299285	4126628	4196750	4242877	4033185	4414889	4274843	4357411	4541975	4576344	4377835	4650271	4641422	4439901	5243950	4677279	4503361	2087261	4207368
F	4621878	4638640	4724805	4554556	4583552	6771338	4343223	4594763	4636852	1,5E+07	6305540	4265762	4904693	4582446	4665611	4596105	4351694	4437997	4461793	4626489	4574066	4490962	2087806	4250439
G	4250578	4251412	4079910	4244233	4329843	4761638	4332858	4268561	4511419	4641930	1,1E+07	4871577	4698348	4784097	4454941	4444850	4810280	5437985	4693235	5042072	4468414	4534484	2103351	4253063
H	4357718	4011386	4471426	4451590	4403936	4575156	4395285	4565157	4630900	4795381	3328373	4428641	4568510	7689807	4154037	4243898	4578312	4606448	4628539	4123240	4410691	4380216	2274328	4179339
I	3997339	3994844	4017639	4186808	4032648	4131853	4319040	4307109	4014656	4343859	4396603	4262284	4351252	4621937	4593016	4445019	4739803	4313762	4528123	4548644	4422655	4536077	2042810	4114464
J	4168935	3931907	3903776	4030992	5006765	4226628	4355636	4341055	4357538	4209661	4308332	4107764	4455981	4630459	5158812	5325850	1,1E+07	4317098	47177070	4260283	4354771	4257934	2105853	4112408
K	3774000	3825858	3903700	4908064	3977574	3967066	4082115	3730155	3995289	4090937	4499219	4786066	8890552	8125011	4751755	4677874	3763772	4322990	4352979	4085640	4148851	4063461	1887608	3356436
L	3918474	3617707	4329292	6729025	4534535	4185748	4141479	4235438	5467000	4294341	4410952	4384066	3791499	4736629	3735705	4156851	4505848	4371781	5261582	4740540	4063156	4051842	131941	3927871
M	4294784	3557944	4205664	4235059	4214157	4206539	4556146	4113234	4175202	4264265	4774590	4592112	4423481	4822076	4713634	4663111	4537506	4456549	4756575	4355676	4472054	4356280	2042404	4122380
N	3983037	4141022	3955905	4180365	4129578	4158204	4161482	3818800	4432145	4412863	4501420	4418094	4437046	5969023	4554399	4532819	4398387	4131526	4410817	4269056	4289795	5517344	2161730	4128058
O	4132291	3972558	4825051	3983399	3910759	3959225	4646865	4010243	4013915	4108825	4678141	4273208	4391010	4442903	4567558	6378773	4422353	4218807	4260395	4400159	4429100	3918235	2133388	4214882
P	4747208	4001559	3946095	4119121	4835291	3823417	7479837	4454217	4368623	4084477	6152739	4345102	4317654	4484047	3286562	4426576	4378132	4372099	4315785	4194373	7132939	4298366	2097224	4175133

Abbildung 3.52

Ansicht einer gemessenen Platte nach 60 Minuten Inkubation nach Beseitigung der technischen Probleme. Die Reihen 1-22 enthielten die Compounds der Marker Library. Spalte 23 enthielt zusätzlich Ebselen als Positivkontrolle, die Negativkontrolle in Spalte 24 enthielt keinen Zusatz.

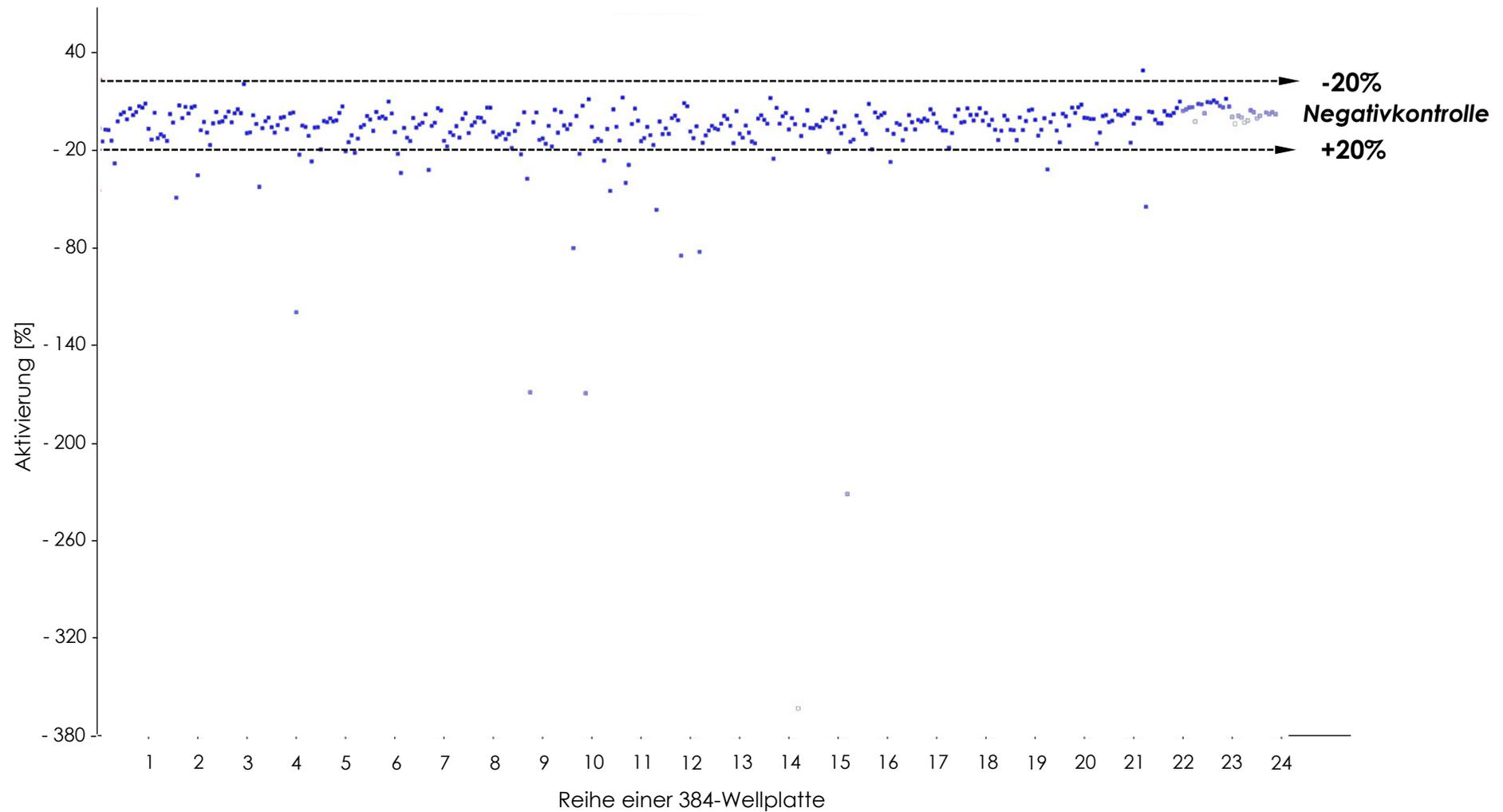
3.2.3.3.2 Primary Screen | High-Throughput Screening

Die Durchführung des *Primary Screens* erfolgte in der gleichen Weise wie die Vermessung der *Marker Library*. Insgesamt wurden von der ENAMINE-Bibliothek des European Screening Ports 52.096 *Compounds* innerhalb von 3 *Tagen*, verteilt auf 148 *Platten* in einer Einzelbestimmung gemessen. Die Endkonzentration der *Compounds* betrug dabei 10 $\mu\text{mol/L}$. Um eine hohe Qualität der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde für den *Z Prime* ein Mindestwert von 0,5 festgesetzt. Bei der statistischen Analyse von 50 willkürlich ausgewählten *Platten* konnte ein durchschnittlicher *Z Prime* von 0,76 und eine Varianz von 2,69 (Negativkontrollen) bzw. 4,25 (Positivkontrolle) ermittelt werden (Tabelle 3.2).

Platten ID	Z Prime	Signal Negativkontrolle (Durchschnittswert) [RFU]	Standardabweichung [RFU]	CV [%]	Signal Positivkontrolle (Durchschnittswert) [RFU]	Standardabweichung [RFU]	CV [%]
ESP0016839	0,77	5142477,06	152402,18	2,96	2188730,38	78487,79	3,59
ESP0016840	0,77	5356705,25	133092,94	2,48	2290012,88	98945,63	4,32
ESP0016841	0,78	5299143,75	136180,19	2,57	2279275,50	86974,25	3,82
ESP0016842	0,74	5485238,88	177759,05	3,24	2407679,38	88091,89	3,66
ESP0016843	0,63	5446671,44	175736,91	3,23	2512718,75	185040,35	7,36
ESP0016844	0,76	5547786,50	138064,35	2,49	2495155,75	103815,31	4,16
ESP0016845	0,77	5331867,38	120245,51	2,26	2263116,69	119058,00	5,26
ESP0016846	0,77	5458351,75	147884,61	2,71	2389097,38	82977,38	3,47
ESP0016847	0,77	5630745,31	145779,78	2,59	2481880,56	90812,55	3,66
ESP0016848	0,59	5612515,44	342024,54	6,09	2451780,33	85734,78	3,50
ESP0016849	0,79	5307693,50	126156,96	2,38	2288967,88	89232,72	3,90
ESP0016850	0,80	5511185,31	133156,80	2,42	2329765,81	80231,57	3,44
ESP0016851	0,82	5477929,69	128898,34	2,35	2296507,94	62949,82	2,74
ESP0016852	0,82	5463051,56	112550,51	2,06	2301405,31	79939,93	3,47
ESP0016853	0,82	6190841,38	129908,16	2,10	2679164,19	75506,52	2,82

Tabelle 3.2 Darstellung der statistischen Analysen 50 willkürlich ausgewählter Platten des Primary Screens. Zur Bewertung der Qualität wurde der Z Prime berechnet, dessen Schwellenwert auf 0,5 gesetzt wurde. Des Weiteren wurden die Standardabweichungen und die Varianzen (CV) der Negativ- und Positivkontrollen ermittelt.

Ein beträchtlicher Teil der getesteten *Compounds* wies bereits eine Autofluoreszenz bzw. einen „Quenching“-Effekt (das Fluoreszenzsignal wird abgeschwächt) auf. Dies erhöht das Risiko falsch-positive *Hits* zu erhalten, das die folgende Analysierung und Selektion erschwert. Um bereits im Vorfeld die Anzahl der falschen Treffer zu reduzieren, wurde eine Messung zum Zeitpunkt $t=0$ min (nach Start der Reaktion) durchgeführt. Da zu dem Zeitpunkt noch kein hemmender oder aktivierender Effekt zu sehen sein sollte, wurden die zu diesem Zeitpunkt identifizierten erhöhten bzw. erniedrigten Signale auf eine Autofluoreszenz oder einen Quenching-Effekt zurückgeführt. Der Grenzwert wurde für falsch-positive *Hits* vorerst auf $\pm 20\%$ (die Werte wurden auf die Negativkontrolle basiert, die y-Achse zeigt daher die Aktivierung in %) an) gesetzt (**Abbildung 3.53**).

**Abbildung 3.53**

Ansicht einer gescreenten 384-Wellplatte zum Zeitpunkt $t=60$ min (jeder Punkt stellt den Effekt einer Compound dar; Negativkontrolle mit 0% Aktivierung). Die Aktivierung [%] wurde aus den gemessenen Fluoreszenzwerten [RFU] des DDAH1-Aktivitätsassays berechnet. Compounds, deren Effekt $\pm 20\%$ beträgt, werden vorerst als falsch-positive Treffer bewertet.

Abbildung 3.54 zeigt das Gesamtergebnis des *Primary Screens* in einem 3D-Modell. Die getesteten *Compounds* (Y-Achse) sind auf die Hemmung [%] (X-Achse) bezogen. Die Höhe der Aktivierung ist auf der Z-Achse abzulesen. Der Großteil der gescreenten Bibliothek zeigte keinen Effekt (grauer Bereich entlang der eingezeichneten Achse). Strukturen, die nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten erhöhte Fluoreszenzwerte aufwiesen und somit als Aktivatoren kategorisiert wurden, befinden sich oberhalb bzw. potenzielle Inhibitoren mit niedrigeren Signalintensitäten sind unterhalb der Achse angeordnet. Insgesamt zeigten 1392 *Compounds* bereits zu Zeitpunkt $t=0$ min einen Effekt. 1336 davon zeigten eine Autofluoreszenz und 56 *Compounds* hingegen einen Quenching-Effekt.

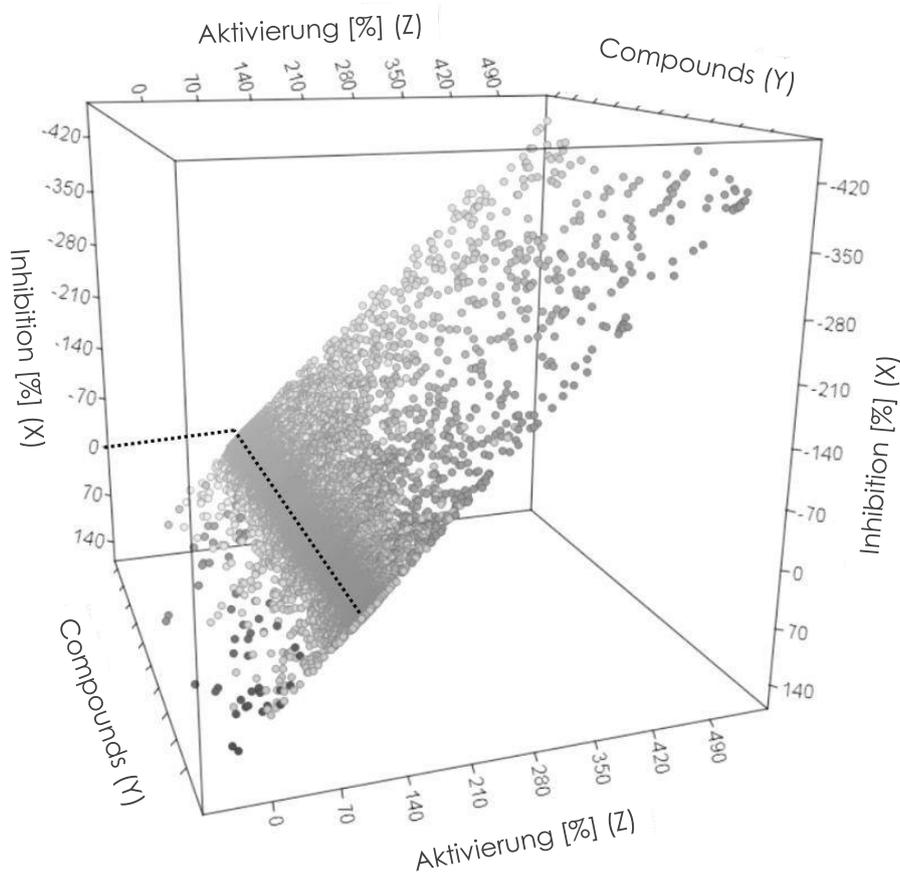


Abbildung 3.54

Ergebnis des gesamten *Primary Screens* als 3D-Modell. Alle 52.096 *Compounds* sind gegen die Aktivierung bzw. Inhibition [%] aufgetragen. Der Großteil der *Compounds* zeigt keinen Effekt (Anreicherung um die eingezeichnete Achse).

In **Abbildung 3.55** ist ein Teil des *Hauptscreenings* in einer anderen Darstellung zu sehen, um einen besseren Einblick über die *Hits* zu erhalten. Die *Compounds* ohne Effekt (grau) sind dabei auf der rechten Seite zentriert, die identifizierten Aktivatoren mit einer hohen Autofluoreszenz sind rot markiert. Die *Compounds*, die zum Zeitpunkt $t=0\text{min}$ einen Effekt unter 20% zeigten, wurden vorerst als potenzielle *Hits* angesehen (*Hit Region*). Für die weitere Analysierung mussten mit Hilfe von Chemikern (ESP) die exakten Schwellenwerte festgelegt werden, die die *Hit Region* definiert (**Abbildung 3.56**).

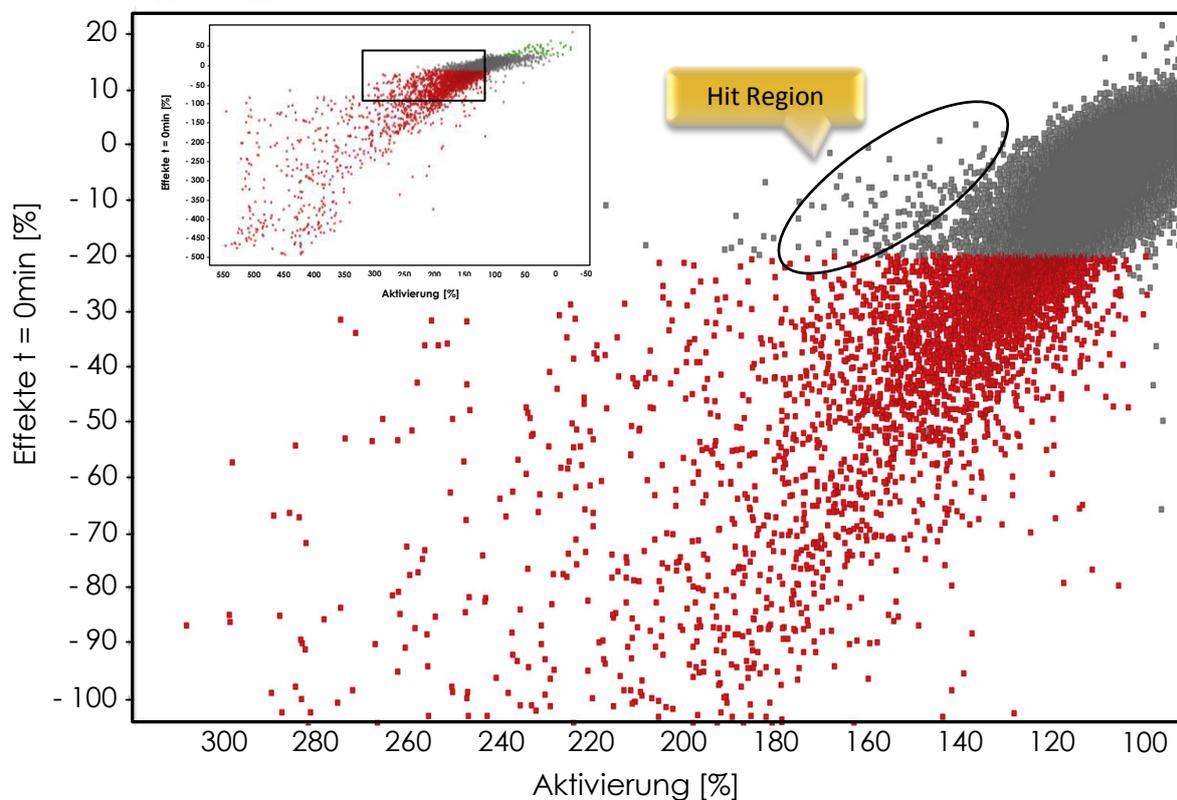


Abbildung 3.55

Auszug des Ergebnisses des *Primary Screens* in einer anderen Darstellung. Jeder Punkt stellt den Effekt einer gemessenen *Compound* dar. Die Effekte zum Zeitpunkt $t=0\text{ min}$ (Negativkontrolle ist auf 0% gesetzt) sind gegen die Aktivierung zum Zeitpunkt $t=60\text{ min}$ (Negativkontrolle ist auf 100% gesetzt) aufgetragen. Die Effekte [%] wurden aus den ermittelten Fluoreszwerten des DDAH1-Aktivitätsassays berechnet. Rot markierte Punkte stellen autofluoreszierende *Compounds* dar (definiert durch den aufgestellten Schwellenwert von 20%). Die markierte *Hit Region* enthält potenzielle „echte“ Aktivatoren (Effekt $t=0\text{ min} \leq 20\%$).

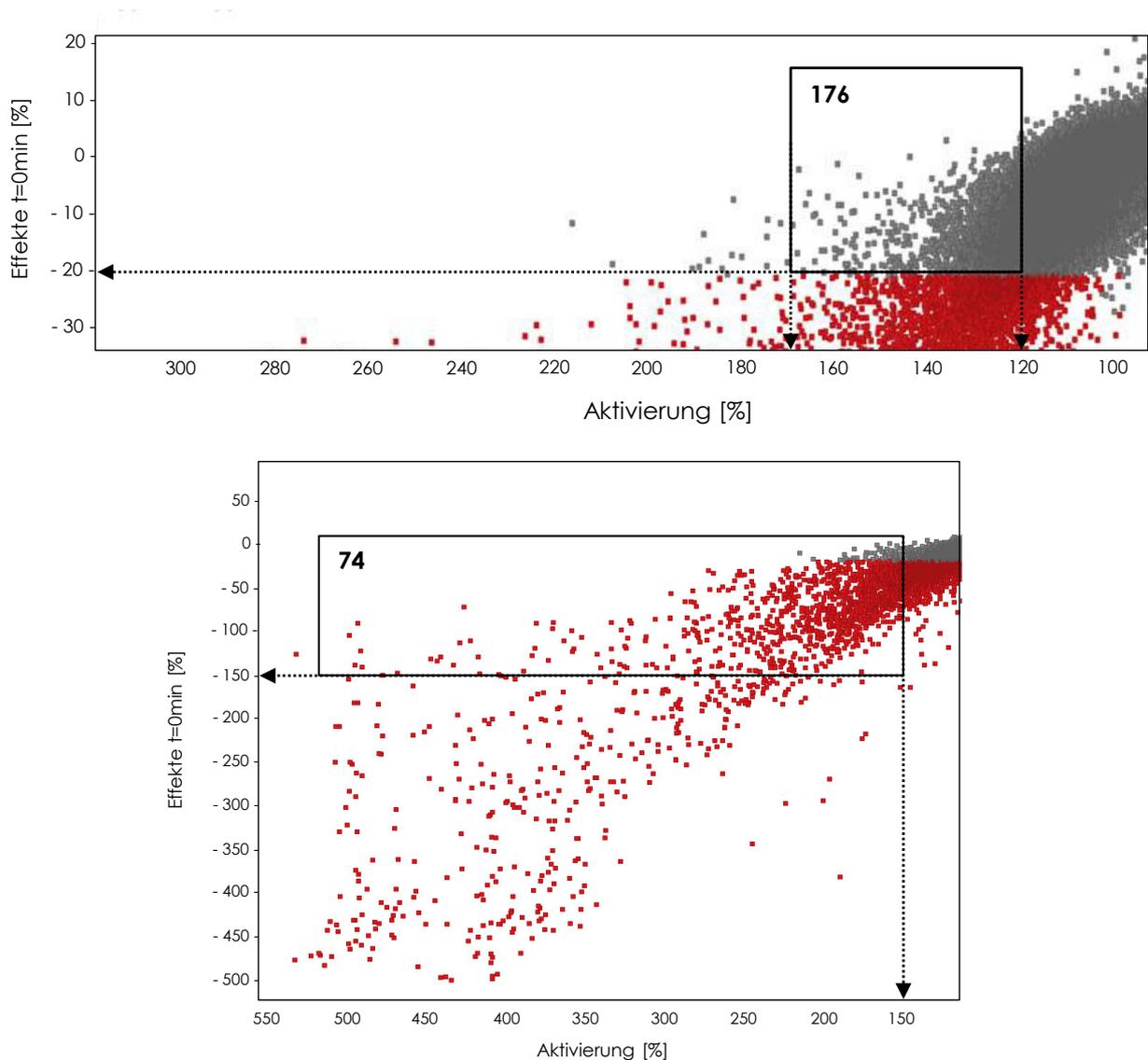


Abbildung 3.56 „Cherry-Picking“ der potenziellen Aktivatoren, die in der folgenden Hit Confirmation wiederholt gemessen werden sollten. Trotz Festlegung auf $\pm 20\%$ wurden Compounds selektiert, die einen autofluoreszierenden Effekt ($n=74$) zeigten.

Da beinahe alle potenziellen Aktivatoren einen Effekt bei Zeitpunkt $t=0$ min zeigten ($\geq 0\%$), war die Festlegung des Hit-Bereiches komplizierter. Um sicherzustellen, dass alle möglichen „echten“ Aktivatoren erfasst werden, wurden zwei Schwellenwerte für die Auswahl festgelegt. Für die folgende Hit Confirmation wurden insgesamt 250 Compounds selektiert. 176 davon wurden aus der Hit Region gewählt, die zu

Zeitpunkt t=0 min einen Effekt $\leq 20\%$ zeigten und zu Zeitpunkt t=60 min eine Aktivierung von 120-170%. 74 weitere *Compounds* wurden aus einem Bereich gewählt, der einen Teil der vorerst ausgeschlossenen autofluoreszierenden *Compounds* berücksichtigt (Schwellenwert: $\geq 150\%$ zu t=0 min und $\geq 150\%$ zu t=60 min), weil unter ihnen trotz autofluoreszierendem Effekt interessante Strukturen dabei waren. Somit sollte verhindert werden, dass positive Aktivatoren verloren gehen.

Abbildung 3.57 zeigt den Teil des *Hauptscreenings* der potenziellen Inhibitoren. Grün markierte *Compounds* wurden ebenfalls durch den zuvor festgelegten Cut-Off-Wert ausgeschlossen. Die grau markierten eingekreisten Punkte stellen die *Hit* Region dar, die die „echten“ Inhibitoren beinhaltet. Auch für die Inhibitoren wurde ein Schwellenwert festgelegt, um die *Hits* für die folgende *Hit Confirmation* zu bestimmen (**Abbildung 3.58**).

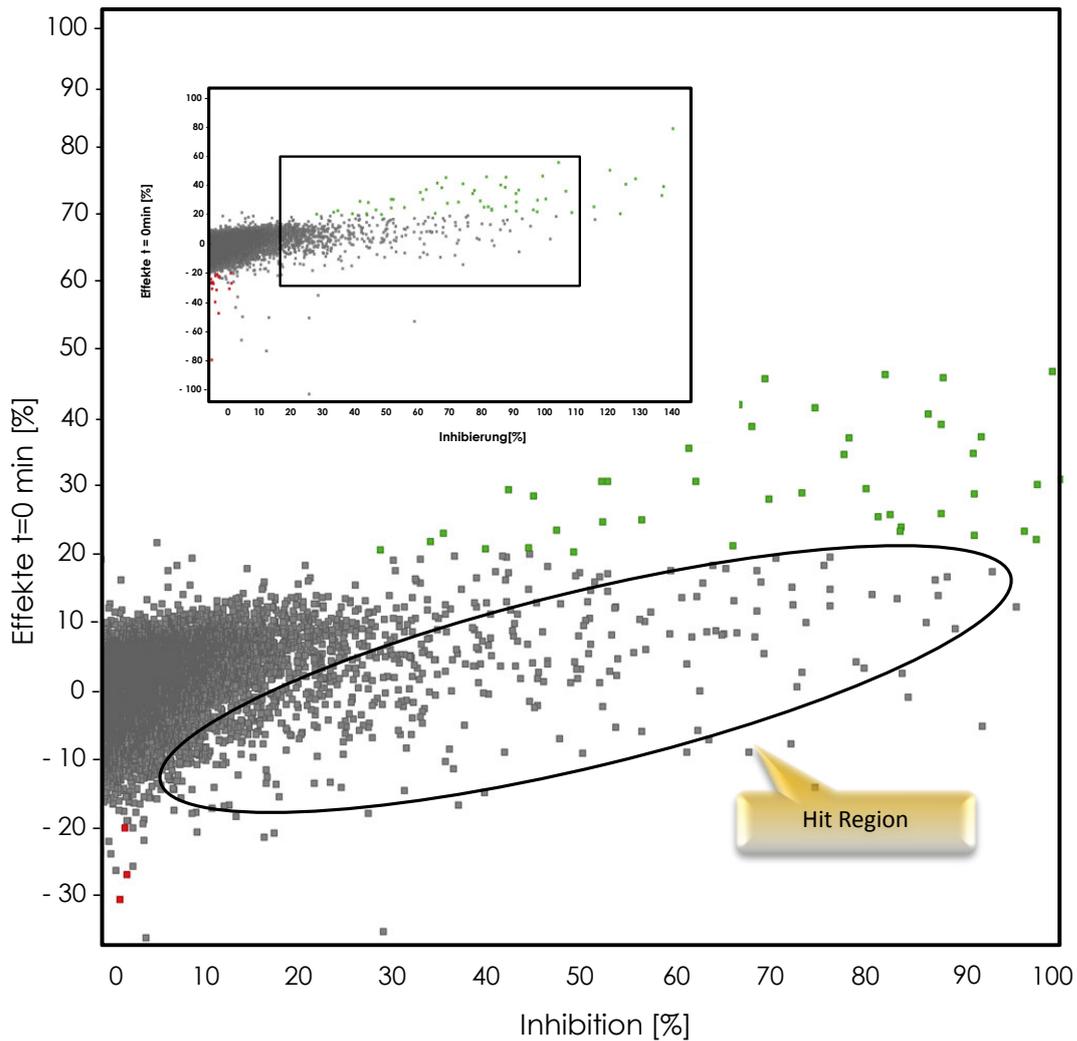


Abbildung 3.57

Auszug des Ergebnisses des Primary Screens zur Ansicht der potenziellen „echten“ Inhibitoren (Hit Region). Jeder Punkt stellt den Effekt einer gemessenen Compound dar. Die Effekte zum Zeitpunkt $t=0$ min (Negativkontrolle ist auf 0% gesetzt) sind gegen die Inhibition zum Zeitpunkt $t=60$ min (Negativkontrolle ist auf 0% gesetzt) aufgetragen. Die Effekte [%] wurden aus den ermittelten Fluoreszwerten [RFU] des DDAH1-Aktivitätsassays berechnet. Compounds mit Quenching-Effekt sind grün markiert (definiert durch den aufgestellten Schwellenwert von 20%). Die markierte Hit Region enthält potenzielle „echte“ Inhibitoren (Effekt $t=0$ min $\leq 20\%$).

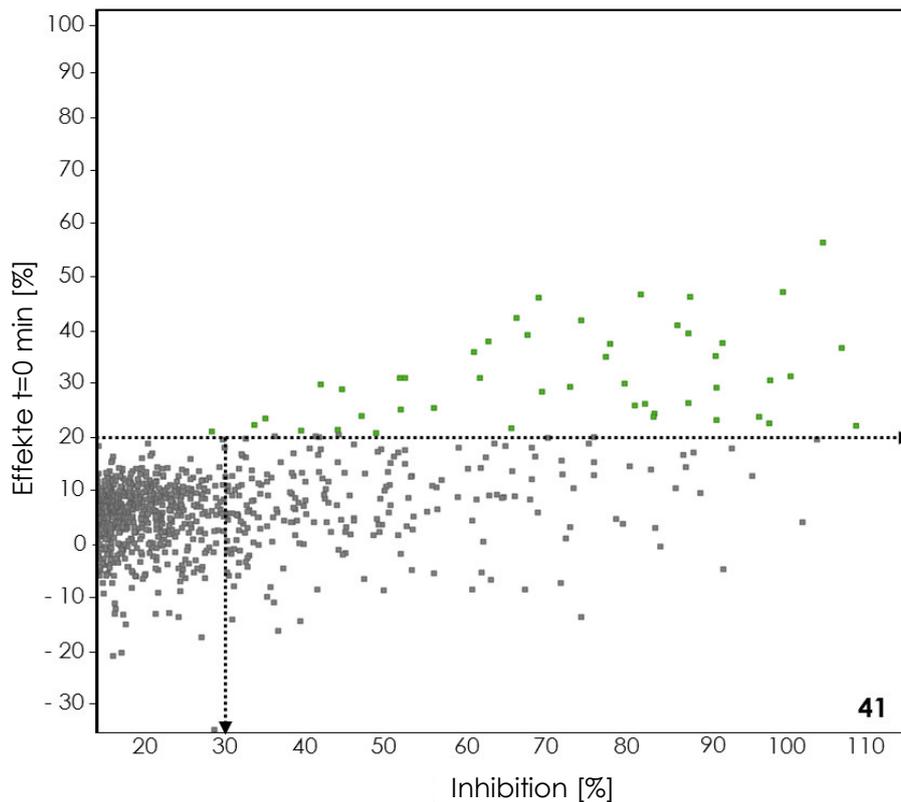


Abbildung 3.58 „Cherry-Picking“ der potenziellen Inhibitoren, die in der folgenden Hit Confirmation wiederholt gemessen werden sollten.

Es wurden 41 Inhibitoren aus dem Bereich zwischen $\leq 20\%$ ($t=0$ min) und $\geq 30\%$ ($t=60$ min) ausgewählt. Aus dem Angebot der eingegrenzten *Compounds* wurden chemisch verschiedenartige Strukturen ausgewählt und in Cluster unterteilt.

Insgesamt wurden weitere 217 *Compounds* aus der ENAMIN-Bibliothek ausgewählt, die nicht im *Primary Screen* getestet wurden. Diese wurden auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit den ausgewählten Aktivatoren (135 *Compounds*) und Inhibitoren (82) ausgewählt. Mit einer kleinen Auswahl an Tool-Komponenten (24 *Compounds*) wurden aus dem Screening von 52.096 *Compounds* insgesamt 532 *Hits* selektiert. Dies machte eine *Hit-Rate* von ca. 1% aus (1% stellt einen ungefähren Richtwert dar, der bei der Durchführung eines HTS erhalten werden soll; bei *Hit-Raten* $\geq 1\%$ ist die weitere Analysierung zu umfangreich und kostspielig; neue Schwellenwerte müssten aufgesetzt werden).

3.2.3.3 Hit Confirmation | Bestätigung der Hits

Da die Durchführung des ersten Screenings normalerweise in einer Einzelbestimmung durchgeführt wird, ist es wichtig die erhaltenen Hits in einer zweiten Messung zu bestätigen. Hierzu wurden die ausgewählten 532 Compounds in einer Dreifachbestimmung in der gleichen Weise gemessen. Die Endkonzentrationen der Compounds lag ebenfalls bei 10 µmol/L. Der Z Prime (\emptyset 0,75 bei 15 Platten) und die Varianz (\emptyset 3,01% bei Negativkontrolle und 4,38% bei Positivkontrolle) zeigten mit dem Primary Screen vergleichbare Werte. Durch die Messung konnten die durch Einzelbestimmung entstandenen Streuungen (Messfehler) aussortiert werden. Die „echten“ Modulatoren sollten hingegen wiederholt einen Effekt bei $t=60$ min aufweisen.

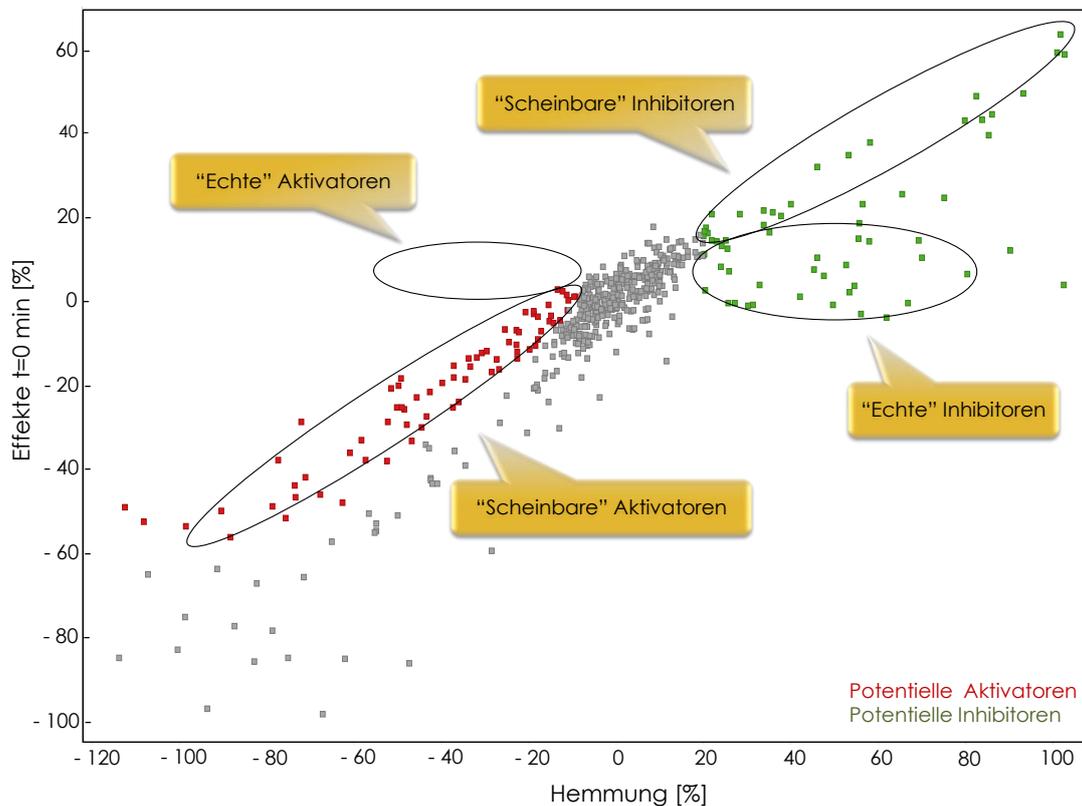


Abbildung 3.59

Ergebnis der Hit Confirmation. Die Effekte zum Zeitpunkt $t=0$ min [%] sind gegen die Inhibition [%] nach 60 Minuten dargestellt. Die zur X-Achse horizontal angeordneten Punkte stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit „echte“ Modulatoren dar. Compounds mit Effekten zu $t=0$ min sind diagonal angeordnet und sind vermutlich falsch-positive Hits („scheinbare“ Modulatoren). Rot/grün markierte Compounds wurden für das nachfolgende Hit Profiling ausgewählt.

In **Abbildung 3.59** ist das Gesamtergebnis der *Hit Confirmation* dargestellt. Echte Modulatoren sollten idealerweise horizontal zur Y-Achse angeordnet sein, das einem Effekt von 0% bei t=0 min entspricht. Die Effekte sind als Hemmung [%] (X-Achse) angegeben. Aktivatoren sollten demnach eine negative Hemmung $\leq 0\%$ aufweisen. Wie sich bereits bei dem Hauptscreening angedeutet hatte, zeigten beinahe alle wiederholt gemessenen potenziellen Aktivatoren einen Effekt zum Zeitpunkt t=0 min. Unter dem wiederholten Screening konnten insgesamt 133 *Compounds* als *Hit* reproduziert werden. Davon wurden 72 *potenzielle/scheinbare Aktivatoren* ausgewählt (rot markierte Punkte), die jedoch auf Grund einer Autofluoreszenz bis zu 60% mit hoher Wahrscheinlichkeit falsch-positive oder schwache *Hits* darstellen. Um aber sicherzustellen, dass sich darunter nicht doch ein „echter schwacher“ Aktivator befindet, wurden diese für die weitere Analyse (*Hit Profiling*) berücksichtigt. Darunter waren 21 *Compounds* der vorher nicht-gescreenten Bibliothek enthalten. Das Ergebnis hinsichtlich der Inhibitoren sah hingegen vielversprechender aus. Ein Teil der *Compounds* zeigte keinen Effekt zum Zeitpunkt t=0 min (horizontale Anordnung zur X-Achse) und die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um „echte“ Inhibitoren handelt, ist daher sehr groß. Insgesamt wurden 61 *potenzielle Inhibitoren* (grünen Punkte) inkl. Quenching-Effekte bis 60% nach der wiederholten Messung ausgewählt worden.

Zur Bewertung der Qualität und Reproduzierbarkeit wurden die Ergebnisse des *Hauptscreenings* und die der *Hit Confirmation* miteinander verglichen. **Abbildung 3.60** zeigt die Gegenüberstellung bezogen auf die Hemmung [%]. Da ein Teil der *Compounds* im ersten Screening nicht gemessen wurden und somit keinem Vergleich unterzogen werden konnten, wurden diese für die Analyse auf eine Hemmung von 0% gesetzt (horizontale Linie). Potenzielle Aktivatoren bzw. Inhibitoren sind farblich gekennzeichnet. Mit einer n-Zahl von 315 konnte durch eine Korrelationsanalyse (diagonale Gerade) ein R^2 von 0.59 festgestellt. Der Unterschied bzw. die Streuung, die zu diesem Wert führten, rührte von der Einfachbestimmung des *Hauptscreenings* her.

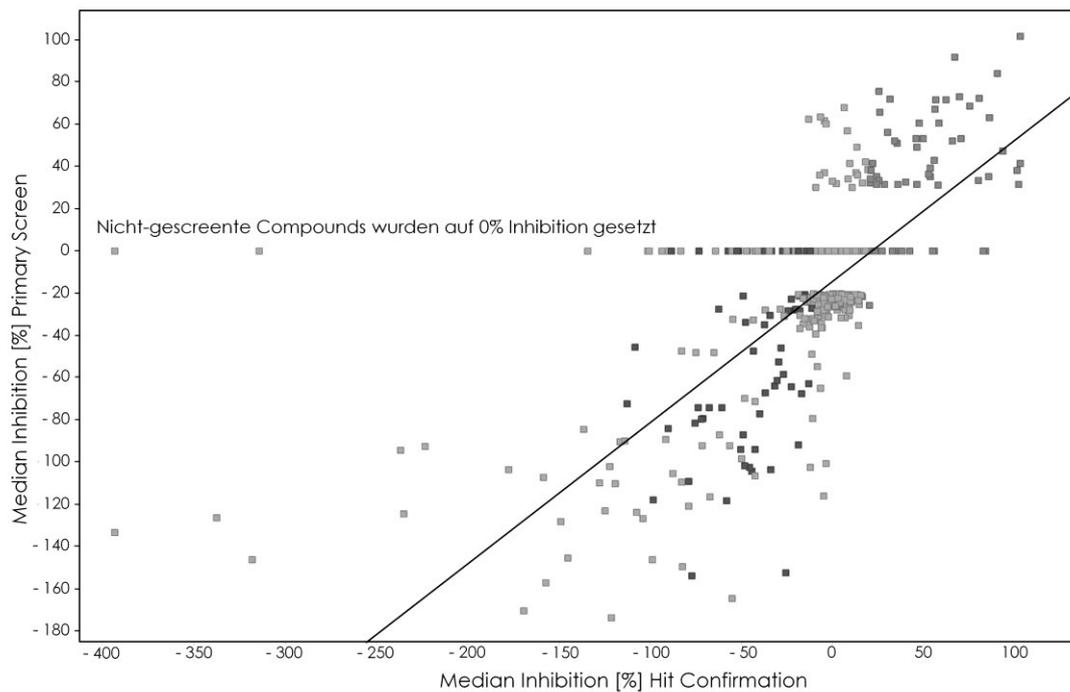


Abbildung 3.60 Bestimmung der Korrelation zwischen Primary Screen und Hit Confirmation bezogen auf die Inhibition [%]. Die im Primary Screen nicht gemessenen Compounds sind auf eine Inhibition von 0% gesetzt (horizontal angeordnete Punkte). Es ergab sich ein R^2 von 0.59 mit $n=315$.

3.2.3.3.4 Hit Profiling | Konzentrations-Wirkungskurven

Im Anschluss an die *Hit Confirmation* erfolgte nun das *Hit Profiling*, die nähere Untersuchung der identifizierten *Hits* durch Aufstellung von 11-Punkt-Konzentrations-Wirkungskurven. Von den *Compounds* wurden Endkonzentrationen von 50-30-22-15-10-6,5-4,5-3-2-1,5-1 $\mu\text{mol/L}$ gemessen. Die zu beobachtenden Effekte sind am Beispiel einer Platte in **Abbildung 3.62** dargestellt.

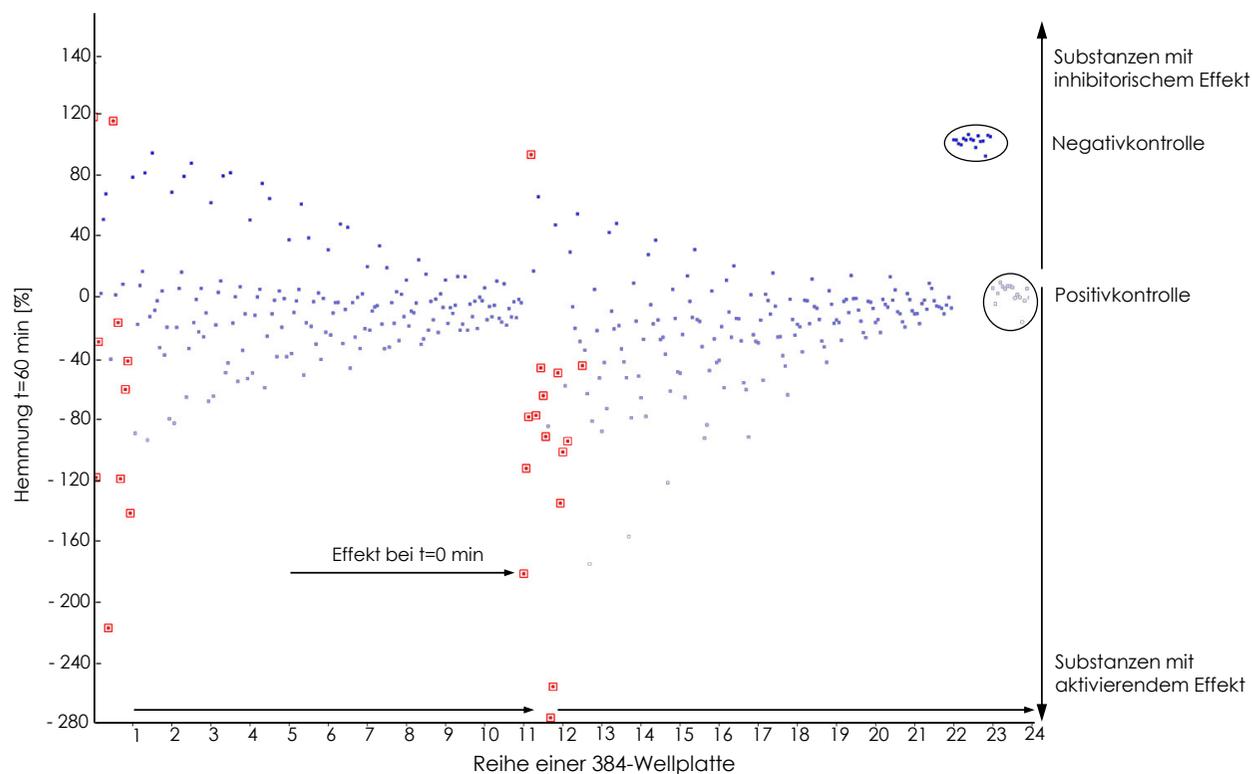
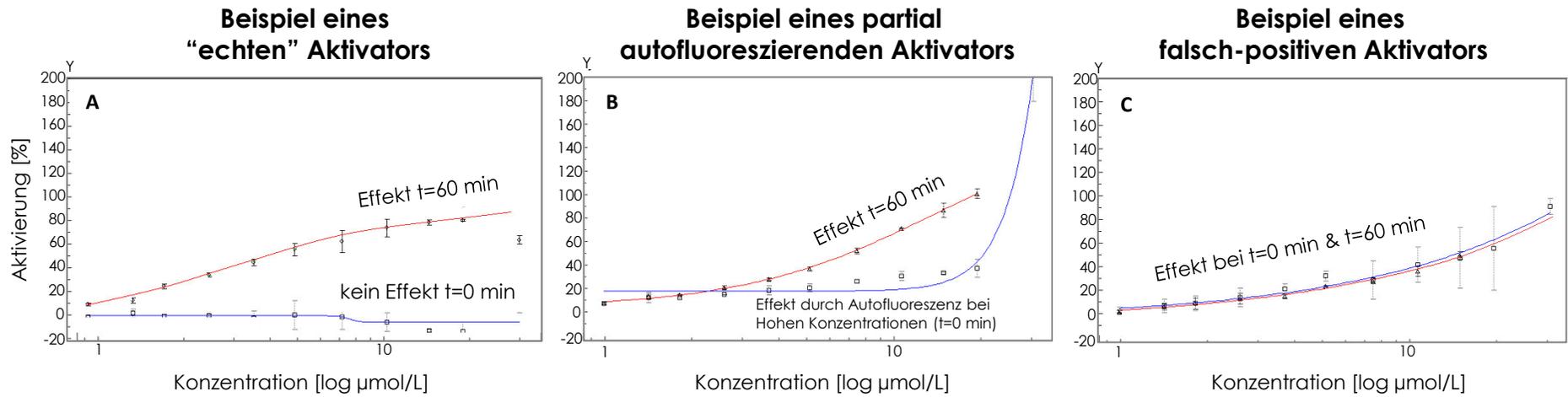


Abbildung 3.62 Ansicht einer gemessenen Platte vom Hit Profiling. Es wurden Konzentrationsreihen von 1-50 $\mu\text{mol/L}$ der *Compounds* gemessen (Konzentration nimmt von Well 1-11 bzw. 12-24 ab). Konzentrationen, die einen Effekt von $\pm 60\%$ bei $t=0$ min bewirkten (rot einkreist) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Negativkontrolle (Spalte 24) wurde auf 0% Inhibition gesetzt.

Zu sehen sind die Effekte der *Compounds* in den jeweiligen Konzentrationen. Die Konzentration nimmt dabei von links nach rechts ab (von Well 1-11 und 12-22, d.h. zwei getestete *Compounds* pro Reihe). Die Bestimmung erfolgte in einer Dreifachbestimmung, die der Positiv- (Reihe 23) und Negativkontrollen (Reihe 24) mit $n=16$. Die Negativkontrolle wurde auf 0% Inhibition gesetzt. Mit abnehmender Konzentration nehmen die Effekte der *Compounds* ab und nähern sich dem Wert 0 an. Die eingekreisten Punkte stellen *Compounds* dar, die zum Zeitpunkt $t=0$ min einen Effekt zeigten und wurden somit der weiteren Analyse entzogen. Ziel des *Hit Profilings* ist die Identifizierung der aussichtsreichsten Strukturen. Die erstellten Konzentrations-Wirkungskurven geben außerdem weitere Informationen darüber, ob es sich um einen „echten“ Modulator handelt oder nicht. **Abbildung 3.63** zeigt Beispiele von Konzentrations-Wirkungskurven „falscher“ und „echter“ Aktivatoren. Bei allen Kurven wurden die Werte für die Aktivierung [%] bei Zeitpunkt $t=0$ min (blau) und $t=60$ min (rot) dargestellt. Die Effekte der Aktivierung wurden dabei auf die Negativkontrolle basiert.

**Abbildung 3.63**

Beispiele für Konzentrations-Wirkungskurven von „echten (A), partialen (B), und falsch-positiven (C)“ Aktivatoren. Die obere Kurve zeigt den Effekt zum Zeitpunkt $t=60$ min, die untere Kurve den Effekt zum Zeitpunkt $t=0$ min dar.

Teil A der **Abbildung 3.63** zeigt die ideale Konzentrations-Wirkungskurve eines „echten“ Aktivators. Während bei Zeitpunkt $t=0$ min kein Effekt zu sehen ist, steigt die Aktivität des Enzyms mit Erhöhung der Konzentration des Aktivators. Teil B zeigt einen Aktivator, der teilweise eine Autofluoreszenz zu Zeitpunkt $t=0$ min aufweist. Vor allem diese Art von Aktivator ist schwer zu identifizieren. Aus diesem Grund wurden bei der Analysierung der Screenings teilweise *Compounds* ausgewählt, die Effekte zu Zeitpunkt $t=0$ min zeigten. Vor allem bei hohen Konzentrationen steigt die Fluoreszenz steil an und überdeckt die Effekte zum Zeitpunkt $t=60$ min. Teil C zeigt einen komplett autofluoreszierenden Aktivator ohne einen echten Effekt auf die Enzym-Aktivität. Die Effekte wachsen mit steigender Konzentration stetig an. Der aktivierende Effekt ist komplett auf die Autofluoreszenz zurückzuführen.

Nach der Messung der 72 ausgewählten potenziellen Aktivatoren bei der *Hit Confirmation* wurden die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt. Die endgültige Analysierung und Auswahl der *Hits* für die weiteren Schritte wurde wieder basierend auf Strukturanalysen durchgeführt. Insgesamt wurden 8 *potenzielle Aktivatoren* ausgewählt. **Abbildung 3.64** zeigt die chemischen Strukturen und vier der entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven. Die Ergebnisse des *Hit Profiling* ließen erkennen, dass es sich bei den Strukturen um partiale autofluoreszierende Aktivatoren handeln könnte. **Tabelle 3.3** fasst die jeweiligen analysierten IC_{50} -Werte und prozentuale Aktivierung (%) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration zusammen.

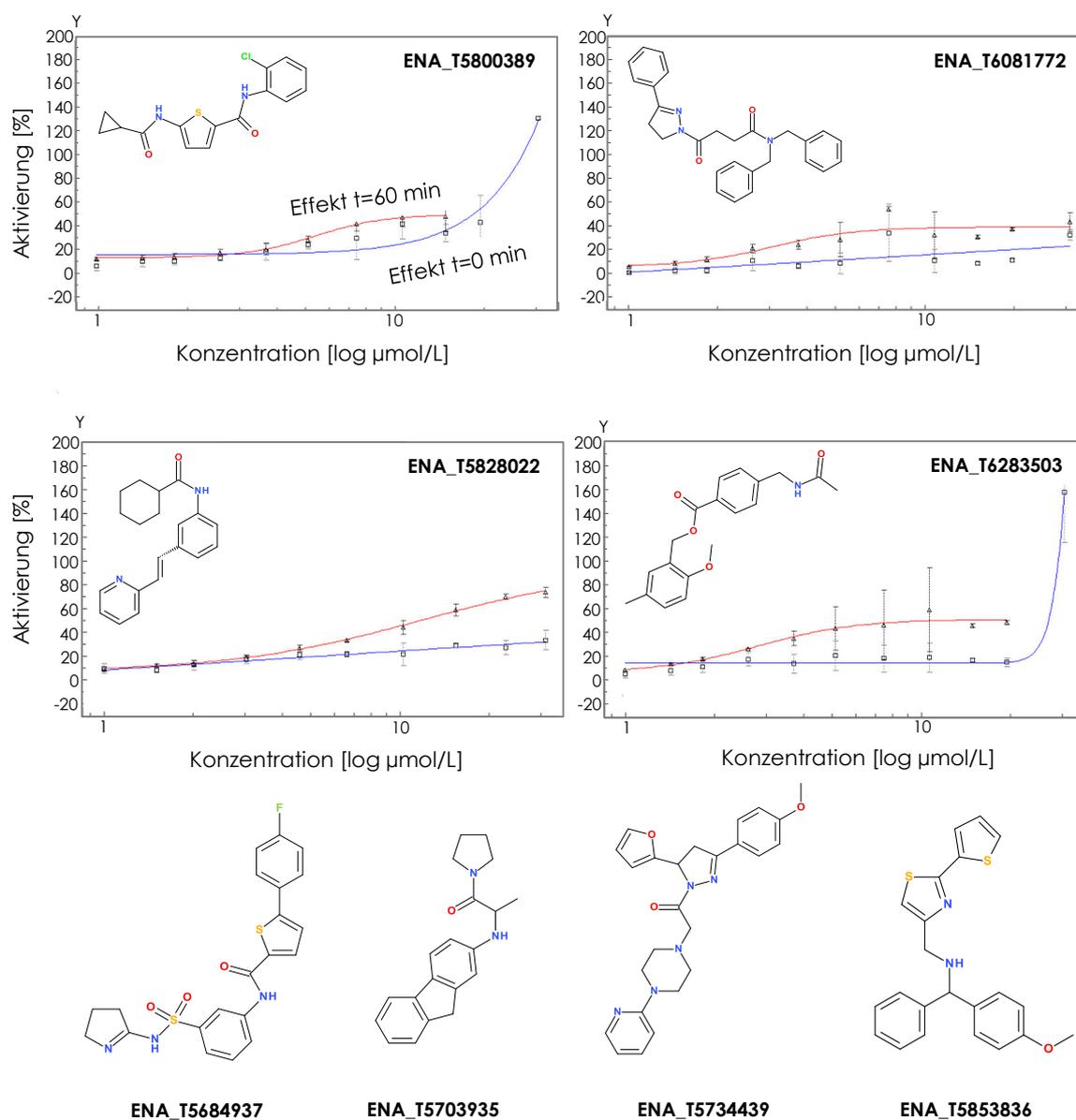


Abbildung 3.64 Teil I der Ergebnisse des Hit Profiling. Es wurden 8 potenzielle schwache Aktivatoren ausgewählt, die teilweise einen autofluoreszierenden Effekt zeigten. Dargestellt sind Teilausschnitte der Konzentrations-Wirkungskurven (obere Kurve = Aktivierung [%] nach 60 Minuten; untere Kurve = Effekt [%] zum Zeitpunkt $t=0$ min).

Compound	IC ₅₀ [µM]	Hill	R ²	Maximale Aktivierung [%]	Konzentration bei maximaler Aktivierung [µmol/L]	Minimale Aktivierung [%]	Konzentration bei minimaler Aktivierung [µmol/L]
ENA_T5800389	6,93	3,23	1	82,46	22	20,23	1
ENA_T6081772	3,55	2,67	0,79	92,98	10	9,19	1
ENA_T5684937	1,58	1,09	0,91	80,61	30	15,37	1
ENA_T5703935	>22	1	1	70,27	22	11,21	1
ENA_T5734439	12,43	1,41	0,99	61,94	22	6,23	1
ENA_T5853836	6,01	2,07	0,84	43,91	30	14,05	1,5
ENA_T5828022	11,66	1,34	1	126,62	30	15,12	1
ENA_T6283503	3,27	2,27	0,95	101,13	15	13,48	1

Tabelle 3.3 Darstellung der mit Hilfe der Konzentrations-Wirkungskurven berechneten IC₅₀-Werte der jeweiligen ausgewählten potenziellen Aktivatoren.

Abbildung 3.65 zeigt ein Beispiel eines „echten“ Inhibitors. Da es allgemein weniger zu Quenching-Effekten kommt, ist die Interpretation bzw. Identifizierung der rhDDAH1-Hemmer einfacher.

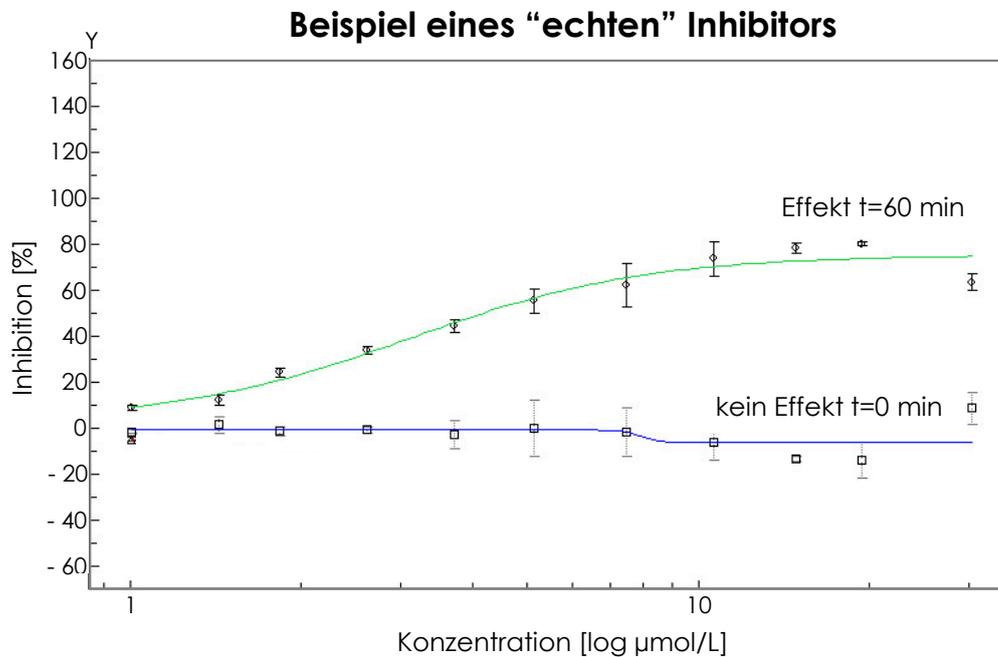
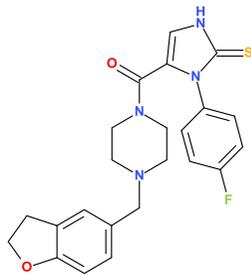
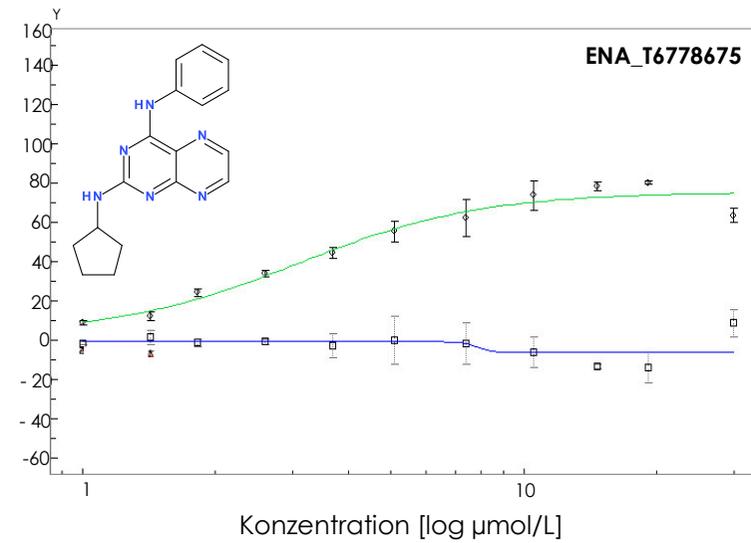
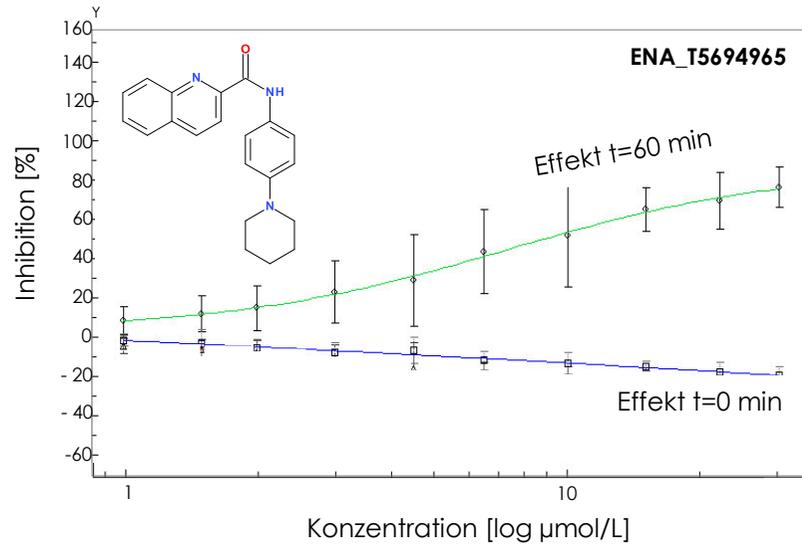
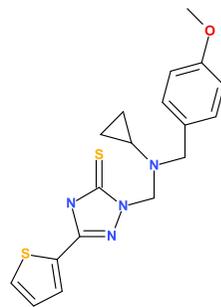


Abbildung 3.65 Beispiel einer Konzentrations-Wirkungskurve von „echten“ Inhibitoren. Wie bei den Aktivatoren sind die Effekte als Inhibition zum Zeitpunkt $t=0$ min (untere Kurve) und $t=60$ min (obere Kurve) wiedergegeben. An der unteren Kurve würde ein Quenching-Effekt widerspiegelt werden.

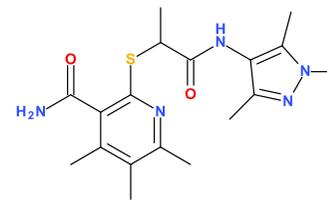
Der ideale Inhibitor zeigt ebenfalls zum Zeitpunkt $t=0$ min keinen Effekt. Mit steigender Konzentration sollte das Signal reduziert werden. Insgesamt wurden 18 potenzielle Inhibitoren identifiziert, deren chemische Strukturen in **Abbildung 3.66** inkl. sechs Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt sind. Keine der 6 Compounds zeigt einen Effekt zu Zeitpunkt $t=0$ min. Mit zunehmender Konzentration wurden die hemmenden Effekte stärker. Die Auswirkung der Reduktion der Enzym-Aktivität mit Werten von 60-120% ($50 \mu\text{mol/L}$) war im Vergleich zu den potenziellen Aktivatoren (40-80%) wesentlich stärker ausgeprägt. Die für die potenziellen Inhibitoren berechneten IC_{50} -Werte sind in **Tabelle 3.4** zusammengefasst.



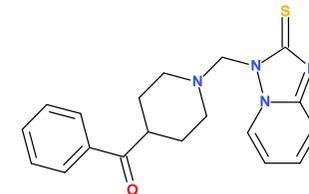
ENA_T6527672



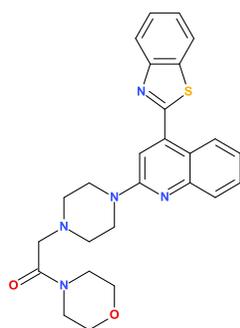
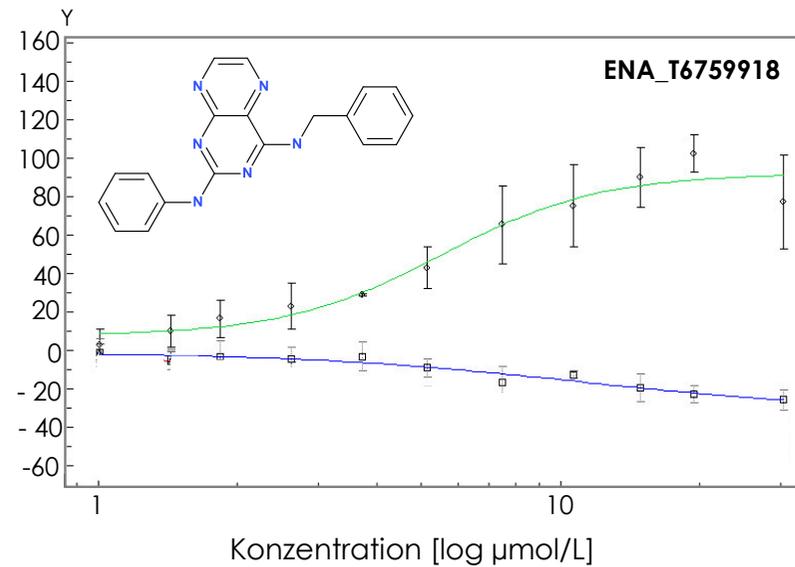
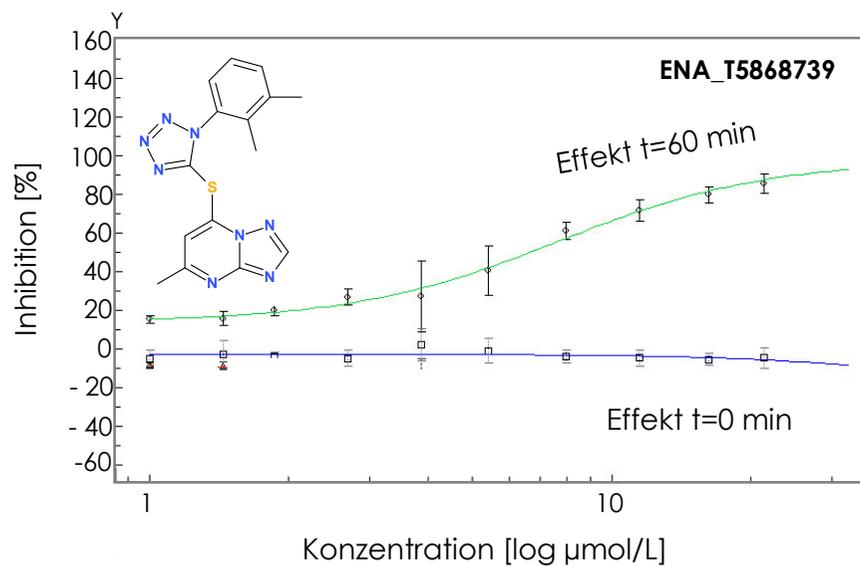
ENA_T6637392



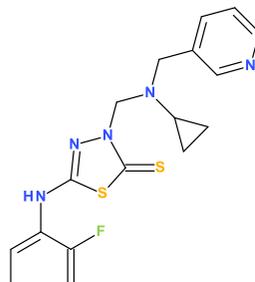
ENA_T5807687



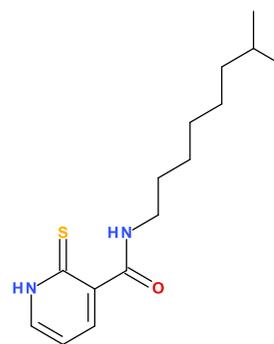
ENA_T5826198



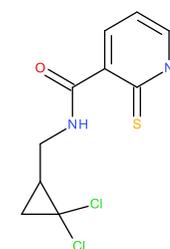
ENA_T5881041



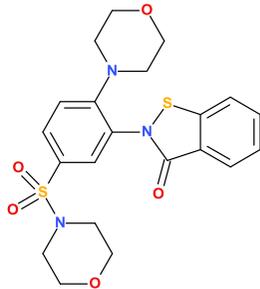
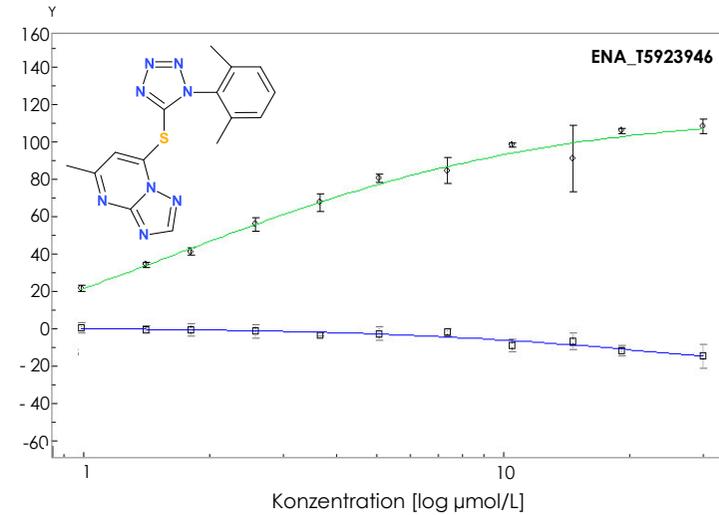
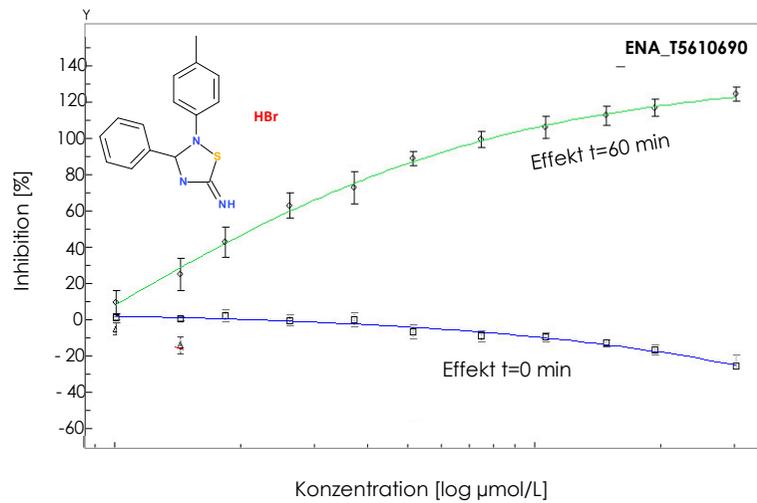
ENA_T5857956



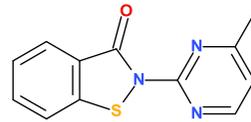
ENA_T6110707



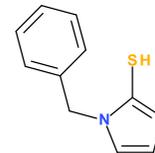
ENA_T6306732



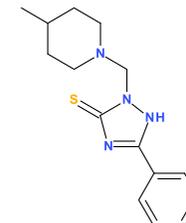
ENA_T0504-6349



ENA_T0515-1684



ENA_T5301828



ENA_T5805956

Abbildung 3.66 Teil II der Ergebnisse des Hit Profilings. Insgesamt konnten 18 potenzielle Inhibitoren gefunden werden. Keine der dargestellten Compounds zeigte einen Effekt zu t=0 min. Dargestellt sind Teilausschnitte der Konzentrations-Wirkungskurven (grüne Kurve = Inhibition [%] nach 60 Minuten, untere Kurve = Inhibition [%] zum Zeitpunkt t=0 min).

Compound	IC ₅₀ [µM]	Hill	R ²	Maximale Hemmung [%]	Konzentration bei maximaler Hemmung [µmol/L]	Minimale Hemmung [%]	Konzentration bei minimaler Hemmung [µmol/L]
aa	<1	0,76	1,00	124,05	50	9,39	1
ENA_T6759918	7,09	2,23	0,96	102,02	30	2,77	1
ENA_T6527672	36,12	0,77	1,00	76,78	50	0,33	1
ENA_T6637392	4,15	1,77	1,00	80,36	50	13,16	1
ENA_T5807687	11,56	1,95	0,99	92,37	50	-0,08	1
ENA_T5826198	9,97	1,60	1,00	105,51	50	2,00	1
ENA_T5694965	7,34	1,40	1,00	76,08	30	8,02	1
ENA_T6778675	3,66	1,83	0,96	79,95	30	8,65	1
ENA_T0504-6394	2,42	1,65	0,99	105,94	50	3,76	1
ENA_T0515-1684	1,09	1,51	0,98	94,18	50	14,30	1
ENA_T5301828	1,43	1,27	0,94	100,66	30	45,77	1
ENA_T5805956	3,28	2,89	0,96	84,06	10	20,34	1
ENA_T5923946	1,78	0,84	0,99	108,05	50	21,19	1
ENA_T5868739	9,6	1,75	0,99	94,95	50	15,02	1
ENA_T5881041	7,01	1,20	1,00	116,71	30	7,69	1
ENA_T5857956	5,63	1,55	0,98	72,30	50	10,37	1
ENA_T6110707	17,95	1,09	1,00	93,94	30	7,28	1
ENA_T6306732	3,56	2,57	0,99	75,16	22	15,80	1

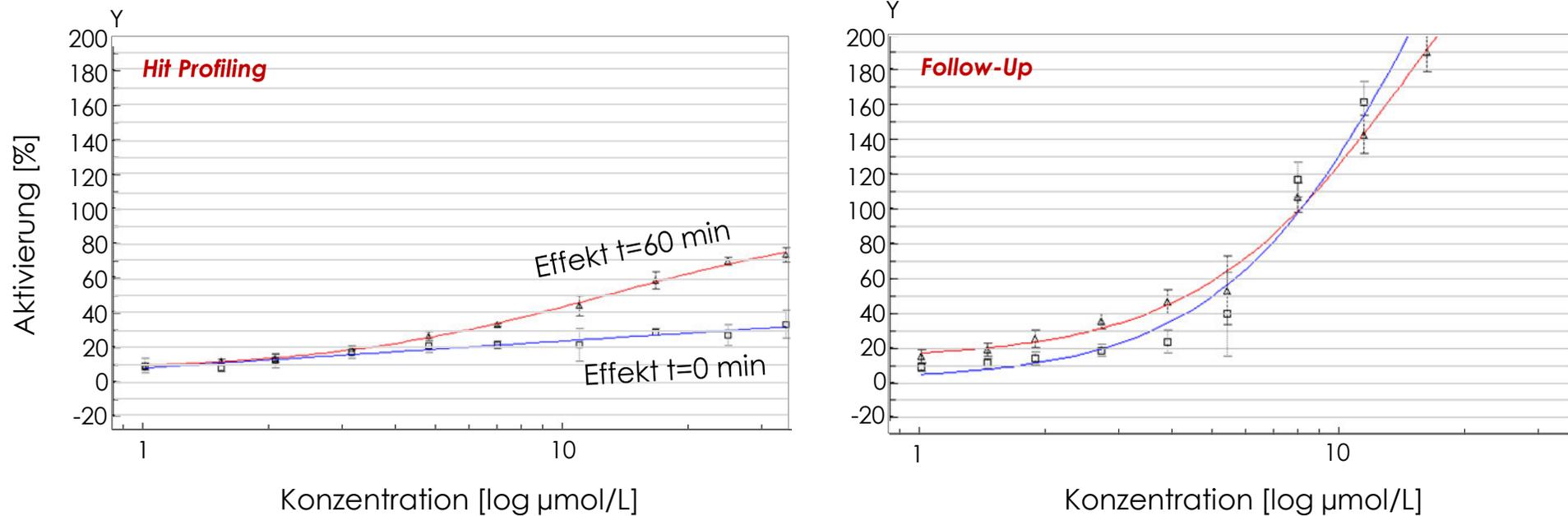
Tabelle 3.4 Darstellung der mit Hilfe der Konzentrations-Wirkungskurven berechneten IC₅₀-Werte der jeweiligen ausgewählten potenziellen Inhibitoren.

3.2.3.3.5 Follow-Up | Trockensubstanzen

Im letzten Schritt des HTS-Prozesses erfolgte das *Follow-Up*. Es kann vorkommen, dass sich die in DMSO gelösten *Compounds* auf Grund der langen Lagerung zersetzen. Dabei ist es möglich, dass nicht das Molekül selbst, sondern ein Fragment bzw. die veränderte Struktur für den hemmenden oder aktivierenden Effekt verantwortlich ist. Aus diesem Grund ist es notwendig die *Hits* als frisch gelöste *Compound* zu testen, um sicher zu stellen, dass der beobachtete Effekt tatsächlich vom intakten Molekül herrührt. 23 *Compounds* (3 *Compounds* waren nicht lieferbar o.ä.) wurden als Trockensubstanz bestellt und frisch in DMSO gelöst. Es wurden erneut Konzentrations-Wirkungskurven mit den gleichen Konzentrationen in Dreifachbestimmung vermessen.

Alle Inhibitoren konnten dabei erfolgreich mit den frischen *Compounds* reproduziert werden und zeigten ähnliche hemmende Effekte im Vergleich zum *Hit Profiling*. Im Gegensatz zu den Inhibitoren konnten jedoch, wie bereits vermutet, keine der ausgewählten potenziellen Aktivatoren reproduziert werden. Der „aktivierende Effekt“ zu $t=60$ min zeigte zwar im Vergleich zum *Hit Profiling* ähnliche Werte, jedoch wiesen die frischen *Compounds* eine wesentlich stärkere Autofluoreszenz zum Zeitpunkt $t=0$ min auf.

In **Abbildung 3.67** ist der Effekt am Beispiel von ENA_5828022 aus dem *Follow-Up* dargestellt (rechts), der von allen *Hits* den stärksten aktivierenden Effekt während des *Hit Profiling*s zeigte. Auf der linken Seite ist das Ergebnis aus dem *Hit Profiling* zum Vergleich zu sehen. Wie zu erkennen ist, stieg der aktivierende und der autofluoreszierende Effekt gleichzeitig mit zunehmender Konzentration der *Compound* an. Es handelte sich somit sicher um einen falsch-positiven Aktivator. Gleiche Ergebnisse wurden bei allen anderen „Aktivatoren“ beobachtet.

**Abbildung 3.67**

Vergleich der gemessenen Konzentrations-Wirkungskurven (Teilausschnitt) eines potenziellen Aktivators zwischen dem Hit Profiling (links) und Follow-Up (rechts). Die obere Kurve stellt die Aktivierung [%] nach 60 Minuten dar, die untere Kurve den Effekt [%] zum Zeitpunkt $t=0$ min. Die gemessene Aktivierung [%] im Hit Profiling konnte im Follow-Up (Messung mit frisch gelösten Compounds) nicht reproduziert werden.

4 Diskussion

4.1 SDMA und AGXT2

4.1.1 Expression und Funktion der AGXT2

4.1.1.1 Expression

In den 70er Jahren wurde die zweite Isoform der AGXT in der Mitochondrienfraktion von Leberhomogenat der *Ratte und Maus* identifiziert (134, 165). In den darauf folgenden Jahren konnte die Lokalisation der AGXT2 in den Mitochondrien in unterschiedlichen Tiermodellen (Maus, Ratte, Schwein, Hase, Affe) bestätigt werden (100, 134, 137, 140, 191). Als das Enzym einige Jahre später wieder in den Fokus der Wissenschaft geriet, wurden richtigerweise Experimente in *menschlichen Nieren- und Leberzellen* (HUVEC- und HepG2⁷¹-Zellen) durchgeführt (11, 162). Dort konnte gezeigt werden, dass das Enzym im Menschen ebenfalls in den Mitochondrien exprimiert wird.

Trotz der ersten erfolgreich durchgeführten AGXT2-Experimente in humanen Leber- und Nierenzellen, wurde bisher nie das Organ-spezifische Expressionsmuster der AGXT2 untersucht. Die Frage, ob die AGXT2 ebenfalls in anderen Organen des Menschen exprimiert wird, blieb weiterhin ungeklärt. Um diese Frage zu beantworten, wurde in dieser Arbeit die Expression der AGXT2 auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert.

Zum einen konnte bestätigt werden, dass das Protein vorwiegend in Leber und Niere exprimiert wird. Des Weiteren wird das Enzym in Herz, Plazenta, Lunge, Skelettmuskel und Pankreas exprimiert. Eine Lokalisation der AGXT2 im Gehirn konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. In humanen Nierenschnitten konnte hier erstmals gezeigt werden, dass die AGXT2 ausschließlich im proximalen Tubulus des Nephrons lokalisiert ist. Anhand von HEK-Zellen konnte die subzelluläre Lokalisation der AGXT2 in der Niere bestätigt werden, die bereits durch Baker & Rodionov (11, 162)

⁷¹ Hepatozellulär carcinoma G2 Zellen

beschrieben wurde. Ein weiteres Ziel war es, zu untersuchen, ob die in der GWAS entdeckte AGXT2-Variante rs37369 einen Einfluss auf dessen Lokalisation hat oder innerhalb der Mitochondrien zu einem veränderten Expressionsmuster führt. Hintergrund dieser Frage war die bei Primärer Hyperoxalurie – einer autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankung – identifizierte Mutation im AGXT1-Gen. Durch die Punktmutation wird dieses Enzym, welches in den Peroxisomen exprimiert wird, zu den Mitochondrien fehlgeleitet. Dadurch kann das in den Peroxisomen anfallende Glyoxylat nicht mehr ausreichend metabolisiert werden (38, 39). Durch Immunfluoreszenz-Färbung der HEK-Zellen (Überexpression des AGXT2-Wildtyps und der Variante rs37369) konnten wir jedoch zeigen, dass die Mutation in der AGXT2 keinen Einfluss auf deren Expression in den Mitochondrien nimmt.

4.1.1.2 Enzymatischer Abbauweg von SDMA

Bereits im Jahre 1987 war von einer Metabolisierung der Dimethylarginine die Rede (137, 138). Ogawa et al. konnte im Urin ^{14}C -ADMA/SDMA-injizierter Ratten $\text{D}'\text{MGV}$ als Metaboliten identifizieren, die bei der renalen Elimination der Dimethylarginine entstehen (138). Er fand heraus, dass 12 h nach Injektion 13% von ADMA über den Urin ausgeschieden wurde. Davon stellten 16,4% DMGV dar. Den Großteil (87%) konnte er dabei im Gewebe nachweisen, als Abbauprodukte der von ihm zuvor entdeckten Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH). SDMA hingegen wurde zu 75% renal ausgeschieden, davon stellte $\text{D}'\text{MGV}^{72}$ einen Anteil von 20,2% dar. Im Gewebe konnte er hingegen keine weiteren Abbauprodukte von SDMA identifizieren (SDMA lag zu 25% unverändert vor). Dies zeigte, dass trotz des hohen unverändert eliminierten Anteils SDMA dennoch zu insgesamt 15,2% metabolisiert wird. ADMA hingegen wird von der AGXT2 insgesamt nur zu ungefähr 2,1% abgebaut. Daraus kann man vermuten, dass *in-vivo* die AGXT2 wohl eher für den Abbau von SDMA verantwortlich zu sein scheint als für ADMA.

Um mögliche Ursachen interindividueller Unterschiede der Dimethylarginine beim Menschen genauer untersuchen zu können, gibt es die Möglichkeit der genomweiten Assoziationsstudien (GWAS), mit denen durch eine genetische Assoziation

⁷² α -Keto- δ -(N',N -dimethylguanidino)-valeriansäure

zum Teil neue Stoffwechselwege identifiziert werden können. In einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten GWAS konnte erstmals eine genetische Assoziation zwischen SDMA-Konzentrationen im Plasma und der AGXT2-Variante im Menschen identifiziert werden (Lüneburg et al., in Revision). Mit ADMA-Plasmakonzentrationen konnte hingegen keine Assoziation mit der AGXT2 entdeckt werden. In dieser Arbeit sollte nun die Metabolisierung von SDMA durch AGXT2 in *humanen Zellen* auf Protein-Ebene mit einem photometrisch-basierten Assay gemessen werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass die durch die genetischen Daten der GWAS aufgestellte Hypothese bestätigt werden konnte. Sowohl mit Glyoxylat als auch mit Pyruvat konnte eine Aktivität der AGXT2 mit SDMA als Substrat *in-vitro* gemessen werden. In der Zwischenzeit wurde durch zwei andere Gruppen die Aktivität von AGXT2 mit SDMA *indirekt in-vivo* nachgewiesen. Zum einen konnten in AGXT2-KO-Mäusen erhöhte SDMA-Plasmakonzentrationen gemessen werden. Biopsien von *Nierentransplantationspatienten* wiesen ebenfalls erhöhte SDMA-Plasmakonzentrationen auf. Diese korrelierten mit der gemessenen AGXT2-Expression (26). Die *direkte* Messung der AGXT2-Aktivität in Mitochondrien (gewonnen aus Nierenhomogenat der Maus) in dieser Studie wurde allerdings nicht mit SDMA durchgeführt. Des Weiteren konnten im Plasma von *Mäusen*, die eine Injektion von 3-Aminoisobutyrat (das als AGXT2-Substrat mit höherer Affinität die Dimethylarginine kompetitiv verdrängt) erhielten, erhöhte ADMA- und SDMA-Konzentrationen gemessen werden. Auch hier erfolgte keine *direkte* Aktivitätsmessung mit SDMA (92).

Mit Hilfe des photometrischen Aktivitätsassays konnte in dieser Arbeit erstmals der *direkte* Nachweis erbracht werden, dass SDMA durch die AGXT2 *im Menschen* abgebaut wird. Dies stellt somit neben der gleichzeitig zu dieser Arbeit nachgewiesenen Assoziation von AGXT2 und SDMA in *Nierentransplantationspatienten* die einzige Studie mit humanem Material dar.

Obwohl in der GWAS kein genetischer Zusammenhang zwischen AGXT2 und ADMA nachgewiesen werden konnte, konnte auch in dieser Arbeit eine Aktivität mit dem asymmetrischen Dimethylarginin gemessen werden (26, 92, 118, 162). Von Ogawa wurde erstmals ein direkter Vergleich zwischen beiden Dimethylargininen als Substrat mit der AGXT2 aufgestellt. Er konnte dabei nur geringfügig unterschiedliche

Affinitäten zwischen ADMA (K_m von 9,7 mmol/L) und SDMA (13,7 mmol/L) in der Ratte messen (137). Allerdings kann bei einer Differenz von 4 mmol/L zwischen den von Ogawa gemessenen K_m -Werten nicht unbedingt von einer unterschiedlichen Affinität zum Enzym ausgegangen werden (K_m -Werte können um das 4-fache variieren; siehe DDAH-Teil). In den hier aufgestellten Messungen konnte keine unterschiedliche Aktivität zwischen beiden Dimethylargininen in humanen Zellen festgestellt werden, allerdings war es bisher im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, einen direkten Vergleich durch Aufstellung der Michaelis-Menten-Konstanten aufzustellen. Es ist durchaus möglich, dass es einen Unterschied bezüglich der beiden Aktivitäten gibt. Um hier einen sicheren Beweis erbringen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Während Ogawa zwar direkt das Produkt D^3 MGV gemessen hat, waren damals noch keine reinen Proteinressourcen vorhanden und enzymatische Messungen waren störanfälliger. In dieser Arbeit hingegen wurden zwar reinere Proteinquellen verwendet, allerdings wurde die Aktivität mit SDMA nur indirekt über Glyoxylat/Pyruvat bewiesen. Um einen direkten Vergleich zwischen SDMA und ADMA aufstellen zu können, müsste das Ergebnis mit mindestens zwei unterschiedlichen Methoden gemessen werden.

4.1.1.3 Einfluss der AGXT2-Mutante rs37369 auf dessen Aktivität

Die in der GWAS entdeckte genetische Assoziation von SDMA mit der AGXT2-Variante rs37369 und die 3D-Analyse ließen zum einen vermuten, dass dieses Enzym für den Abbau von SDMA verantwortlich ist, und zum anderen, dass die Punktmutation einen Einfluss auf dessen Lokalisation oder Aktivität hat.

In dieser Arbeit konnte das erste Mal nachgewiesen werden, dass die beschriebene Mutante die enzymatische Aktivität beeinträchtigt. Mit SDMA als Substrat zeigte sie eine verminderte Aktivität von 51,9% im Vergleich zur intakten Form. Mit L-Alanin zeigte sich eine vergleichbar starke Reduktion um 51,3%. Dieses Ergebnis zeigte erstens, dass der Austausch einer einzigen Base im codierenden Bereich der AGXT2 eine Halbierung der enzymatischen Katalyse zur Folge hat. Zweitens beeinträchtigt sie nicht nur den Abbau von SDMA, sondern auch von L-Alanin und möglicherweise auch den der anderen Substrate. Ob die Metabolisierung der anderen Substrate wirklich eingeschränkt ist, muss in Zukunft analysiert werden.

Die Mutante ist nicht nur hilfreich für die weitere Aufklärung der AGXT2-Funktion mit Hilfe von Zell-Versuchen. Da in der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten GWAS 8% der Patienten den SNP rs37369 im AGXT2-Gen trugen, weist sie auch eine klinische Relevanz auf. Mit einer bis zu 50% eingeschränkten Aktivität, liegt die Vermutung nahe, dass das Enzym mit an der Erhöhung der beobachteten SDMA-Plasmakonzentrationen in diversen Krankheitsbildern beteiligt sein könnte.

4.1.2 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass (1) das AGXT2-Enzym innerhalb der Niere in den proximalen Tubuluszellen des Nephrons lokalisiert ist, (2) die AGXT2 in der Lage ist, SDMA abzubauen, (3) eine Mutation zu einer eingeschränkten Aktivität bis 50% mit SDMA und L-Alanin führt und (4) SDMA und ADMA *in-vitro* zu gleichen Teilen durch die AGXT2 abgebaut wird.

Durch das Wissen, dass SDMA hauptsächlich über die Niere ausgeschieden bzw. eliminiert wird und die AGXT2 vorwiegend in der Niere lokalisiert ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass SDMA nach glomerulärer Filtration teilweise in den proximalen Tubuluszellen durch die AGXT2 zu D´MGV verstoffwechselt und ausgeschieden wird. Dies wird durch die von Ogawa aufgestellten Aussagen über die Urin-Anteile weiter untermauert. Ca. 15% wurden in Form des AGXT2-Stoffwechselproduktes detektiert, wohingegen der größte Teil unverändert ausgeschieden wurde. Aus diesem Grund wurde SDMA bereits als neuer aussichtsreicher Nierenfunktionsmarker diskutiert. Auch wenn SDMA nun doch über einen enzymatischen Stoffwechselweg in der Niere verfügt, hatte sich bisher herausgestellt, dass die SDMA dennoch den bisherigen Markern überlegen ist.

Es ist wahrscheinlich, dass die AGXT2 unabhängig von der Nierenfunktion eine eingeschränkte Aktivität (teilweise hervorgerufen durch die Punktmutation rs37369) innerhalb der Niere oder in anderen Organen aufweist und Einfluss auf SDMA-Plasmakonzentrationen nimmt. Es kann aber auch vermutet werden, dass die AGXT2-Aktivität die Folge einer eingeschränkten Nierenfunktion ist und dadurch an der verminderten SDMA-Elimination beteiligt ist. Solange die Abhängigkeit von der Nierenfunktion noch nicht ausgeschlossen ist, kann davon ausgegangen werden,

dass die AGXT2 mit den veränderten SDMA-Konzentrationen assoziiert ist – egal ob die Assoziation von SDMA mit einer Erkrankung abhängig oder unabhängig von der Nierenfunktion ist. Um die Frage zu klären, sind weitere klinische Studien erforderlich.

Wie bereits erwähnt, konnte in zwei unabhängigen Studien gezeigt werden, dass SDMA sowohl mit der Kurzzeit-, als auch mit der Langzeit-Mortalität nach einem ischämischen Schlaganfall assoziiert ist (114, 175). Die Vermutung liegt nahe, dass eine durch genetische Mutation hervorgerufene erniedrigte AGXT2-Aktivität Ursache für erhöhte SDMA-Konzentrationen bei Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls sein könnte. Des Weiteren hätte man eine verminderte AGXT2-Aktivität in der Niere und die daraus folgende Erhöhung der SDMA-Plasmakonzentration als Ursache für ischämischen Schlaganfall vermuten können. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ausgerechnet im Gehirn keine AGXT2-Expression nachweisbar war. Zusätzlich konnte keine Assoziation mit verschiedenen AGXT2-Genotypen und der Inzidenz, der Prävalenz und der Mortalität nach einem ischämischen Schlaganfall festgestellt werden (Lüneburg et al., in Revision). Somit kann eine veränderte AGXT2-Expression oder -Aktivität im Gehirn bzw. in der Niere nicht die direkte Ursache sein. Dies schließt jedoch einen Einfluss der Mutante oder eingeschränkten Aktivität auf andere Krankheitsbilder, wie bei pulmonaler Hypertonie, bei der u.a. erhöhte SDMA-Konzentrationen im Lungengewebe nachgewiesen werden konnten (156), oder Diabetes mellitus (siehe **Punkt 4.1.4.2**) nicht aus und bedarf weiterer Studien.

4.1.3 Etablierung des LDH/NADH-basierten AGXT2-Assays

Die bisher am meisten verwendete Methode zur Bestimmung der AGXT2-Aktivität ist die photometrisch-basierte Produktmessung mit LDH und dem Cosubstrat NADH (35, 100, 140, 162, 165, 191). Bisher wurde der Assay nur im größeren Format durchgeführt. Des Weiteren wurden unterschiedliche Konzentrationen und Negativkontrollen verwendet, die den Vergleich der Aktivitäten untereinander erschweren und komplizierter machen.

In dieser Arbeit konnte der Aktivitätsassay mit LDH/NADH erfolgreich im eigenen Labor etabliert und weiter optimiert werden. Die Reproduktion von bereits durchgeführten Assays durch andere Gruppen stellt oft ein Problem dar. Die

Ergebnisse einer Methode können bedingt durch unterschiedliche Bedingungen, Protokolle, Materialien und durchführender Person zum Teil stark differenzieren. Nicht selten sind publizierte Methoden nicht reproduzierbar (nur 6-25% Reproduzierbarkeit) (13, 155).

Das Reaktionsvolumen konnte drastisch reduziert und die Detektion dadurch im 384-Wellformat durchgeführt werden. Dies hatte eine Einsparung an Material und vor allem an Protein, das oftmals limitierend vorliegt, zur Folge. Neben der Anpassung der Enzym- und Substratkonzentrationen wurden Negativkontrollen, Puffer und Zusätze ausgetestet.

Es hatte sich herausgestellt, dass die Reaktion ohne Substrat die geeignetste Negativkontrolle war. Die Anwesenheit von Protein in der Lösung führte zu einer größeren Steigung, das die endogene Aktivität widerspiegelt. Die beschriebenen Michaelis-Menten-Konstanten bzw. Spezifischen Aktivitäten, die aus einer Messung mit einer Negativkontrolle ohne Protein resultieren, könnten somit niedriger bzw. höher ausfallen, als sie in Wirklichkeit sind (z.B. benutzte Caplin et al. (26) Negativkontrollen ohne Protein). Die Benutzung unterschiedlicher Negativkontrollen kann somit unter Umständen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Die Verwendung unterschiedlicher Substratkonzentrationen und Proteinquellen erschwert zusätzlich den Vergleich zwischen unterschiedlichen Gruppen. In dieser Arbeit konnte für Glyoxylat mit L-Alanin (rhAGXT2) eine K_m von 0,96 mol/L berechnet werden. Die K_m von L-Alanin mit Glyoxylat lag bei 62,3 mmol/L und 32,06 mmol/L (Mitochondrien und Lysat). Die Spezifische Aktivität von AGXT2 (Lysat) mit L-Alanin und Glyoxylat lag bei 59,2 Units/mg AGXT2. Bei SDMA und Glyoxylat konnte zwar nur eine sehr niedrige Spezifische Aktivität von 0,013 nmol/min*mg AGXT2-Protein gemessen werden, allerdings ist die Reaktion von SDMA noch nicht optimiert. Wie bereits erwähnt, erfolgte die Bestimmung des SDMA-Abbaus indirekt, was wesentlich ungenauer als eine direkte Aktivitätsbestimmung ist. Eine direkte Produkt- oder Substratmessung (z.B. Glycin) ist der jetzigen Methode daher vorzuziehen. Zur genauen Aktivitätsmessung müssen außerdem SDMA- und Glyoxylat-Konzentrationskurven erstellt werden, um eine Enzymsättigung sicherzustellen.

Als AGXT2-Quellen wurden bisher ausschließlich Homogenate oder isolierte Mitochondrien aus Leber und Niere der Ratte, Maus oder anderen Tierarten verwendet. Dies zeigte, dass es auch mit der Absorptionsmessung möglich ist eine Aktivität in Homogenaten zu messen. Dies ist vor allem von Nutzen, wenn zur Aufklärung bestimmter Fragen Tier-Experimente erforderlich sind, dessen Gewebe das einzig verfügbare Material darstellt. Allerdings sind spektroskopische Assaymethoden eher anfällig für unreine Proteinlösungen als andere Methoden, wie z.B. LC/MS. Sinkende Partikel in Homogenaten können einen Ausschlag vortäuschen. Dadurch wird die exakte Messung erschwert und die Ergebnisse können evtl. verfälscht sein. In Homogenat sind zusätzlich viele andere Enzyme (Kontaminationen) vorhanden, die mit der eigentlichen Reaktion interagieren können.

Die Verwendung von isolierten Mitochondrienfraktionen war zwar für die Optimierung des Assays hilfreich, ist jedoch für die Durchführung vieler Assays zu aufwendig. Die Verwendung von Homogenaten macht die Verfügbarkeit von Mäusen oder Ratten notwendig. Für die Verwendung von Zell-Lysaten ist die Kultivierung von Zellen notwendig, die ebenfalls zeitintensiv ist. Allerdings ist dies im Vergleich zu isolierten Fraktionen oder Homogenaten weitaus einfacher, schneller oder praktischer durchzuführen. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei transfizierten Zellen gleichzeitig eine geeignete Zelllinie als Negativkontrolle generiert werden kann (Transfektion mit leerem pcDNA-Vektor), das die beste Negativkontrolle darstellt. Hier können alle Substanzen eingesetzt werden und die endogen abspielenden Reaktionen gehen ebenfalls in die Auswertung mit ein. Wenn auf rekombinantes Protein nicht zugegriffen werden kann, stellt die Verwendung von Lysat daher die beste Möglichkeit zur Aktivitätsmessung dar. In dieser Arbeit wurde die Aktivität von AGXT2 erstmals auch mit Zell-Lysat erfolgreich gemessen.

Mit Hinsicht der weiteren Aufklärung der Funktion der AGXT2 und SDMA im Labor ist der AGXT2-Assay prinzipiell gut einsetzbar. Neben der Überführung der AGXT2-Reaktion in die Wellplatte wäre eine Austestung der Aktivitätsmessung aus Homogenat für Tier-Experimente hilfreich. Der Assay hat seine Grenzen, wenn es um die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten und Spezifischen Aktivitäten von SDMA und ADMA geht. Hier wäre die Produktbestimmung (Glycin oder D¹⁴MGV) besser als die indirekte Methode. Dadurch könnten bessere Vergleiche zwischen den einzelnen Substanzen der AGXT2 aufgestellt werden.

4.1.3.1 Eignung der Methode als HTS-Assay

Bisher wurden bereits einige unterschiedliche AGXT2-Aktivitätsassays beschrieben. Neben der LDH/NADH-Methode stellt die von Martens-Lobenhoffer et al. etablierte HPLC/MS-Messung eine weitere geeignete Methode dar (118). Hierbei wird markiertes Substrat (d_6 -ADMA) verwendet und die Aktivität mittels Detektion des resultierenden d_6 -DMGV gemessen. Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Selektivität durch die Isotopen-Markierung. Hierdurch kann genau die aus ADMA resultierte Produktmenge ermittelt und exakte enzymkinetische Eigenschaften analysiert werden. Ein Nachteil liegt allerdings in der Verfügbarkeit der markierten Substrate. Diese sind nur selten kommerziell erhältlich und müssen meist zuerst synthetisiert werden. Dies macht zusätzliche Reinheits- und Quantifizierungsmessungen notwendig. Außerdem ist die Messung mittels HPLC/MS zeitaufwendig. Die schnelle Messung einiger Proben lohnt sich daher nicht mittels HPLC/MS durchzuführen. Auch für High-Throughput Screenings ist die Methode nur bedingt brauchbar. Zeit und Kosten sind auch hier die wesentlichen Gründe und viele Dienstleister (ebenfalls der European Screening Port als Kooperationspartner unserer Arbeitsgruppe) verfügen nicht über eine HTS-taugliche HPLC/MS-Anlage.

Neben dieser Methode wurde auch die Absorptionsmessung von 2-Oxosäuren beschrieben (35, 137, 140, 152). Diese Methode ist sehr wertvoll, da hier ebenfalls die Aktivitätsmessung durch Produktmessung erfolgt und eine gewisse Selektivität gegeben ist. Zu beachten ist jedoch, dass bei der Reaktion mehrere 2-Oxosäuren im Gemisch vorliegen können und deren Absorptionsspektren überlagert sein können. Wenn dies vorher nicht ausgeschlossen wird, ist die Selektivität nicht mehr gegeben. Wichtig ist daher, dass vor der eigentlichen Messung Absorptionsspektren der einzelnen Substanzen vermessen werden. Dies macht für die Aktivitätsmessung von SDMA/ADMA mit AGXT2 das Vorhandensein von synthetisiertem D^6 DMGV erforderlich. D^6 DMGV ist zurzeit ebenfalls nicht kommerziell erhältlich und muss zuerst synthetisiert werden. Diese Methode ist auch weniger für Screenings geeignet, da viele Substanzen ähnliche strukturelle Eigenschaften wie 2-Oxosäuren aufweisen könnten.

Zur Durchführung von High-Throughput Screenings ist die Verwendung von Assays, die auf einer Absorptions-, Fluoreszenz-, oder Lumineszenzmessung basieren, üblich. Von den bisher etablierten AGXT2-Aktivitätsassays stellt die Absorptionsmessung mit

LDH/NADH daher bisher die beste Methode dar. Das Problem ist allerdings, dass das Absorptionsmaximum von NADH bei 340 nm liegt. Leider weisen sehr viele der im HTS gescreenten *Compounds* eine Eigenabsorption in diesem Wellenlängen-Bereich auf. Dies führt zu Interaktionen und Erhalt zahlloser falsch-positiver Treffer. Dass ein HTS dennoch durchführbar ist, wurde erst kürzlich bei einem HTS der LDH gezeigt (202). Anstelle der Absorption, kann die Messung von NADH auch fluorimetrisch bei einer Emission von 482 nm und einer Extinktion von 340 nm gemessen werden. Hier weisen zwar auch viele *Compounds* eine Eigenfluoreszenz auf, jedoch ist die Fluoreszenzmessung der Absorptionsmessung vorzuziehen. Wenn ein HTS mit NADH durchgeführt wird, erhöht sich auf Grund der auftretenden Interaktionen der Aufwand im Anschluss an das Hauptscreening. In diesem Fall müssen wesentlich mehr Hits wiederholt gemessen werden, als es mit selektiveren Assays der Fall ist. Das hat wieder einen erhöhten Verbrauch an Material und Kosten zur Folge. Allerdings bestünde die Möglichkeit auch eine alternative Detektionsmethode zu LDH/NADH zu entwickeln, die für einen HTS eingesetzt werden kann (siehe **Punkt 4.1.4.4.1**).

4.1.4 Ausblick

4.1.4.1 Mögliche Funktion der AGXT2 in proximalen Tubuluszellen | eine Hypothese

Bisher ist die eigentliche Funktion des Proteins nicht bekannt. Es stellt sich die Frage, für welche Stoffwechselwege die von der AGXT2 abgebauten (L-Alanin, SDMA, ADMA, Pyruvat, Glyoxylat etc.) / zugeführten (Pyruvat, Glycin, L-Alanin, D¹³MGV, etc.) Substanzen von Bedeutung sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Überlegung zu, ob die AGXT2 nicht eine wichtige Rolle bei der Energieversorgung der Zelle spielt und somit auch einen Einfluss auf die mit Ischämie- und Hypoxie-assoziierten Erkrankungen hat.

Der proximale Tubulus des Nephrons befindet sich zum Großteil in der Nierenrinde, die vor allem sehr reich an Mitochondrien ist (208). Hier werden die meisten Stoffe nach glomerulärer Filtration wieder rückabsorbiert. Hypoxie führt hier rasch zu einem starken ATP/AMP-Abfall in den Zellen (79, 208, 220). Durch die Sauerstoff-Unterversorgung ist die weitere Bereitstellung von ATP durch oxidative Phosphorylierung (aerobe Atmung) eingeschränkt. Wenn die Minderversorgung

anhält, bemüht sich die Zelle die Energieversorgung alleine durch die Glykolyse aufrechtzuerhalten, um die zellulären Funktionen vorerst aufrecht zu erhalten. Es ist bekannt, dass der proximale Tubulus (vor allem das S3-Segment) stark von einer durch Ischämie hervorgerufenen Unterversorgung betroffen ist (56, 182, 206, 208). Grund ist zum einen die verzögerte Reoxygenierung dieser Region, zum anderen ist speziell der proximale Tubulus der Niere kaum zur anoxen Glykolyse in der Lage (10). Aus diesem Grund sind diese Zellen stark von der aeroben Atmung abhängig und entwickeln eine mitochondriale Dysfunktion, sobald die Sauerstoffversorgung abnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die bei der durch Hypoxie und nachfolgender Reperfusion entstehenden mitochondrialen Dysfunktion der Komplex I der Atmungskette betroffen zu sein scheint. Durch Zugabe von Succinat und Bereitstellung von NADH zur Aufrechterhaltung des Komplex II konnte die gestörte ATP-Produktion verbessert werden. Es wird vermutet, dass die eingeschränkte Energieversorgung nicht durch den NADH-Dehydrogenase-Komplex der Atmungskette selbst, sondern durch eine ungenügende NADH-Zufuhr aus dem Zitratzyklus herrührt (44, 220, 221). Für die Bereitstellung von NADH/H⁺ wird dem Zitratzyklus Acetyl-CoA zur Verfügung gestellt. Acetyl-CoA wird von dem im Mitochondrium lokalisiertem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex bereitgehalten.

Es könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die AGXT2 in den Mitochondrien an der Bereitstellung von Pyruvat an den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex beteiligt ist und somit indirekt die Funktion des Komplex I der Atmungskette beeinflusst (**Abbildung 4.1**). Auch eine Assoziation von AGXT2 mit der ebenfalls im Mitochondrium vorliegenden Pyruvat-Carboxylase ist wahrscheinlich, da diese Pyruvat zur Produktion von Oxalacetat für den Zitratzyklus benötigt. Da die AGXT2 speziell in den Mitochondrien des proximalen Tubulus exprimiert ist, könnte vermutet werden, dass sie bei unzureichend funktionierender Glykolyse (zum Beispiel unter Hypoxie) für die Bereitstellung von Pyruvat zuständig ist bzw. hochreguliert wird. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass durch eine Supplementierung von L-Alanin die ATP-Produktion in proximalen Tubuluszellen des Hasen gesteigert werden kann (52). Durch ein erhöhtes Angebot von Substrat könnte das Protein genügend Pyruvat zur Verfügung stellen, um die Substratzufuhr für den Zitratzyklus aufrecht zu erhalten. In unserer Arbeitsgruppe wurden Mausmodelle der chronischen pulmonalen Hypertonie etabliert, um den Einfluss der Dimethylarginine

ADMA und SDMA zu analysieren (AG Lüneburg, unveröffentlichte Daten). Mäuse, die der Hypoxie chronisch ausgesetzt waren, zeigten in der Niere eine drastisch erhöhte AGXT2-Expression. Mit Hinblick auf die Hypothese der Funktion von AGXT2, könnte die Hochregulierung des AGXT2-Proteins bei langfristiger Sauerstoff-Unterversorgung als Kompensationsmechanismus angesehen werden.

Der Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor HIF 1- α spielt eine zentrale Rolle bei Adaptionsvorgängen und akkumuliert in den Zellen bei renaler Ischämie (180, 214, 215). Bei Sauerstoffmangel im Gewebe komplexiert HIF 1- α mit der konstitutiv exprimierten Subunit HIF 1- β . Der Komplex bindet als Transkriptionsfaktor an Hypoxie-Response-Elemente. HIF 1- α ist ein durch Sauerstoffmangel-induziertes Protein und unterliegt unter Normoxie einem ständigen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (68, 81). Dies geschieht durch Hydroxylierung der Prolinreste, die durch den von Hippel-Lindau (VHL)-Faktor erkannt werden (34, 74, 75, 139, 192, 225). Die Hydroxylierung der Prolinreste wird durch Sauerstoff-abhängige Prolylhydrolasen (PHD) durchgeführt, die 2-Oxoglutarat als Cosubstrat verwenden (93, 154). 2-Oxoglutarat wird dabei zu Succinat oxidiert, welches wiederum hemmend auf die PHD's wirkt. Bei Hypoxie werden die PHD's inaktiviert, so dass HIF akkumuliert und seine Funktion ausüben kann. Es wurden bereits 2-Oxoglutarat-Analoga getestet, die die PHD's kompetitiv hemmen und als therapeutisches Target zur HIF-Stabilisierung eingesetzt werden sollen. Dadurch soll die durch Ischämie herbeigeführte Zerstörung der Zellen vermindert werden (128, 132, 172).

Bei der Metabolisierung der Dimethylarginine durch AGXT2 entsteht D⁽¹⁾MGV. Da D⁽¹⁾MGV ebenfalls ein 2-Oxoglutarat-Derivat darstellt, könnte spekuliert werden, dass es als endogener PHD-Hemmer agieren könnte. Diese Vermutung wird durch das Wissen unterstützt, dass die endogen vorkommenden Substanzen Succinat, Fumarat, Oxalacetat und Pyruvat (als Intermediate des Zitratzyklus) ebenfalls als PHD-Inhibitor agieren (37, 73, 112, 178). Eine Inaktivierung der PHD's durch D⁽¹⁾MGV würde in den Sauerstoff-armen proximalen Tubuluszellen dementsprechend zur Stabilisierung von HIF und Protektion der Zellen führen. Auf der anderen Seite ist es aber auch möglich, dass SDMA, ADMA und D⁽¹⁾MGV keine Funktion besitzen und lediglich Abbauprodukte darstellen, die über AGXT2 abgebaut bzw. durch die Niere ausgeschieden werden.

Nach Erhalt der beschriebenen Ergebnisse und den Informationen aus der Literatur können neue Hypothesen aufgestellt werden, die in Zukunft überprüft werden müssen:

- 1) Die AGXT2 ist involviert im Energiehaushalt der Zelle und kann durch Hypoxie reguliert werden.
- 2) AGXT2 ist bei der Bereitstellung wichtiger Ausgangssubstanzen für den Zitronensäurezyklus beteiligt und nimmt somit indirekt Einfluss auf die ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung.
- 3) AGXT2 ist mit Ischämie- und Hypoxie-bedingten Erkrankungen, wie z.B. pulmonaler Hypertonie assoziiert.
- 4) Die Metaboliten, die beim Abbau von SDMA und ADMA durch AGXT2 entstehen, agieren als endogene PHD-Hemmer und tragen zur Stabilisierung von HIF bei.

Der nächste Schritt wäre der Nachweis der neuen Hypothesen in *in-vitro*- und Zell-basierten Analysen. Mit Hilfe einer stabilen Linie von humanen proximalen Tubuluszellen, die beide AGXT2-Varianten überexprimieren bzw. eine AGXT2-KO-Zelllinie (shRNA), könnte dabei eine Vielzahl von Methoden durchgeführt werden, die erste Hinweise über die Funktion der AGXT2 in den Energiehaushalt der Zelle geben könnten. Je nach Ausgang der Zell-Experimente stünden weiterhin Tiermodelle zur Verfügung. Mit dem in unserer Arbeitsgruppe etabliertem Hypoxie-Modell könnte man die mit chronischer Hypoxie behandelten Mäuse weiter charakterisieren. Des Weiteren wäre eine Kooperation mit Leiper et al. und seinem Team denkbar, da sie über AGXT2-KO-Mäuse verfügen (26). Durch die Aufdeckung der AGXT2-Funktion würde man außerdem mehr Informationen über dessen Einfluss in anderen Organen, wie der Lunge oder dem Pankreas erhalten.

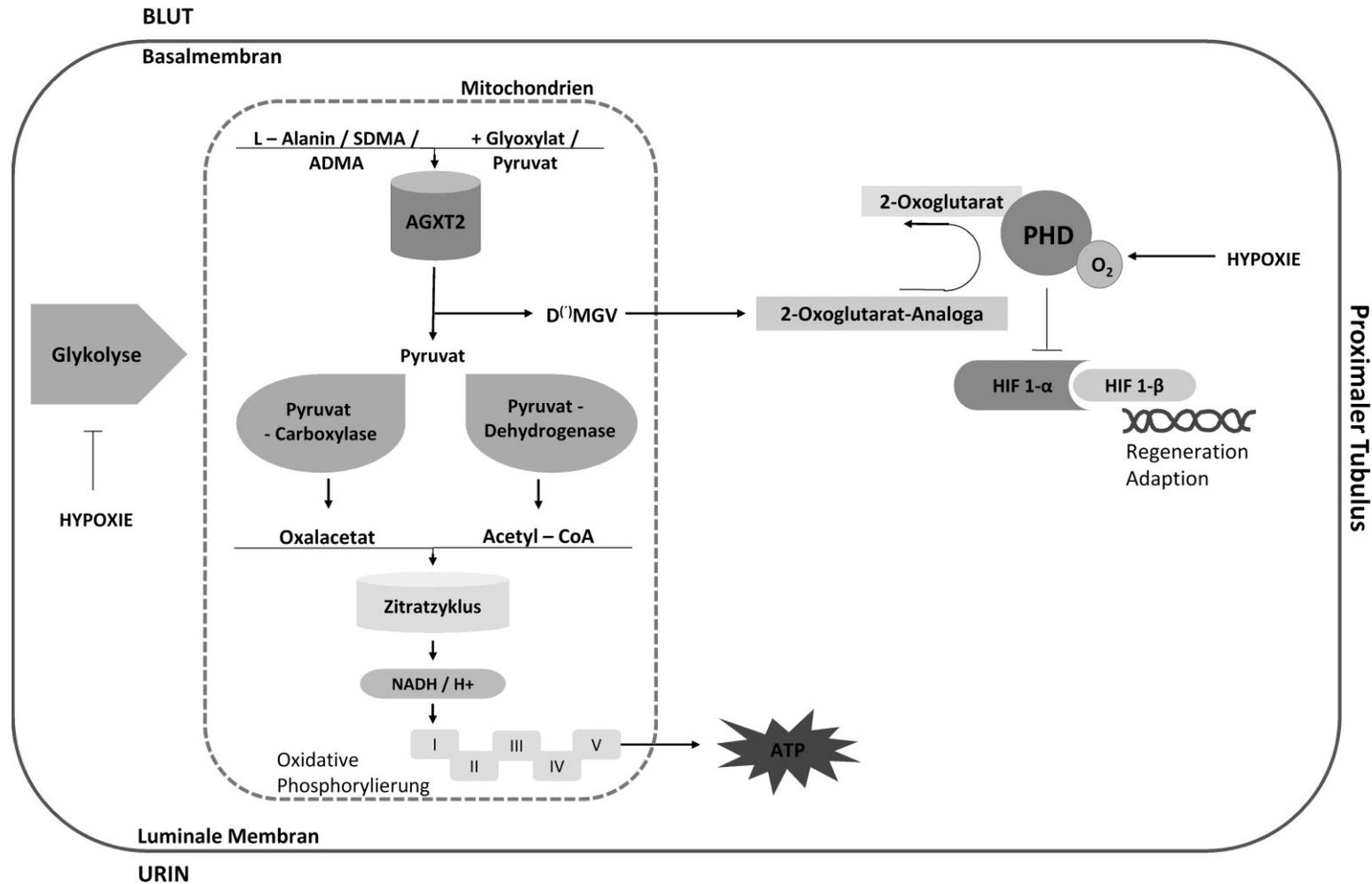


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung: Hypothese über die Funktion der AGXT2, den Dimethylargininen SDMA/ADMA bzw. deren Abbauprodukt D(1)MGV (als 2-Oxoglutarat-Analoga) in den Mitochondrien des proximalen Tubulus der Niere. PHD = Prolylhydroxylase, HIF = Hypoxia-inducible factor, D(1)MGV = α -Keto- δ -(N',N-dimethylguanidino)-valeriansäure, AGXT2 = Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2, ADMA/SDMA = Asymmetrisches/Symmetrisches Dimethylarginin.

4.1.4.2 Klinische Relevanz von SDMA und AGXT2

Wie bereits erwähnt, scheint die AGXT2 bei ischämischem Schlaganfall keine Rolle zu spielen. Dennoch werden Assoziationen veränderter SDMA-Konzentrationen im Plasma oder Gewebe mit unterschiedlichen Erkrankungen aufgedeckt. Eine wichtige Rolle einer veränderten AGXT2-Aktivität oder -Expression sollte daher weiter in Betracht gezogen werden. Ein Krankheitsbild, das bezüglich der AGXT2 interessant erscheint, soll in diesem Kapitel kurz erläutert werden.

4.1.4.3 Diabetes mellitus

Neben der pulmonalen Hypertonie ist vor allem der Einfluss von SDMA bei Diabetes Mellitus sehr interessant. Bisher ist es nach unserem Kenntnisstand die einzige Erkrankung, bei der erniedrigte SDMA-Konzentrationen mit beeinträchtigten Funktionen assoziiert sind. Typ-II-Diabetiker mit schlechter glykämischer Kontrolle (Hb1Ac > 6.5%) zeigten erniedrigte SDMA-Konzentrationen und zusätzlich eine Assoziation mit reduziertem Adiponektin (25). In fettleibigen prä-menopausalen Frauen konnten ebenfalls erniedrigte SDMA-Konzentrationen gemessen werden. Diese Probanden, deren Fettleibigkeit ein Risikofaktor für die Entwicklung von Diabetes Mellitus ist, wiesen auch eine erniedrigte Insulin-Sensitivität auf (28). Eine inverse Assoziation von SDMA konnte auch bei Typ-I-Diabetikern mit erhöhten Insulinkonzentrationen beobachtet werden (116). Dies zeigt, dass SDMA scheinbar nicht nur negative Eigenschaften hat, sondern dass ein Gleichgewicht zwischen SDMA-Produktion und -Abbau herrschen muss. Vor allem die β -Zellen des Pankreas und das Fettgewebe sind an dem Krankheitsmaß maßgebend beteiligt.

Inwieweit SDMA bei der Pathogenese von Diabetes mellitus eine Rolle spielt, ist noch weitgehend unbekannt. Mit Hinblick auf die aufgeführten Publikationen sollten weitere Studien zur Aufklärung der Assoziationen von SDMA mit der Glucose-Homeostase durchgeführt werden. Da der enzymatische Stoffwechselweg von SDMA im Menschen bisher nicht bekannt war, wurde der Einfluss der AGXT2 bisher nicht berücksichtigt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AGXT2 im

Pankreas exprimiert wird. Es wäre interessant zu wissen, wo die AGXT2 innerhalb des Pankreas lokalisiert ist. Bei einer Expression des Enzyms in den β -Zellen könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass SDMA und AGXT2 eine Rolle bei der Entstehung von Diabetes mellitus spielen könnten. Um einen ersten Einblick über die Verteilung der AGXT2 innerhalb des Pankreas zu bekommen, könnten ebenfalls humane Schnitte immunhistologisch untersucht werden. Des Weiteren würden durch die Arbeitsgruppe von Leiper et al. (26) AGXT2-KO-Mäuse zur Verfügung stehen, um einen Zusammenhang zwischen SDMA und AGXT2 mit dem Insulin-/Glucose-Stoffwechsel zu analysieren. Umgekehrt könnte ein Mausmodell für Diabetes Mellitus II (*Diet induced obesity*) in Betracht gezogen werden. Es ist bereits eine kleine Studie geplant, in der der Einfluss von Glucose und Insulin auf SDMA im gesunden Probandenkollektiv untersucht werden soll. Diese Studie soll erste Eindrücke über die Regulation von SDMA unter physiologischen Bedingungen verschaffen. Zusätzlich soll die Expression der an SDMA-beteiligten Enzyme und Proteine analysiert werden. Es wurde bereits ein kleiner Vorversuch an 6 Probanden durchgeführt und eine Korrelation von SDMA mit den Glucose- und Insulinwerten gefunden. SDMA korrelierte unter normalen physiologischen Bedingungen invers mit Glucose, aber vor allem mit Insulin. Da SDMA auch mit Adiponektin korreliert und Fettgewebe ebenfalls bei der Entwicklung von Diabetes Mellitus eine große Rolle spielt, sollte dies ebenfalls bei den Untersuchungen mit einbezogen werden. Falls sich bestätigen lassen würde, dass die AGXT2 im Zusammenhang mit Diabetes mellitus steht, könnte rein hypothetisch AGXT2 als potenzielles therapeutisches Target untersucht werden.

4.1.4.4 Entwicklung eines HTS-Assays

Die Durchführung des AGXT2-HTS soll wie bei der DDAH ebenfalls mit unserem Kooperationspartner – dem European Screening Port – durchgeführt werden. Wenn die Entscheidung getroffen wird, dass das Screening mit dem AGXT2-Aktivitätsassay basierend auf LDH/NADH durchgeführt werden soll, muss dieser zunächst mit der entgeltlichen Proteinquelle (rhAGXT2) validiert werden. Zurzeit findet die eigentliche Reaktion in Eppendorf-Gefäßen statt. Ein Aliquot wird anschließend in das 384-Wellformat überführt und dort mit LDH/NADH in einem Reaktionsvolumen von 90 μ l vermessen. Für einen HTS-Assay müsste zunächst auch die AGXT2-Reaktion in die

384-Wellplatte überführt werden, so dass beide Reaktionen nacheinander im gleichen Well stattfinden können. Daraufhin muss der Einfluss des Lösungsmittels (die *Compounds* werden in DMSO gelöst) auf die Aktivitätsmessung getestet werden, um Interaktionen auszuschließen. Wenn möglich, wird die Verwendung von Inhibitoren und Aktivatoren als Negativ- und Positivkontrolle bevorzugt. Im Falle der AGXT2 wurden bereits einige Hemmstoffe, wie 5-Fluoruracil oder Aminoprolin untersucht (95). Bisher wurde noch keine aktivierende Substanz beschrieben. Man könnte allerdings die Verwendung eines natürlichen Substrates, das eine höhere Affinität zur AGXT2 als das im HTS verwendete Substrat (z.B. 3-Aminoisobutyrat oder β -Alanin) aufweist, als Kontrolle in Betracht ziehen. Ob dies möglich ist, muss ausgetestet werden. Anschließend werden Titrationskurven der einzelnen Substrate und des Enzyms erstellt, IC_{50} -Werte für die Kontrollen gemessen und weitere kinetische Messungen durchgeführt, bevor der Assay dann verwendet werden kann. Außerdem würde die Messung als Endpunktbestimmung erfolgen, da dies bei der Durchführung und Auswertung von mind. 50.000 *Compounds* während des HTS einfacher ist (die genaue Durchführung wurde im DDAH-Teil beschrieben).

4.1.4.4.1 Alternative HTS-geeignete Detektionsmethoden

Wenn die Entscheidung getroffen wird, dass der Assay mit LDH/NADH nicht für den HTS genutzt werden soll oder SDMA anstelle von L-Arginin verwendet werden soll, muss der Assay weiter modifiziert werden. Da bei der Reaktion von SDMA als auch von L-Alanin mit Glyoxylat und AGXT2 Glycin als gemeinsames Produkt entsteht, ist dessen Detektion die beste Wahl. Dabei muss beachtet werden, dass die Messung bei hohen Absorptions- bzw. Fluoreszenzbereichen durchgeführt wird, um eine hohe Selektivität und wenige Interaktionen mit den *Compounds* zu erreichen. Eine Möglichkeit ist, Glycin mit Hilfe der Glutathion-Synthase zu messen. Diese benötigt Glycin zur Bildung von Glutathion aus γ -L-Glutamyl-L-cystein. Als Cosubstrat braucht das Enzym Mg^{2+} und ATP. Der Verbrauch von ATP kann mittels Lumineszenz gemessen werden. Lumineszenz-Messungen sind dabei die beste Wahl für ein HTS, da die wenigstens *Compounds* eine Eigenlumineszenz aufweisen. Die rekombinante Produktion des Enzyms müsste zusammen mit der AGXT2 in Auftrag gegeben werden. Allerdings wurde diese Art der Detektion bisher noch nicht beschrieben.

Die zweite Möglichkeit wäre, die Detektion von Glycin mit der Glycin-Oxidase. Diese baut Glycin unter Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Glyoxylat um. Durch Zugabe von Peroxidase und o-Dianisidin entsteht ein pinker Farbkomplex, der sein Absorptionsmaximum bei 530nm hat. Die Bildung des Farbkomplexes beruht auf der Oxidation von o-Dianisidin durch die Peroxidase. Vorteil hierbei ist, dass diese Reaktion bereits im Aktivitätsassay ausgetestet wurde (41). Allerdings müssten hier drei rekombinante Proteine (AGXT2, Glycin-Oxidase, Peroxidase) gekauft bzw. produziert werden. Die neue Detektionsmethode müsste dann mit der in dieser Arbeit optimierten AGXT2-Reaktion kombiniert und verbessert werden.

Die hier optimierte AGXT2-Reaktion kann durchaus als Grundlage für einen Primärassay zur Durchführung eines HTS verwendet werden. Als Sekundärassay wäre die Messung mittels HPLC/MS oder LC/MS die erste Wahl, da diese sehr selektiv ist und zu diesem Zeitpunkt die Anzahl der wiederholt gemessenen Hits begrenzt ist. Für die weitere Optimierung eines HTS-geeigneten Assays ist die Verfügbarkeit von reinem rekombinantem AGXT2 unerlässlich. Hierfür käme die weitere Kooperation mit Prof. Fischer aus der Lebensmittelchemie der Universität Hamburg in Frage. Des Weiteren könnte eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Donini aus Italien (41) in Erwägung gezogen werden, da sie das Enzym scheinbar bereits erfolgreich produziert und vermessen haben. Die gleiche Gruppe hat den Glycin-Assay basierend auf o-Dianisidin verwendet, und könnte somit unsere Arbeitsgruppe bei der Optimierung des Assays unterstützen.

Zusammenfassend stehen durch die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse eine Vielzahl weiterer Experimente und Projekte an, die im Anschluss durchgeführt werden können. Auf Grund des Potenzials der AGXT2 als therapeutisches Target liegt die weitere Untersuchung der Funktion der AGXT2 im Energiehaushalt und deren Bedeutung bei pulmonaler Hypertonie und Diabetes Mellitus an erster Stelle. Dazu gehören die mechanistische Aufklärung der Funktion in den Mitochondrien, die weitere Etablierung des HTS-Assays sowie die Durchführung der jeweiligen Tiermodelle.

4.2 ADMA und DDAH1

4.2.1 Bewertung der Eignung des rhDDAH1-Assays und des HTS

Insgesamt konnte in dieser Arbeit die Optimierung und Überführung des HTS-Assays und die Durchführung des kompletten High-Throughput Screening-Prozesses erfolgreich durchgeführt werden. Mit Hinblick auf die gestellten allgemeinen Anforderungen – *Pharmakologische Relevanz des Assays, Reproduzierbarkeit, Qualität, Kosten, Einfachheit und Sensitivität* (69) – stellte der rhDDAH1-Aktivitätsassay eine geeignete Methode für die Durchführung des HTS dar.

Pharmakologische Relevanz des Assays. Idealerweise sollten die natürlichen Liganden verwendet werden, damit die enzymatische Reaktion den physiologischen Bedingungen ähnelt. Auch wenn in diesem Assay nicht das natürliche Substrat – ADMA verwendet wurde, zeigt dessen Struktur analogon SMTC jedoch eine hohe Ähnlichkeit. Anstelle eines Stickstoffes befindet sich ein Schwefel-Atom in der Guanidino-Gruppe des L-Arginin-Derivats, das etwas nukleophiler ist als das N-Atom. Allerdings hat dies kaum einen Einfluss auf die Enzymaktivität oder die Lage des Substrats innerhalb des aktiven Zentrums.

Reproduzierbarkeit. Die hohe Reproduzierbarkeit der Daten konnte mit Hilfe der statistischen Analyse gezeigt werden. Bei 50 willkürlich ausgewählten Platten aus dem *Primary Screen* konnte eine durchschnittliche Varianz von 2,69 (Negativkontrolle) bzw. 4,25 (Positivkontrolle) ermittelt werden. Die Ergebnisse waren nicht nur innerhalb eines Tages, sondern auch zwischen den einzelnen Tagen und den Screenings (*Marker Library – Primary Screen – Hit Confirmation & Profiling – Follow-Up*) sehr gut reproduzierbar, das sich durch die gleichen statistischen Werte widerspiegelte.

Qualität. Die Qualität wird seit einiger Zeit mit Hilfe des *Z prime* bewertet, das nicht nur das Signalfenster, sondern auch die Streuung zwischen Negativ- und Positivkontrolle berücksichtigt. Mit Werten von 0,75-0,78 zeigte der Assay eine hohe Qualität. Auch mit der Benutzung von pharmakologisch aktiven Positivkontrollen

kann die Qualität der Ergebnisse zusätzlich abgeschätzt werden. Auch wenn keine geeignete Positivkontrolle für die Aktivatoren vorhanden war, konnte die hemmende Wirkung von Ebselen als pharmakologische Positivkontrolle für die potenziellen Inhibitoren verwendet werden (im Gegensatz zu *Fast & Linsky*, die keine pharmakologischen Kontrollen verwendeten). Die inhibitorischen Effekte von Ebselen zeigten während des Screenings die erwarteten bzw. vordefinierten Werte. Dies war ein weiterer Hinweis dafür, dass die Qualität des Assays sehr gut ist.

Kosten. Auch wenn die Menge des Proteins auf Grund der Endpunktbestimmung erhöht werden musste, blieben die Kosten im Vergleich zu anderen Methoden (z.B. ELISA) niedrig. Neben den Pufferlösungen waren nur wenige Substanzen für den Assay erforderlich, die in sehr niedrigen Konzentrationen verwendet werden mussten. Da bereits eine hohe Menge an rekombinantem Protein hergestellt wurde, war die Erhöhung der Proteinkonzentration für das HTS kein Problem. Somit entstanden keine zusätzlichen Kosten, die durch eine erneute Produktion an rhDDAH1 zustande gekommen wären.

Einfachheit. Um ein HTS schnell und einfach durchführen zu können sind „Mix & Measure“-Assays erwünscht, da zu viele Waschschriffe oder Übertragungen auf mehrere Platten komplizierter und zeitintensiver sind. Auch wenn auf Grund der Eigenfluoreszenz der *Compounds* eine zusätzliche Nullpunkt-Messung erfolgen musste, war die Durchführung des Assays mit der HTS-Plattform wegen der Zusammenführung zweier Lösungen (rhDDAH1- und Substratlösung) sehr einfach. Da keine zusätzlichen Schritte durchgeführt werden mussten, war die Messung der Platte nach 60 Minuten Inkubationszeit fertig. Da das Starten der einzelnen Platten nach jeweils 5 Minuten erfolgte, konnte der *Primary Screen* mit 50.000 *Compounds* innerhalb von 3 Tagen durchgeführt werden.

Interaktionen. Der Assay darf nicht durch Lösungsmittel (z.B. DMSO) beeinträchtigt bzw. muss er unempfindlich gegenüber unspezifische Interaktionen sein. Dies konnte sowohl durch *Fast & Linsky* als auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Der DMSO-Gehalt bis 2% hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms, eine mögliche Interaktion zwischen der rhDDAH1, CPM und SMTc (mit den Cystein-Resten) konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Zugabe von Tween-20® verhinderte die Adsorption von Protein an die Wände der 384-Wellplatte. Durch die vorherige

Inkubation der *Multidrop® Combi Dispenser* mit der Enzym-Lösung konnte man dem zuvor beobachteten „Ausschleich“-Effekt vorbeugen.

Sensitivität. Da es sich um einen Fluoreszenz-basierten Assay handelt, weist er eine hohe Sensitivität auf. Durch die höhere Sensitivität im Vergleich zu anderen Assays (Absorption) konnte die Reaktion im reduzierten Volumen durchgeführt werden, was eine weitere Kostenersparnis zur Folge hatte. Die Eigenfluoreszenz der Lösungen oder der *Compounds* stellt dabei jedoch den limitierenden Faktor dar. Dieses Problem ergab sich auch in diesem Fall, da in dem HTS neben Inhibitoren auch Aktivatoren identifiziert werden sollten. Aus diesem Grund wurde die zusätzliche Nullpunkt-Messung eingeführt, um die Anzahl, der durch die Eigenfluoreszenz falsch-positiven *Hits* einzugrenzen.

4.2.2 Ergebnis des HTS

Insgesamt wurden mit dem HTS-Assay 52.096 *Compounds* im *Primary Screen* (Einfachbestimmung) vermessen. 532 *Compounds* wurden als potenzielle Modulatoren in der nachfolgenden *Hit Confirmation* in Dreifachbestimmung wiederholt gemessen. 133 *Hits* konnten reproduziert werden und wurden im nächsten Schritt – dem *Hit Profiling* – durch Konzentrations-Wirkungskurven näher charakterisiert. Mit Hilfe der Kurven und der ermittelten IC_{50} -Werte wurden insgesamt 26 *Compounds*, davon 8 potenzielle Aktivatoren und 18 potenzielle Inhibitoren der rhDDAH1 ausgewählt. Im abschließendem *Follow-Up* konnte die hemmende Wirkung aller 18 Inhibitoren reproduziert werden, die im nächsten Schritt mit dem *Secondary Assay* weiter untersucht werden (**Abbildung 4.2**).

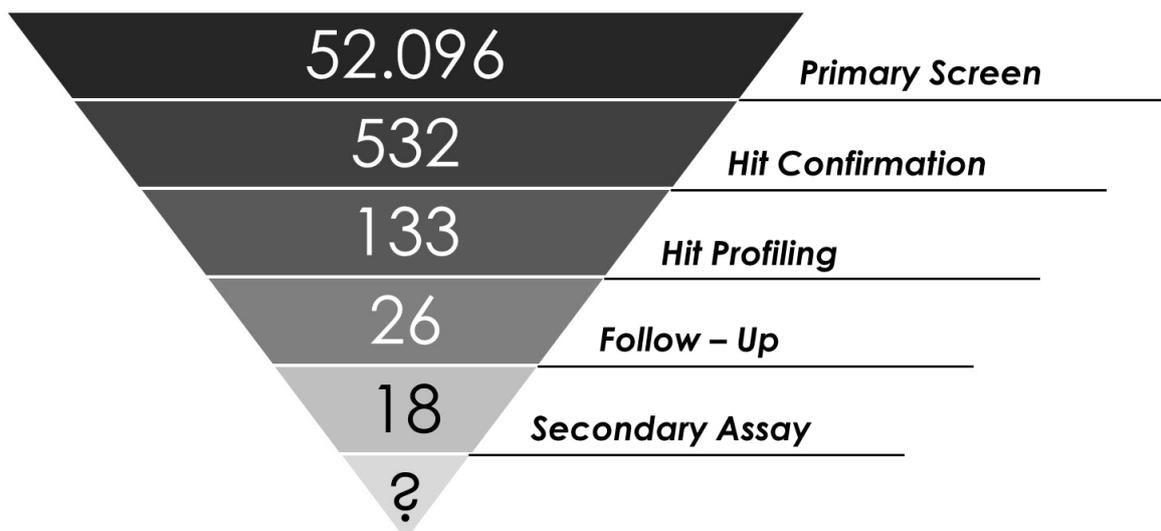


Abbildung 4.2 Selektion der gescreenten Compounds im Verlauf des Primary Screens und der Hit Validierung von 52.096 auf 18 potentielle Inhibitoren. Diese werden mit dem anschließenden Secondary Assay getestet.

4.2.2.1 Inhibitoren

Aus den 18 ausgewählten Inhibitoren konnten einige Strukturen identifiziert werden, die bereits bekannten Strukturen ähneln.

4.2.2.1.1 Ebselen-Mimetika

Einige der identifizierten Hits stellen Analoga des antioxidativ wirkenden DDAH-Inhibitors Ebselen dar (ENA_T0504-6394, ENA_0515-1684, ENA_T5610690).

Es ist bekannt, dass Ebselen u.a. in Gegenwart von Thiolen und Wasserstoffperoxid als GSH-Peroxidase-Mimetikum agiert (146). Auf Grund der hohen Reaktivität mit Thiol-Gruppen reagiert Ebselen jedoch mit verschiedenartigen Enzymen und zeigt somit eine niedrige Spezifität. So wirkt Ebselen unter anderem hemmend auf die Diguanylat-Cyclase, Protein-Kinase C (105), H⁺/K⁺-ATPase, auf verschiedene Lipoxygenasen, NADPH-Oxidase, NADPH-Cytochrom-Reduktase, Gluthathione-Transferase als auch auf die induzierte und konstitutive NO-Synthase (146, 171). Auch wenn sich Ebselen in Tagesdosen von 300 mg als recht gut verträglich zeigte, konnte dessen Nutzen nicht vollständig bewiesen werden. In zwei klinischen Studien wirkte

Ebselen zwar nach einem Schlaganfall neuroprotektiv, allerdings nur wenn die Verabreichung direkt 6-12 h nach Auftreten des Schlaganfalls erfolgte. Einen Effekt auf die Gesamtmortalität hatte Ebselen jedoch nicht (136, 224). Neben der mäßigen Effizienz konnte eine bisher vermutete Toxizität auf Grund des Seleniums im Molekül nicht ausgeschlossen werden. Aus diesen Gründen wurde dieser Wirkstoff bisher nicht zugelassen (147). Um weitere Daten zu generieren läuft zur Zeit eine Phase III Studie in Japan (194). Bei der Überlegung die Dosis von Ebselen zu erhöhen, um eine bessere Effizienz zu erhalten, steigt das Risiko an auftretenden Nebenwirkungen. Die Toxizität von Ebselen konnte in verschiedenen Studien dargestellt werden. Unter anderem konnte beispielsweise in Myeloma-Zellen gezeigt werden, dass es über eine Induktion der ROS-Produktion zu einer mitochondrialen Dysfunktion und zu einer erhöhten Apoptose kommt (135).

Mit Hinblick auf die Potenz und Toxizität stellen die hier identifizierten Ebselen-Analoga neue vielversprechende Strukturen dar, da diese anstelle des als toxisch angesehenen Seleniums eine Schwefelgruppe enthalten. Durch die reduzierte Toxizität könnte eine Erhöhung der Dosis bzw. der Potenz bewirkt werden. Diese Strukturen könnten dabei helfen eine verbesserte Ebselen-basierte *Lead-Struktur* zu finden.

4.2.2.1.2 Derivat des DDAH-Inhibitors SCH202676

Das Molekül SCH202676 ist ebenfalls seit längerer Zeit bekannt. Es wurden bereits verschiedene Inhibitoren basierend auf diesem Molekül synthetisiert und mit Radioligand-Binding Assays getestet (57). Auch diese Struktur reagiert vorwiegend mit Cystein-Resten unter den in **Abbildung 4.3** dargestellten Mechanismus.

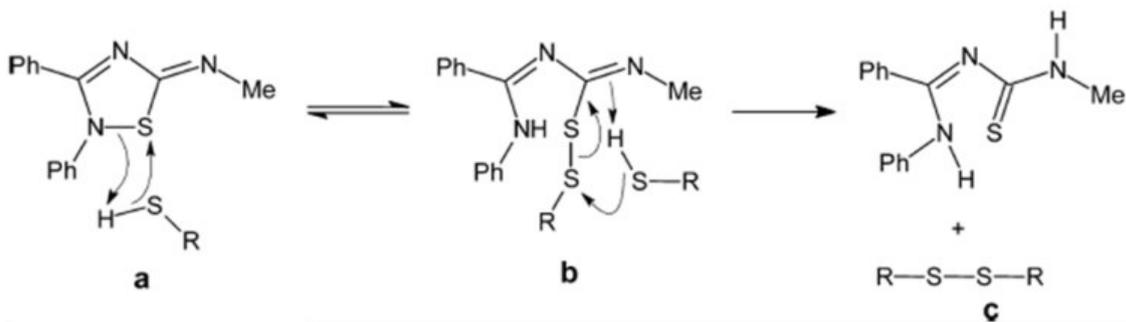


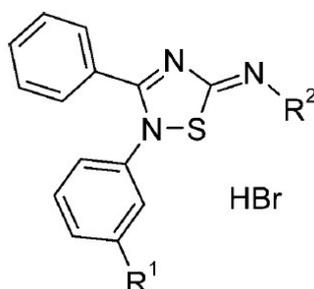
Abbildung 4.3 Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus des Thiodiazols SCH202676 und deren Derivaten mit Cystein-Resten (Abbildung aus der Publikation von Göbblös et al. 2005).

Dabei wird das Thiodiazol (a) durch Cysteinreste von Proteinen zu einem Thiourea-Addukt reduziert (b). Danach wird es entweder recycled oder weiter zum freien Thioharnstoff abgebaut. In diesem Fall werden zwei Thiolgruppen von Cysteinresten zu einer Disulfidbrücke oxidiert (c).

Auf Grund der Thiol-Reaktivität hemmt SCH202676 mehrere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie Adenosin-Rezeptor A1 (201), Opioid-, α/β -adrenerge-, Muskarin (M_1/M_2)- und Dopamin-Rezeptoren (D_1/D_2) (43). Auch das kürzlich entdeckte Enzym Phospho1, das Phosphoethanolamin und Phosphocholin für die Calcifikation spaltet, wird durch das Molekül unter physiologischen Bedingungen bis zu 10% gehemmt (161).

Dementsprechend ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die in diesem HTS identifizierte Struktur ENA_T5610690 in der gleichen Weise und ebenfalls nicht selektiv auf die DDAH1 wirkt (Vergleich der Strukturen in **Abbildung 4.4**). Es wurde aber berichtet, dass eine synthetisierte Struktur in den Radioligand-Binding Assays keine Hemmung auf die erwähnten Enzyme zeigte (57). Diese Struktur trägt an einem Stickstoff-Atom eine Phenylgruppe und führt vermutlich durch sterische Effekte zur

verminderten/keinen Hemmung. Interessant wäre, ob diese Struktur im Gegensatz zu den Rezeptoren dennoch die rhDDAH1 hemmen kann und somit eine DDAH-Selektivität gegeben wäre.



	ENA_T5610690	Göblyös et al. 2005	SCH202676
R ¹	-CH ₃	-CH ₃	-H
R ²	-H	-Phenyl	-CH ₃

Abbildung 4.4 Vergleich des identifizierten DDAH-Inhibitors (linke Spalte) mit den in der Literatur beschriebenen Thiothiazol-Derivaten.

4.2.2.1.3 Analoga von Thyreostatika

Eine Vielzahl der ausgewählten Hits (ENA_T5301828, ENA_T5805956, ENA_T5826198, ENA_T5857956, ENA_T6110707, ENA_T6306732, ENA_T6637392 und ENA_T6527672) ähneln der Struktur der Thioharnstoffe, wie Thiamazol und Propylthiouracil, die zur Therapie der Hyperthyreose eingesetzt werden. In dieser Arbeit konnten erste Hinweise über eine mögliche Verbindung zwischen der rhDDAH1 und Thioharnstoff-ähnlichen *Compounds in-vitro* gezeigt werden. Diese Annahme muss im folgenden *Secondary Assay* und weiteren Analysen sicher bestätigt werden. Dies lässt vermuten, dass die DDAH1 mit an der Wirkung oder der Entstehung von Nebenwirkungen dieser Wirkstoffe beteiligt sein könnte. Neben häufiger auftretenden Hautreaktionen (4-6%) oder gastrointestinalen Nebenwirkungen (1-5%), müssen auch mit schwerwiegenden seltener auftretenden Nebenwirkungen, wie die Agranulozytose und Hepatotoxizität während der Therapie mit Thioharnstoffen gerechnet werden (36).

Es gibt jedoch eine tierexperimentelle Studie, die über die verzögerte Regeneration der Leber bei Hypothyreose (induziert durch Propylthiouracil) nach durchgeführter Resektion berichtet. Hier wurde gleichzeitig eine erhöhte DDAH1-Expression in der Leber sowie erniedrigte ADMA-Plasmakonzentrationen beobachtet (111). Entweder hemmt Propylthiouracil im Gegensatz zu anderen Thioharnstoffen die DDAH1 nicht oder der hemmende Effekt auf das Enzym ist *in-vivo* zu vernachlässigen. Im letzteren Fall hätte die DDAH1 vermutlich wenig Einfluss auf die durch Thyreostatika verursachten Nebenwirkungen. Weiterhin könnte man vermuten, dass die bei einer Leberresektion mit gleichzeitiger auftretender (subklinischer) Hypothyreose auftretende Hochregulation der DDAH1-Expression die DDAH-hemmenden Effekte von Propylthiouracil kompensiert.

Das Interessante bei dieser Studie ist, dass die DDAH1 scheinbar eine Rolle bei der Regeneration der Leber bei (subklinischen) hypothyreotischen Patienten zu spielen scheint und daher in diesem Krankheitsbild wiederum eine Hemmung der DDAH1 von Vorteil sein könnte (siehe weiter unten).

Auch wenn ein Großteil der Leber bei einer Resektion auf Grund der schnellen Regenerationsfähigkeit entfernt werden kann, können unterschiedliche Faktoren die Genesung verlangsamen. Unter anderem wird neben einem erhöhten Alter auch eine (subklinische) Hypothyreose als Risikofaktor angesehen (14), da Triiodthyronin (T_3)/Thyroxin (T_4) maßgebend an der Leberregeneration und Proliferation beteiligt sind (102). Vor allem eine subklinische Hypothyreose, bei der die T_3/T_4 -Werte noch im Normbereich sind, jedoch die TSH-Plasmakonzentrationen erhöht, wird auf Grund fehlender Symptome oft nicht erkannt. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass die Prävalenz bei ca. 4-6% liegt (63, 145, 160, 190). Dabei entwickeln Frauen eher eine subklinische Hypothyreose als Männer und sie nimmt vor allem mit zunehmendem Alter zu. Die Prävalenz von Probanden mit einem Alter >65 Jahre lag bei 8%. Bei der Beobachtung der Schilddrüsenfunktion über einen Zeitlauf von 13 Jahren konnte gezeigt werden, dass sich der TSH-Wert bei 16% um 1 mU/ml und bei 3% um 3 mU/ml erhöhte (23).

So konnte entsprechend beobachtet werden, dass die Regeneration nach einer Leberresektion bei bestehender Hypothyreose die Regeneration zeitlich verschoben ist (um ca. 24 h) (14, 129). Während bei euthyreotischen Ratten die Ausgangsmasse der Leber nach 96h erreicht ist, beträgt sie bei hypothyreotischen Ratten nur 50% des Ausgangsgewichts. Durch Zugabe von T₃ konnte die Regeneration entsprechend verbessert werden. Lopez-Fontal et al. konnte an T₃/T₄-Rezeptor-KO-Mäusen zeigen, dass simultan zur auftretenden Verzögerung, die Apoptose-Rate erhöht ist (um 30%). Diese Phase war assoziiert mit der Bildung von nitrosativem Stress und erniedrigten ADMA-Konzentrationen 24-48 h nach dem chirurgischen Eingriff. Die erniedrigten ADMA-Konzentrationen konnten auf eine erhöhte DDAH1-Expression zurückgeführt werden. Es wurde vermutet, dass die DDAH1-Induktion von der ebenfalls erhöhten Menge an FXR (involviert bei der DDAH-Expression, siehe Einleitung **Punkt 1.2.4.2.1**) herrührte (erhöhte mRNA- und Protein-Konzentrationen) und die dadurch erhöhte NO-Produktion zur Erhöhung von nitrosativem Stress und Apoptose führen. Dies ist die einzige Studie, die die Expression der DDAH1 untersuchte (111). Allerdings konnte auch in einer anderen Studie gezeigt werden, dass bei Hypothyreose erniedrigte ADMA-Konzentrationen auftreten (158).

Um die Periode der Leberinsuffizienz zu verkürzen, eine schnellere Erholungszeit zu gewährleisten oder um größere Resektionen durchführen zu können, sind weitere therapeutische Ansätze wünschenswert, die den Regenerationsprozess beschleunigen (14). Unter Berücksichtigung der neuesten Daten wäre eine Kurzzeit-Behandlung hypothyreotischer Patienten mit einem DDAH1-Inhibitor (oder eine Kombinationstherapie mit T₃) 24-48h nach Durchführung der Leberresektion zur Beschleunigung des Regenerationsprozesses denkbar.

Die Thyreoperoxidase (TPO), die die Synthese der Schilddrüsenhormone katalysiert, als auch die Laktatperoxidase (LPO) werden durch die Thyreostatika, wie Methimazol gehemmt. Der hemmende Effekt von Methimazol und weiterer antithyreostatisch wirkenden Thioharnstoff-Derivate soll auf die sich durch Tautomerie bildende Thiol-Gruppe zurückzuführen sein (**A von Abbildung 4.5**). Derivate, die an beiden Stickstoff-Atomen der Harnstoff-Gruppe substituiert sind und nicht mehr in die Thiol-Form umgewandelt werden können, zeigten keine hemmende Wirkung mehr auf TPO/LPO (**B von Abbildung 4.5**) (166). Mit Hinblick auf die DDAH1 wäre es interessant zu wissen,

ob für die hemmende Wirkung durch Thiamazol-Derivate ebenfalls die Thiol-Struktur nötig ist oder ob auch eine Hemmung mit zweifach substituierten Analoga möglich ist, und somit eine Art Selektivität erreicht werden könnte.

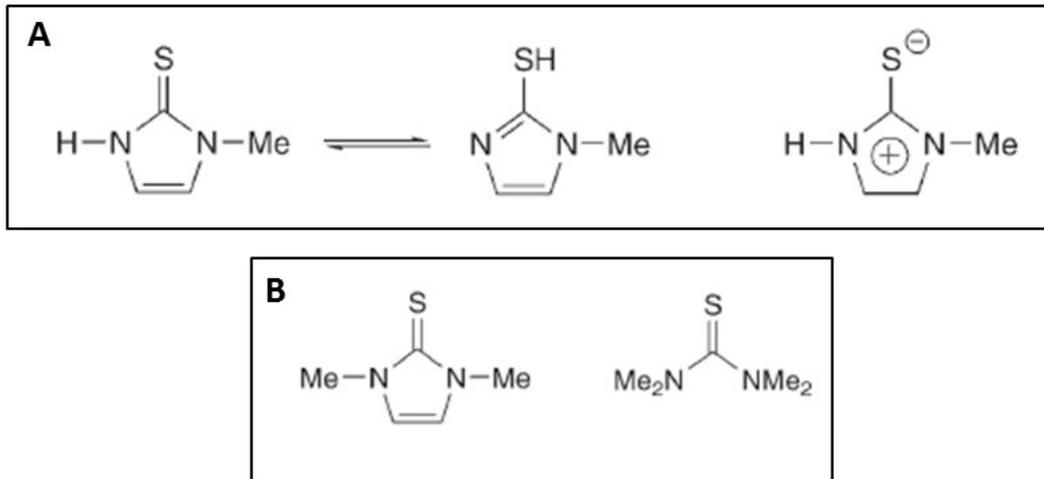


Abbildung 4.5 A) Tautomerie des Thyreostatikums Methimazol in die wirksame Thiolform. B) Dimethylierte Analoga ohne hemmenden Effekt auf die Thyreo-Peroxidase/Laktat-Peroxidase (Abbildung aus der Publikation von Roy et al. 2008).

4.2.2.1.4 Verschiedenartige Inhibitoren

Die letzten 7 Inhibitoren weichen dagegen strukturell von bisher bekannten DDAH-Inhibitoren ab. Während sich ENA_T6759918 mit ENA_T6778675 als auch ENA_T5868739 mit ENA_T5923946 ähnelt, zeigen die anderen Hits keine Gemeinsamkeiten. Da hierzu keine Informationen erhältlich sind, sind keine Voraussagen über dessen Potenzial als DDAH1-Inhibitor möglich. Mit den neu identifizierten Strukturen besteht aber die Möglichkeit bessere Inhibitor-Eigenschaften zu finden bzw. mehr über molekulare Mechanismen der DDAH1-Hemmung zu erfahren.

4.2.2.2 Aktivatoren

Wie sich bereits im Verlauf des *Primary Screens* und der folgenden Validierung angedeutet hatte, wurden in diesem HTS keine aktivierenden *Hits* gefunden. Die im *Hit Profiling* beobachteten schwachen aktivierende Effekte wurden durch die starke Autofluoreszenz der frischen *Compounds* überdeckt (Ergebnisteil **Punkt 3.2.3.3.5**). Auch wenn es generell möglich ist Aktivatoren für manche Enzyme zu finden, ist die Wahrscheinlichkeit jedoch sehr gering. Denn das natürliche Substrat besitzt generell die Beste für das entsprechende Enzym strukturelle Eigenschaft. Um die Chance zu erhöhen einen aktivierenden *Hit* zu identifizieren, muss daher eine Vielzahl an *Compounds* durchgetestet werden. Daher kann die Durchführung eines erneuten HTS mit einer anderen Substanzbibliothek in Betracht gezogen werden.

4.2.3 Fazit

Als DDAH-Inhibitoren sind zur Zeit die L-Arginin-Analoga L-257 (163) und CI-NIO (217), das Antioxidant Ebselen (108) und die Protonen-Pumpen-Hemmer (wie Omeprazol, Lansoprazol) (53) im Gespräch, um Erkrankungen zu behandeln, die mit einer erhöhten DDAH-Aktivität/-Expression bzw. einer erniedrigten NO-Produktion einhergehen.

Von allen bekannten Inhibitoren wurde L-257 bisher am ausführlichsten charakterisiert. Der Vorteil von L-257 ist, dass die Substanz nicht hemmend auf weitere am NO-Stoffwechsel beteiligten Enzyme, wie Arginase und NOS wirkt. Des Weiteren soll es selektiv nur DDAH1 inhibieren und somit eine gewisse Gewebespezifität haben (131). L-257 wurde nun erstmals im Tiermodell untersucht. Erste Ergebnisse zeigten positive Effekte auf die sich bei einem septischen Schock entwickelnde Hypotension – bedingt durch eine Überproduktion von NO (131, 219). Allerdings werden die Substrat-Analoga nicht als ideale *Lead-Strukturen* angesehen, da sie unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind (108). Dadurch ist die Substanz sehr hydrophil und abhängig von kationischen Transporter-Systemen, was Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit und das Verteilungsvolumen des Wirkstoffs hat. Des Weiteren fehlen weitere tierexperimentelle Studien (unter anderem auch für idiopathische pulmonale Fibrose, bei der die DDAH hochreguliert ist etc.).

Somit können momentan noch keine Rückschlüsse über Interaktionen mit weiteren Enzymen, Toxizität, Effektivität und Wirkung *in-vivo* gemacht werden.

Der Einfluss der PPIs auf die DDAH-Aktivität wird kontrovers diskutiert. Ob Omeprazol als DDAH-Inhibitor *in-vivo* wirklich wirksam ist, ist noch nicht bekannt. Die Hemmung konnte bisher *in-vitro* und im Zellsystem nachgewiesen werden, allerdings mit höheren Konzentrationen (5- bis 10-fach) als mit der therapeutisch eingesetzten PPI-Dosis. Im höheren Konzentrationsbereich konnte eine dosis-abhängige Reduktion der NO-Konzentration in humanen endothelialen Zellen und eine Erhöhung der ADMA-Konzentration bis 30% erreicht werden (53). Die PPIs sind aber auch ein Beispiel dafür, dass erst nach langjähriger Anwendung schädliche Langzeitwirkungen erkannt werden. So verfügt die U.S. Food and Drug Administration bereits über Informationen, die auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko hindeuten. Zum Beispiel konnte beobachtet werden, dass Patienten, die unter gastrointestinalem Reflux leiden und langfristig PPIs einnehmen, ein erhöhtes Herzinfarkt-Risiko besitzen (53). Des Weiteren soll die Einnahme höherer Dosen (>1 Jahr) das Risiko für Knochenbrüche bei Patienten über 50 Jahre erhöhen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist diese Assoziation noch nicht ausreichend bewiesen, aber entsprechende Studien laufen bereits (197).

Auf Grund der fehlenden wirksamen, zugelassenen Medikamente bei IPF ist der Einsatz der PPI's in dieser Erkrankung im Gespräch. Die idiopathische pulmonale Fibrose ist charakterisiert durch eine hohe Komorbidität. Dabei stellen 20% kardiovaskuläre Erkrankungen, 15% arterielle Hypertension und 11% Diabetes mellitus dar (70). Demnach wäre die Behandlung von IPF-Patienten mit einem PPI als DDAH-Inhibitor mit Hinblick auf Nebenerkrankungen allerdings nicht geeignet. Dieser würde vielleicht die mit der Erkrankung verbundene Fibrose und Zell-Proliferation in der Lunge verbessern, gleichzeitig jedoch das kardiovaskuläre Risiko und die Mortalität erhöhen.

Aus diesen Gründen wird weiterhin nach Strukturen gesucht, die bessere Eigenschaften aufweisen, als die bisher beschriebenen Inhibitoren. Daher sind die in dieser Arbeit identifizierten Strukturen von großer Bedeutung. Da ebenfalls der DDAH-Inhibitor Ebselen nicht als *Lead-Struktur* fungieren kann, können die ausgewählten Schwefel-Analoga dabei helfen selektivere und weniger toxische Ebselen-Analoga

zu finden. Auch die strukturell verschiedenartigen Inhibitoren, die bisher keinem Inhibitor ähneln, können dabei helfen einen tieferen Einblick über die Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten. Vor allem die Thiamazol-ähnlichen Strukturen sind vielversprechend. Diese können nicht nur weiter zu selektiveren Strukturen modifiziert werden, sie haben auch aufgezeigt, dass die DDAH möglicherweise im T₃/T₄-Stoffwechsel eine Rolle spielt. Bisher gibt es kaum Informationen über den Zusammenhang von ADMA und DDAH und der Schilddrüsenfunktion. Durch diesen Link wurde außerdem auf ein neues potenzielles Indikationsfeld aufmerksam gemacht – die Kurzzeitgabe eines DDAH1-Inhibitors nach einer Leberresektion zur verbesserten bzw. beschleunigten Regeneration.

Die Ergebnisse des durchgeführten HTS kräftigen die Vermutungen, dass die Hemmung der DDAH durch strukturell diverse Inhibitoren über die Bildung einer kovalenten Bindung mit dem Cystein-Rest im aktiven Zentrum erfolgt. Da Strukturen, die z.B. eine Thiolgruppe enthalten sehr reaktiv sind und mit einer großen Bandbreite an Enzymen bzw. Proteinen interagieren, scheint die Entwicklung eines selektiven DDAH-Inhibitors komplizierter zu sein als bisher vermutet. Auch wenn durch weitere strukturelle Modifikationen die Selektivität gegenüber bestimmten Enzymen erhöht werden kann, muss davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlichen DDAH-Inhibitoren bestimmte Nebenwirkungen aufweisen und indikationsbezogen eingesetzt werden müssen. Aus diesem Grund ist es wichtig weitere Strukturen zu finden und verschiedene DDAH-Inhibitoren mit unterschiedlichem Nebenwirkungsprofil zu entwickeln.

4.2.4 Ausblick

4.2.4.1 Charakterisierung der Hits

Secondary Assay. Die *Compounds* der ausgewählten 18 potenziellen Inhibitoren werden im nächsten Schritt mit einem *orthogonalen Assay* getestet. Für den *Secondary Assay* werden Methoden verwendet, die vom HTS-Assay abweichen. Dadurch sollen letztendlich falsch-positive *Hits* identifiziert werden, die Effekte auf Grund Assay-bedingter Interaktionen zeigten. Die in der Arbeit identifizierten *Hits* werden mit zwei unterschiedlichen Assays getestet. Im Labor des UKE wird eine

etablierte Isotopen-basierte LC/MS-Messung durchgeführt. Dabei wird d₇-ADMA als Substrat verwendet. Spätestens hier sollten sich Effekte, die auf das abgewandelte Substrat SMTC zurückzuführen sind, identifiziert werden. Die DDAH1-Aktivität wird mit dem rekombinanten Protein gemessen. Dabei wird der Verbrauch an Substrat für die Interpretation der Ergebnisse herangezogen. Des Weiteren testet unser Kooperationspartner Dr. W. Fast in Austin die ausgewählten *Hits* mit einem anderen bereits bekannten photometrisch-basierten Aktivitätsassay. Hierbei wird die Bildung des Produktes L-Citrullin durch Bildung eines Farbkomplexes quantifiziert. Somit erfolgt die Bestimmung der Inhibitoren und Aktivatoren durch eine Substrat- und Produktmessung.

Biochemische in-vitro Studien. Die *Compounds*, die auch im *secondary/orthogonalen Assay* reproduzierbar sind, werden dann näher analysiert. Da die Arbeitsgruppe in Austin auf enzymkinetische Messungen spezialisiert ist, führen sie nochmals Konzentrations-Wirkungskurven durch, testen auf Reversibilität/Irreversibilität und ob es sich um einen kompetitiven oder nicht-kompetitiven Inhibitor handelt. Des Weiteren müssen die *Hits* auf ihre Toxizität getestet werden. Hierfür können kommerzielle erhältliche photometrisch-basierte Toxizitäts- bzw. Apoptose-Kits verwendet werden.

Da vor allem die Selektivität des DDAH-Hemmers gegenüber der Arginase und NOS-Isoformen von Bedeutung sind, können diese ebenfalls getestet werden (Arginase Assay Kits und der im Labor des UKE etablierte HPLC-basierte NOS-Aktivitätsassay). Eine weitere Analysierung der Effekte auf andere Enzyme (wie z.B. LPO/TPO bei den Thiamazol-Derivaten etc.) können auch in Betracht gezogen werden.

Eine Eigenschaft, die viele Wirkstoffe in der Entwicklung aufweisen, ist deren Effekt auf die QT-Zeit. Viele bekannte Wirkstoffe, wie z.B. Amiodaron, Terfenadin, Doxepin verlängern die QT-Zeit (es kommt zu einer Störung der Erregungsbildung im Herzmuskel, das zu Herzrhythmusstörungen bis zu Kammerflimmern führt). Daher gehört die Testung dafür zu den Standardmethoden in der pharmazeutischen Industrie. Prof. Dr. Schwarz aus dem Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) verfügt über hERG⁷³-überexprimierende HEK-Zellen. Der hERG-Kanal ist ein

⁷³ human Ether-a-go-go-related gene

spannungsaktivierter Kalium-Kanal in den Herzmuskelzellen, der vorwiegend für den Effekt auf die QT-Zeit verantwortlich ist. Die Arbeitsgruppe untersucht Wirkstoffe auf ihren QT-Effekt mittels Patch-Clamp-Methode. Vorstellbar wäre eine Kooperation, um die *Hits* auf diesen Effekt zu analysieren.

Außerdem müssen die *Compounds* im Zellsystem getestet werden. Nicht alle *Compounds* werden die idealen hydrophilen/lipophilen Eigenschaften aufweisen, um durch Zellen aufgenommen zu werden und den Wirkungsort erreichen. Hierfür werden Zellen (z.B. Lungenfibroblasten) mit unterschiedlichen Konzentrationen der *Compounds* für einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Die ADMA-Konzentrationen können dann aus dem Zell-Lysat und dem -Überstand (mit LC/MS oder einem ADMA-ELISA) getestet werden.

In-vivo-Experimente. Am Ende bleiben idealerweise 1-2 *Compounds* übrig, die zunächst in einem Tier-Versuch getestet werden, um erste Informationen über ihr *in-vivo*-Verhalten zu bekommen. Denn erst *in-vivo* sind viele pharmakokinetische oder -dynamische Effekte (wie Off-Target-Effekte) ersichtlich. Zunächst könnten die *Compounds* in Wildtyp-Mäusen getestet werden. Im späteren Verlauf können außerdem Tiermodelle bestimmter Erkrankungen verwendet werden, wie zum Beispiel Bleomycin-behandelte Mäuse, um die Wirkung der *Compounds* bei IPF zu analysieren.

Structure-based Drug Design. Vor oder nach einer ersten Charakterisierung der ausgewählten *Lead-Strukturen in-vivo* ist dann eine weitere Modifizierung der Strukturen mit Hilfe von medizinischen Chemikern der Arbeitsgruppe von Prof. Clement (Pharmazeutische Chemie, Universität Kiel) geplant. Bei der *Lead Optimization* steht vor allem die Steigerung der Potenz vom μM -Bereich in den nM-Bereich im Vordergrund, um Kosten für die Produktion und galenische Zubereitung zu sparen und das Risiko für Off-Target-Effekte zu minimieren. Dies geschieht durch Austausch von hydrophilen oder lipophilen Gruppen im Molekül, um die Affinität zum Enzym zu erhöhen. Hierbei können auch Strukturen hergestellt werden, die ggf. auch eine bessere Selektivität gegenüber der DDAH1 zeigen. Die Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften (Löslichkeit) ist eine weitere Eigenschaft, die in diesem Schritt berücksichtigt wird.

4.2.4.2 DDAH, ADMA und die Schilddrüse

Neben der Charakterisierung der *Hits* könnte die weitere Untersuchung der Assoziationen zwischen ADMA, DDAH mit der Schilddrüsenfunktion und Lebergeneration in Betracht gezogen werden.

Da bisher nur eine tierexperimentelle Studie veröffentlicht wurde, bei der die Expression und Aktivität der DDAH berücksichtigt wurde, sind weitere Experimente notwendig, die diese Hypothese unterstützen. Man müsste ggf. auch den Einfluss von DDAH und ADMA bei Hypothyreose als auch bei Leberresektion getrennt betrachten, da es auch kontroverse Informationen bezüglich der ADMA-Konzentrationen gibt. Beispielsweise wurden auch erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen bei hypothyreotischen Patienten gemessen (193). Es kämen klinische Studien mit dem entsprechenden Patientenkollektiv in Frage, deren ADMA-Plasmakonzentrationen ermittelt werden könnten. Weitere Tier-Experimente mit hypothyreotischen Mäusen wären denkbar, um die Assoziationen von ADMA, DDAH und der Schilddrüse weiter zu charakterisieren. Mit Hinblick auf die ausgewählten *Lead-Strukturen* könnte deren therapeutischer Effekt bei hypothyreotischen Mäusen, die einer Leberresektion unterzogen werden, untersucht werden. Hierbei könnte den Mäusen 24-48h nach durchgeführter Leberresektion ein DDAH-Hemmer injiziert werden.

4.3 Einordnung der Projekte in den Prozess der Drug Discovery/Developments nach Durchführung der beschriebenen Arbeiten

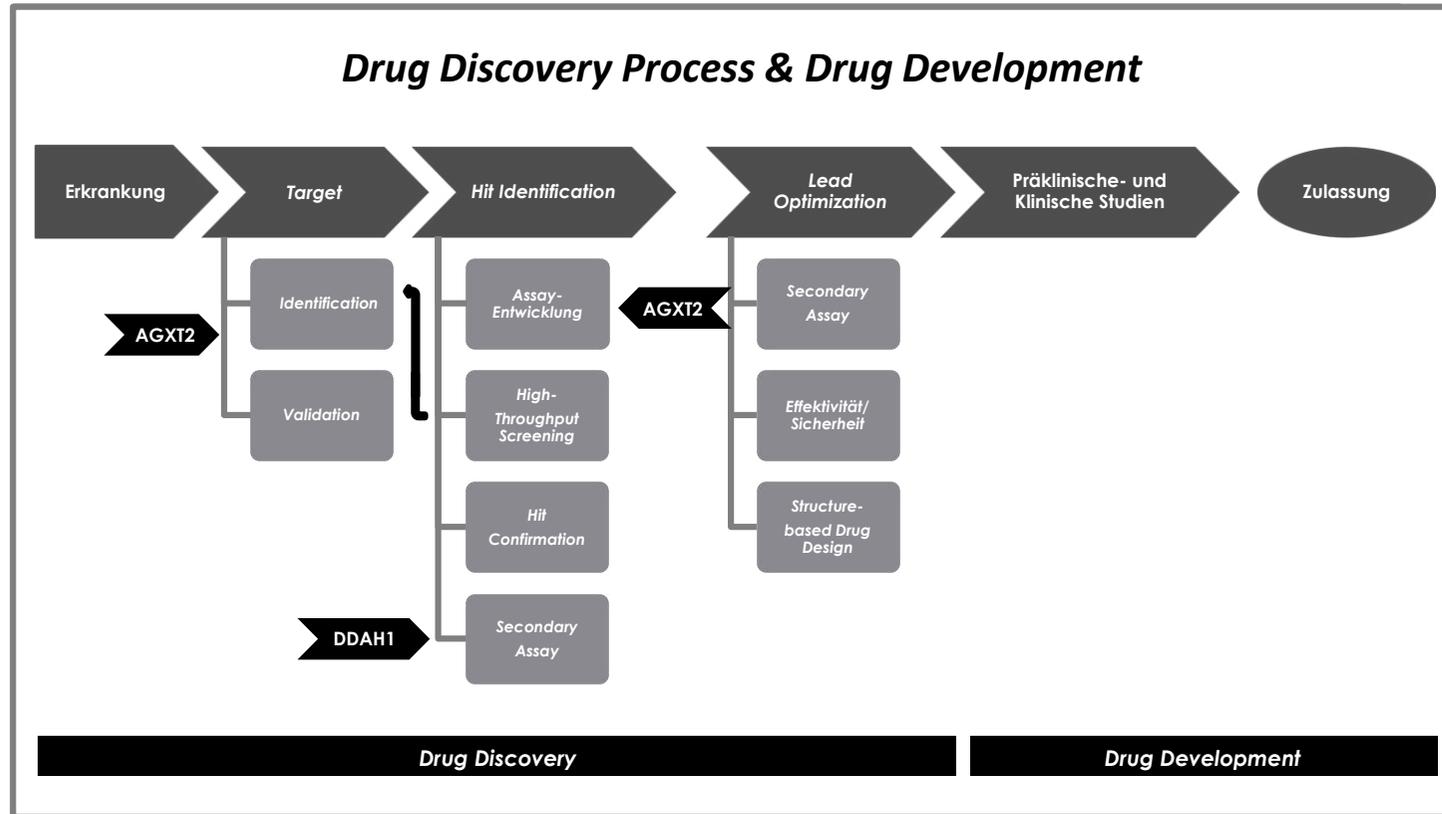


Abbildung 4.6

Schematische Darstellung des Verlaufs der Wirkstoffentwicklung (Drug Discovery Process/Development). Einordnung der Enzyme AGXT2 und DDAH1 als potenzielle therapeutische Targets nach Durchführung der beschriebenen Arbeiten. Die Begriffe werden in **Tabelle 1.3** näher erläutert.

In dieser Arbeit konnten weitere Resultate erbracht werden, die sehr hilfreich für die *Target Identification* von SDMA mit AGXT2 sein werden (**Abbildung 4.6**). Da die Target-Phase viele *in-vitro* als auch *in-vivo* Experimente erfordert, befindet sich AGXT2 im Prozess der *Drug Discovery*-Phase noch sehr weit am Anfang. Es fehlen vor allem tierexperimentelle Studien, die die Rolle der AGXT2 und SDMA in diversen Erkrankungen beweisen. Daten von Modellen der betroffenen Erkrankungen sowie AGXT2-Knock-In/Out-Mäusen sind erforderlich. Um die Beziehungen von AGXT2, SDMA und den assoziierten Erkrankungen mechanistisch zu verstehen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die AGXT2 in den proximalen Tubuluszellen der Niere lokalisiert, so dass der Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Zelle wahrscheinlich ist. Der optimierte spektroskopische Assay kann jetzt als Basis für die Entwicklung eines HTS-Assays dienen. Parallel zur *Target-Phase* ist die Durchführung eines HTS mit der AGXT2 hilfreich, um Tools zu identifizieren, die für *Loss & Gain of Function Studies* verwendet werden können. Durch die rechtzeitige bzw. parallele Durchführung der *Hit Identification* könnte die Dauer des *Drug Discovery*-Prozesses für die AGXT2 etwas verkürzt werden. Des Weiteren kann der Assay zukünftig für weitere Fragestellungen bei der *Target Validation* verwendet werden.

In der Arbeit konnte der komplette *Hit Identification*-Prozess mit der DDAH1 durchgeführt werden. Mit der Überprüfung der identifizierten *Hits* mit den *orthogonalen Assays*, befindet sich das Enzym mit dem nächsten Schritt in der *Hit-to-Lead-Phase*. Nach Bestätigung der *Hits* erfolgt in Zukunft die weitere Charakterisierung und Prüfung der *Lead-Strukturen* in der *Lead Optimization*-Phase. Hier werden wie unter **Punkt 4.2.4.1** beschrieben *in-vitro* und *in-vivo* Daten generiert, die die Eigenschaften des potenziellen Wirkstoffes beschreiben. Dazu gehören die Sicherheit des Wirkstoffes, die Effektivität und die ADME⁷⁴-Eigenschaften. Es ist zu hoffen, dass einer der bisher identifizierten Inhibitoren den Schritt in das *Drug Development* schafft. Des Weiteren werden auch in Zukunft weitere Versuche gestartet, um einen Aktivator der DDAH zu finden.

⁷⁴ Absorption-Distribution-Metabolism-Elimination

5 Zusammenfassung

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein kompetitiver Hemmer der NO-Synthase (NOS) und wird vorwiegend durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) zu L-Citrullin abgebaut.

ADMA und DDAH sind in unterschiedlichen Krankheitsbildern involviert, die mit einem veränderten NO-Stoffwechsel einhergehen. So konnten Assoziationen zwischen erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen, die durch eine erniedrigte DDAH-Aktivität oder -Expression verursacht werden, mit dem metabolischen Syndrom, endothelialer Dysfunktion und einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF), Alzheimer und manche Tumorerkrankungen sind hingegen mit einer Überproduktion von NO, niedrigen ADMA-Konzentrationen und einer erhöhten Expression der DDAH assoziiert.

Die Manipulation des NO-Stoffwechsels über DDAH-Inhibitoren oder -Aktivatoren stellt eine neue und vielversprechende therapeutische Option zur Beeinflussung dieser Erkrankungen dar. Ziel der Arbeit war die Identifizierung potenzieller Modulatoren, da die bisher bekannten Inhibitoren keine ausreichende Selektivität gegenüber anderen Enzymen zeigten oder Studien über deren *in-vivo*-Verhalten fehlen. Des Weiteren wurden bisher keine aktivierenden Substanzen der DDAH gefunden.

In dieser Arbeit wurde ein High-Throughput Screening (HTS) von 52.096 *Compounds* mit Hilfe eines optimierten Fluoreszenz-basierten DDAH-Aktivitätsassays durchgeführt. Nach der Hit-Validierung wurden 18 potente Strukturen mit einem hemmenden Effekt identifiziert. Einige Moleküle weisen eine neuartige Struktur auf oder stellen Analoga von bereits bekannten DDAH-Inhibitoren dar. In dieser Arbeit konnten erste Hinweise über eine mögliche Verbindung zwischen der humanen DDAH1 und Thioharnstoff-ähnlichen Substanzen *in-vitro* gezeigt werden. Potenzielle DDAH-Aktivatoren konnten hingegen nicht identifiziert werden.

Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) stellt im Gegensatz zu ADMA kein direkter Inhibitor der NOS dar, beeinträchtigt jedoch die intrazelluläre Bereitstellung von L-Arginin zur NO-Produktion durch Hemmung des kationischen Aminosäure-Transporters. Neben der Assoziation erhöhter SDMA-Plasmakonzentrationen mit der Gesamtmortalität nach ischämischem Schlaganfall ist über weitere Effekte wenig

bekannt. Seit kurzer Zeit ist die Metabolisierung von SDMA durch das Enzym Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2 (AGXT2) im Gespräch, da unter anderem in Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) deren genetischer Zusammenhang gezeigt werden konnte. Erhöhte SDMA-Konzentrationen waren dabei mit einer Punktmutation (rs37369) im codierenden Bereich assoziiert.

Ziel dieser Arbeit war die Bestätigung der Hypothese über den Abbau von SDMA durch AGXT2 und die eingeschränkte Aktivität der AGXT2-Mutante auf Proteinebene. Da wenig über die Funktion dieser Isoform bekannt ist, sollte außerdem das Organspezifische Expressionsmuster des Enzyms untersucht werden.

In der Arbeit wurde ein AGXT2-Aktivitätsassay optimiert und der enzymatische Abbau von SDMA konnte bestätigt werden. Die Variante rs37369 wies eine um 50% verminderte enzymatische Aktivität auf. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die reduzierte Aktivität auch gegenüber des Hauptsubstrates L-Alanin bestehen bleibt. Außerdem konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass AGXT2 innerhalb der Niere ausschließlich in den proximalen Tubuluszellen exprimiert wird, das auf einen möglichen Einfluss des Enzyms auf den Energiehaushalt der Zelle hinweist.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit weitere hemmende DDAH-Strukturen identifiziert werden, mit deren Hilfe die Möglichkeit besteht potentere und weniger toxische Leitstrukturen zu entwickeln und tiefere Einblicke über die Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten.

Durch den Nachweis der Lokalisation der AGXT2 in der Niere konnte ein weiterer Anhaltspunkt über mögliche Funktionen des Enzyms hervorgebracht werden. Da SDMA als Substrat der AGXT2 bestätigt werden konnte, kann das Enzym als neues therapeutisches Target betrachtet werden. Die hier optimierte Aktivitätsmessung kann dabei als Grundlage für die Entwicklung eines HTS-Assays dienen.

6 Summary

Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) is a competitive inhibitor of NO synthase (NOS) and is mainly metabolized to L-citrulline by the enzyme dimethylarginine-dimethylaminohydrolase (DDAH).

ADMA and DDAH are involved in different diseases which are associated with an altered NO pathway. Elevated ADMA plasma levels due to downregulation of expression and/or activity of DDAH are linked with the metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and numerous cardiovascular diseases. By contrast, Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), Alzheimer's disease, and some types of cancer are connected with an overproduction of NO, reduced ADMA concentrations and an increased expression of DDAH.

The manipulation of the NO pathway through inhibition or activation of DDAH represents a new and promising therapeutic option to therapeutically influence these diseases. One goal of this study was to identify potential modulators given that previous inhibitors lacked selectivity over other enzymes or necessary *in-vivo* studies are missing. In addition no DDAH-activating compound has been found yet.

A high-throughput screening (HTS) with 52.096 compounds was performed with a fluorescence-based DDAH activity assay. After subsequent hit validation 18 potent structures with an inhibiting effect were identified. Several molecules show a novel structure or represent analogues of already known DDAH inhibitors. By finding derivatives of thiamazole it was first shown that the enzyme is probably involved in off-target effects of thyreostatic drugs. In contrast no DDAH-activating compound has been found here, too.

Compared to ADMA, symmetrical dimethylarginine (SDMA) is not a direct inhibitor of NOS but impairs the intracellular provision of L-arginine for NO production by inhibiting the cationic amino acid transporter. Next to the association of elevated SDMA levels with overall mortality after ischemic stroke, less is known about other effects. So far it was thought that SDMA is exclusively excreted unchanged by the kidney. Therefore SDMA is known as a renal marker. Lately there are discussions about an enzymatic degradation of SDMA by alanine-glyoxylate-aminotransferase 2 (AGXT2) because of their genetic associations discovered by genome-wide

association studies (GWAS). Thereby elevated SDMA concentrations were associated with the single nucleotide polymorphism (SNP) rs37369 in the coding region.

One goal of the AGXT2 part was the confirmation of the metabolism of SDMA by AGXT2 and the supposed impaired activity of the mutant form on protein level. Since less is known about the function of this isoform the organ-specific expression pattern for the enzyme had to be investigated.

In this study an AGXT2 activity assay was optimized and the enzymatic degradation of SDMA could be confirmed. The variant showed an impaired activity up to 50%. For the first time it was shown that the reduced enzyme activity persisted with the main substrate L-alanine. Furthermore it was firstly proved that the expression of AGXT2 in the kidney is exclusively restricted to the proximal tubule cells. A connection of AGXT2 with energy balance of the cell can be assumed.

In summary, in this thesis further DDAH-inhibiting compounds could be identified. With their help there is a chance to develop more potent and less toxic lead structures and to get deeper insights to the relations between the molecular structure and its effects on enzyme activity.

By proving the localization of AGXT2 new evidence about its possible function could be generated. Given that SDMA could be confirmed as a substrate of AGXT2 the enzyme can be considered as a new therapeutic target. The optimized activity assay can be used as a base for the development of an HTS-suitable assay.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A

A	Absorption
Abb	Abbildung
Abk	Abkürzung
ad	"zu" (bis zu 100ml auffüllen)
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ADME	Absorption-Distribution-Metabolism-Elimination
ALDH2	Aldehyd-Dehydrogenase 2
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat

B

BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BH ₄ /BH ₂	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin / 7,8-dihydro-L-biopterin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine

C

C	Celcius
CAT(2B)	Cationic amino acid transporter (2B)
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
Cl-NIO	N(5)-(1-imino-2-chloroethyl)-L-ornithine
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX IV	Cytochrome C oxidase IV
CPM	7-Diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methylcoumarin
CV	Coefficient of variation

D

<i>d</i>	<i>Durchmesser</i>
<i>DAPI</i>	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>
<i>DMA</i>	<i>Dimethylamin</i>
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>D'MGV</i>	<i>α-Keto-δ-(N',N-dimethylguanidino)-valeriansäure</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethylsulfoxid</i>
<i>DNTB</i>	<i>5,5-Dithio-bis(2-nitrobenoic acid)</i>
<i>DTPA</i>	<i>Diethylentriaminpentaessigsäure</i>
<i>DTT</i>	<i>Dithiothreitol</i>

E

<i>EDRF</i>	<i>Endothelium-derived-relaxing-factor</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<i>Em</i>	<i>Emission</i>
<i>eNOS</i>	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
<i>ESP</i>	<i>European Screening Port</i>
<i>Ex</i>	<i>Extinction</i>

F

<i>Fa.</i>	<i>Firma</i>
<i>FAD</i>	<i>Flavin-Adenin-Dinukleotid</i>
<i>FAM</i>	<i>6-Carboxyfluorescein</i>
<i>FBS</i>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<i>FI</i>	<i>Fluorescence intensity</i>
<i>Fl</i>	<i>Flashes</i>
<i>FMN</i>	<i>Flavinmononucleotid</i>
<i>FRET</i>	<i>Förster-Resonanzenergietransfer</i>
<i>FXRE</i>	<i>Farnesoid-X-receptor response element</i>

G

<i>g</i>	<i>Erdbeschleunigung</i>
<i>G</i>	<i>Gain</i>

G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	G-protein-coupled receptor
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudie

H

h	Stunde
H	Height
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HbA _{1c}	Glykohämoglobin
HEK293	Human embryonic kidney. 293ste Versuch der Transformation
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	Hepatocellular carcinoma G2
hERG	Human ether-à-go-go-related gene
hGAPDH	Humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HIF	Hypoxia-inducible factors
His ₆ - SUMO	Histidin ₆ -small-ubiquitin-like modifier
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish-peroxidase
HTS	High-Throughput Screening
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells

I

IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IQR	Interquartile range

K

kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KO	Knock-out

Kpos/neg Kontrolle positiv/negativ

L

LB Lysogeny broth
 LC/MS Liquid chromatography-mass spectrometry
 LDH Laktat-Dehydrogenase
 LDL Low-density lipoprotein
 log Logarithmus
 LPO Laktat-Peroxidase

M

MAF Minor allele frequency
 MATE1 Multidrug and toxin extrusion protein 1
 MCP-1 Monocyte chemotactic protein-1
 min Minuten
 MMA Monomethylamin
 mRNA Messenger ribonucleic acid
 MW Mittelwert

N

n Anzahl
 NAD⁺ / NADH Nicotinamidadeninukleotid
 NADPH Nicotinamidadeninukleotidphosphat
 NF-κB Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
 nl, µl, ml Nano -, mikro -, milliliter
 nNOS Neuronal nitric oxide synthase
 NO Nitric oxide
 NTP Nukleosidtriphosphat

O

O⁻ Superperoxid

OCT2	Organic cation transporter 2
OD	Optische Dichte
ONOO-	Peroxynitrit

P

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PBS	Phosphate buffered saline
PC12	Pheochromocytoma 12
pcDNA	Expressionsvektor pcDNA 3.1
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PHD	Prolylhydrolase
PLP	Pyridoxal-5-phosphat
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PPI	Proton pump inhibitor
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase

R

RFU	Relative fluorescence unit
rhAGXT	Rekombinante humane Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase
rhDDAH	Rekombinante humane Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
ROS	Reactive oxygen species
ROX	6-Carboxyl-X-rhodamin
RT	Raumtemperatur

S

S	Substrat
S/H	Signal/Hintergrund-Verhältnis
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standard deviation
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SDS	Sodium dodecylsulfate
siRNA	Small inhibitory RNA

SLC25A45	Transporter der solute carrier-Familie
SMTC	S-Methylthiocitrullin
SOC	Store-operated channels

T

T	Temperatur
TAE	Tris base – acetatic acid - EDTA
Taq Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TBS(T)	Tris buffered saline (inkl. Tween-20®)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tgDDAH	Transgene DDAH
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TPO	Thyreo-Peroxidase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U - Z, Sonstiges

UKE	Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
V	Volt
VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor
V _{max}	Velocity, maximal
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg
(q)PCR	(Quantitative) polymerase chain reaction

7.2 Substanzen | Materialien | Geräte

7.2.1 Substanzen

	Hazard Statements	Precautionary Statements	Firma
Allgemein			
Ethanol, 96%	225	210-403+235	Merck, KGaA, Darmstadt
Natronlauge (NaOH) TitriPur®	290-314	280-301+330+331-305+351+ 338-	Merck, KGaA, Darmstadt
PBS Dulbecco´s Phosphat-Puffer (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ ; 9,55 g/L)	/	/	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (HCl) rauchend, 37%	314-335	260-301+330+331-303+361+353-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasser für Injektionszwecke	/	/	Baxter Healthcare SA, Unterschleißheim
Zellkultur			
Dimethyl sulfoxide Hybri-Max™ (DMSO), ≥99.7%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM, low glucose (1g/L), GlutaMAX™ Supplement, pyruvate	/	/	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (FBS), heat-inactivated	/	/	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
Geneticin (G418 sulfate, 50 mg/ml)	317-334-316	285-304+341-305+351+338- 332+313-261-280	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
HEK-AGXT2-Zellen (pcDNA 3.1 Kontrolle, Wildtyp, rs37369)	/	/	Prof. Maas, Institut für Experimentelle & Klinische Pharmakologie & Toxikologie, Friedrich-Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg
Natriumbutyrat, ≥98,5%	315-319-335-341	261-281-305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml)	315-320-317-334-335-361	304+340-305+351+338-337+313- 303+361+353-332+313-264-312	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
0.5% Trypsin-EDTA (10X)	/	/	GIBCO Invitrogen, Darmstadt

RNA und DNA-Analysen

Acetic Acid ReagentPlus®, ≥99%	226-314	280-305+351+338-310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose Standard Roti®agarose	/	/	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Anti-AGXT2 antibody produced in rabbit Prestige Antibodies® (0,1mg/ml)	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform, ≥99.5%	302-315-351-373	302+352-314	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol, 96%	225	210-403+235	Merck, KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung (1% in H ₂ O)	341-330-302	281-302+352-305+351+338-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GeneRuler DNA Ladder Mix (broad range 100 - 10.000bp) inkl. 6xDNA Loading Dye	/	/	Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte
Human Multiple Tissue cDNA™ Panels	/	/	Takara Bio Europe/Clontech, Frankreich
Isopropanol EMSURE®, ≥99,8%	225-319-336	210-233-240-305+351+338-403+235	Merck KGaA, Darmstadt
Maxima® Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)	/	/	Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis KIT	/	/	Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte
RNAzol® B	301-311-314	302+352	WAK-Chemie Medical, Steinbach/Ts.
TaqMan® Gene Expression Assays (human AGXT2 und GAPDH)	/	/	Applied Biosystems®, California, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris/Trizma® Base), ≥99%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Immunhistologische Untersuchungen

Alexa Fluor® 488 F(ab') ₂ Fragment of Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody	/	/	Life Technologies, California, USA
Anti-AGXT2 antibody produced in rabbit Prestige Antibodies® (0,1mg/ml)	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Alkaline phosphatase antibody produced in goat	373-412	273	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovine Serum Albumin (BSA, Fraktion V)	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), BioReagent, ≥98%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eseserum	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehyd, ≥36.0% in H ₂ O	301+311+331-314-317- 335-351-370	260-280-301+310- 305+351+338-310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MitoTracker® Red CMXRos	/	/	Life Technologies, California, USA
PromoFluor® Antifade Reagent	/	/	PromoCell GmbH, Heidelberg

Proteinanalytik

Proteinbestimmung

Bovine Serum Albumine; 2.0µg/ml in 0.9% Kochsalzlösung (Standard)	/	/	Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte
Bradford-Reagenz, Bio-Rad Protein Assay	226-370-314-332	/	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Western Blot

Acetic Acid ReagentPlus®, ≥99%	226-314	280-305+351+338-310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
40% Acrylamid/Bis Solution (37.5:1)	350-340-361-301-372-332-	201-280-301+310-	Bio-Rad Laboratories
Ammonium Persulfat (APS)	272-302-315-319-335-	280-305+351+338-302+352-	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat	373-412	273	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Mercaptoethanol	302-311-331-314-319-411	/	Merck KGaA, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA, Fraktion V)	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau Indikator	/	/	Merck KGaA, Darmstadt
Cytochrome C Oxidase Subunit IV Isoform 1 (COX4I1)	/	/	antibodies-online GmbH, Aachen
GAPDH Antikörper (FL-335)	/	/	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Glycerol ReagentPlus®, ≥99.0%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin PUFFERAN® ≥99%	/	/	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Substrate	/	/	Roche Diagnostic, Canada
Methanol ROTIPURAN® ≥99,9 %, p.a., ACS, ISO	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Milchpulver, Blotting grade, fettarm	/	/	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl), ≥99,5 %, p.a., ACS, ISO	/	/	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	225-332-302-314	210-233-280-301+330+331- 305+351+338-309+310	Merck KGaA, Darmstadt
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	/	/	Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte
Ponceau S, sodium salt, BioReagent	315-319-335	261-305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protease Inhibitor Cocktail	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), ≥96%	228-311-302-335-315-319	210-280-304+340-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

		305+351+338-309+310	
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	/	/	Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris/Trizma® Base), ≥99%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris/trizma® hydrochlorid, ≥99%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween®- 20	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
AGXT2 Assay			
Ammoniumsulfat reinst.	/	/	Merck, KGaA, Darmstadt
L-Alanine from non-animal source, ≥98.5%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Lactate Dehydrogenase (LDH) from rabbit muscle	/	/	Roche Diagnostic, Canada
Mitochondria Fractionation Kit	/	/	Active Motif® Europe, Rixensart, Belgien
Natriumhydrogencarbonat EMSURE®	/	/	Merck, KGaA, Darmstadt
N ^ε ,N ^ε -Dimethyl-L-arginine dihydrochloride (ADMA)	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N ^ε , N ¹ -Dimethyl-L-arginine dihydrochloride (SDMA)	/	/	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Nicotinamadeninucleotid (NADH), Grade II, disodium salt	/	/	Roche Diagnostic, Canada
Protease Inhibitor Cocktail	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PUFFERAN® ≥99,5 %, Buffer Grade	/	/	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pyridoxal 5'-phosphate hydrate (PLP), ≥98%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pyruvic acid, 98%	314	280-305+351+338-310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
rhAGXT2	/	/	Prof. Fischer, Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, Hamburg
Sodiumglyoxylate, monohydrate, ≥93%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SMTC Assay			
7-Diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methylcoumarin (CPM), ≥95%	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ebselen, ≥98%	301-331-373-410	261-273-301+310-311-501	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	319	305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	/	/	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	/	/	Merck KGaA, Darmstadt
rhDDAH1	/	/	Prof. Fischer, Lebensmittelchemie,

<i>S</i> -Methyl-L-thiocitrulline acetate salt (SMTC), ≥98%	/	/	Universität Hamburg, Hamburg
Tween®- 20	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
			Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

7.2.2 Puffer & Lösungen

Zellkultur

Zellmedium für HEK-Zellen

Fötales Kälberserum	50,00 ml
Penicillin/Streptomycin	5,00 ml
DMEM 1g/L Glucose-Grundmedium	ad 100,00 ml

Einfríermedium (pro Kryoróhrchen)

Zellmedium	100,00 μ l
FBS	300,00 μ l
DMSO	100,00 μ l

Immunhistologische Untersuchungen

Blockierlösung (Immunhistologie)

Eserum	10,00 ml
Rinderserumalbumin	1,00 ml
Wasser für Injektionszwecke	ad 100,00 ml

RNA und DNA-Analysen**1,2% Agarose-Gel**

Agarose	0,24 g
Ethidiumbromid-Lösung	2,00 μ l
in 1X TAE-Puffer	ad 20,00 ml

TAE-Puffer, 50X

Tris Base	242,00 g
0,5mol/L EDTA	100,00 ml
Essigsäure	57,10 ml
Deionisiertes Wasser	ad 500,00 ml

Western Blot**Trenngel 10% (1 Gel)**

50% Glycerol	3,10 ml
40% Acrylamid/Bis Solution	1,55 ml
Lower Tris, pH 8.8	1,58 ml
TEMED	3,00 μ l
10% APS	32,00 μ l

Sammelgel 4% (1 Gel)

Deionisiertes Wasser	1,29 ml
40% Acrylamid/Bis Solution	200,00 μ l
Upper Tris, pH 6.8	500,00 μ l
TEMED	2,00 μ l
10% APS	15,00 μ l

Lower Tris, pH 8.8

Tris Base	18,17	g
20% SDS	2,00	ml
Deionisiertes Wasser	ad	100,00 ml

Sample Buffer

50% Glycerol	2,00	ml
20% SDS	1,50	ml
Upper Tris, pH 6.8		1,25 ml
β -Mercaptoethanol		500,00 μ l
Deionisiertes Wasser	ad	10,00 ml

Load Mix

Glycerol	20,00	ml
Bromphenolblau	20,00	mg
Deionisiertes Wasser	ad	40,00 ml

Tris-Glycin-Puffer, 10X, pH 8.3

Tris Base	30,00	g
Glycin	144,00	g
Deionisiertes Wasser	ad	1,00 L

Ponceau Lösung

Ponceau S	100,00	mg
Trichloressigsäure	3,00	ml
Deionisiertes Wasser	ad	100,00 ml

SDS-PAGE-Laufpuffer, 1X

10X Tris-Glycin-Puffer, pH 8.3	100,00	ml
20% SDS	5,00	ml
Deionisiertes Wasser	ad	1,00 L

Transfer-Puffer, 1X

10X Tris-Glycin-Puffer	100,00	ml
Methanol	200,00	ml
Deionisiertes Wasser	ad	1,00 L

TBS-Puffer, 10X, pH 7.6

Tris HCl	24,20	g
Natriumchlorid	80,00	g
Deionisiertes Wasser	ad	1,00 L

TBST-Puffer, 1X, pH 7.6

Tween® -20	1,00	ml
1X TBS-Puffer	ad	1,00 L

Blockierlösung (Western Blot)

Milchpulver	0,75	g
Bovine serume albumine	0,25	g
TBST-Puffer, pH 7.6	ad	25,00 ml

Lysis-Puffer

20% SDS	100,00	µl
Protease-Inhibitor	1,00	ml
Deionisiertes Wasser	ad	10,00 ml

7.2.2.1 H- und P -Sätze des GHS

Hazard Statements / H-Sätze

H200-Reihe: Physikalische Gefahren

H200	Instabil, explosiv.
H201	Explosiv, Gefahr der Massenexplosion
H202	Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H203	Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H204	Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H205	Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
H220	Extrem entzündbares Gas.
H221	Entzündbares Gas.
H222	Extrem entzündbares Aerosol.
H223	Entzündbares Aerosol.
H224	Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H240	Erwärmung kann Explosion verursachen.
H241	Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
H242	Erwärmung kann Brand verursachen.
H250	Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
H251	Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H252	In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H260	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
H261	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
H270	Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
H271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
H281	Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder –Verletzungen verursachen.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H300-Reihe: Gesundheitsgefahren

H300	Lebensgefahr bei Verschlucken.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H304	Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H331	Giftig bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H350	Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H350i	Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H360F	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H360Fd	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H360Df	Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H361d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H361fd	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H362	Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
H370	Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H371	Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H372	Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H373	Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H300+310	Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt.
H300+310+330	Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H300+330	Lebensgefahr bei Verschlucken oder Einatmen.
H301+311	Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt.
H301+311+331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H301+331	Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.
H302+312	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt.
H302+312+332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H302+332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.
H310+330	Lebensgefahr bei Hautkontakt oder Einatmen.
H311+331	Giftig bei Hautkontakt oder Einatmen.
H312+332	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.

H400-Reihe: Umweltgefahren

H400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H413	Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.
H420	Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre.

Precautionary Statements / P-Sätze

P100-Reihe: Allgemeines

P101	Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
P102	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
P103	Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.

P200-Reihe: Prävention

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210	Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P211	Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
P220	Von Kleidung / .../ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
P221	Mischen mit brennbaren Stoffen / ... unbedingt verhindern.
P222	Kontakt mit Luft nicht zulassen.
P223	Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.
P230	Feucht halten mit
P231	Unter inertem Gas handhaben.
P232	Vor Feuchtigkeit schützen.

P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P234	Nur im Originalbehälter aufbewahren.
P235	Kühl halten.
P240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P241	Explosionssgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung / ... verwenden.
P242	Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
P243	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
P244	Druckminderer frei von Fett und Öl halten.
P250	Nicht schleifen / stoßen / ... / reiben.
P251	Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.
P260	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
P262	Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
P263	Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden.
P264	Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P271	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
P282	Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
P283	Schwer entflammbare / flammhemmende Kleidung tragen.
P284	Atemschutz tragen.
P285	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P231+232	Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
P235+410	Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P300-Reihe: Reaktion

P301	Bei Verschlucken:
P302	Bei Berührung mit der Haut:
P303	Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
P304	Bei Einatmen:
P305	Bei Kontakt mit den Augen:
P306	Bei kontaminierter Kleidung:
P307	Bei Exposition:
P308	Bei Exposition oder falls betroffen:
P309	Bei Exposition oder Unwohlsein:
P310	Sofort Giftnformationszentrum oder Arzt anrufen.
P311	Giftnformationszentrum oder Arzt anrufen.
P312	Bei Unwohlsein Giftnformationszentrum oder Arzt anrufen.
P313	Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P315	Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- P320 *Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).*
- P321 *Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).*
- P322 *Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).*
- P330 *Mund ausspülen.*
- P331 *Kein Erbrechen herbeiführen.*
- P332 *Bei Hautreizung:*
- P333 *Bei Hautreizung oder -ausschlag:*
- P334 *In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.*
- P335 *Lose Partikel von der Haut abbürsten.*
- P336 *Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.*
- P337 *Bei anhaltender Augenreizung:*
- P338 *Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.*
- P340 *Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.*
- P341 *Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.*
- P342 *Bei Symptomen der Atemwege:*
- P350 *Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.*
- P351 *Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.*
- P352 *Mit viel Wasser und Seife waschen.*
- P353 *Haut mit Wasser abwaschen / duschen.*
- P360 *Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.*
- P361 *Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.*
- P362 *Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.*
- P363 *Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.*
- P370 *Bei Brand:*
- P371 *Bei Großbrand und großen Mengen:*
- P372 *Explosionsgefahr bei Brand.*
- P373 *Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.*
- P374 *Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.*
- P375 *Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.*
- P376 *Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.*
- P377 *Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.*
- P378 *... zum Löschen verwenden.*
- P380 *Umgebung räumen.*
- P381 *Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.*
- P390 *Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.*
- P391 *Verschüttete Mengen aufnehmen.*
- P301+310 *Bei Verschlucken: Sofort Gifftinformationszentrum oder Arzt anrufen.*
- P301+312 *Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Gifftinformationszentrum oder Arzt anrufen.*
- P301+330+331 *Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.*
- P302+334 *Bei Kontakt mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.*
- P302+350 *Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.*
- P302+352 *Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.*
- P303+361+353 *Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.*

P304+340	Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P304+341	Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P305+351+338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P306+360	Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
P307+311	Bei Exposition: Giftnormales Zentrum oder Arzt anrufen.
P308+313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P309+311	Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftnormales Zentrum oder Arzt anrufen.
P332+313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P333+313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P335+334	Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
P337+313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342+311	Bei Symptomen der Atemwege: Giftnormales Zentrum oder Arzt anrufen.
P370+376	Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P370+378	Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
P370+380	Bei Brand: Umgebung räumen.
P370+380+375	Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P371+380+375	Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P400-Reihe: Aufbewahrung

	... aufbewahren.
P401	An einem trockenen Ort aufbewahren.
P402	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P403	In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
P404	Unter Verschluss aufbewahren.
P405	In korrosionsbeständigem / ... Behälter mit korrosionsbeständiger Auskleidung aufbewahren.
P406	Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen.
P407	Vor Sonnenbestrahlung schützen.
P410	Bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C / ... aufbewahren.
P411	Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
P412	Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg bei Temperaturen von nicht mehr
P413	als ... °C aufbewahren. Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.
P420	Inhalt in / unter ... aufbewahren
P422	In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.
P402+404	Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P403+233	Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P403+235	Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P410+403	Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
P410+412	Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren.
P411+235	

P500-Reihe: Entsorgung

Inhalt / Behälter ... zuführen.

P501 *Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten*

P502 *erfragen.*

(global harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien)

7.2.3 Materialien

Allgemeiner Laborbedarf

Eppendorf Gefäß-Halter	Scienceware® Bel-Art Products, Wayne, USA
Falcon/Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml, Polypropylen, runder Boden)	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
Glasware (1L Zylinder, Bechergläser, Flaschen)	DURAN Group GmbH, Wertheim Main
Handschuhe	Aurelia Gloves/Supermax Healthcare Inc.,
Vibrant® Latex Powder Free Examination Gloves	Aurora, USA
Vibrant® Protégé Nitrile Powder Free Blue Examination Gloves	
Multipipetten Eppendorf Reference/Research Pro/Plus (0,1 - 2,5µl / 0,5 - 10µl / 2 - 20µl / 5 - 100µl / 100 - 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Parafilm® M IS	BEMIS® Flexible Packaging, USA
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, Eppendorf Safe Lock (0,5, 1,5 und 2 ml + braun)	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen

Zellkultur

6-Well plate (flat bottom, with lid, polystyrene, clean)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

CryoPure® Röhrchen (1,6ml)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Isopropanol-Einfrierbox

Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Neubauer-Zählkammer

Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim

Pasteur Pipetten (230mm, Kalk - Soda - Glas)

VWR™ International GmbH, Darmstadt

Zellkulturflaschen 25cm² / 75cm² / 160cm²

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

(polystyrene, PE Vented Cap, Canted Neck)

Immunhistologische Untersuchungen

Histo -/Färbekammern z.B. Stain Tray™

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Objektträger Assistent® Elka mit Mattrand

Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co

KG,

Sondheim

Slide Marker (Liquid Blocker Super Pap Pen)

Daido Sangyo Co., Ltd. Tokyo, Japan

Tissue Culture Coverslips, (rund, d13mm)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

RNA und DNA-Analysen

Wattestäbchen mit kleinem Kopf

Karl Beese Verbandstoffe GmbH & Co.,

Barsbüttel

Reaktionsgefäße, Multiply® - µStripPro 0,1 ml PCR 8er - Kette

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

RNAse ZAP® Wipes

Ambion® GmbH, Hamburg

384er PCR - Platte (Vollrand)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

PCR-Klebefolien (optisch klar)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Proteinanalytik

Proteinbestimmung

96-well Microplate (Polystyrene, flat bottom)

Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen

HandyStep® Pipettus

BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim

Plastibrand® PD Tips (5ml)

BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim

Western Blot

Zellschaber (16cm)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Insulinspritze Omnifix® - F (1ml)

Braun Melsungen AG, Melsungen

Sterican® Nadel (Gr. 20)

Braun Melsungen AG, Melsungen

Mini-PROTEAN® Tetra Cell for Mini Precast Gels inkl. Accessoires

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Microliter™ Syringe (50µl)

Hamilton Bonaduz AG, GR, Schweiz

Nitrocellulose-Membran (0,45 µm Pore, 300mm v. Whatman™)

GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Whatman Chromatography Paper (3mm v. Whatman™)

GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Sterile Skalpellklinge BAYHA®

Bayha GmbH, Tuttlingen

Filter Paper Circles (d90mm)

Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

AGXT2 Assay und Fraktionierung/Lysierung

384-well Assay Plate (with lid, clear, flat bottom, polystyrene)

Corning Optical Communications

GmbH & Co. KG, Berlin

Objektträger Assistent® Elka mit Mattrand

Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co
KG,

Sondheim

Deckgläschen, normal

Paul Mariefeld GmbH & Co. KG,

Lauda-Königshofen

SMTC Assay

OptiPlate, 384-Well Microplate

Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH,

Rodgau

(black opaque, flat bottom, polystyrene, untreated, height 10,4mm
tief)

Echo™ Qualified 384 - well COC ADE Source Microplate,
(Low Dead Volume, clear, flat bottom, diamond shaped)

Labcyte, Sunnyvale, CA

96-Well ELISA Plate (8 x F12 Strips, flat bottom, clear, polystyrene)

Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen

384-Well Microplate, Small Volume™

Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen

(HiBase, black, polystyrene, slit bottom $\leq 150\mu\text{m}$, non-binding)

Multidrop Dispensing Cassette (silicone tubes, d0,4mm)

Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte

7.2.4 Elektrogeräte

Universtitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System

Abzug Vintair 9000

Alarm Liquid Nitrogen Tank

Analysenwaage CP225

Autoklav Evo 120®

ChemiGenius² Bioimaging System

Eismaschine Scotsman® AF103

Große Tischzentrifuge Rotina 35R

HeraCell™ CO₂-Inkubator

Hood HERASafe

Kleine Tischzentrifugen MC6 centrifuge

Konfokales Mikroskop TCS SP5

Lichtmikroskop Axiovert 25C

Magnetrührer MR Hei-Tec & MR 3000

Applied Biosystems Inc, Foster

Vinitex Laboratorium Einrichtungen B.V., Coswig

Taylor-Wharton, Husum

Satorius AG, Göttingen

Meditech Service GmbH, Hamburg

Syngene, Cambridge, UK

Millipore GmbH, Schwalbach

Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold

Heraeus Holding GmbH, Hanau

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Leika Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

Carl Zeiss Microscopy, Jena

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

MiniVac E1

PCR Cycler Vapo protect & Mastercycler ep gradient

pH-Meter FiveEasy™ FE20

Photometer Tecan Safire II - Basic

Pipettierhelfer, accu-jet®pro

Polytron Power Control Unit Drehzahlregler inkl. Aggregate

PowerPac™ Basic Power Supply

Rollenmischer RM5-V

Schwenkgerät Heidolph Duomax 1030

Spektrophotometer, NanoDrop™ ND-1000

Thermomixer Compact

Vortexer Heidolph REAX Top

Waage BP3100S

Wasseraufbereitungssystem Mili-Q Plus

Wasserbad GFL®

Wide Mini-SUB® Cell GF

Axon Lab AG, Baden

Eppendorf AG, Hamburg

Mettler Toledo AG, Schwerzenbach

Tecan, Grodig, Austria

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

KINEMATICA GmbH, Eschbach

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Labortechnik Frödel GmbH, Lindau

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA

Eppendorf AG, Hamburg

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Satorius AG, Göttingen

Millipore GmbH, Schwalbach

GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

European Screening Port

Gesamte HTS-Anlage

Automated High Content Screening System Cell::explorer™

Perkin Elmer LAX Germany GmbH

bestehend aus

Agilent VSpin™ Spin Down Station

Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Frankfurt (Main)

Echo® 550 Touchless Liquid Transfer Handler

Labcyte, Sunnyvale, CA

Großer Inkubations-/Lagerschrank I189 (Cytomat 6001)

Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert

Inkubationsschrank I1R (STX 1000, Typ DC2SA)

LiCONiC AG, Montabaur

Inkubationsschrank I30 (LW)

Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau

Multidrop Combi (LW) Dispenser

Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert

Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau

Agilent Technologies Sales & Service GmbH & Co KG,
Böblingen

Photometer EnVision (PE) Multifunction Plate Reader

Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau

(Mirror LANCE/DELFI A, Filter X340 (Excitation 340nm)

und M460 (Emission 460nm))

Plate::Handler II (LW)™ VP-62420 & VP - 6242E/GM

Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau

Rotiergerät Turn::Table (RW)

Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau

Transportband Conveyer Belt

Zentrifuge Megafuge 16R

Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau

Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert

7.2.5 Software

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

ND-1000 V3.8.1	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
SDS 2.4.	Applied Biosystems, Foster City, USA
Magellan 5.03	Tecan, Grodig, Austria
GeneSnap 7.12	SynGene, Cambridge, UK
Quantity One® 1-D Analysis (free Basic version)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Microsoft 2010	Microsoft GmbH, Hamburg
Leica LAS	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

European Screening Port

Plate::Works	Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau
Intelligent Automation Control and Scheduling Software	
TIBCO™ Spottfire® 6.0	TIBCO Spottfire European, Göteborg, Schweden
Activity Base Suite	IDBS, London, UK
Wallac EnVision Manager 1.12	Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau

7.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1** Derivate der Aminosäure L-Arginin. Asymmetrisches- (ADMA) und symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) werden am Guanidino-Rest durch Protein-Methyltransferasen (PRMT) zweifach methyliert (Pfeile). 3
- Abbildung 1.2** Manhattan-Plot der durchgeführten Genom-weiten Assoziationsstudie (GWAS) mit der Framingham Heart Study. Die gemessenen Single-nucleotide polymorphisms (SNP) – lokalisiert auf den unterschiedlichen Chromosomen – sind gegen den negativ dekadischen Logarithmus des p-Wertes ($-\log p$) aufgetragen. Es konnten genom-weit signifikante Assoziationen zwischen SDMA-Konzentrationen und mehreren SNP's, die auf dem Gen der AGXT2 (Chromosom 5) lokalisiert sind, gefunden werden. 8
- Abbildung 1.3** 3D-Strukturanalyse der AGXT2 mit dem Co-Faktor Pyridoxalphosphat (PLP). a) Ansicht des AGXT2-Wildtyps. Dargestellt ist die mögliche Position von SDMA als potenzielles Substrat in der Bindungstasche. Die ebenfalls im aktiven Zentrum vorliegende Aminosäure Valin140 tritt in Wechselwirkung mit dem Glutamin83-Rest, der für die Konformationsänderung des Enzyms essentiell ist. b) Der SNP rs37369 führt im Protein zu einem Austausch von Valin140 gegen Isoleucin140. Durch den größeren Aminosäure-Rest des Isoleucins kann das Substrat nicht in die für die katalytische Umsetzung notwendige Position gebracht werden (sterische Hinderung). Des Weiteren wird ein negativer Einfluss auf die Funktion von Glutamin83 vermutet (Pfeile)..... 12
- Abbildung 1.4** Schematische Darstellung des Verlaufs der Wirkstoff-Entwicklung (Drug Discovery Process/Development). Einordnung der Enzyme AGXT2 (Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2) und DDAH1 (Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1) als potenzielle therapeutische Targets. Die Begriffe werden in **Tabelle 1.3** näher erläutert. 27
- Abbildung 2.1** Durchführung des AGXT2-Aktivitätsassays: Die für die Reaktion verwendeten Lösungen wurden in einem Eppendorf-Gefäß zusammengefügt und bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitze-Inaktivierung des Enzyms. Zu 10µl des Reaktionsansatzes wurden 80µl des Detektionsreagenzes (dieser enthielt das Hilfsenzym Laktat-Dehydrogenase und NADH) hinzugefügt. Bestimmung der Aktivität durch Messung der Absorption des in der Indikatorreaktion umgesetzten NADH..... 46

- Abbildung 2.2** SDS-PAGE der Fraktionen bei der Herstellung des rekombinanten humanen DDAH1-Proteins. Die ungereinigte Protein-Lösung wurde zur Bewertung der Reinheit verwendet (Reihe 1). M=Marker. Reihen 2 bis 6 stellen Fraktionen der aufgereinigten Enzym-Lösungen dar. Die Bande der rhDDAH1 war bei ~48 kDa zu finden. Der Blot wurde von der Lebensmittelchemie der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt und stellt kein Ergebnis dieser Arbeit dar. 55
- Abbildung 2.3** Reaktionsschema des DDAH1-Aktivitätsassays, der für die Durchführung des High-Throughput-Screenings verwendet wurde. Schritt 1: S-Methylthio-L-citrullin wird zu L-Citrullin abgebaut. Als Nebenprodukt entsteht Methanthiol. Schritt 2: Methanthiol reagiert mit der Maleimidyl-Gruppe des Fluoreszenzmarkers CPM (7-Dimethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin)..... 56
- Abbildung 2.4** Das High-Throughput Screening (HTS) wurde mit der vollautomatischen HTS-Anlage des European Screening Ports (Hamburg) durchgeführt. Dargestellt sind die für das durchgeführte Screening relevanten Arbeitsbereiche der Anlage. Abb. vom European Screening Port, modifiziert..... 61
- Abbildung 2.5** Teil I – Zur besseren Veranschaulichung sind die verwendeten Geräte und Arbeitsbereiche der HTS-Anlage dargestellt..... 62
- Abbildung 2.6** Teil II – Zur besseren Veranschaulichung sind die verwendeten Geräte und Arbeitsbereiche der HTS-Anlage dargestellt..... 63
- Abbildung 2.7** Die im Screening getesteten Compounds wurden von den Lager-Platten auf die HTS-Platten mittels Ultraschall beladen: Schematische Darstellung des Transfers mit Hilfe des Echo® 550 Touchless Liquid Transfer Handler (Abb. von Fa. Labcyte). 64
- Abbildung 2.8** Die von der HTS-Anlage durchzuführenden Aktionen wurden durch ein vorprogrammiertes Protokoll definiert. 68
- Abbildung 3.1** Organ-spezifische mRNA-Expression von AGXT2 im Menschen. GAPDH wurde als interne Kontrolle verwendet. Gelelektrophorese mit standardisierter cDNA. Organ-spezifische Lokalisation der AGXT2 72
- Abbildung 3.2** Lokalisation der humanen AGXT2 in der Niere. Lichtmikroskopische Kryoschnitte mit einer Vergrößerung von 50 µm und 100 µm. Links: Kontrolle ohne AGXT2-Primärantikörper. Rechts: Positivkontrolle mit AGXT2-Primärantikörper. Die AGXT2 ist in den proximalen Tubuluszellen lokalisiert (Pfeile, intensiv rote Färbung)... 74
- Abbildung 3.3** Subzelluläre Lokalisation der AGXT2 in transfizierten HEK-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung von pcDNA (Kontrollvektor; links), AGXT2-

- Wildtyp (Mitte) und AGXT2-Variante rs37369 (rechts). Zellkerne sind in blau, Mitochondrien in rot, AGXT2 in grün dargestellt. 10x Vergrößerung. 76
- Abbildung 3.4** Identifikation der humanen rekombinant hergestellten AGXT2 (rhAGXT2). Western Blot mit 30 µg Protein. GAPDH (37 kDa) wurde als interne Kontrolle verwendet. Die Bande bei 58 kDa wurde als rhAGXT2 identifiziert. 77
- Abbildung 3.5** mRNA-Expressionslevel von AGXT2 in transfizierten HEK-Zellen (Leervektor pcDNA, AGXT2 Wildtyp und AGXT2 rs37369). Real Time-PCR mit GAPDH als interne Kontrolle. n=3; 1way ANOVA ***p<0.0001. 78
- Abbildung 3.6** Western Blot von humaner AGXT2 in transfizierten HEK-Zellen (Leervektor pcDNA, AGXT2-Wildtyp, AGXT2 rs37369). Western Blot mit GAPDH als interne Kontrolle (je 30 µg). 79
- Abbildung 3.7** Quantifizierung des Western Blots der transfizierten HEK-Zellen (Leervektor pcDNA, AGXT2-Wildtyp, AGXT2 rs37369). Die AGXT2-Expression wurde mit GAPDH normiert. n=3; 1way ANOVA mit p=0.0002. 79
- Abbildung 3.8** Western Blot. AGXT2-Proteingehalt in der Mitochondrienfraktion, hergestellt aus den AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen (Kontrolle pcDNA, AGXT2-Wildtyp, AGXT2-Variante rs37369). Western Blot mit GAPDH als interne Ladungskontrolle und COX IV als Mitochondrienmarker (je 30 µg). 80
- Abbildung 3.9** Schematische Darstellung des AGXT2-Assays mit L-Alanin als Substrat. Die Reaktion von L-Alanin mit Glyoxylat als Amino-Akzeptor ist an eine Indikatorreaktion mit LDH und NADH gekoppelt. Absorptionsmessung des Umsatzes von NADH bei 340 nm. LDH = Laktat-Dehydrogenase. 81
- Abbildung 3.10** Vergleich unterschiedlicher Negativkontrollen für den AGXT2-Assay (Von links: ohne rhAGXT2, durch Hitze inaktivierte rhAGXT2, ohne L-Alanin, Positivkontrolle). Es wurden die Steigungen (1/min) aus der kinetischen Absorptionsmessung (aus unterer Abbildung) ermittelt. Die Negativkontrolle ohne L-Alanin wurde für weitere Assays eingesetzt. n=3; 1way ANOVA ***p=0.0004. 84
- Abbildung 3.11** AGXT2-Assay in 120 µl Reaktionsvolumen (0,7 µg/µl rhAGXT2, 2 mmol/L L-Alanin, 0,45 mmol/L Glyoxylat, 0,05 mmol/L PLP in PBS). Kinetische Messung der Absorption von NADH bei 340 nm über einen Zeitraum von 20 Minuten. n=3; Lineare Regression mit p=0.0279. 84
- Abbildung 3.12** Volumenreduktion des Reaktionsansatzes von 120 µl auf 30 µl des AGXT2-Assays (0,7 µg/µl rhAGXT2, 10 mmol/L L-Alanin, 2,5 mmol/L Glyoxylat, 0,35 mmol/L PLP in PBS im 30 µl-Format). Vergleich der Steigungen (1/min), die aus der kinetischen Absorptionsmessung von NADH ermittelt wurden. In der Negativkontrolle

- ist kein L-Alanin enthalten. $n(30\mu\text{l})=7$, $n(120\mu\text{l})=3$; t-Test mit $***p=0.0002$ (30 μl) und $*p=0.015$ (120 μl)..... 85
- Abbildung 3.13** Direkter Vergleich der Steigungen (1/min) des AGXT2-Assays mit 30 μl und 120 μl Reaktionsvolumen basiert auf der Negativkontrolle ohne L-Alanin (aus obiger Abbildung). $n(30\mu\text{l})=7$, $n(120\mu\text{l})=3$; t-Test mit $p=0.1899$ 86
- Abbildung 3.14** Ermittlung der Mindestkonzentration von Glyoxylat als Amino-Akzeptor durch Aufstellung einer Konzentrationsreihe mit dem AGXT2-Assay (0,37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ rhAGXT2, 0-10 mmol/L Glyoxylat, 10 mmol/L L-Alanin, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP in PBS). Die aus den kinetischen Messungen ermittelten Steigungen (1/min) wurden gegen die Konzentrationen (mol/L) aufgetragen (Nicht-lineare Regression). $n=3$; $R^2:0.9819$ 87
- Abbildung 3.15** Kinetische Absorptionsmessung des AGXT2-Aktivitätsassays mit der Mitochondrienfraktion, isoliert aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein, 10 mmol/L L-Alanin und Glyoxylat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP in HEPES-Puffer). Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die mit einem Kontrollplasmid (pcDNA) transfiziert wurden. Absorptionsabfall der Positivkontrolle (AGXT2 Wildtyp) im Vergleich zur Negativkontrolle (pcDNA). $n(\text{pcDNA})=3$, $n(\text{AGXT2 Wildtyp})=3$; Lineare Regression mit $p=0.0052$ 88
- Abbildung 3.16** Vergleich der ermittelten Steigungen (1/min) aus obiger Abbildung. $n(\text{pcDNA})=3$, $n(\text{AGXT2 Wildtyp})=3$; t-Test mit $***p=0.0009$ 89
- Abbildung 3.17** Messung einer Substrat-Sättigungskurve von L-Alanin und der Mitochondrienfraktion (isoliert aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen) mit dem fertigen Assayformat (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein, 0-200 mmol/L L-Alanin, 10 mmol/L Glyoxylat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die aus den kinetischen Messungen ermittelten Steigungen (1/min) wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen von L-Alanin (mol/L) aufgetragen und eine Nicht-lineare Regression durchgeführt. $n=4$; $R^2:0.9988$ 90
- Abbildung 3.18** Messung einer Substrat-Sättigungskurve von L-Alanin und Zell-Lysat – hergestellt aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen – mit dem fertigen Assayformat (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein, 0-200 mmol/L L-Alanin, 10 mmol/L Glyoxylat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die ermittelten Steigungen (1/min) wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen von L-Alanin aufgetragen und eine Nicht-lineare Regression durchgeführt. $n=5$; $R^2:0.9934$ 91
- Abbildung 3.19** Schematische Darstellung des AGXT2-Assays mit SDMA als Substrat. Die Reaktion von SDMA mit Glyoxylat oder Pyruvat als Amino-Akzeptor ist ebenfalls an die Indikatorreaktion mit LDH und NADH gekoppelt. Im Gegensatz zu L-Alanin wird

hier die verbleibende Menge des Amino-Akzeptors durch die kinetische Absorptionsmessung von NADH bei 340 nm detektiert. LDH = Laktat-Dehydrogenase, D´MGV = α -Keto- δ -(N´,N-dimethylguanidino)-valeriansäure..... 92

Abbildung 3.20 Kinetische Absorptionsmessung des AGXT2-Aktivitätsassays mit SDMA und aufgereinigter Nukleusfraktion, isoliert aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen (1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein, 20 mmol/L SDMA und 0,5 mmol/L Pyruvat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Absorptionsabfall der Positivkontrolle (AGXT2 Wildtyp) im Vergleich zur Negativkontrolle (pcDNA). n=6; Lineare regression mit ***p>0.0001..... 94

Abbildung 3.21 Vergleich der Positiv- und Negativkontrolle (AGXT2 Wildtyp und pcDNA) mit SDMA als Substrat. Ermittlungen der Steigungen (1/min) aus den kinetischen Messungen aus obiger Abbildung n=6; t-Test mit ***p<0.0001. 95

Abbildung 3.22 Vergleich der enzymatischen Umwandlung von SDMA und ADMA (1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Nukleusfraktion, 20 mmol/L SDMA bzw. ADMA, 0,5 mmol/L Glyoxylat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die aus kinetischen Messungen erstellten Steigungen (1/min) von den jeweiligen Positiv- und Negativkontrollen (AGXT2 Wildtyp und pcDNA) werden gegenübergestellt. n(pcDNA)=4, n(AGXT2 Wildtyp)=7; t-Test mit **p=0.0013 (SDMA) und **p=0.0048 (ADMA). 96

Abbildung 3.23 Direkter Vergleich der Steigungen (1/min) des AGXT2-Assays mit SDMA und ADMA als Substrate basiert auf der Negativkontrolle (pcDNA) (aus obiger Abbildung). n=4; t-Test mit p=0.725. 97

Abbildung 3.24 Quantifizierung Western Blot: eingesetzte Zell-Lysate (aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen) für den AGXT2-Aktivitätsassay mit SDMA als Substrat (Leervektor pcDNA, AGXT2 Wildtyp, AGXT2 rs37369; je 20 μg). Die AGXT2-Expression wurde mit GAPDH normiert. Die Protein-Lösung der Mutante hatte einen niedrigeren AGXT2-Anteil im Vergleich zum Wildtyp. Um einen gleichen AGXT2-Anteil im AGXT2-Assay einsetzen zu können, wurde ein Faktor berechnet, um die benötigte Proteinmenge zu erhalten. Dabei wurde ein Quotient zwischen Wildtyp und Mutante gebildet. n(pcDNA)=3, n(AGXT2 Wildtyp)=6, n(AGXT2 rs37369)=4; 1way ANOVA mit ***p<0.0001. 98

Abbildung 3.25 AGXT2-Aktivitätsassay der Mutante rs37369 mit SDMA als Substrat und den Zell-Lysaten von AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen (1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pcDNA/Wildtyp, 2,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Mutante, 20 mmol/L SDMA, 0,5 mmol/L Glyoxylat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die ermittelten Steigungen (1/min) aus den kinetischen Daten werden miteinander verglichen (pcDNA Kontrolle, AGXT2 Wildtyp, AGXT2 rs37369). n=4; 1way ANOVA mit ***p<0.0001. 99

- Abbildung 3.26** Darstellung der spezifischen Aktivität (Unit/mg Protein) der AGXT2 mit SDMA als Substrat, ermittelt aus den Steigungen (1/min) aus obiger Abbildung (AGXT2 Wildtyp und AGXT2 rs37369). Hierfür wurden Eichgeraden der Substrate gemessen und die von der AGXT2 umgesetzte SDMA-Konzentration berechnet. Die SDMA-Konzentration wurde auf die eingesetzte Inkubationszeit ($\mu\text{mol pro Minute} = \text{Unit}$) und die Proteinmenge basiert. $n=4$; t-Test mit $***p=0.0005$ 100
- Abbildung 3.27** Quantifizierung des Western Blots der eingesetzten Zell-Lysate (isoliert aus AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen) im AGXT2-Aktivitätsassay mit L-Alanin als Substrat (Leervektor pcDNA, AGXT2 Wildtyp, AGXT2 rs37369; je 20 μg). Die AGXT2-Expression wurde mit GAPDH normiert. Die Protein-Lösung des Wildtyps hatte einen etwas geringeren AGXT2-Anteil im Vergleich zur Mutante. Um einen gleichen AGXT2-Anteil im AGXT2-Assay einsetzen zu können, wurde ein Faktor berechnet. Dabei wurde ein Quotient zwischen Mutante und Wildtyp gebildet. $n(\text{pcDNA})=3$, $n(\text{AGXT2 Wildtyp})=4$, $n(\text{AGXT2 rs37369})=3$; 1way ANOVA mit $***p<0.0001$ 101
- Abbildung 3.28** AGXT2-Aktivitätsassay der Mutante rs37369 mit L-Alanin in Zell-Lysaten aus AGXT2-überexprimierender HEK-Zellen (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pcDNA/Mutante, 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Wildtyp, 60 mmol/L L-Alanin, 10 mmol/L Glyoxylat, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PLP, 50 mmol/L HEPES-Puffer). Die ermittelten Steigungen (1/min) aus den kinetischen Messungen werden miteinander verglichen (pcDNA Kontrolle, AGXT2 Wildtyp, AGXT2 rs37369 $n=4$; 1way ANOVA mit $***p<0.0001$ 102
- Abbildung 3.29** Darstellung der Spezifischen Aktivität (Unit/mg Protein) der AGXT2 mit L-Alanin als Substrat, ermittelt aus den Steigungen (1/min) aus obiger Abbildung (AGXT2 Wildtyp und AGXT2 rs37369). Hierfür wurden Eichgeraden der Substrate gemessen und die von der AGXT2 umgesetzte L-Alanin-Konzentration berechnet. Die Konzentration wurde auf die eingesetzte Inkubationszeit ($\mu\text{mol pro Minute} = \text{Unit}$) und die Proteinmenge basiert. $n=4$; t-Test mit $***p<0.0001$ 103
- Abbildung 3.30** Aktivitätsmessung rekombinanter humaner DDAH1. Ausschnitt (bis 150 nmol/L) der rhDDAH1-Titrationskurve (Charge #1). Die aus kinetischen Fluoreszenzmessungen ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die eingesetzten Konzentrationen von 0-1500 nmol/L rhDDAH1 aufgetragen (0,375 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Der Pfeil markiert die für die weiteren Analysen ausgewählte rhDDAH1-Konzentration von 25 nmol/L. Doppelbestimmung. $R^2: 0.9943$ und SD: 8,24RFU/min; CV: 8,59%..... 105
- Abbildung 3.31** Analysierung des Einflusses von DMSO auf die rhDDAH1-Aktivität (25

nmol/L rhDDAH1, 0,375 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Die Negativkontrolle stellt die Reaktion ohne DMSO dar (grau). Vergleich der jeweiligen Steigungen [RFU/min] – ermittelt aus den kinetischen Daten – als Balkendiagramm. Doppelbestimmung..... 106

Abbildung 3.32 Volumenreduktion des DDAH1-Aktivitätsassays von 90 μl (links) auf 10 μl (rechts) Gesamtvolumen (Vortest). Vergleich der aus den kinetischen Messungen ermittelten Steigungen [RFU/min] (25 nmol/L rhDDAH1, 0,375 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Der Ansatz ohne rhDDAH1 diene als Negativkontrolle. Doppelbestimmung. 108

Abbildung 3.33 Ermittlung der rhDDAH1-Konzentration für den Aktivitätsassay. Messung der Titrationskurve mit Konzentrationen von 0-1500 nmol/L (0,375 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer) mit der neu hergestellten DDAH1- Charge (#2), die für die Durchführung des HTS vorgesehen war. Die aus den kinetischen Daten ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die gemessenen Konzentrationen [nmo/L] aufgetragen. $n=4$; SD: 10,34RFU/min; CV: 4,08%..... 110

Abbildung 3.34 Linearer Bereich der durchgeführten rhDDAH1-Titration von 0-250 nmol/L aus obiger Abbildung. Der Pfeil kennzeichnet die für die weiteren Messungen ausgewählte Endkonzentration von 40 nmol/L. $R^2: 0.9904$ 111

Abbildung 3.35 Substrat-Sättigungskurve von SMTC von 0-20 $\mu\text{mol/L}$ (40 nmol/L rhDDAH1, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer) zur Bestimmung der Konzentration für den entgeltigen Aktivitätsassay. Die ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die Konzentrationen [mol/L] aufgetragen. Zur Ermittlung der SMTC-Konzentration wurde die Michaelis-Menten-Konstante K_m bestimmt. $n=5$, $R^2: 0.9891$, SD: 14,37RFU/min; CV: 3,3%. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin, V_{max} = maximale Geschwindigkeit..... 112

Abbildung 3.36 Kinetische Messung der Fluoreszenz (RFU) bis 250 min (1,5 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 40 nmol/L rhDDAH1, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Analysierung des Zeitfensters für die Aktivitätsbestimmung, zu der Linearität der Reaktion besteht. In der Negativkontrolle war kein Enzym vorhanden. $n=3$; SD/CV (Negativkontrolle): 4,3RFU/0,29%; SD/CV (Positivkontrolle): 2,18RFU/1,05%. 113

Abbildung 3.37 Linearer Bereich der kinetischen Messung von 0-80 min. aus obiger Abbildung. $R^2: 0.9806$ 113

Abbildung 3.38 Konzentrations-Wirkungskurve des DDAH-Inhibitors Ebselen bis zu

einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/L}$ (40 nmol/L rhDDAH1, 0,375 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Mit den aus den kinetischen Messungen ermittelten Steigungen [RFU/min] wurde die Hemmung [%] gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration [$\log \text{mol/L}$] gestellt. Hierbei wurden die maximalen Steigungen auf 100% Hemmung gesetzt, die niedrigen Steigungen auf 0%. Zur Ermittlung der Inhibitor-Konzentration für den DDAH1-Aktivitätsassay (als Positivkontrolle) wurde der IC_{50} -Wert ermittelt. $n=3$, R^2 : 0.9434. 115

Abbildung 3.39 Wiederholung der Substrat-Sättigungskurve mit SMTC-Konzentrationen bis zu 15 $\mu\text{mol/L}$ (3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 40 nmol/L rhDDAH1, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer) mit den frisch hergestellten Reagenzien nach Fertigstellung der Vorarbeiten mit dem DDAH1-Aktivitätsassay. Die aus den kinetischen Daten ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die Konzentrationen von SMTC [$\mu\text{mol/L}$] aufgetragen. $n=3$, R^2 : 0.9917, SD: 5,81RFU/min; CV: 5,39%. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin..... 116

Abbildung 3.40 Ermittlung der Notwendigkeit einer Kalibrierkurve für das High-Throughput Screening. Von der kinetischen Messung (die zur Ermittlung der Substrat-Sättigungskurve in der obigen Abbildung verwendet wurde) sind die Fluoreszenzwerte [RFU] nach einer Reaktionszeit von 120 min gegen die SMTC-Konzentrationen [$\mu\text{mol/L}$] aufgetragen. Der Pfeil zeigt die SMTC-Konzentration an (4 $\mu\text{mol/L}$), die im DDAH1-Aktivitätsassay verwendet wurde. Dieser Punkt liegt im linearen Bereich, so dass auf eine Kalibrierkurve verzichtet werden kann. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin. R^2 : 0.9807, SD: 3,73RFU; CV: 3,16%..... 117

Abbildung 3.41 Wiederholte Messung der SMTC-Substrat-Sättigungskurve mit den frisch hergestellten Puffer-Lösungen im Labor des European Screening Ports zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit (3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 40 nmol/L rhDDAH1, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Die aus den kinetischen Daten ermittelten Steigungen [RFU/min] sind gegen die gemessenen SMTC-Konzentrationen [$\mu\text{mol/L}$] aufgetragen. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin. $n=5$, R^2 : 0.9872, SD: 6,08RFU/min; CV: 3,99%..... 118

Abbildung 3.42 Kinetische Messung der Fluoreszenz [RFU] des DDAH1-Aktivitätsassays. Darstellung zweier Ansätze der durchgeführten Substrat-Sättigungskurve aus obiger Abbildung. Der Ansatz ohne SMTC wurde als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle diente die Konzentration von 0,38 $\mu\text{mol/L}$ SMTC (Nähe des K_m -wertes). Die Werte zum Zeitpunkt $t=60$ min wurden für die

DDAH1-Aktivitätsbestimmung als Endpunktmethode verwendet (siehe nächste Abbildung). n=5, SD/CV (Negativkontrolle): 4,06RFU/0,73%; SD/CV (Positivkontrolle): 1,28RFU/0,27%. 120

Abbildung 3.43 Vergleich der Steigungen [RFU/min] (links) aus den kinetischen Messungen versus der maximalen Fluoreszenzwerte [RFU] nach 60 Minuten Reaktionszeit (rechts) aus der Endpunktsbestimmung (die Steigung bzw. max. Fluoreszenz wurden aus den Daten der obigen Abbildung genommen). Darstellung als Balkendiagramm. S/H (Steigungen): 2,61; S/H (max. RFU:) 1,23; beide ***p<0.0001.. 121

Abbildung 3.44 Aufstellung einer rhDDAH1-Titrationskurve im Labor des European Screening Ports zur Ermittlung der DDAH1-Konzentration für eine Endpunktsbestimmung. Maximale Fluoreszenzwerte [RFU] nach 60 Minuten Reaktionszeit sind gegen die rhDDAH1-Konzentrationen von 0-800 nmol/L (3,55 µmol/L CPM, 4,5 µmol/L SMTc, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L KH₂PO₄/KCl-Puffer) aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet die bisher für die kinetische Messung verwendete Konzentration von 40nmol/L. n=3; SD: 18,08RFU; CV: 8,82%... 122

Abbildung 3.45 Linearer Bereich der rhDDAH1-Titrationskurve von 99 nmol/L bis 330 nmol/L aus obiger Abbildung. Der Pfeil kennzeichnet die für die Endpunktbestimmung ausgewählte DDAH1-Konzentration mit 200 nmol/L, die für das High-Throughput Screening verwendet werden soll. R²: 0.9606..... 123

Abbildung 3.46 Vergleich der alten und neuen rhDDAH1-Konzentration (40 nmol/L vs. 200 nmol/L; die Werte stammen aus der Messung der obigen Abbildung) bei der Endpunktbestimmung als Balkendiagramm. Die Negativkontrolle enthielt kein Enzym. n=16; Ratio (40 nmol/L): 1,2; Ratio (200 nmol/L): 1,8; 1way ANOVA mit ***p<0.0001. 124

Abbildung 3.47 Aufstellung der Konzentrations-Wirkungskurve mit dem DDAH-Inhibitor Ebselen im Labor des European Screening Ports in 90 µl Endvolumen (0-10 µmol/L Ebselen, 200 nmol/L rhDDAH1, 4,5 µmol/L SMTc, 3,55 µmol/L CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L KH₂PO₄/KCl-Puffer). Mit den ermittelten Fluoreszenzwerten [RFU] wurde die Hemmung [%] berechnet. Hierbei wurden die maximalen Werte auf 0% Hemmung gesetzt, die niedrigen Werte auf 100%. Diese sind gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration [log mol/L] aufgetragen. Zur Ermittlung der Inhibitor-Konzentration für den DDAH1-Aktivitätsassay (als Positivkontrolle) wurde der IC₅₀-Wert ermittelt. n=3; R²: 0.9558; SD: 5,78RFU; CV: 2,99%.. 125

Abbildung 3.48 Vergleich der maximalen Fluoreszenzwerte [RFU] zwischen der

Negativkontrolle (normale Reaktion ohne Compound) und der Positivkontrolle mit 2,8 $\mu\text{mol/L}$ Ebselen. Die Fluoreszenzwerte wurden aus den Daten der obigen Abbildung verwendet. Die Ebselen-Konzentration von 2,8 $\mu\text{mol/L}$ liegt der im späteren Screening verwendeten Konzentration von 4 $\mu\text{mol/L}$ am nächsten. S/H: 2,26. Z prime: 0,78. n=3; t-Test mit *** $p < 0.0001$ 126

Abbildung 3.49 Zur Messung der Reproduzierbarkeit des DDAH1-Aktivitätsassays nach Reduktion von 90 μl auf ein 10 μl -Format wurde die gleiche Konzentrations-Wirkungskurve von Ebselen wie in **Abbildung 3.47** wiederholt (0-10 $\mu\text{mol/L}$ Ebselen, 200 nmol/L rhDDAH1, 4,5 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Doppelbestimmung; R^2 : 0.9682; SD: 3,07RFU; CV: 2,25%..... 127

Abbildung 3.50 Ausgebautes Dispensiergerät der HTS-Anlage – bestehend aus 8 Schläuchen. Diese mussten mit der Enzym-Lösung vorinkubiert werden, um den beobachteten „Ausschleich“-Effekt (siehe **Abbildung 3.51**) zu vermeiden. 129

Abbildung 3.51 Lösen technischer Probleme durch Messung der Marker Library (dargestellt sind die nach 60 Minuten gemessenen Fluoreszenzwerte einer 384-Wellplatte). Der „Ausschleich“-Effekt der Enzym-Lösung, sowie die veränderte Position der Platte in der Halterung des Photometers konnte korrigiert werden (erkennbar an den erhöhten (rot markiert) oder erniedrigten (grün) Fluoreszenzwerten). Spalte 24 stellte die Ebselen-enhaltende Positivkontrolle (4,0 $\mu\text{mol/L}$) dar. Die Endkonzentrationen der verwendeten Substrate & Puffer des Aktivitätsassays enthielten: 200 nmol/L rhDDAH1, 4,5 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer..... 130

Abbildung 3.52 Ansicht einer gemessenen Platte nach 60 Minuten Inkubation nach Beseitigung der technischen Probleme. Die Reihen 1-22 enthielten die Compounds der Marker Library. Spalte 23 enthielt zusätzlich Ebselen als Positivkontrolle, die Negativkontrolle in Spalte 24 enthielt keinen Zusatz..... 130

Abbildung 3.53 Ansicht einer gescreenten 384-Wellplatte zum Zeitpunkt $t=60$ min (jeder Punkt stellt den Effekt einer Compound dar; Negativkontrolle mit 0% Aktivierung). Die Aktivierung [%] wurde aus den gemessenen Fluoreszenzwerten [RFU] des DDAH1-Aktivitätsassays berechnet. Compounds, deren Effekt $\pm 20\%$ beträgt, werden vorerst als falsch-positive Treffer bewertet..... 134

Abbildung 3.54 Ergebnis des gesamten Primary Screens als 3D-Modell. Alle 52.096 Compounds sind gegen die Aktivierung bzw. Inhibition [%] aufgetragen. Der Großteil der Compounds zeigt keinen Effekt (Anreicherung um die eingezeichnete Achse).....

- 135
- Abbildung 3.55** Auszug des Ergebnisses des Primary Screens in einer anderen Darstellung. Jeder Punkt stellt den Effekt einer gemessenen Compound dar. Die Effekte zum Zeitpunkt $t=0$ min (Negativkontrolle ist auf 0% gesetzt) sind gegen die Aktivierung zum Zeitpunkt $t=60$ min (Negativkontrolle ist auf 100% gesetzt) aufgetragen. Die Effekte [%] wurden aus den ermittelten Fluoreszwerten des DDAH1-Aktivitätsassays berechnet. Rot markierte Punkte stellen autofluoreszierende Compounds dar (definiert durch den aufgestellten Schwellenwert von 20%). Die markierte Hit Region enthält potenzielle „echte“ Aktivatoren (Effekt $t=0$ min \leq 20%).
- 136
- Abbildung 3.56** „Cherry-Picking“ der potenziellen Aktivatoren, die in der folgenden Hit Confirmation wiederholt gemessen werden sollten. Trotz Festlegung auf \pm 20% wurden Compounds selektiert, die einen autofluoreszierenden Effekt ($n=74$) zeigten...
- 137
- Abbildung 3.57** Auszug des Ergebnisses des Primary Screens zur Ansicht der potenziellen „echten“ Inhibitoren (Hit Region). Jeder Punkt stellt den Effekt einer gemessenen Compound dar. Die Effekte zum Zeitpunkt $t=0$ min (Negativkontrolle ist auf 0% gesetzt) sind gegen die Inhibition zum Zeitpunkt $t=60$ min (Negativkontrolle ist auf 0% gesetzt) aufgetragen. Die Effekte [%] wurden aus den ermittelten Fluoreszwerten [RFU] des DDAH1-Aktivitätsassays berechnet. Compounds mit Quenching-Effekt sind grün markiert (definiert durch den aufgestellten Schwellenwert von 20%). Die markierte Hit Region enthält potenzielle „echte“ Inhibitoren (Effekt $t=0$ min \leq 20%)...... 139
- Abbildung 3.58** „Cherry-Picking“ der potenziellen Inhibitoren, die in der folgenden Hit Confirmation wiederholt gemessen werden sollten. 140
- Abbildung 3.59** Ergebnis der Hit Confirmation. Die Effekte zum Zeitpunkt $t=0$ min [%] sind gegen die Inhibition [%] nach 60 Minuten dargestellt. Die zur X-Achse horizontal angeordneten Punkte stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit „echte“ Modulatoren dar. Compounds mit Effekten zu $t=0$ min sind diagonal angeordnet und sind vermutlich falsch-positive Hits („scheinbare“ Modulatoren). Rot/grün markierte Compounds wurden für das nachfolgende Hit Profiling ausgewählt..... 141
- Abbildung 3.60** Bestimmung der Korrelation zwischen Primary Screen und Hit Confirmation bezogen auf die Inhibition [%]. Die im Primary Screen nicht gemessenen Compounds sind auf eine Inhibition von 0% gesetzt (horizontal angeordnete Punkte. Es ergab sich ein R^2 von 0.59 mit $n=315$ 143

- Abbildung 3.61** Bestimmung der Genauigkeit der Dreifachbestimmung der Hit Confirmation. $n=532$; $R^2: 0.96 - 0.98$ 144
- Abbildung 3.62** Ansicht einer gemessenen Platte vom Hit Profiling. Es wurden Konzentrationsreihen von 1-50 $\mu\text{mol/L}$ der Compounds gemessen (Konzentration nimmt von Well 1-11 bzw. 12-24 ab). Konzentrationen, die einen Effekt von $\pm 60\%$ bei $t=0$ min bewirkten (rot einkreist) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Negativkontrolle (Spalte 24) wurde auf 0% Inhibition gesetzt. 145
- Abbildung 3.63** Beispiele für Konzentrations-Wirkungskurven von „echten (A), partialen (B), und falsch-positiven (C)“ Aktivatoren. Die 147
- Abbildung 3.64** Teil I der Ergebnisse des Hit Profiling. Es wurden 8 potenzielle schwache Aktivatoren ausgewählt, die teilweise einen autofluoreszierenden Effekt zeigten. Dargestellt sind Teilausschnitte der Konzentrations-Wirkungskurven (obere Kurve = Aktivierung [%] nach 60 Minuten; untere Kurve = Effekt [%] zum Zeitpunkt $t=0$ min). 149
- Abbildung 3.65** Beispiel einer Konzentrations-Wirkungskurve von „echten“ Inhibitoren. Wie bei den Aktivatoren sind die Effekte als Inhibition zum Zeitpunkt $t=0$ min (untere Kurve) und $t=60$ min (obere Kurve) wiedergegeben. An der unteren Kurve würde ein Quenching-Effekt widerspiegelt werden. 151
- Abbildung 3.66** Teil II der Ergebnisse des Hit Profiling. Insgesamt konnten 18 potenzielle Inhibitoren gefunden werden. Keine der dargestellten Compounds zeigte einen Effekt zu $t=0$ min. Dargestellt sind Teilausschnitte der Konzentrations-Wirkungskurven (grüne Kurve = Inhibition [%] nach 60 Minuten, untere Kurve = Effekt [%] zum Zeitpunkt $t=0$ min)..... 154
- Abbildung 3.67** Vergleich der gemessenen Konzentrations-Wirkungskurven (Teilausschnitt) eines potenziellen Aktivators zwischen dem Hit Profiling (links) und Follow-Up (rechts). Die obere Kurve stellt die Aktivierung [%] nach 60 Minuten dar, die untere Kurve den Effekt [%] zum Zeitpunkt $t=0$ min. Die gemessene Aktivierung [%] im Hit Profiling konnte im Follow-Up (Messung mit frisch gelösten Compounds) nicht reproduziert werden. 157
- Abbildung 4.1** Schematische Darstellung: Hypothese über die Funktion der AGXT2, den Dimethylargininen SDMA/ADMA bzw. deren Abbauprodukt D'GMV (als 2-Oxoglutarat-Analoga) in den Mitochondrien des proximalen Tubulus der Niere. PHD = Prolylhydrolase, HIF = Hypoxia-inducible factor, D'GMV = α -Keto- δ -(N',N'-dimethylguanidino)-valeriansäure, AGXT2 = Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase 2, ADMA/SDMA = Asymmetrisches/Symmetrisches Dimethylarginin..... 171

Abbildung 4.2 Selektion der gescreenten Compounds im Verlauf des Primary Screens und der Hit Validierung von 52.096 auf 18 potentielle Inhibitoren. Diese werden mit dem anschließenden Secondary Assay getestet.....	179
Abbildung 4.3 Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus des Thiodiazols SCH202676 und deren Derivaten mit Cystein-Resten (Abbildung aus der Publikation von Göbylös et al. 2005).	181
Abbildung 4.4 Vergleich des identifizierten DDAH-Inhibitors (linke Spalte) mit den in der Literatur beschriebenen Thiodiazol-Derivaten.....	182
Abbildung 4.5 A) Tautomerie des Thyreostatikums Methimazol in die wirksame Thiolform. B) Dimethylierte Analoga ohne hemmenden Effekt auf die Thyreo-Peroxidase/Laktat-Peroxidase (Abbildung aus der Publikation von Roy et al. 2008).185	
Abbildung 4.6 Schematische Darstellung des Verlaufs der Wirkstoffentwicklung (Drug Discovery Process/Development). Einordnung der Enzyme AGXT2 und DDAH1 als potenzielle therapeutische Targets <u>nach</u> Durchführung der beschriebenen Arbeiten. Die Begriffe werden in Tabelle 1.3 näher erläutert.	192

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Der mit der höchsten Signifikanz ($p=1.95 \times 10^{-14}$) gefundene SNP (rs37369) ist auf Chromosom 5p13 lokalisiert und stellt eine „missense“-Punktmutation dar. Der SNP liegt im codierenden Bereich, bei der die Base Cytosin gegen Thymidin (MAF von 0,077) ausgetauscht ist. SNP = Single-nucleotide polymorphism.	10
Tabelle 1.2	Vergleich der gemessenen SDMA-Plasmakonzentrationen (als Mittelwert, Median und „Interquartile range IQR“, jeweils in $\mu\text{mol/L}$) unter Einfluss des AGXT2-Wildtyps bzw. der AGXT2-Varianten rs37369 (heterozygote und homozygote Träger) der Framingham-Kohorte der durchgeführten Genom-weiten Assoziationsstudie.....	10
Tabelle 1.3	Erläuterung allgemeiner Begriffe der Wirkstoff-Entwicklung.....	25
Tabelle 2.1	Zur Bestimmung der Expressionsstärke der AGXT2 in den AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen wurde eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Für die PCR wurde das dargestellte Temperatur- und Zeitschema verwendet.	36
Tabelle 2.2	Western Blot: Die für den Transfer verwendeten Schwämme und Membranen wurden in dargestellter Reihenfolge übereinander gelegt.....	41
Tabelle 2.3	Die bei den Western Blots verwendeten Primärantikörper. GAPDH diente dabei als interne Ladungskontrolle, COX IV als Mitochondrien-Marker.....	42
Tabelle 2.4	Dargestellt sind die verwendeten Konzentrationen der Protein- und Substratlösungen während der Etablierung des AGXT2-Assays sowie der Analysierung der AGXT2-Variante und SDMA als Substrat.	48
Tabelle 2.5	Entgültige Assay-Bedingungen des AGXT2-Aktivitätsassays. In der Tabelle sind die Konzentrationen der verwendeten Lösungen am Ende der Assay-Etablierung dargestellt.	49
Tabelle 2.6	Die bei der Assay-Etablierung verwendeten Konzentrationen der Detektionsreagenzien LDH (Laktat-Dehydrogenase) und NADH in Abhängigkeit des Assay-Formats (Gesamtvolumen) und der verwendeten Substrate.	51
Tabelle 2.7	Formel der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Bestimmung der n-fachen Expression von AGXT2 in den AGXT2-überexprimierenden HEK-Zellen mittels Real-Time PCR.	53
Tabelle 2.8	Kalibrierung der Dispensier-Schläuche der HTS-Anlage: jeweils $5 \times 10 \mu\text{l}$ pro Well pro herausnehmbarem Stripe (bestehend aus 12 Wells) einer 96-Well ELISA-Platte wurden befüllt. Die einzelnen Stripes wurden anschließend mit einer Präzisionswaage gewogen und die ausgeworfenen Volumina miteinander	

verglichen. Die Abweichung der Volumina durfte nicht $>0,1 \mu\text{l}$ betragen. 66

Tabelle 2.9 Zusammenfassung der Anzahl der gemessenen Platten und den dafür benötigten ungefähren Verbrauch der jeweiligen Reaktionslösungen und der Menge an rhDDAH1. 69

Tabelle 2.10 Die im rhDDAH1-Teil verwendeten Formeln (über Microsoft Excel 2010 oder die Software GraphPad Prism 5.02 berechnet). S = Substrat, K_m = Michaelis-Menten-Konstante, IC_{50} = inhibitorische Konstante, MW = Mittelwert, $K_{pos/neg}$ = Positiv-/Negativkontrolle, SD = Standard deviation. 71

Tabelle 3.1 Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen den Substraten und rhDDAH1. Wiedergabe der ermittelten Steigungen [RFU/min] aus den kinetischen Messungen des DDAH1-Aktivitätsassays. Neben der Positivkontrolle und Negativkontrolle (ohne DDAH1) wurden zwei Interaktionsansätze (ohne DDAH oder SMTC) gemessen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Reaktionen in den Interaktionsansätzen durch Zugabe der fehlenden Komponente gestartet (25 nmol/L rhDDAH1, 0,375 $\mu\text{mol/L}$ SMTC, 3,55 $\mu\text{mol/L}$ CPM, 2 mmol/L EDTA, 0,02% Tween-20, 175 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ -Puffer). Es findet keine Wechselwirkung zwischen den Reaktionspartnern (CPM+DDAH1 bzw. CPM+SMTC) mit Einfluss auf die Fluoreszenz statt. SMTC = S-Methylthio-L-citrullin, CPM = 7-Diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methylcoumarin. 107

Tabelle 3.2 Darstellung der statistischen Analysen 50 willkürlich ausgewählter Platten des Primary Screens. Zur Bewertung der Qualität wurde der Z Prime berechnet, dessen Schwellenwert auf 0,5 gesetzt wurde. Des Weiteren wurden die Standardabweichungen und die Varianzen (CV) der Negativ- und Positivkontrollen ermittelt. 132

Tabelle 3.3 Darstellung der mit Hilfe der Konzentrations-Wirkungskurven berechneten IC_{50} -Werte der jeweiligen ausgewählten potenziellen Aktivatoren. 150

Tabelle 3.4 Darstellung der mit Hilfe der Konzentrations-Wirkungskurven berechneten IC_{50} -Werte der jeweiligen ausgewählten potenziellen Inhibitoren. 155

7.5 Literaturverzeichnis

1. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, et al. 2001. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 88:1201–3
2. Abe T, Tohgi H, Murata T, Isobe C, Sato C. 2001. Reduction in asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 312:177–79
3. Achan V, Tran CT, Arrigoni F, Whitley GS, Leiper JM, Vallance P. 2002. All-trans-retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res.* 90:764–69
4. Adelstein RS, Eisenberg E. 1980. Regulation and kinetics of the actin-myosin-atp interaction. *Annu Rev Biochem.* 49:921–56
5. Altinova AE, Arslan M, Sepici-Dincel A, Akturk M, Altan N, Toruner FB. 2007. Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:1881–85
6. Anderssohn M, Maass LM, Diemert A, Lüneburg N, Atzler D, et al. 2012. Severely decreased activity of placental dimethylarginine dimethylaminohydrolase in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 161:152–56
7. Arlt S, Schulze F, Eichenlaub M, Maas R, Lehmbeck JT, et al. 2008. Asymmetrical dimethylarginine is increased in plasma and decreased in cerebrospinal fluid of patients with alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 26:58–64
8. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U A.* 74:3203–7

9. Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S. 1986. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol.* 88:411–15
10. Bagnasco S, Good D, Balaban R, Burg M. 1985. Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *Am J Physiol.* 248:F522–6
11. Baker PR, Cramer SD, Kennedy M, Assimios DG, Holmes RP. 2004. Glycolate and glyoxylate metabolism in hepg2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287:C1359–65
12. Bath PM, Hassall DG, Gladwin AM, Palmer RM, Martin JF. 1991. Nitric oxide and prostacyclin. divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arter. Thromb.* 11:254–60
13. Begley CG, Ellis LM. 2012. Drug development: raise standards for preclinical cancer research. *Nature.* 483(7391):531–33
14. Biondo-Simões M de LP, Castro GRA, Montibeller GR, Sadowski JA, Biondo-Simões R. 2007. The influence of hypothyroidism on liver regeneration: an experimental study in rats. *Acta Cir. Bras. Soc. Bras. Para Desenvolv. Pesqui. Em Cir.* 22 Suppl 1:52–56
15. Birdsey GM, Leiper JM, Vallance P. 2000. Intracellular localization of dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpressed in an endothelial cell line. *Acta Physiol. Scand.* 168(1):73–79
16. Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, et al. 2006. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol.* 17:1128–34
17. Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A, Kienke S, Brandes R, et al. 1995. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with l-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores no production. *Atherosclerosis.* 117:273–84
18. Böger RH, Bode-Böger SM, Phivthong-ngam L, Brandes RP, Schwedhelm E, et al.

1998. Dietary l-arginine and alpha-tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. *Atherosclerosis*. 141:31–43
19. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, et al. 1998. Asymmetric dimethylarginine (adma): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 98:1842–47
20. Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. 2005. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (adma) as a marker of cardiovascular disease and mortality. *Clin Chem Lab Med*. 43:1124–29
21. Böger RH, Ron ES. 2005. L-arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of adma, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev*. 10:14–23
22. Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, et al. 2000. Ldl cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of s-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*. 87:99–105
23. Bremner AP, Feddema P, Leedman PJ, Brown SJ, Beilby JP, et al. 2012. Age-related changes in thyroid function: a longitudinal study of a community-based cohort. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 97(5):1554–62
24. Brouns R, Marescau B, Possemiers I, Sheorajpanday R, De Deyn PP. 2009. Dimethylarginine levels in cerebrospinal fluid of hyperacute ischemic stroke patients are associated with stroke severity. *Neurochem Res*. 34:1642–49
25. Can A, Bekpınar S, Gurdol F, Tutuncu Y, Unlucerci Y, Dıncçag N. 2011. Dimethylarginines in patients with type 2 diabetes mellitus: relation with the glycaemic control. *Diabetes Res Clin Pr*. 94:e61–4
26. Caplin B, Wang Z, Slaviero A, Tomlinson J, Dowsett L, et al. 2012. Alanine-

- glyoxylate aminotransferase-2 metabolizes endogenous methylarginines, regulates NO, and controls blood pressure. *Arter. Thromb Vasc Biol.* 32:2892–2900
27. Cardounel AJ, Xia Y, Zweier JL. 2005. Endogenous methylarginines modulate superoxide as well as nitric oxide generation from neuronal nitric-oxide synthase: differences in the effects of monomethyl- and dimethylarginines in the presence and absence of tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* 280(9):7540–49
28. Cetinalp-Demircan P, Can A, Bekpınar S, Unlucerci Y, Orhan Y. 2007. Unchanged asymmetric dimethylarginine levels in non-diabetic, premenopausal obese women who have common risk factors for cardiovascular disease. *Endocrine.* 31:100–104
29. Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. 2008. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 321(5895):1493–95
30. Chen Y, Li Y, Zhang P, Traverse JH, Hou M, et al. 2005. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase and endothelial dysfunction in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:H2212–9
31. Closs EI, Albritton LM, Kim JW, Cunningham JM. 1993. Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *J Biol Chem.* 268:7538–44
32. Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Förstermann U. 1997. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hcat-2b. *Nitric Oxide.* 1:65–73
33. Cobanoglu AK, Gungor O, Kircelli F, Altunel E, Asci G, et al. 2013. Role of asymmetric dimethylarginine in the progression of carotid atherosclerosis in

- renal transplant patients. *Int. Urol. Nephrol.* 45(5):1463–69
34. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, et al. 2000. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 275:25733–41
 35. Cooper AJ, Krasnikov BF, Okuno E, Jeitner TM. 2003. L-alanine-glyoxylate aminotransferase ii of rat kidney and liver mitochondria possesses cysteine s-conjugate beta-lyase activity: a contributing factor to the nephrotoxicity/hepatotoxicity of halogenated alkenes? *Biochem J.* 376:169–78
 36. Cooper DS. 2005. Antithyroid drugs. *N. Engl. J. Med.* 352(9):905–17
 37. Dalgard CL, Lu H, Mohyeldin A, Verma A. 2004. Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors. *Biochem J.* 380:419–24
 38. Danpure CJ, Cooper PJ, Wise PJ, Jennings PR. 1989. An enzyme trafficking defect in two patients with primary hyperoxaluria type 1: peroxisomal alanine/glyoxylate aminotransferase rerouted to mitochondria. *J Cell Biol.* 108:1345–52
 39. Danpure CJ, Jennings PR. 1986. *Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I.* FEBS Lett
 40. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, et al. 2003. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation.* 108:3042–47
 41. Donini S, Ferrari M, Fedeli C, Faini M, Lamberto I, et al. 2009. Recombinant production of eight human cytosolic aminotransferases and assessment of their potential involvement in glyoxylate metabolism. *Biochem J.* 422:265–72
 42. Druhan LJ, Forbes SP, Pope AJ, Chen C-A, Zweier JL, Cardounel AJ. 2008. Regulation of enos-derived superoxide by endogenous methylarginines. *Biochemistry (Mosc.).* 47(27):7256–63

43. Fawzi AB, Macdonald D, Benbow LL, Smith-Torhan A, Zhang H, et al. 2001. SCH-202676: an allosteric modulator of both agonist and antagonist binding to G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 59(1):30–37
44. Feldkamp T, Kribben A, Roeser NF, Senter RA, Kemner S, et al. 2004. Preservation of complex I function during hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial injury in proximal tubules. *Am J Physiol Ren. Physiol.* 286:F749–59
45. Feng Q, Lu X, Fortin AJ, Pettersson A, Hedner T, et al. 1998. Elevation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in experimental congestive heart failure. *Cardiovasc Res.* 37:667–75
46. Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT, Morath C, Bode-Böger SM, et al. 2005. Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: the mild to moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol.* 16:2456–61
47. Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Ishii K, Schmidt HH, et al. 1990. Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in n1e-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol Pharmacol.* 38:7–13
48. Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. 1990. Regional distribution of eDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 168:727–32
49. Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K. 2000. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation.* 101:856–61
50. Furchgott RF, Vanhoutte PM. 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3:2007–18
51. Garg UC, Hassid A. 1989. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-

- cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 83:1774–77
52. Garza-Quintero R, Ortega-Lopez J, Stein JH, Venkatachalam MA. 1990. Alanine protects rabbit proximal tubules against anoxic injury in vitro. *Am J Physiol.* 258:F1075–83
53. Ghebremariam YT, LePendou P, Lee JC, Erlanson DA, Slaviero A, et al. 2013. Unexpected effect of proton pump inhibitors: elevation of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 128(8):845–53
54. Ghebremariam YT, Yamada K, Lee JC, Johnson CL, Atzler D, et al. 2013. Fxr agonist int-747 upregulates ddah expression and enhances insulin sensitivity in high-salt fed dahl rats. *PLoS One.* 8:e60653
55. Ghosh SK, Paik WK, Kim S. 1988. Purification and molecular identification of two protein methylases i from calf brain. myelin basic protein- and histone-specific enzyme. *J. Biol. Chem.* 263(35):19024–33
56. Glaumann B, Trump BF. 1975. Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury. iii. morphological changes of the proximal pars recta tubules (p3) of the rat kidney made ischemic in vivo. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 19:303–23
57. Göblyös A, de Vries H, Brussee J, Ijzerman AP. 2005. Synthesis and biological evaluation of a new series of 2,3,5-substituted [1,2,4]-thiadiazoles as modulators of adenosine a1 receptors and their molecular mechanism of action. *J. Med. Chem.* 48(4):1145–51
58. Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, Friend A, Shah V, Dillon MJ. 1997. Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens.* 15:901–9
59. Gore MO, Lüneburg N, Schwedhelm E, Ayers CR, Andersohn M, et al. 2013. Symmetrical dimethylarginine predicts mortality in the general population:

- observations from the dallas heart study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33(11):2682–88
60. Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. 2001. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 37:489–92
61. Hasegawa K, Wakino S, Tatematsu S, Yoshioka K, Homma K, et al. 2007. Role of asymmetric dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2. *Circ Res.* 101:e2–10
62. Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. 1998. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 178:551–56
63. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, et al. 2002. Serum tsh, t(4), and thyroid antibodies in the united states population (1988 to 1994): national health and nutrition examination survey (nhanes iii). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(2):489–99
64. Hu J, el-Fakahany EE. 1993. Beta-amyloid 25-35 activates nitric oxide synthase in a neuronal clone. *Neuroreport.* 4(6):760–62
65. Hu T, Chouinard M, Cox AL, Sipes P, Marcelo M, et al. 2006. Farnesoid x receptor agonist reduces serum asymmetric dimethylarginine levels through hepatic dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 gene regulation. *J Biol Chem.* 281:39831–38
66. Hu X, Atzler D, Xu X, Zhang P, Guo H, et al. 2011. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. *Arter. Thromb Vasc Biol.* 31:1540–46
67. Hu X, Xu X, Zhu G, Atzler D, Kimoto M, et al. 2009. Vascular endothelial-specific

- dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1-deficient mice reveal that vascular endothelium plays an important role in removing asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 120:2222–29
68. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an o₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U A*. 95:7987–92
69. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. 2011. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol*. 162(6):1239–49
70. Hylgaard C, Hilberg O, Bendstrup E. 2014. How does comorbidity influence survival in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir. Med*. 108(4):647–53
71. Iapichino G, Umbrello M, Albicini M, Spanu P, Bellani G, et al. 2010. Time course of endogenous nitric oxide inhibitors in severe sepsis in humans. *Minerva Anesthesiol*. 76(5):325–33
72. International Diabetes Federation. The idf consensus worldwide definition of the metabolic syndrome
73. Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, et al. 2005. Hif overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of hif stability. *Cancer Cell*. 8:143–53
74. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, et al. 2001. Hif α targeted for vhl-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for o₂ sensing. *Science*. 292:464–68
75. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, et al. 2001. Targeting of hif- α to the von hippel-lindau ubiquitylation complex by o₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 292:468–72
76. Jacobi J, Sydow K, von Degenfeld G, Zhang Y, Dayoub H, et al. 2005.

- Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation*. 111:1431–38
77. Janssen W, Pullamsetti SS, Cooke J, Weissmann N, Guenther A, Schermuly RT. 2013. The role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (ddah) in pulmonary fibrosis. *J. Pathol.* 229(2):242–49
78. Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, et al. 2006. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N. Engl. J. Med.* 355(23):2427–43
79. Kahng MW, Berezesky IK, Trump BF. 1978. Metabolic and ultrastructural response of rat kidney cortex to in vitro ischemia. *Exp Mol Pathol.* 29:183–98
80. Kakimoto Y, Akazawa S. 1970. Isolation and identification of n-g,n-g- and n-g,n'-g-dimethyl-arginine, n-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem.* 245:5751–58
81. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. 1997. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U A.* 94:5667–72
82. Kari JA, Donald AE, Vallance DT, Bruckdorfer KR, Leone A, et al. 1997. Physiology and biochemistry of endothelial function in children with chronic renal failure. *Kidney Int.* 52:468–72
83. Katsuki S, Murad F. 1977. Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 13:330–41
84. Kiechl S, Lee T, Santer P, Thompson G, Tsimikas S, et al. 2009. Asymmetric and

- symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis*. 205:261–65
85. Kielstein JT, Bode-Böger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, et al. 2005. Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25(7):1414–18
86. Kielstein JT, Bode-Böger SM, Klein G, Graf S, Haller H, Fliser D. 2003. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. *Eur J Clin Invest.* 33:370–75
87. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC, Haller H, et al. 2002. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 13:170–76
88. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Böger SM, Cooke JP, Fliser D. 2006. Symmetric dimethylarginine (sdma) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis. *Nephrol Dial Transpl.* 21:2446–51
89. Kielstein JT, Veldink H, Martens-Lobenhoffer J, Haller H, Burg M, et al. 2011. Sdma is an early marker of change in gfr after living-related kidney donation. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 26(1):324–28
90. Kim JW, Closs EI, Albritton LM, Cunningham JM. 1991. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature.* 352:725–28
91. Kimoto M, Miyatake S, Sasagawa T, Yamashita H, Okita M, et al. 1998. Purification, cdna cloning and expression of human ng,ng-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Eur. J. Biochem. FEBS.* 258(2):863–68
92. Kittel A, Maas R, König J, Mieth M, Weiss N, et al. 2013. In vivo evidence that agxt2 can regulate plasma levels of dimethylarginines in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 430:84–89

93. Kivirikko KI, Myllylä R, Pihlajaniemi T. 1989. Protein hydroxylation: prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit. *FASEB J.* 3:1609–17
94. Knipp M, Charnock JM, Garner CD, Vasak M. 2001. Structural and functional characterization of the zn(ii) site in dimethylargininase-1 (ddah-1) from bovine brain. zn(ii) release activates ddah-1. *J. Biol. Chem.* 276(44):40449–56
95. Kontani Y, Kaneko M, Kikugawa M, Fujimoto S, Tamaki N. 1993. Identity of d-3-aminoisobutyrate-pyruvate aminotransferase with alanine-glyoxylate aminotransferase 2. *Biochim Biophys Acta.* 1156:161–66
96. Kostourou V, Robinson SP, Cartwright JE, Whitley GS. 2002. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase i enhances tumour growth and angiogenesis. *Br J Cancer.* 87:673–80
97. Kostourou V, Robinson SP, Whitley GS, Griffiths JR. 2003. Effects of overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase on tumor angiogenesis assessed by susceptibility magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 63:4960–66
98. Kostourou V, Troy H, Murray JF, Cullis ER, Whitley GS, et al. 2004. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase enhances tumor hypoxia: an insight into the relationship of hypoxia and angiogenesis in vivo. *Neoplasia.* 6:401–11
99. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U A.* 88:4651–55
100. Lee IS, Muragaki Y, Ideguchi T, Hase T, Tsuji M, et al. 1995. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding alanine-glyoxylate aminotransferase 2 from rat kidney. *J Biochem.* 117:856–62
101. Lee JH, Cook JR, Yang ZH, Mirochnitchenko O, Gunderson SI, et al. 2005. Prmt7,

- a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *J Biol Chem.* 280:3656–64
102. Leffert HL, Alexander NM. 1976. Thyroid hormone metabolism during liver regeneration in rats. *Endocrinology.* 98(5):1241–47
103. Leiper J, Nandi M. 2011. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nat Rev Drug Discov.* 10:277–91
104. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, et al. 1999. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem. J.* 343 Pt 1:209–14
105. Lieberman OJ, Orr MW, Wang Y, Lee VT. 2014. High-throughput screening using the differential radial capillary action of ligand assay identifies ebselen as an inhibitor of diguanylate cyclases. *ACS Chem. Biol.* 9(1):183–92
106. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, et al. 2002. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 106:987–92
107. Linsky T, Fast W. 2011. A continuous, fluorescent, high-throughput assay for human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1. *J. Biomol. Screen.* 16(9):1089–97
108. Linsky T, Wang Y, Fast W. 2011. Screening for dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibitors reveals ebselen as a bioavailable inactivator. *ACS Med Chem Lett.* 2:592–96
109. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46(1-3):
110. Loland KH, Bleie O, Borgeraas H, Strand E, Ueland PM, et al. 2013. The

- association between progression of atherosclerosis and the methylated amino acids asymmetric dimethylarginine and trimethyllysine. *PLoS One*. 8(5):
111. López-Fontal R, Zeini M, Traves PG, Gómez-Ferreria M, Aranda A, et al. 2010. Mice lacking thyroid hormone receptor beta show enhanced apoptosis and delayed liver commitment for proliferation after partial hepatectomy. *PLoS One*. 5(1):
112. Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A. 2005. Reversible inactivation of hif-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal hif-1. *J Biol Chem*. 280:41928–39
113. Lüneburg N, Harbaum L, Hennigs JK. 2014. The endothelial adma/no pathway in hypoxia-related chronic respiratory diseases. *BioMed Res. Int*. 2014:
114. Lüneburg N, von Holten RA, Topper RF, Schwedhelm E, Maas R, Boger RH. 2012. Symmetric dimethylarginine is a marker of detrimental outcome in the acute phase after ischaemic stroke: role of renal function. *Clin. Sci*. 122:105–11
115. Lüneburg N, Xanthakis V, Schwedhelm E, Sullivan LM, Maas R, et al. 2011. Reference intervals for plasma l-arginine and the l-arginine:asymmetric dimethylarginine ratio in the framingham offspring cohort. *J. Nutr*. 141(12):2186–90
116. Marcovecchio ML, Dalton RN, Turner C, Prevost AT, Widmer B, et al. 2010. Symmetric dimethylarginine, an endogenous marker of glomerular filtration rate, and the risk for microalbuminuria in young people with type 1 diabetes. *Arch Child*. 95:119–24
117. Marescau B, Nagels G, Possemiers I, De Broe ME, Beaus I, et al. 1997. Guanidino compounds in serum and urine of nondialyzed patients with chronic renal insufficiency. *Metabolism*. 46:1024–31
118. Martens-Lobenhoffer J, Rodionov RN, Bode-Böger SM. 2012. Probing agxt2

- enzyme activity in mouse tissue by applying stable isotope-labeled asymmetric dimethyl arginine as substrate. *J Mass Spectrom.* 47:1594–1600
119. Matsumoto Y, Ueda S, Yamagishi S, Matsuguma K, Shibata R, et al. 2007. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase prevents progression of renal dysfunction by inhibiting loss of peritubular capillaries and tubulointerstitial fibrosis in a rat model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 18:1525–33
120. Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, Kohno K, Tamai O, et al. 1997. Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. *Hypertension.* 29:242–47
121. Mayer B, Schmidt K, Humbert P, Bohme E. 1989. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 164:678–85
122. McDermott JR. 1976. Studies on the catabolism of NG-methylarginine, NG, NG-dimethylarginine and NG, NG-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J.* 154:179–84
123. McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. 1997. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J. Biol. Chem.* 272(50):31213–16
124. McEvoy M, Schofield P, Smith W, Agho K, Mangoni AA, et al. 2014. Memory impairment is associated with serum methylarginines in older adults. *Curr. Alzheimer Res.* 11(1):
125. Meinitzer A, Kielstein JT, Pilz S, Drechsler C, Ritz E, et al. 2011. Symmetrical and asymmetrical dimethylarginine as predictors for mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *Clin Chem.* 57:112–21

126. Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, et al. 2003. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase i in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 108:1493–98
127. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, et al. 1999. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 99(9):1141–46
128. Mole DR, Schlemminger I, McNeill LA, Hewitson KS, Pugh CW, et al. 2003. 2-oxoglutarate analogue inhibitors of hif prolyl hydroxylase. *Bioorg Med Chem Lett*. 13:2677–80
129. Moro L, Marra E, Capuano F, Greco M. 2004. Thyroid hormone treatment of hypothyroid rats restores the regenerative capacity and the mitochondrial membrane permeability properties of the liver after partial hepatectomy. *Endocrinology*. 145(11):5121–28
130. Nakajima T, Matsuoka Y, Kakimoto Y. 1971. Isolation and identification of n-g-monomethyl, n-g, n-g-dimethyl- and n-g,n' g-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. *Biochim Biophys Acta*. 230:212–22
131. Nandi M, Kelly P, Torondel B, Wang Z, Starr A, et al. 2012. Genetic and pharmacological inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 is protective in endotoxic shock. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 32(11):2589–97
132. Nangaku M. 2009. Novel therapeutic approach targeting the hif-hre system in the kidney. In *Oxygen Transport to Tissue XXX*, ed P Liss, P Hansell, D Bruley, D Harrison. 645:81–86. Springer US
133. Nicholls SJ, Wang Z, Koeth R, Levison B, DelFraio B, et al. 2007. Metabolic profiling of arginine and nitric oxide pathways predicts hemodynamic abnormalities and mortality in patients with cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Circulation*. 116:2315–24

134. Noguchi T, Okuno E, Takada Y, Minatogawa Y, Okai K, Kido R. 1978. Characteristics of hepatic alanine-glyoxylate aminotransferase in different mammalian species. *Biochem J.* 169:113–22
135. Nogueira CW, Rocha JBT. 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* 85(11):1313–59
136. Ogawa A, Yoshimoto T, Kikuchi H, Sano K, Saito I, et al. 1999. Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 9(2):112–18
137. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. 1990. Dimethylarginine:pyruvate aminotransferase in rats. purification, properties, and identity with alanine:glyoxylate aminotransferase 2. *J Biol Chem.* 265:20938–45
138. Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K. 1987. Metabolism of ng,ng-and ng,n'g-dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys.* 252:526–37
139. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, et al. 2000. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von hippel-lindau protein. *Nat Cell Biol.* 2:423–27
140. Okuno E, Minatogawa Y, Kido R. 1982. Co-purification of alanine-glyoxylate aminotransferase with 2-aminobutyrate aminotransferase in rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 715:97–104
141. Paik WK, Kim S. 1968. Protein methylase i. purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem.* 243:2108–14
142. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from l-arginine. *Nature.* 333:664–66
143. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327:524–26

144. Palmer RM, Moncada S. 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 158:348–52
145. Parle JV, Franklyn JA, Cross KW, Jones SC, Sheppard MC. 1991. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotrophin (tsh) concentrations in the elderly in the united kingdom. *Clin. Endocrinol. (Oxf.).* 34(1):
146. Parnham M, Sies H. 2000. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 9(3):607–19
147. Parnham MJ, Sies H. 2013. The early research and development of ebselen. *Biochem. Pharmacol.* 86(9):1248–53
148. Pedersen LG, Tarnow I, Olsen LH, Teerlink T, Pedersen HD. 2006. Body size, but neither age nor asymptomatic mitral regurgitation, influences plasma concentrations of dimethylarginines in dogs. *Res Vet Sci.* 80:336–42
149. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, et al. 2005. Asymmetric dimethylarginine, l-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 46:518–23
150. Petterson A, Hedner T, Milsom I. 1998. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (adma), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 77:808–13
151. Pollack BP, Kotenko SV, He W, Izotova LS, Barnoski BL, Pestka S. 1999. The human homologue of the yeast proteins *skb1* and *hsl7p* interacts with jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J Biol Chem.* 274:31531–42
152. Porter DJ, Harrington JA, Almond MR, Chestnut WG, Tanoury G, Spector T. 1995. Enzymatic elimination of fluoride from alpha-fluoro-beta-alanine. *Biochem Pharmacol.* 50:1475–84

153. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. 1992. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267(34):24173–76
154. Prescott AG, John P. 1996. Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47:245–71
155. Prinz F, Schlange T, Asadullah K. 2011. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nat. Rev. Drug Discov.* 10(9):
156. Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, Voswinckel R, Haredza P, et al. 2005. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB J.* 19:1175–77
157. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. 1987. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 92:639–46
158. Ragginer C, Bernecker C, Ainoedhofer H, Pailer S, Kieslinger P, et al. 2013. Treatment with the nitric oxide donor snp increases triiodothyronine levels in hyper- and hypothyroid sprague-dawley rats. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* 45(11):808–12
159. Rajpurohit R, Paik WK, Kim S. 1992. Enzymatic methylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein in isolated liver nuclei. *Biochim Biophys Acta.* 1122:183–88
160. Rivolta G, Cerutti R, Colombo R, Miano G, Dionisio P, Grossi E. 1999. Prevalence of subclinical hypothyroidism in a population living in the milan metropolitan area. *J. Endocrinol. Invest.* 22(9):693–97
161. Roberts S, Narisawa S, Harmey D, Millan JL, Farquharson C. 2007. Functional involvement of phospho1 in matrix vesicle-mediated skeletal mineralization. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 22(4):617–27
162. Rodionov RN, Murry DJ, Vaulman SF, Stevens JW, Lentz SR. 2010. Human

- alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production. *J Biol Chem.* 285:5385–91
163. Rossiter S, Smith CL, Malaki M, Nandi M, Gill H, et al. 2005. Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Med Chem.* 48:4670–78
164. Rowsell EV, Snell K, Carnie JA, Al-Tai AH. 1969. Liver-l-alanine-glyoxylate and l-serine-pyruvate aminotransferase activities: an apparent association with gluconeogenesis. *Biochem. J.* 115(5):1071–73
165. Rowsell EV, Snell K, Carnie JA, Rowsell KV. 1972. The subcellular distribution of rat liver l-alanine-glyoxylate aminotransferase in relation to a pathway for glucose formation involving glyoxylate. *Biochem J.* 127:155–65
166. Roy G, Mugesh G. 2008. Selenium analogues of antithyroid drugs--recent developments. *Chem. Biodivers.* 5(3):414–39
167. Saitoh M, Osanai T, Kamada T, Matsunaga T, Ishizaka H, et al. 2003. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level. *Heart Vessels.* 18:177–82
168. Sardone LD, Renlund R, Willett TL, Fantus IG, Grynepas MD. 2011. Effect of rosiglitazone on bone quality in a rat model of insulin resistance and osteoporosis. *Diabetes.* 60(12):3271–78
169. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaides KH. 2003. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet.* 361:1511–17
170. Schepers E, Glorieux G, Dhondt A, Leybaert L, Vanholder R. 2009. Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ros via store-

- operated calcium influx in monocytes. *Nephrol Dial Transpl.* 24:1429–35
171. Schewe T. 1995. Molecular actions of ebselen--an antiinflammatory antioxidant. *Gen. Pharmacol.* 26(6):1153–69
172. Schley G, Klanke B, Schödel J, Kröning S, Türkoglu G, et al. 2012. Selective stabilization of hif-1alpha in renal tubular cells by 2-oxoglutarate analogues. *Am J Pathol.* 181:1595–1606
173. Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Förstermann U, Murad F. 1991. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci U A.* 88:365–69
174. Schultz G, Hardman JG, Schultz K, Baird CE, Sutherland EW. 1973. The importance of calcium ions for the regulation of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels. *Proc Natl Acad Sci U A.* 70:3889–93
175. Schulze F, Carter AM, Schwedhelm E, Ajjan R, Maas R, et al. 2010. Symmetric dimethylarginine predicts all-cause mortality following ischemic stroke. *Atherosclerosis.* 208(2):518–23
176. Schwedhelm E, Xanthakis V, Maas R, Sullivan LM, Atzler D, et al. 2011. Plasma symmetric dimethylarginine reference limits from the framingham offspring cohort. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC.* 49(11):1907–10
177. Schwedhelm E, Xanthakis V, Maas R, Sullivan LM, Schulze F, et al. 2009. Asymmetric dimethylarginine reference intervals determined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry: results from the framingham offspring cohort. *Clin. Chem.* 55(8):1539–45
178. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, et al. 2005. Succinate links tca cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting hif-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell.* 7:77–85
179. Selley ML. 2003. Increased concentrations of homocysteine and asymmetric

- dimethylarginine and decreased concentrations of nitric oxide in the plasma of patients with alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 24:903–7
180. Semenza GL, Wang GL. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 12:5447–54
181. Seppälä I, Kleber ME, Lyytikäinen LP, Hernesniemi JA, Makela KM, et al. 2013. Genome-wide association study on dimethylarginines reveals novel agxt2 variants associated with heart rate variability but not with overall mortality. *Eur Heart J*
182. Shanley PF, Brezis M, Spokes K, Silva P, Epstein FH, Rosen S. 1986. Hypoxic injury in the proximal tubule of the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int*. 29:1021–32
183. Skoro-Sajer N, Mittermayer F, Panzenboeck A, Bonderman D, Sadushi R, et al. 2007. Asymmetric dimethylarginine is increased in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 176:1154–60
184. Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. 17(8):2653–57
185. Smith MA, Vasák M, Knipp M, Castellani RJ, Perry G. 1998. Dimethylargininase, a nitric oxide regulatory protein, in alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. 25:898–902
186. Strobel J, Muller F, Zolk O, Endress B, König J, et al. 2013. Transport of asymmetric dimethylarginine (adma) by cationic amino acid transporter 2 (cat2), organic cation transporter 2 (oct2) and multidrug and toxin extrusion protein 1 (mate1). *Amino Acids*. 45(4):
187. Stuehr DJ, Marletta MA. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to escherichia coli

- lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U A.* 82:7738–42
188. Stuehr DJ, Marletta MA. 1987. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by bcg infection, lymphokines, or interferon-gamma. *J Immunol.* 139:518–25
189. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, et al. 2002. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA.* 287:1420–26
190. Suchartwatnachai C, Theppisai U, Jirapinyo M. 2002. Screening for hypothyroidism at a menopause clinic. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* 77(1):
191. Takada Y, Noguchi T. 1980. Kidney alanine: glyoxylate aminotransferase isoenzymes; species distribution, subcellular distribution and properties. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 65:133–38
192. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. 2000. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* 19:4298–4309
193. Tejovathi B, Suchitra MM, Suresh V, Reddy VS, Sachan A, et al. 2013. Association of lipid peroxidation with endothelial dysfunction in patients with overt hypothyroidism. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 121(5):306–9
194. The internet stroke center;
http://www.strokecenter.org/trials/search?utf8=%E2%9C%93&search%5Bname_or_brief_summary_or_detailed_description_or_acronym_contains%5D=ebselen
195. Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, et al. 1997. Colocalization of demethylating enzymes and nos and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int.* 52(6):1593–1601

196. Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP. 1994. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation*. 89:2176–82
197. U.S. Food and Drug Administration. 2007. Update of safety review - follow-up to the august 9, 2007, communication about the ongoing safety review of omeprazole and esomeprazole
198. Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, et al. 2003. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res*. 92:226–33
199. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. 1992. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 339:572–75
200. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. 1992. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 20 Suppl 12:S60–2
201. Van den Nieuwendijk AMCH, Pietra D, Heitman L, Goblyos A, IJzerman AP. 2004. Synthesis and biological evaluation of 2,3,5-substituted [1,2,4]thiadiazoles as allosteric modulators of adenosine receptors. *J. Med. Chem*. 47(3):663–72
202. Vanderporten E, Frick L, Turincio R, Thana P, Lamarr W, Liu Y. 2013. Label-free high-throughput assays to screen and characterize novel lactate dehydrogenase inhibitors. *Anal Biochem*. 441:115–22
203. Vanella L, Di Giacomo C, Acquaviva R, Santangelo R, Cardile V, et al. 2011. The ddah/nos pathway in human prostatic cancer cell lines: antiangiogenic effect of L-name. *Int J Oncol*. 39:1303–10
204. Varticovski L, Kushner JP, Burnham BF. 1980. Biosynthesis of porphyrin precursors. purification and characterization of mammalian L-alanine:gamma,delta-

- dioxovaleric acid aminotransferase. *J Biol Chem.* 255:3742–47
205. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, et al. 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(16):9220–25
206. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. 1978. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the s1, s2, and s3 segments. *Kidney Int.* 14:31–49
207. Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, et al. 1996. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 184(4):1425–33
208. Vogt MT, Farber E. 1968. On the molecular pathology of ischemic renal cell death. reversible and irreversible cellular and mitochondrial metabolic alterations. *Am J Pathol.* 53:1–26
209. Wakino S, Hayashi K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, et al. 2005. Pioglitazone lowers systemic asymmetric dimethylarginine by inducing dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rats. *Hypertens Res.* 28:255–62
210. Wanby P, Teerlink T, Brudin L, Brattstrom L, Nilsson I, et al. 2006. Asymmetric dimethylarginine (adma) as a risk marker for stroke and tia in a swedish population. *Atherosclerosis.* 185:271–77
211. Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, et al. 2007. Isoform-specific regulation by n(g),n(g)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/no. *Circ Res.* 101:627–35
212. Wang D, Strandgaard S, Iversen J, Wilcox CS. 2009. Asymmetric dimethylarginine, oxidative stress, and vascular nitric oxide synthase in essential hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296:R195–200

213. Wang F, Ye P, Luo L, Xiao W, Wu H. 2010. Association of risk factors for cardiovascular disease and glomerular filtration rate: a community-based study of 4,925 adults in Beijing. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 25(12):3924–31
214. Wang GL, Semenza GL. 1993. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood.* 82:3610–15
215. Wang GL, Semenza GL. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 270:1230–37
216. Wang S, Hu CP, Jiang DJ, Peng J, Zhou Z, et al. 2009. All-trans retinoic acid inhibits cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells: role of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase/asymmetric dimethylarginine pathway. *J Neurosci Res.* 87:1938–46
217. Wang Y, Hu S, Gabisi AMJ, Er JAV, Pope A, et al. 2014. Developing an irreversible inhibitor of human DDH-1, an enzyme upregulated in melanoma. *ChemMedChem.* 9(4):792–97
218. Wang Y, Monzingo AF, Hu S, Schaller TH, Robertus JD, Fast W. 2009. Developing dual and specific inhibitors of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 and nitric oxide synthase: toward a targeted polypharmacology to control nitric oxide. *Biochemistry (Mosc.).* 48:8624–35
219. Wang Z, Lambden S, Taylor V, Sujkovic E, Nandi M, et al. 2014. Pharmacological inhibition of DDH1 improves survival, hemodynamics and organ function in experimental septic shock. *Biochem. J.*
220. Weinberg JM, Roeser NF, Davis JA, Venkatachalam MA. 1997. Glycine-protected, hypoxic, proximal tubules develop severely compromised energetic function. *Kidney Int.* 52:140–51

221. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I. 2000. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc Natl Acad Sci U A.* 97:2826–31
222. Wu G, Morris SM. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 336 (Pt 1):1–17
223. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. 1998. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. a ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J. Biol. Chem.* 273(40):25804–8
224. Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, Saito I, Shinohara Y, et al. 1998. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. ebselen study group. *Stroke J. Cereb. Circ.* 29(1):12–17
225. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. 2001. Hif-1alpha binding to vhl is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U A.* 98:9630–35
226. Zhang, Chung, Oldenburg. 1999. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* 4(2):
227. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, et al. 2001. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet.* 358:2113–17

8 Lebenslauf

Name Isabel Berges
Geburtsdatum 09. Juni 1984
Geburtsort Lauterbach (Hessen)

Schulische Ausbildung:

1993 – 1995 Eichberg-Schule, Grundschule, Lauterbach
1995 – 2004 Alexander-von-Humboldt-Schule, Gymnasium,
Lauterbach (Abitur im Juni 2004)
Oktober 2004 Freiwilliges Praktikum in der Markt-Apotheke, Lauterbach
April 2005 – April 2009 Pharmaziestudium
Johann-Wolfgang-Goethe Universität,
Frankfurt am Main

Berufliche Ausbildung:

Mai 2009 – Oktober 2009 Praktikum in der Krankenhausapotheke des
Universitätsklinikums Eppendorf (UKE), Hamburg
November 2009 – April 2010 Praktikum in der Pfeil-Apotheke, Hamburg
Mai 2010 Erhalt der Approbation als Apothekerin,
Frankfurt am Main
Juni 2010 – Oktober 2010 Apothekerin in Teilzeit in der Ara-Apotheke, Hamburg
November 2010 – Februar 2011 Apothekerin in Teilzeit in der Krankenhausapotheke
des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE), Hamburg
**Seit Wintersemester 2011 Aufbaustudiengang Molekularbiologie (ASMB)
im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
(ZMNH), Hamburg**

Beruflicher Werdegang:

Juli 2013 – Dezember 2013 Auslandsaufenthalt im Rahmen der Promotion
Department of Cardiovascular Sciences
Houston Methodist Research Institute, Houston, Texas,
USA
**Seit Juni 2010 – heute Promotion im Institut für Klinische Pharmakologie &
Toxikologie Universitätsklinikum Eppendorf (UKE),
Hamburg**

9 Veröffentlichungen

Poster

- "Identification of a novel enzyme degrading the cardiovascular risk marker symmetric dimethylarginine (SDMA)"
- "Spanish Physiological Society Scientific Congress 2012" in Santiago de Compostela, Spanien
- Erhalt des „Best Poster Awards“ unter den Jungwissenschaftlern

Vortrag

- "High Throughput Screening identified an analogue of the thyreostatic drug thiamazole as potential regulator of DDAH1."
- St. Petersburg, Russland vom 30. Juni – 02. Juli 2014

10 Erklärung

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

**Die Metabolisierung der Dimethylarginine durch die Enzyme
AGXT2 und DDAH1 und deren Anwendung für den Prozess der Drug
Discovery**

in der Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie des Instituts für Klinische Pharmakologie & Toxikologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger und der Betreuung durch Frau Prof. Dr. Elke Oetjen des Arbeitsbereichs Pharmakologie für Pharmazeuten ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

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

Hamburg, Mai 2014

Isabel Bernges

11 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Böger für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Vergabe des sehr spannenden Projektes bedanken. Außerdem möchte ich mich bedanken, dass Sie mich bei meinem Auslandsaufenthalt und der Teilnahme an Internationalen Kongressen unterstützt haben. Durch die Festanstellung haben Sie mir die Möglichkeit gegeben, dass ich mich komplett auf die Laborarbeit konzentrieren konnte. Vielen Dank für die sehr hilfreichen Ratschläge und zahlreichen Zeugnisse und Gutachten, die Sie für mich schreiben mussten! Ich habe die Zeit als Doktorandin bei Ihnen sehr genossen!

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Frau Prof. Oetjen, die die Betreuung der Promotion für den Fachbereich Chemie übernahm und mein Gutachten über die Dissertation verfasst. Was ich an Ihnen sehr schätze ist, dass sie immer sehr präsent sind und immer hilfsbereit waren, wenn ich einen Ratschlag von Ihnen benötigt habe!

Vielen Dank auch an Herr Prof. Fischer für die Zusage als Prüfer meiner Disputation. Ein Dank geht auch an seine Arbeitsgruppe – Dr. Gräwert, Abdulrahman Albunni, Sonja Sarge, Alexandra Schädig – die die Herstellung der rekombinanten Proteine durchführte.

Ich freue mich sehr, dass Herr Prof. Duchstein mit seiner fröhlichen und lustigen Art an meiner Disputation als Prüfer teilnimmt und mir zur Unterstützung für mein Auslandsvorhaben ein Gutachten erstellt hatte.

Ein Dank geht auch an Herrn Prof. Eschenhagen und dem Institut für Experimentelle Pharmakologie, deren Geräte und Labore ich benutzen durfte.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Nicole Lüneburg und meiner Kollegin Dr. Maike Anderssohn bedanken. Ihr seid wie zwei große Schwestern für mich und habt mir mit eurem Wissen und hilfreichen Tipps sehr weitergeholfen. Ihr habt mir nicht nur bei fachlichen, sondern auch bei privaten Problemen oder Fragen zugehört und mich beraten! Danke an Nicole für das mühselige Korrekturlesen meiner Berichte, Anträge und der Dissertation. Du hast mir sehr viel Freiraum gelassen und mir Vertrauen gegenüber gebracht, was mir in meiner Entwicklung sehr geholfen hat. Danke an Maike für die tollen Kochabende! Auch Simone (bei der ich mich mit kleinen Plauderpäuschen vor der Arbeit drücken konnte), Sandra (die ich v.a. zu Beginn der Promotion mit labortechnischen Fragen gelöchert habe), Antonia (die mich während ihrer Zeit als Praktikantin tatkräftig unterstützt hatte), Dr. Diana

Danksagung

Kaiser und Dr. Justus Stenzig (die mich nach dem Labor ins Borchers entführt oder sich an unseren Kochabenden beteiligt haben) will ich besonders danken. Ihr alle habt für eine prächtige Arbeitsatmosphäre gesorgt und mich fröhlich gestimmt, wenn ich wieder einmal total frustriert war oder Selbstzweifel hatte! Ohne Euch hätte ich die Promotion nicht so genossen und durchgehalten! Ich wünsche Euch privat und beruflich viel Glück! Antonia: Dir wünsche ich viel Erfolg für deine Promotion. Ich habe keine Zweifel, dass du das super meistern wirst!

Des Weiteren möchte ich auch Dr. Doro Atzler für ihre Unterstützung und Hilfe beim DDAH – Projekt sehr herzlich danken, sowie Dr. Edzard Schwedhelm. Danke an Mariola Kastner, Anna Steenpaß und Cornelia Wöhrmann für Eure labortechnische Unterstützung und Hilfsbereitschaft! Es hat viel Spaß gemacht mit Euch zusammen zu arbeiten! Außerdem möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Doktoranden, u.a. bei Eileen, Anika, Afschin, Felix, Pia, Ninja, Anny, Wiebke und allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern für ihre tolle Art und schönen Gespräche bedanken. Viel Glück und Erfolg bei Euren Projekten! Haltet durch!

Ein großer Dank geht an Dr. Phil Gribbon und Dr. Sheraz Gul vom European Screening Port, die mich für das Screening in ihre Räumlichkeiten aufgenommen haben und mir viele fachliche als auch private Ratschläge gegeben haben. Besonders danken will ich Markus Wolf, der mit mir das Screening durchgeführt und mir bei allen Fragen und Problemen tatkräftig geholfen hat.

Ich bedanke mich ausdrücklich bei Herrn Prof. Cooke, der mich für 6 Monate in seine Arbeitsgruppe im Houston Methodist Research Institute aufgenommen und mich während dieser Zeit finanziell unterstützt hat. Ihm, als auch Yohannes, Sawanna und allen anderen Mitarbeitern danke ich für diese tolle Arbeitsatmosphäre, Freizeitabende und privaten- als auch fachlichen Gespräche!

Danke an meine beste Freundin Anna und all meinen Freunden, die ich während meiner Zeit in Hamburg getroffen habe! Besonders an Caro und Isa, die mir beim Druck der Dissertation geholfen haben und Moe für die schönen gemeinsamen vier Jahre!

Am allermeisten möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Mama und Papa – ich weiß nicht, wie ich meine Dankbarkeit ausreichend zum Ausdruck bringen kann! Ihr habt immer an mich geglaubt und mich bei den unterschiedlichsten Problemen sehr unterstützt! Mama, du bist die beste Trösterin, die es gibt! Papa, vor allem deine Ratschläge und Meinungen sind mir besonders wichtig! Danke an Steffi, die mir immer Mut zugesprochen hat und mit der ich an unseren gemeinsamen Abenden vom Doktoranden-Stress abschalten konnte! Lara, du bist die tollste Nichte, die es gibt! Bussi