

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. Rainer H. Böger

**Untersuchungen zur Rolle des asymmetrischen
Dimethylarginins in der Pathophysiologie des Diabetes
mellitus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Departments Chemie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Afshin Sobhi

Hamburg, September 2016

Gutachter/in: Prof. Dr. Elke Oetjen

Prof. Dr. Rainer H. Böger

Tag der Disputation: 09.12.2016

Meinen Eltern

تقدیم به پدر و مادرم

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	2
1.1.1	Insulin	6
1.2	Atherosklerose	9
1.2.1	Die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO)	10
1.2.2	Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)	13
1.3	NO und ADMA beim Diabetes mellitus	14
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	16
2	Materialien und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.2	In-vivo Untersuchungen im Tiermodell	18
2.2.1	Versuchstiere und Genehmigung	18
2.2.2	Die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-Knockout (DDAH1 ^{-/-}) Maus	18
2.2.3	Das Diät-induzierte Adipositas (DIO) Mausmodell	19
2.2.4	Tierexperimentelle Methoden	20
2.2.4.1	Präparation genomischer Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	20
2.2.4.2	Genotypisierung der Versuchstiere anhand genomischer DNA	21
2.2.4.3	Blutentnahme	24
2.2.4.4	Bestimmung der Blutglucose-Konzentration	24
2.2.4.5	Gewinnung der Plasmaproben	24
2.2.4.6	Organentnahme	25
2.2.4.7	Wägung der Fettpolster	25
2.2.5	Oraler Glucose-Toleranztest (OGTT)	25
2.2.6	Untersuchung der Kontraktion und Relaxation von Aortensegmenten im Organbad	26
2.2.7	Enzymgekoppelte Immunosorbensenz Untersuchung von Insulin (Insulin-ELISA)	29
2.2.8	Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) Messung der Argininderivate in den Plasmaproben	31

2.3	In-vitro Untersuchungen in der Zellkultur	34
2.3.1	3T3-L1-Adipozyten	34
2.3.2	C2C12-Myozyten	35
2.3.3	HIT-T15-Zellen	36
2.3.4	Zellexperimentelle Untersuchungen	37
2.3.4.1	Kultivierung der Zellen	37
2.3.4.2	Kryokonservierung der Zellen	37
2.3.4.3	Subkultivierung der Zellen	38
2.3.4.4	Zählung der Zellzahl in einer Suspension	38
2.3.4.5	Zellaufschluss	38
2.3.4.6	Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford	39
2.3.4.7	Färbung von Adipozyten mittels Oil Red O-Reagenz	39
2.3.5	Analyse der Protein-Expression (Western-Blot)	40
2.3.6	Fluorometrische Messung der Nitrit-Konzentration im Überstand	43
2.3.7	Untersuchung der ³ H-Deoxy-D-Glucoseaufnahme	44
2.3.8	Insulin-ELISA	45
2.3.9	Untersuchung der Viabilität	45
2.4	Statistische Auswertung	46
3	Ergebnisse	48
3.1	In-vivo Untersuchungen im Tiermodell	48
3.1.1	Genotypische und phänotypische Charakterisierung der DDAH1-defizienten Mäuse	48
3.1.2	Manifestation einer Adipositas	53
3.1.3	Insulinsensitivität und Glucosehomöostase	59
3.1.4	Funktionalität des Endothels	63

3.2	In-vitro Untersuchungen in der Zellkultur	69
3.2.1	Charakterisierung der Zelllinien	69
3.2.2	Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)	76
3.2.3	Einfluss von NO auf die insulinabhängige Glucoseaufnahme	80
3.2.4	Einfluss von NO auf die Insulinsekretion und Viabilität Insulin-produzierender β -Zellen	82
4	Diskussion	85
4.1	In-vivo Untersuchungen im Tiermodell	85
4.1.1	Einfluss des DDAH1 ^{-/-} auf die Argininderivate	85
4.1.2	Manifestation einer Adipositas	86
4.1.3	Insulinsensitivität und Glucosehomöostase	89
4.1.4	Funktionalität des Endothels	94
4.2	In-vitro Untersuchungen in der Zellkultur	95
4.2.1	Einfluss von NO auf die Insulinsensitivität	96
4.2.2	Einfluss von NO auf die Insulinsekretion und Viabilität	97
4.3	Ausblick	98
5	Zusammenfassung	100
5.1	Zusammenfassung	100
5.2	Summary	101
6	Anhang	102
6.1	Katalog	102
6.1.1	Materialien	102
6.1.1.1	Substanzen und Reagenzien	102
6.1.1.2	Lösungen und Puffer	114
6.1.1.3	Verbrauchsmaterialien und weitere Hilfsmittel	123
6.1.1.4	Laborgeräte	126
6.1.1.5	Software	129

6.1.2	Literaturverzeichnis	129
6.1.3	Abbildungsverzeichnis	145
6.1.4	Tabellenverzeichnis	146
6.1.5	Abkürzungsverzeichnis	147
6.1.6	Hazardous und Precautionary (H und P) Sätze	150
6.2	Lebenslauf	157
6.3	Eidesstattliche Erklärung	158
6.4	Danksagung	159

1 Einleitung

Diabetes mellitus entwickelt sich in der gegenwärtigen Zeit zunehmend zu einer Herausforderung für die globale Gesundheit und gehört zu den sich am schnellsten verbreitenden Krankheiten mit pandemischem Ausmaß. Seit 1980 hat sich die Zahl der Betroffenen weltweit von 108 Millionen (entsprechend 4,7% der erwachsenen Weltbevölkerung) auf 422 Millionen Menschen (8,5%) im Jahr 2014 beinahe vervierfacht¹. Diabetes mellitus stellt damit die häufigste Stoffwechselerkrankung dar². Im Jahr 2012 starben weltweit 1,5 Millionen Menschen als direkte Folge des Diabetes mellitus³. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) prognostiziert, dass bis zum Jahr 2025 ca. 700 Millionen Menschen (11,6%) an Diabetes mellitus leiden¹ und Diabetes sich im Jahr 2030 zur siebthäufigsten Todesursache weltweit entwickeln wird⁴. Der Anstieg an Inzidenzen beruht zum großen Teil (40%) auf dem Bevölkerungswachstum und der demographischen Altersstruktur. 29% des Anstiegs ist allein aufgrund der erhöhten Prävalenz an Diabetes mellitus zu erkranken, bedingt. Die restlichen 31% des Anstiegs sind in beiden Ursachen begründet¹. Seit 1980 ist trotz verbesserter medizinischer Versorgung und vermehrter Erkenntnisse in keinem Land die Prävalenz für Diabetes gesunken¹.

Wesentliche Relevanz besitzen die mikro- und makroangiopathischen Folgeschäden bzw. Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus⁵. So ist die Inzidenz von Beinamputationen bei Diabetikern um ein Vielfaches höher als bei Nicht-Diabetikern⁶. Diabetiker haben ein erhöhtes Risiko zu erblinden^{7,8} und leiden häufiger an Niereninsuffizienz^{9,10,11}. Insbesondere stellt Diabetes mellitus einen unabhängigen, bis zu dreifach erhöhten Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar¹², welche im äußersten Fall in einem Herzinfarkt oder Schlaganfall resultieren. So liegt die Zahl der jährlichen Todesfälle bei Diabetikern aufgrund kardiovaskulärer Folgeerkrankungen bei über 2 Millionen¹³ und stellt somit, mit über 50% der Fälle, die häufigste Todesursache bei Diabetikern¹⁴ dar. Ischämische Herzerkrankungen mit 7,4 Millionen und Schlaganfall mit 6,7 Millionen Todesfällen stellen in der Gesamtpopulation die beiden häufigsten Todesursachen weltweit dar³. Neben Diabetes¹², Adipositas¹⁵, Hyperglykämie¹⁶ und Insulinresistenz¹⁷ sind andere Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen Dyslipidämie¹⁸, Hypertonie¹⁹ und das Rauchen²⁰. Die Risikofaktoren abdominale Adipositas, Insulinresistenz, Dyslipidämie und Hypertonie werden unter dem Begriff des metabolischen Syndroms zusammengefasst^{17,21,22}, wodurch die Korrelation und Interaktion zwischen Diabetes, Atherosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich wird.

Die sozialpolitisch bedingt, vor allem in ärmeren Ländern und Entwicklungsländern¹, gehäufte Inzidenz und Prävalenz an Diabetes mellitus, das gravierende ökonomische²³ und medizinische Ausmaß dieser Erkrankung und ihrer Folgeerkrankungen, aufgrund chronisch erhöhter Blutglucose-Konzentrationen, erfordern sowohl eine frühere Diagnostik, eine Prävention, eine verbesserte medikamentöse Senkung der Blutglucose-Konzentration als auch vermehrte Erkenntnisse über die Pathophysiologie und den Zusammenhang zwischen Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen.

In den Fokus der kardiovaskulären Forschung rückte dabei in den vergangenen Jahrzehnten, seit der Entdeckung im Jahr 1992 durch Dr. Patrick Vallance und Kollegen²⁴, das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA). Erhöhte Plasma-ADMA-Konzentrationen wurden bei mehreren Erkrankungen mit Bezug zum Herzkreislaufsystem festgestellt²⁵. Hohe Plasma-ADMA-Konzentrationen wurden dabei mit einer Erhöhung der Mortalität bzw. Verschlechterung der Erkrankung in Verbindung gebracht, so dass ADMA sich als unabhängiger Marker für kardiovaskuläre Ereignisse, wie Herzinfarkte oder Schlaganfälle, und Tod etabliert hat^{26,27,28}. Beim Diabetes mellitus gab es jedoch bisher widersprüchliche Erhebungen bezüglich der ADMA-Konzentration und -Wirkung. So existieren Studien, in denen sowohl erhöhte Plasma-ADMA-Konzentrationen^{29,30,31,32} als auch erniedrigte Plasma-ADMA-Konzentrationen³³ bei Diabetikern festgestellt wurden. Ungeklärt ist ebenfalls, in welcher Weise ADMA sich auf die Glucosehomöostase und Entwicklung einer Insulinresistenz bei Diabetikern auswirkt³⁴. In Betrachtung der Rolle von ADMA in der Entwicklung von Gefäßerkrankungen und dem Zusammenhang dieser mit Diabetes mellitus, ist das Ziel dieser Arbeit, die Erforschung der biochemischen Auswirkung von ADMA auf den Glucosemetabolismus und auf Insulin im diabetischen Zustand.

1.1 Diabetes mellitus

Als Diabetes mellitus wird eine Stoffwechselerkrankung bezeichnet, die durch eine gestörte Glucosehomöostase gekennzeichnet ist²². Die vom Körper angestrebte Blutglucose-Konzentration von 55-100 mg/dL (3,05-5,55 mmol/L) wird dabei überschritten. Maßgeblich verantwortlich ist hierbei entweder ein absoluter oder ein relativer Mangel des, den Glucosestoffwechsel regulierenden, Hormons Insulin²². Neben Somatotropin, das die Glucoseaufnahme der Zellen hemmt, Adrenalin und Glucagon, die die Gluconeogenese und Glucosefreisetzung stimulieren, ist Insulin das wichtigste Hormon für die Regulierung der Glucosehomöostase. Im Gegensatz zu den genannten Hormonen ist

Insulin auch das einzige, welches die Glucose-Konzentration im Blutkreislauf sinken lässt. Als Ursache für einen absoluten Insulinmangel wird die Zerstörung der β -Zellen der Langerhans Inseln des Pankreas und damit die weitgehende Einstellung der Insulinproduktion und -sekretion verstanden. Von einem relativen Insulinmangel wird gesprochen, wenn die Insulinproduktion bzw. -sekretion, den Bedingungen entsprechend, nicht mehr ausreicht. Eine verringerte Insulinsensitivität durch eine Abschwächung des Insulinrezeptorsignalwegs und damit einer abgeschwächten Wirkung des Insulins, beschreibt die Bedingung unter welcher der Bedarf an Insulin erhöht ist.

Das Ausbleiben bzw. die verminderte Wirkung des Insulins führt dazu, dass im Fettgewebe und in der Skelettmuskulatur, die aufgrund ihrer hohen Masse eine wichtige Rolle im Energiehaushalt einnehmen, die Glucoseaufnahme und damit der Glucosemetabolismus verringert werden. Die in der Leber durch Glucagon vermittelte Gluconeogenese und Glucosefreisetzung werden trotz der hohen Blutglucose-Konzentration nicht unterdrückt. Beide Mechanismen tragen zu einer erhöhten Blutglucose-Konzentration bei. Zu Beginn der Erkrankung äußert sich der verringerte Glucosemetabolismus, insbesondere nach einer erhöhten Glucosezufuhr, in einer postprandialen Hyperglykämie, die sich im Verlauf der Erkrankung zu einer chronischen Hyperglykämie entwickelt. Die Hyperglykämie spiegelt sich auch im Urin der Betroffenen wider, woher der Name „honigsüßer Durchfluss“ (aus dem griech.: Diabetes mellitus) herrührt. Die schwerste akute Form einer Stoffwechsellage, die eine gestörte Glucoseverwertung hervorrufen kann, ist das diabetische Koma. Sowohl das ketoazidotische Koma bei Typ I Diabetikern als auch das hyperosmolare Koma bei Typ II Diabetikern können lebensbedrohlich sein. Langfristig führt diese charakteristisch hohe Blutglucose-Konzentration zu Folgeschäden an den Blutgefäßen und den dadurch betroffenen Organen.

Ein wichtiger Aspekt des Diabetes mellitus sind die durch atherosklerotische Mikro- und Makroangiopathien verursachten vaskulären Folgeerkrankungen⁵, als Langzeitfolge des Diabetes. Als diabetesspezifische Mikroangiopathie wird die durch Mikroaneurysmen und kapillare Gefäßverschlüsse beeinträchtigte kapillare Versorgung verschiedener Organe verstanden. Diese kann sich vor allem als Neuro-, Retino-, und Nephropathie äußern. Diabetes ist dabei sogar einer der häufigsten Gründe für dialysepflichtige Niereninsuffizienz¹¹. Als Ursache der Neuropathie sind auch osmotische Zellschädigungen durch die hohe Glucose-Konzentration von Bedeutung. Zu den diabetesunspezifischen Makroangiopathien zählen periphere, zerebrale und koronare Durchblutungsstörungen, die unter dem Begriff der kardiovaskulären Erkrankungen zusammengefasst sind und in periphere arterielle Verschlusskrankungen, dem Schlaganfall und

koronaren Herzerkrankungen (Herzinfarkt) resultieren. Die Makroangiopathien entsprechen dabei der Atherosklerose, mit dem typischen Verschluss der versorgenden Arterien durch atherosklerotische Plaques bei Nicht-Diabetikern, wobei diese beim Diabetiker häufiger, früher und stärker ausgeprägt sind. Diabetes stellt einen wichtigen Risikofaktor für Atherosklerose³⁵ dar und begünstigt damit auch kardiovaskuläre Erkrankungen.

Diabetes zeichnet sich nicht nur durch eine Beeinträchtigung des Glucose- bzw. Kohlenhydratstoffwechsels aus, sondern bewirkt auch eine Beeinträchtigung des Eiweiß- und Fettstoffwechsels. So wird der Abbau von Eiweißen und Lipiden kompensatorisch erhöht. Die gesteigerte Lipolyse und der Anstieg freier Fettsäuren im Blut führen zur Bildung von Plaques in den Arterien. Außerdem ist durch die Begrenzung des Abbaus im Citratzyklus die Bildung von Ketonkörpern erhöht, wodurch das diabetische Koma initiiert wird. Insgesamt führt die verminderte Glucoseverwertung zu einer vermehrten Bildung von Lipoproteinen und Triglyceriden, welche die Entstehung von Atherosklerose weiter begünstigen.

Laut der Leitlinie der WHO²² sowie in vielen anderen nationalen und internationalen Leitlinien kann die Diagnose Diabetes mellitus gestellt werden, wenn einem der folgenden Kriterien bei zwei Messungen entsprochen wird:

- Hämoglobin A_{1C} (HbA_{1C}): $\geq 6,5\%$ (≥ 48 mmol/mol)
- Gelegenheits Plasma-Glucose-Konzentration: ≥ 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L)
- Nüchtern Plasma-Glucose-Konzentration: ≥ 126 mg/dL ($\geq 7,0$ mmol/L)
- 2 h-Wert des OGTTs im venösen Plasma: ≥ 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L)

Je nach Ursache wird Diabetes mellitus seit 1999 in vier Typen klassifiziert²²:

- Diabetes mellitus Typ I
- Diabetes mellitus Typ II
- andere spezifische Diabetestypen
- Gestationsdiabetes

Beim Typ I Diabetes, von dem 5-10% der Diabetiker betroffen sind, handelt es sich um ein absolutes Insulindefizit. Dieses wird hauptsächlich durch eine T-Zellen vermittelte Autoimmunreaktion ausgelöst und führt zur selektiven Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen der Langerhans Inseln des Pankreas³⁶. Dieser Diabetestyp manifestiert sich meist schon im jungen Alter und muss, da in kurzer Zeit keine Insulinproduktion mehr vorhanden ist, mit Insulinsubstitution behandelt werden.

Beim Typ II Diabetes, mit dem sich die Forschungsarbeit hauptsächlich befasst, handelt es sich um eine Insulinresistenz, die mit einer relativen β -Zell Insuffizienz (Insulindefizit) einhergeht und ca. 80-85% der Diabetiker betrifft. Diese Form ist überwiegend durch einen ungesunden Lebensstil mit langjähriger hochkalorischer Nahrungsaufnahme³⁷ und geringer körperlicher Betätigung³⁸, welche zur Adipositas führt, verursacht^{2,39}. Die erhöhte Glucosebelastung führt zu einer verminderten Glucoseverwertung und damit zu einer verminderten Insulinsensitivität⁴⁰. Die Insulinresistenz äußert sich durch eine verminderte Signaltransduktion der Insulinrezeptoren an den Zielzellen. Der Krankheitsverlauf ist progredient, aber verlangsamt und entfaltet sich schleichend von einer Insulinresistenz, in der die insulinsensitiven Zellen (Gewebe: Fett, Muskel, Leber) vermindert auf die hohe Insulinfreisetzung reagieren⁴¹, über eine kompensatorisch erhöhte Insulinfreisetzung zu einer daraus folgenden progredienten Abnahme der β -Zellfunktion, in der sich ein absoluter Insulinmangel einstellt⁴². Die Entwicklung der diabetischen Erkrankung verläuft dabei individuell über Jahre bis Jahrzehnte. Die Relation zwischen Adipositas und erhöhter Insulinsekretion⁴³ stellt in der Pathogenese des Diabetes einen wichtigen Schritt dar. Die Behandlung dieses Diabetestyps ist dementsprechend variabler und beinhaltet neben der Bekämpfung der Ursachen mit Sport und einer Nahrungsumstellung, die medikamentöse Behandlung mit Arzneimitteln, die die Insulinwirkung verstärken oder die Insulinsekretion erhöhen. Wenn sich ein absoluter Insulinmangel bzw. eine starke β -Zell Insuffizienz eingestellt hat, muss auch der Typ II Diabetes mit Insulinsubstitution behandelt werden.

Unter anderen spezifischen Diabetestypen werden alle weiteren Formen des Diabetes mit verschiedenen Ursachen zusammengefasst. Ein beeinträchtigter Glucosestoffwechsel kann unter anderem durch Erkrankungen des exokrinen Pankreas, wie z. B. Pankreatitis oder zystische Fibrose, Medikamente, seltene genetische Defekte der β -Zellfunktion (z.B.: verschiedene Formen des juvenilen Diabetes, der bei Erwachsenen auftritt (aus dem engl.: maturity onset diabetes of the young, MODY^{44,45})) oder Insulinwirkung (z.B.: Leprechaunismus^{46,47} oder Rabson-Mendenhall-Syndrom^{48,47}) verursacht werden.

Eine weitere gesonderte Form ist der Gestationsdiabetes, der erstmalig in der Schwangerschaft auftritt. Bei Patientinnen mit Gestationsdiabetes erhöht sich sowohl das Risiko später an einem manifesten Diabetestyp zu erkranken^{49,50} als auch das Risiko zu einer Präeklampsie⁵¹. Die Behandlung von Gestationsdiabetes reduziert die Häufigkeit perinataler Komplikationen^{52,53}.

1.1.1 Insulin

Insulin ist ein Polypeptid-Hormon, das in den β -Zellen der Langerhans Inseln des Pankreas gebildet und von dort in die Blutbahn abgegeben wird. β -Zellen stellen 70% der Langerhans Inseln dar, die auch 20% α -Zellen besitzen, die Glucagon produzieren, den Antagonisten des Insulins. Insulin hat eine Molekularmasse von ca. 5 800 Da und besteht aus einer A-Kette mit 21 Aminosäuren und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren, die über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Die Insulinsekretion wird durch Inkretine, wie das glucoseabhängige insulinotrope Peptid (aus dem engl.: gastric inhibitory polypeptide, GIP) und das glucagonähnliche Peptid 1 (aus dem engl.: glucagon-like peptide-1, GLP 1), gesteigert und das ebenfalls in den Langerhans Inseln gebildete Somatostatin gehemmt.

Insulinsynthese

Zunächst wird das im Ribosomen der β -Zelle gebildete Präproinsulin im endoplasmatischen Retikulum zu Proinsulin mit einem C-Peptid und dann im Golgi-Apparat durch Abspalten des C-Peptids zu Insulin umgewandelt. Insulin wird als Hexamer an Zink gebunden in Vesikeln gespeichert und durch Exocytose mit dem C-Peptid in die Blutbahn sezerniert.

Insulinsekretion

Freie Fettsäuren, bestimmte Aminosäuren und vor allem erhöhte Blutglucose-Konzentrationen initiieren eine Insulinfreisetzung, die unter anderem von gastrointestinalen Hormonen (Inkretine) verstärkt wird. Die erhöhte Glucoseoxidation in der β -Zelle führt dabei zu vermehrter Adenosintriphosphat (ATP) Bildung und damit zum Schließen der ATP-abhängigen Kaliumkanäle. Die Permeabilität der Zelle für Kalium wird dadurch herabgesetzt, welches zu einer Erniedrigung des Ruhepotentials von -65 mV auf -30 mV führt. Durch die Depolarisation öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle, die zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration in den Zellen führt, wodurch die Exocytose ausgelöst wird und Insulin aus den Vesikeln freigesetzt wird.

Insulinwirkung/GLUT4

Insulin ist ein anabol und wachstumsfördernd wirkendes Hormon, das die akute Glucoseaufnahme und Glucoseverwertung der insulinabhängigen Zellen des Muskel- und Fettgewebes verbessert. Insulin wirkt an den Zielzellen am membranständigen Insulinrezeptor, welcher nach Wechselwirkung

mit Insulin eine Autophosphorylierung durchführt. Der Rezeptor kann nach Aufhebung der sterischen Hemmung der Tyrosinkinasedomäne, durch Konformationsänderung der cytoplasmatischen β -Untereinheit, die Eigenschaft einer aktiven Tyrosinkinase erlangen. Dadurch wird die Tyrosinkinasedomäne des Insulinrezeptorsubstrates 1 bzw. 2 (IRS 1 bzw. IRS 2) phosphoryliert und aktiviert. IRS 1 aktiviert über verschiedene Adapterproteine und Guanosintriphosphatasen (GTPasen) die Mitogen aktiviertes Protein (MAP) Kinase-Kaskade, wodurch die Genexpression, das Wachstum und die Differenzierung der Zelle stimuliert werden. In Muskel- und Fettzellen führt die Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne des Insulinrezeptors zur Rekrutierung und Translokation von präformiertem Glucosetransporter 4 (GLUT4) aus den cytoplasmatischen Vesikeln in die Zellmembran⁵⁴, die über zwei Signaltransduktionswege erfolgt. Zum einen wird über die Phosphorylierung des Casitas B Lymphomproteins (Cbl) und die Bindung der Adapterproteine CrkII und Cyanidin-3-glucosid (C3G) die GTPase Tc10 aktiviert, die die erforderlichen Veränderungen im Cytoskelett bewirkt. Zum anderen wird aktiviertes IRS 2 an die regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) gebunden. Die durch Phosphorylierung aktivierte PI3K phosphoryliert wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3). Die phosphatidylinositolabhängige Proteinkinase (aus dem engl.: phosphatidylinositol-dependent protein kinase, PDK) bindet wiederum an PIP3 und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Die PDK phosphoryliert die Proteinkinase B (AKT, PKB), die die Translokation des GLUT4 vermittelt. Dieser GLUT4 ist maßgeblich verantwortlich für die Insulin-induzierte Glucoseaufnahme. Neben dem GLUT4 gibt es weitere Glucosetransporter, die unabhängig vom Insulin, die Glucoseaufnahme in den Zellen regulieren. GLUT4 jedoch verstärkt die Glucoseaufnahme, so dass eine Senkung der Blutglucose-Konzentration erreicht wird.

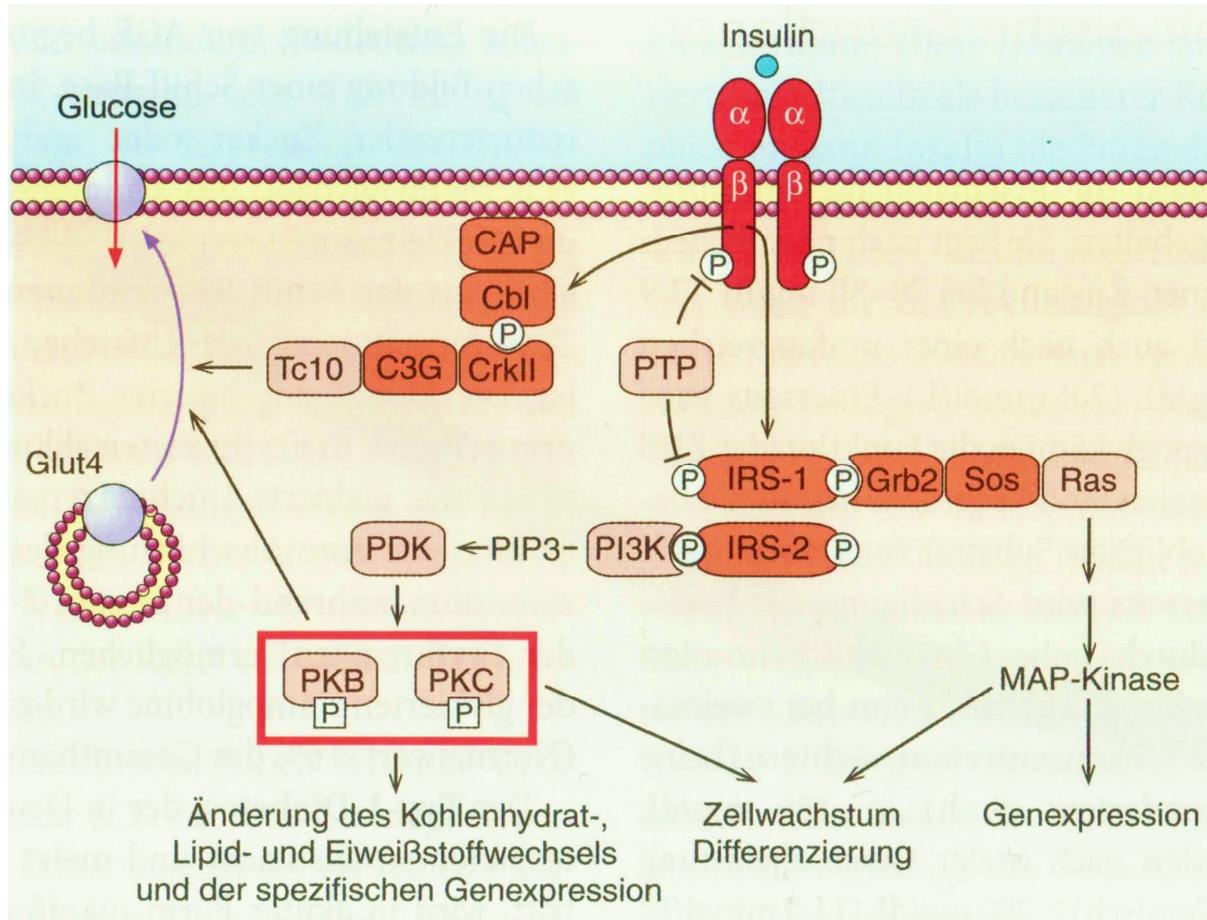


Abbildung 1: Insulinrezeptor und nachgeschaltete Insulinsignalkaskade

Der Insulinrezeptor ist ein Transmembranprotein, bestehend aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Bindet ein Insulinmolekül an den beiden extrazellulären α -Untereinheiten, so wird eine Konformationsänderung der beiden transmembranen β -Untereinheiten induziert. Die cytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne der β -Untereinheiten phosphoryliert (P) dabei die Tyrosinreste der gegenüberliegenden β -Untereinheit, wodurch die Tyrosinkinaseaktivität gesteigert wird. Des Weiteren werden durch die Konformationsänderung spezifische Bindungsstellen für die Adapterproteine IRS 1 und IRS 2 gebildet. Die Insulinrezeptorsubstrate werden an den Insulinrezeptor gekoppelt und von der Tyrosinkinasedomäne phosphoryliert. PI3K koppelt an phosphoryliertes IRS 2, wird dadurch aktiviert und phosphoryliert PIP₂ der inneren Plasmamembranschicht zu PIP₃. PIP₃ verbleibt in der Plasmamembran, bindet und aktiviert die PDK, die wiederum die Akt/PKB und Proteinkinase C (PKC) durch Phosphorylierung der Serin-Gruppe aktiviert. Die Aktivierung der Akt/PKB vermittelt die gesteigerte Translokation vom GLUT4 in die Plasmamembran, wodurch sich die Glucoseaufnahme der Zelle steigert. Die Translokation vom GLUT4 bedarf jedoch der zusätzlichen Aktivierung durch die GTPase Tc10, die die erforderliche Änderung im Cytoskelett bewirkt. Dieser Signalweg wird infolge der Phosphorylierung vom Cbl durch die Tyrosinkinasedomäne des Insulinrezeptors initiiert. Cbl bindet dabei nicht selbst an den Insulinrezeptor und wird daher vom Cbl-bindenden Protein (aus dem engl.: Cbl associated protein, CAP) an den Insulinrezeptor dirigiert. Cbl aktiviert über die Zwischenschaltung von den Adapterproteinen CrkII und C3G das Rohprotein Tc10.

Die Aktivierung von Akt/PKB und PKC bewirkt durch Aktivierung weiterer cytoplasmatischer Stoffwechsellzyme auch eine Anpassung des Kohlenhydrat-, Lipid-, und Eiweißstoffwechsels. Das phosphorylierte IRS 1 aktiviert über das Wachstumsfaktorrezeptor-gebundene Protein 2 (aus dem engl.: growth factor receptor bound protein 2, Grb2) und dem Guaninnukleotid Austauschfaktor Sos (aus dem engl.: son of sevenless, Sos) das Guaninnukleotid-bindende Protein des Rattensarkomavirus (RAS) und somit über die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade die Genexpression. Beide Mechanismen stimulieren zusätzlich Zellwachstum und Differenzierung.

Spezifische Phosphotyrosin-Phosphatasen (PTP) dephosphorylieren sowohl den Insulinrezeptor als auch die IRS und vermindern damit die Wirkung von Insulin.

Quelle: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; K. Aktories, U. Förstermann, F. B. Hofmann, K. Starke; 11. Auflage: 2013

Die Insulinrezeptoren an den Zielzellen sind im gesunden Zustand im Überschuss vorhanden. Ein Überangebot an Insulin kann zu einer regulatorischen Erniedrigung der nachgeschalteten Signalkaskade führen. Dieser Mechanismus beschreibt die Insulinresistenz, die bei Adipositas zu beobachten ist.

Des Weiteren steigert Insulin die oxidative Glucoseverwertung, stimuliert die Bildung von Fetten aus Glucose und hemmt die Umwandlung von Eiweißen zu Glucose in Leber und Muskel. In der Leberzelle führt Insulin zu vermehrter Glycogenbildung und verringertem Glycogenabbau und somit zur Bildung eines Glucosedepots. Im Fettgewebe wird durch Aktivierung plasmatischer Lipoproteinlipasen die Aufnahme freier Fettsäuren erhöht. Diese Fettsäuren werden in Triglyceride umgewandelt und im Fettdepot gespeichert. Dabei wird der Abbau von Glucose zu Acetyl-Coenzym A und die Umwandlung zu Triglyceriden vermehrt. Somit wird die Lipolyse und damit der Fettabbau und -mobilisierung sowohl im Fettgewebe als auch in der Leber gehemmt. Auch die Aufnahme von Aminosäuren in den Zellen wird durch Insulin verbessert. Durch jeden dieser genannten Mechanismen wird die Blutglucose-Konzentration erniedrigt und das Energiedepot aufgeladen.

1.2 Atherosklerose

Als Atherosklerose wird die morphologische Veränderung der Intima von Arterien bezeichnet, bei der die Arterien durch Ablagerung und inflammatorischen Reaktionen ihre Funktionalität verlieren. Das Endothel, als innerste Schicht der Arterien, verliert dabei die Fähigkeit sich dem verlängerten Kontakt mit Leukozyten und Monozyten zu widersetzen. Dadurch kommt es zur vermehrten Adhäsion, wobei die Monozyten in die Endothelschicht penetrieren und dort die Eigenschaft von Makrophagen annehmen. Oxidierte und glycolisierte Lipoproteine im Blut werden durch die Makrophagen internalisiert, wodurch es zur Bildung von Schaumzellen kommt. Dieser Vorgang wird durch eine verstärkte Immunreaktion und oxidativem Stress weiter begünstigt, so dass die Bildung sogenannter Plaques in den Blutgefäßen gefördert wird. Weitere zelluläre Bestandteile binden an diese, womit nicht nur die Funktion des Endothels gehemmt, sondern die Durchblutung der Arterien gestört wird, welches sich bis zum akuten Gefäßverschluss entwickeln kann.

Atherosklerose stellt somit das primäre Stadium kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Je nach Lokalisation kann dieses langfristig zu einem breiten Spektrum von peripheren, zerebralen und koronaren Durchblutungsstörungen führen. Primär ist dabei die Sauerstoffversorgung der betroffenen

Organe, wie das Gehirn und das Herz, gestört. Die verminderte Versorgung der Herzmuskulatur resultiert langfristig in einer Herzinsuffizienz. Ein akuter Verschluss der koronaren Gefäße äußert sich in einem Herzinfarkt und der der gehirnversorgenden Blutgefäße in einem Schlaganfall. Die beiden häufigsten Todesursachen der Welt³, ischämische Erkrankungen am Herzen und Schlaganfall, stellen solche Durchblutungsstörungen dar.

1.2.1 Die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO)

Der durch Prof. Dr. Salvador Moncada und Prof. Dr. Louis J. Ignarro als Stickstoffmonoxid (NO) identifizierte^{55,56} endothelabhängiger Gefäß-relaxierender Faktor (aus dem engl. endothelium derived relaxing factor, EDRF) ist besonders im Gefäßsystem von Bedeutung, da NO dort ein wichtiger endogener Mediator der vaskulären Homöostase⁵⁶ mit multiplen antiatherogenen Eigenschaften ist. So konnte schon 1980 durch Prof. Dr. Robert F. Furchgott und Kollegen gezeigt werden, dass der damalige EDRF bzw. NO die Erweiterung der Gefäße vermittelt⁵⁷. In der folgenden Zeit konnte gezeigt werden, dass NO die Aggregation von Thrombozyten⁵⁸, die Adhäsion von Monozyten⁵⁹, die Proliferation der glatten Muskelzellen⁶⁰ und die Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (aus dem engl.: low density lipoprotein, LDL)⁶¹ verhindert. Außerdem besteht eine Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (aus dem engl.: reactive oxygen species, ROS)⁶². Eine verminderte Bildung und Wirkung von NO im Endothel wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet, die durch die verringerten vasodilatierenden, antiinflammatorischen und antithrombotischen Eigenschaften des NOs eine negative Auswirkung auf die Pathogenese der Atherosklerose besitzt⁶³. Andererseits kann NO als Mediator inflammatorischer Reaktionen⁶⁴ auch schädliche Eigenschaften besitzen⁶⁵. So wird eine schädliche Rolle von NO bei einer Sepsis diskutiert⁶⁶.

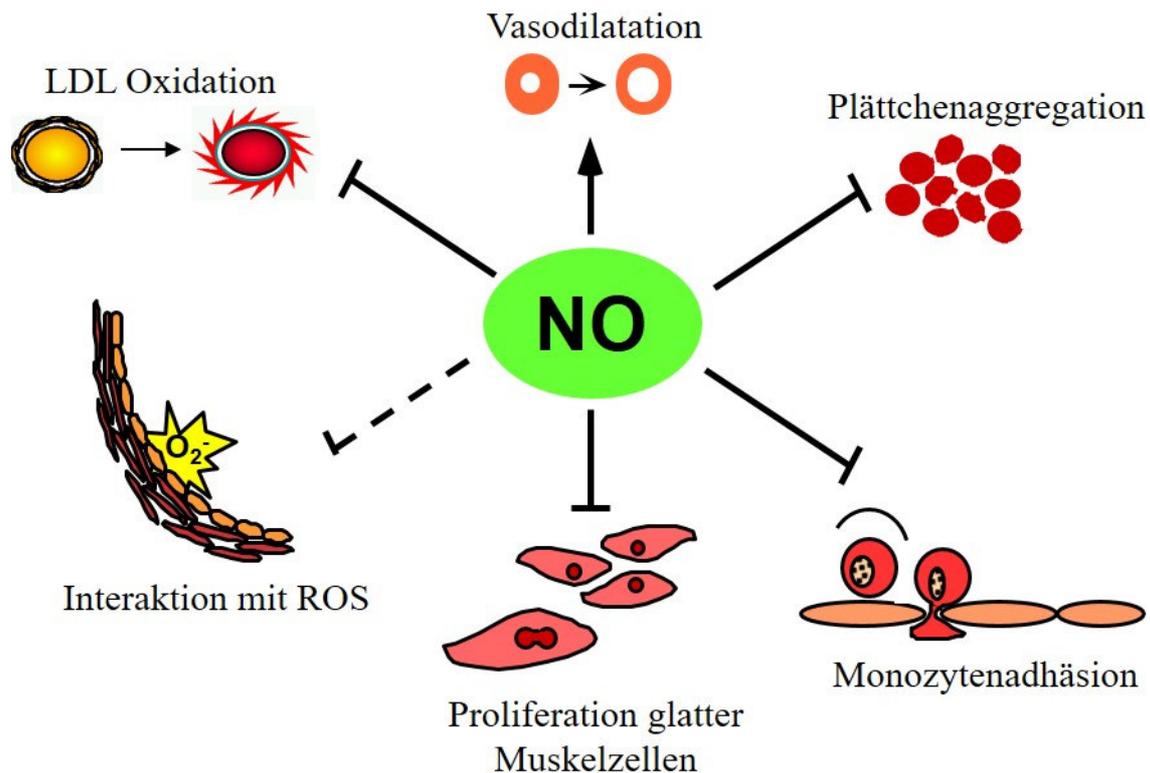


Abbildung 2: Eigenschaften vom Stickstoffmonoxid im Endothel

NO besitzt multiple protektive Eigenschaften im vaskulären System, wie die Dilatation der Gefäße und die Hemmung der Aggregation von Blutplättchen, der Adhäsion von Monozyten, der Proliferation glatter Muskelzellen und der Oxidation von LDL. Zusätzlich werden die positiven Eigenschaften einer Interaktion mit ROS diskutiert (gestrichelter Pfeil).

↑: Stimulierung, ⊥: Inhibition

Quelle: The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor; R. H. Böger; Cardiovascular Research 59: 2003

NO wird unter Abspaltung von L-Citrullin und H_2O durch die NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin freigesetzt^{67,68}. L-Arginin wird dabei durch verschiedene Kationentransporter (γ^+ Transporter), wie SLC7a1 und SLC7a2 in die Zelle aufgenommen⁶⁹. Bislang sind drei verschiedene Isoforme der NOS mit unterschiedlichen Expressionsmustern in verschiedenen Geweben bekannt. Die konstitutiv exprimierte, endotheliale NO-Synthase (eNOS) kommt dabei im namensgebenden Endothel vor. Die ebenfalls konstitutiv exprimierte, neuronale NO-Synthase (nNOS) wird vor allem im Nervengewebe gefunden. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird in den Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen exprimiert und kann im Zuge einer Immunreaktion auch in anderen Geweben induziert werden. Dadurch kann NO auch eine Cytotoxizität aufweisen, die durch Bildung exzessiver Mengen durch die iNOS verursacht ist⁷⁰. Die NO-Synthase wird mittels der Cofaktoren Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), Tetrahydrobiopterin (BH_4), Flavinadenindinukleotid, Flavinmononukleotid und Calmodulin vermittelt⁷¹.

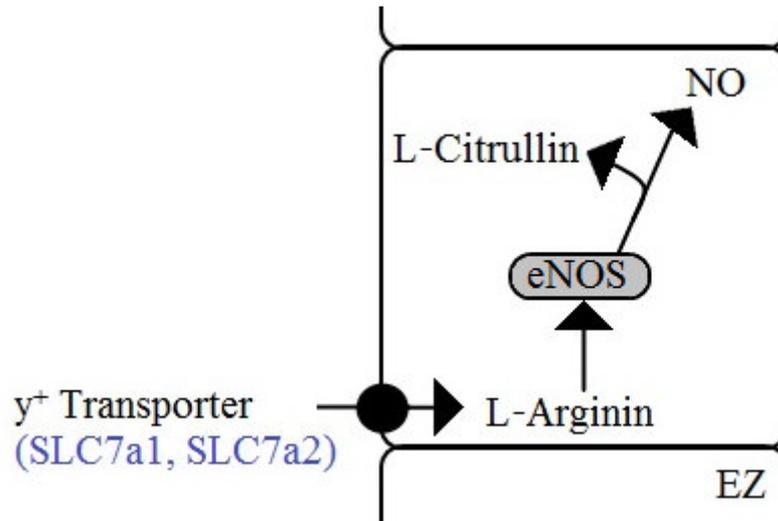


Abbildung 3: Transport und enzymatische Umsetzung von L-Arginin in der Endothelzelle (EZ)

L-Arginin wird durch y⁺ Transporter in die Endothelzelle aufgenommen, wo es durch das Enzym eNOS zu L-Citrullin und NO umgesetzt wird.

Die vasodilatierende und relaxierende Wirkung von NO im Endothel ist durch einen Anstieg der cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) Konzentration vermittelt^{72,73}. Dieser Anstieg verursacht eine Aktivierung der cGMP-abhängigen Signaltransduktion, die zur Vasodilatation führt.

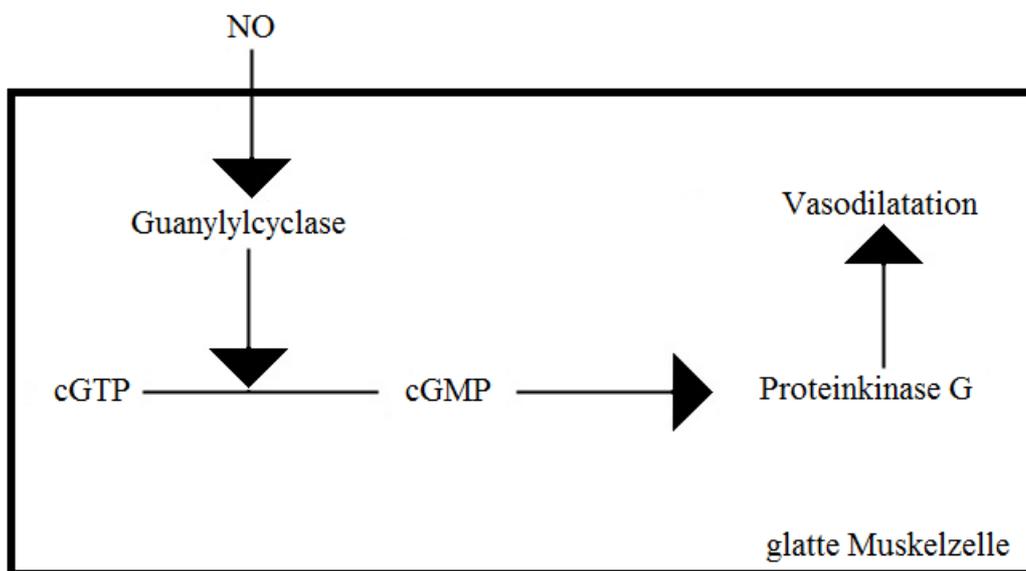


Abbildung 4: NO-vermittelte Vasodilatation in der glatten Muskelzelle

Nach der Diffusion in die Zelle der glatten Muskulatur aktiviert NO das Enzym Guanylylcyclase, welches die Umsetzung vom cyclischen Guanosintriphosphat (cGTP) zu cGMP katalysiert. Das cGMP aktiviert die Proteinkinase G, die über eine Signaltransduktion die Vasodilatation stimuliert.

1.2.2 Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)

ADMA ist ein im Körper gebildetes Derivat der Aminosäure L-Arginin. Aufgrund seiner Ähnlichkeit mit L-Arginin interagiert ADMA mit dem Transport und der enzymatischen Umsetzung von L-Arginin. Derivate des L-Arginins, wie ADMA und Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), können als kompetitive Inhibitoren der NOS die NO-Synthese hemmen^{24,74} und somit auch den Verlauf von atherosklerotischen Erkrankungen beeinflussen. Außerdem kann ADMA sowie das symmetrische Dimethylarginin (SDMA) durch eine Inhibition der Kationentransporter die zelluläre L-Argininaufnahme vermindern⁷⁵. Durch die kompetitive Inhibition der NOS kann ADMA die Menge an freigesetztem NO deutlich reduzieren und so zur endothelialen Dysfunktion führen.

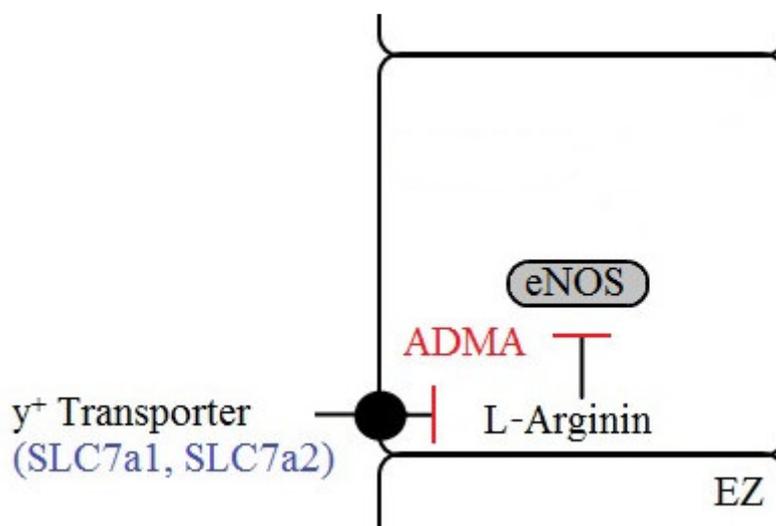


Abbildung 5: Interaktion zwischen ADMA und dem L-Argininstoffwechsel

ADMA hemmt sowohl den Transport von L-Arginin in die Endothelzelle als auch die enzymatische Umsetzung vom L-Arginin über die eNOS.

ADMA entsteht durch Methylierung von Protein gebundenem L-Arginin durch Enzyme aus der Familie der Protein-L-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs)⁷⁶. Nach der Proteolyse zirkuliert freies ADMA im Körper. ADMA wird enzymatisch durch die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)^{77;78} abgebaut oder direkt renal eliminiert²⁴. Von der DDAH sind bislang zwei Isoformen bekannt.

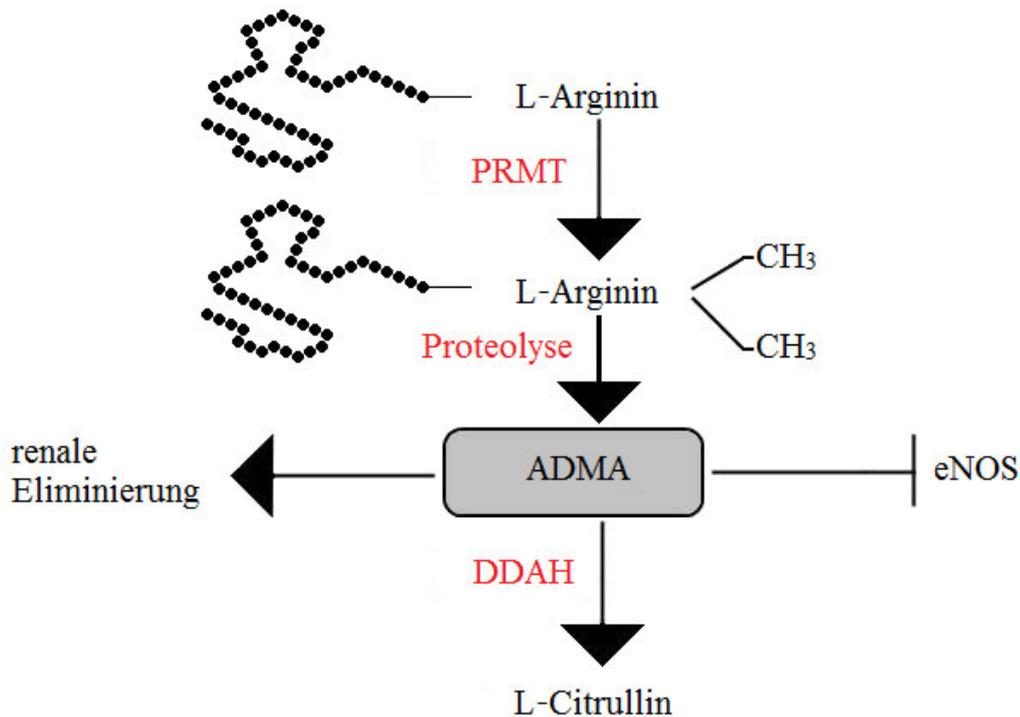


Abbildung 6: Biosynthese und enzymatische Umsetzung von ADMA

An Protein gebundenes L-Arginin wird durch die Enzyme PRMT methyliert, so dass bei der Proteolyse des Proteins ADMA freigesetzt wird. ADMA wird durch die Enzyme DDAH zu L-Citrullin metabolisiert oder renal ausgeschieden.

Klinische Studien haben gezeigt, dass eine hohe ADMA-Konzentration im Plasma auch mit einer hohen Wahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Ereignisse und Mortalität assoziiert ist²⁵. Erhöhte ADMA-Konzentrationen wurden in verschiedenen pathologischen Zuständen, wie unter anderem chronisches Nierenversagen²⁴, Hypercholesterolämie^{79,80,81}, Herzinsuffizienz^{82,83}, Hypertonie^{84,85}, koronare Herzerkrankungen⁸⁶, Schlaganfall⁸⁷ und Diabetes mellitus vom Typ II²⁹, beschrieben.

1.3 NO und ADMA beim Diabetes mellitus

Dass erhöhte Plasma-ADMA-Konzentrationen von klinischer Bedeutung sind, mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und auch Tod einhergehen, ist durch klinische Studien für viele Patientengruppen bereits gezeigt worden²⁵.

Die Bedeutung erhöhter Plasma-ADMA-Konzentrationen ist jedoch bei Patienten mit Diabetes mellitus nach wie vor ungeklärt. In verschiedenen Studien wurden sowohl erhöhte^{29,30,31,32}, unveränderte²⁶ als auch erniedrigte³³ ADMA-Konzentrationen bei Diabetikern festgestellt. Die Assoziation zwischen ADMA und Mortalität bei Diabetikern ist bisweilen widersprüchlich³⁴. Zum

einen wurden hohe ADMA-Konzentrationen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse verbunden⁸⁸. Zum anderen wurde in einer großen populationsbasierten Untersuchung, der Framingham-Offspring Studie²⁵, anders als erwartet, gezeigt, dass gerade bei dieser Patientengruppe der gegenteilige Effekt zu beobachten war. Während in der Patientengruppe ohne Diabetes das Mortalitätsrisiko mit höheren ADMA-Konzentrationen stieg, war bei Diabetikern diese Korrelation aufgehoben. Das Mortalitätsrisiko sank tendenziell sogar bei hohen ADMA-Konzentrationen.

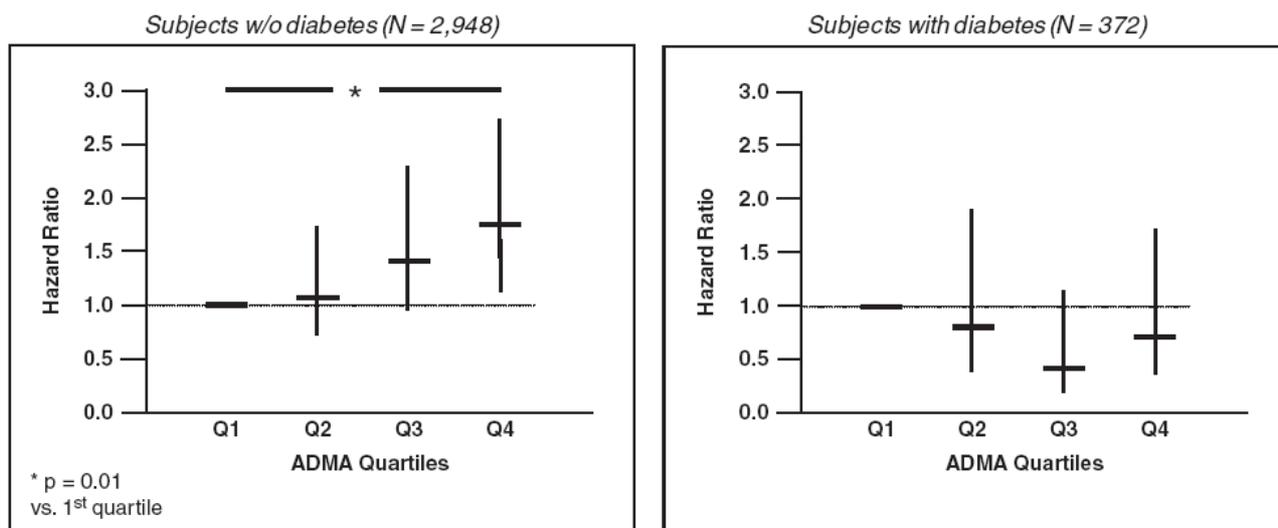


Abbildung 7: Relation zwischen Plasma-ADMA-Konzentrationen und Mortalität in der Framingham-Offspring Studie

Die Studienteilnehmer wurden in vier Quartile mit steigender Plasma-ADMA-Konzentration unterteilt (Q1-Q4). Während in der Patientengruppe ohne Diabetes das Quartil mit der höchsten Plasma-ADMA-Konzentration ein höheres Mortalitätsrisiko (Hazard Ratio) aufwies, war in der Patientengruppe mit Diabetes keine gesteigerte Sterblichkeitsrate in den Quartilen mit höherer Plasma-ADAM-Konzentration zu verzeichnen.

Quelle: Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and incidence of cardiovascular disease and mortality in the community; R. H. Böger, L. M. Sullivan, E. Schwedhelm et al.; Circulation 199: 2009

Dies führte zu Fragestellungen nach der Bedeutung von ADMA und NO bei Diabetes mellitus. Einerseits besitzt NO neben den antiatherogenen Eigenschaften einen positiven Einfluss auf die Glucoseaufnahme in insulinresistenten Muskelzellen⁸⁹. Bestätigt wird dieser Einfluss dadurch, dass in eNOS^{-/-}- und nNOS^{-/-}-Mäusen eine Insulinresistenz gezeigt wurde⁹⁰. Außerdem stellt eine hohe ADMA-Konzentration als Hemmstoff der NO-Produktion einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse dar, die wiederum im Bezug zu Diabetes stehen. Eine endotheliale Dysfunktion kann die Entstehung von Insulinresistenz durch eine verschlechterte kapillare Versorgung von insulinresistentem Gewebe mit Insulin begünstigen⁹¹.

Andererseits spiegeln diese Erkenntnisse eine physiologische NO-Produktion wider. Die für den Typ II charakteristische Adipositas und Insulinresistenz gehen mit einer chronisch subklinischen

Inflammation einher⁹². Eine verstärkte Expression der iNOS und eine exzessive NO-Produktion konnte bereits in diesem inflammatorischen Zustand bei Diabetikern gezeigt werden⁹³. Die verstärkte Expression der iNOS resultierte dabei in einer Schädigung der Muskelzellen und einer verschlechterten Insulinsensitivität. Diese pathologische Menge an NO führt zur Bildung reaktiver Nitrogenspezies (RNS), die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen⁹⁴. Experimentelle Arbeiten anderer Gruppen konnten bereits zeigen, dass der hierbei entstehende nitrosative Stress auch zur Nitrosylierung von Proteinen der Insulinrezeptorsignalkaskade, wie Akt/PKB⁹⁵ oder IRS 1⁹⁶ führt, wodurch die Insulinresistenz weiter gefördert wird⁹⁷. In diesem Zusammenhang wäre eine Inhibition der iNOS durch ADMA eine Möglichkeit den nitrosativen Stress und dessen Auswirkungen abzuschwächen.

Des Weiteren könnte die hohe Glucose-Exposition der Endothelzellen im diabetischen Zustand zu einer Entkopplung der eNOS führen⁹⁸. Bei der Entkopplung der eNOS ist die Oxidation von L-Arginin und Sauerstoff zu NO, H₂O und L-Citrullin aufgrund eines Mangels an Cofaktoren, wie BH₄ gestört, so dass nur noch Sauerstoff zu Sauerstoffradikalen oxidiert wird^{99,100}. Dadurch wird oxidativer Stress¹⁰¹ verursacht, welcher wiederum die Atherosklerose begünstigt. Durch die Hemmung der DDAH und Steigerung der PRMT beeinflusst oxidativer Stress direkt die ADMA-Konzentration¹⁰². Oxidativer Stress begünstigt auch die Entwicklung einer Insulinresistenz^{103,104}. Zusätzlich kann das exzessiv freigesetzte NO mit freien Sauerstoffradikalen zu Peroxinitrit reagieren¹⁰⁵, welches durch nitrosativen Stress eine Zelltoxizität aufweist¹⁰⁶. Dies führt zu einer verstärkten Beeinträchtigung von Proteinen und Enzymen, die nitrolysiert werden¹⁰⁵. Hinzu kommt, dass Peroxinitrit einen essentiellen Cofaktor der eNOS, das BH₄, oxidiert. Der Substratmangel und der Mangel an Cofaktoren führen zur Entkopplung der eNOS¹⁰⁷. In diesem Kreislauf wäre eine Hemmung der NOS bis zu einem bestimmten Grad vorteilhaft.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Der Zusammenhang zwischen Insulinresistenz, Diabetes und chronischer Inflammation auf der einen Seite mit dem NO-Stoffwechsel und ADMA auf der anderen Seite ist weitgehend widersprüchlich. Der zugrundeliegende Mechanismus ist nach wie vor unklar, so dass das Ziel der Forschungsarbeit war, diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen und mögliche biochemische Mechanismen offen zu legen. Dabei wurde sich primär mit der Frage beschäftigt, ob und wie die Inhibition der NO-Synthese durch erhöhte Plasma-ADMA-Konzentrationen beim Diabetiker von Vorteil sein könnte.

In einem Diät-induzierten Adipositas (DIO) Tiermodell, in dem die für die DDAH1 codierende Gensequenz ausgeschaltet worden ist, sollte der Einfluss von erhöhten ADMA-Konzentrationen auf die Entwicklung von Adipositas und die Glucosehomöostase bestimmt werden. Dadurch konnte ermittelt werden, ob ADMA einen direkten Einfluss auf die Entstehung einer Adipositas und die Entwicklung einer Insulinresistenz besitzt und wie sich dieser auswirkt. Des Weiteren sollten die Insulinsensitivität und die Expression der iNOS in Fett- und Muskelzellen anhand von Gen- und Proteinexpressionsanalysen bestimmt werden.

Unterstützend wurde in in-vitro Untersuchungen der Frage nach der Auswirkung der iNOS-Induktion und ADMA auf die Glucoseaufnahme und die Insulinrezeptorsignalkaskade insulinsensitiver Zellen nachgegangen. Die Induktion der iNOS in Fett- und Muskelzellen wird dabei mit einem Cytokin-Cocktail, bestehend aus für die subklinische Inflammation charakteristischen Chemokine, ermöglicht.

Die Auswirkung der iNOS-Induktion und ADMA wurde auch in Insulin-produzierenden β -Zellen untersucht. Hierbei wurde der Einfluss auf die Sekretion von Insulin und allgemein auf die Viabilität der Zellen untersucht.

Zusammengefasst sollten folgende Fragen beantwortet werden:

Wie beeinflussen hohe ADMA-Konzentrationen die Entwicklung der Adipositas und die Entstehung der Insulinresistenz?

Wirken sich hohe ADMA-Konzentrationen auf die Glucosehomöostase aus und welcher Mechanismus liegt zugrunde?

Wie wird die Glucoseverwertung insulinsensitiver Zellen durch eine vermehrte Expression der iNOS verringert und wird sie durch ADMA beeinflusst?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Substanzen, Reagenzien, Puffer, Lösungen, Laborgeräte und sonstige Materialien sind im Anhang (s. Kapitel 6.1.1: Materialien) detailliert aufgelistet.

2.2 In-vivo Untersuchungen im Tiermodell

2.2.1 Versuchstiere und Genehmigung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche C57BL/6-Mäuse, bei denen die für die DDAH1-Expression zuständige Gensequenz ubiquitär ausgeschaltet wurde. Als Kontrolle dienten männliche Wildtyp-Geschwister, bei denen die DDAH1 vollständig exprimiert wurde. Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, um den Einfluss hormoneller Schwankungen zu minimieren. Die Tiere wurden in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) gezüchtet und dort gehalten. Die Untersuchung der DDAH1^{-/-}-Mäuse und die damit zusammenhängenden Versuche an Wirbeltieren wurden vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg unter der Nummer 15/11 genehmigt.

2.2.2 Die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-Knockout (DDAH1^{-/-}) Maus

Die im Tiermodell verwendeten DDAH1^{-/-}-Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. YingJie Chen generiert¹⁰⁸. Dafür wurde zunächst ein pGEM-Teasy-Vektor (Promega Co.) der 132 kb großen DDAH1-Gensequenz, bei der eine Neomycinresistenz und eine flox-Schnittstelle im Exon 4 eingeführt wurden, mittels homologer Rekombination kloniert. Danach erfolgte durch Elektroporation in embryonalen Stammzellen das Einbringen des Vektors in die Gensequenz der Tiere. Durch das Kreuzen der DDAH1^{flox/flox}-Mäuse mit Protamin-Cre transgenen Mäusen (The Jackson Laboratory) wurde der globale Knockout aufgrund der Elimination des Exons 4 während der Spermatogenese ermöglicht. Das Kreuzen dieser Männchen mit WT-Weibchen

ermöglichte die Generierung heterozygoter (het.) globaler DDAH1^{+/-}-Mäuse. In den homozygoten DDAH1^{-/-}-Mäusen des daraus gebildeten Inzucht-Stamms konnte durch das Fehlen des Exons kein funktionstüchtiges Protein gebildet werden.

2.2.3 Das Diät-induzierte Adipositas (DIO) Mausmodell

Das in den in-vivo Untersuchungen zum Generieren einer Insulinresistenz und somit auch eines diabetischen Zustandes verwendete Diät-induzierte Adipositas (aus dem engl.: diet induced obesity, DIO) Mausmodell, orientierte sich an einem von den Jackson Laboratory etablierten Mausmodell¹⁰⁹. Die verwendete Diät bestand aus einer erhöhten Kalorienzufuhr, die durch Gabe einer hochkalorischen Nahrung mit 60% Fettanteil erreicht wurde. Die Zusammensetzung des verwendeten EF R/M Futters (sniff Spezialdiäten GmbH) war dem von den Jackson Laboratory verwendeten D12492 (Research Diets Inc.) nachempfunden, wobei die Versorgung mit essentiellen Vitaminen und Spurenelementen gewährleistet war. Bei der Kontrollgruppe bestand die verwendete Nahrung aus einem Standardfutter mit 10% Fettanteil. Nachdem die Jungtiere drei Wochen durch das Muttertier ernährt wurden, wurden sie direkt der DIO-Gruppe entsprechend mit dem sniff EF R/M Futter bzw. in der Kontrollgruppe mit dem Standardfutter gefüttert. Um die Manifestation einer Adipositas bzw. einer Insulinresistenz zu überprüfen, wurden in regelmäßigen Zeitabständen das Gewicht und die Blutglucose-Konzentration der Tiere bestimmt. Des Weiteren wurden gleichzeitig Blutproben entnommen und in der 17. Woche ein oraler Glucose-Toleranztest (OGTT) durchgeführt. Nach einer einwöchigen Beobachtungsphase erfolgte die Tötung der Tiere, um die Organe für weitere Untersuchungen entnehmen zu können und die Funktionalität des Endothels in einem Organbad der Aortensegmente zu überprüfen.

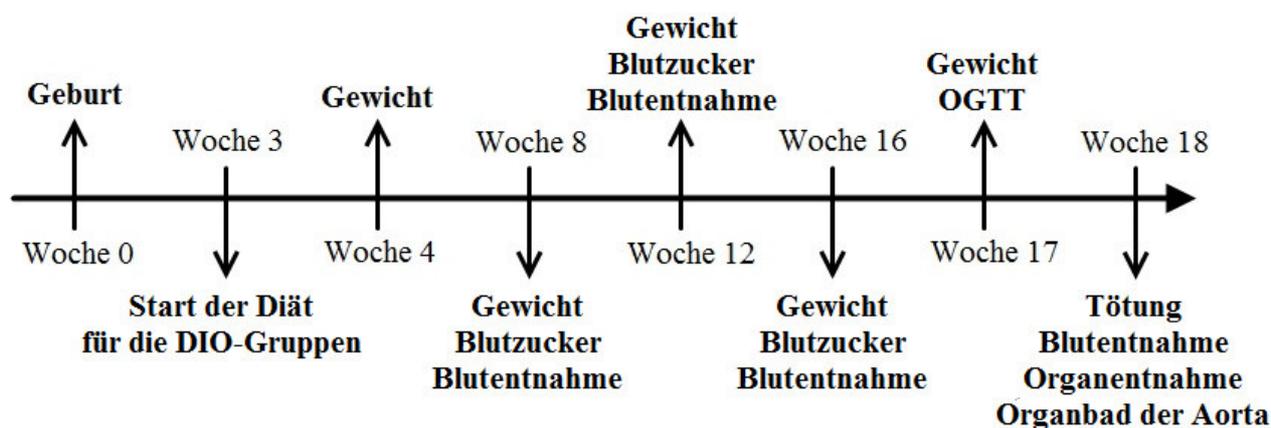


Abbildung 8: Zeitplan und Versuchsablauf des DDAH 1^{-/-}-DIO-Mausmodells

Der Zeitplan zeigt von links nach rechts die Reihenfolge der Untersuchungen jeder einzelnen Maus, beginnend mit der Geburt. Die erfassten Parameter, wie die Bestimmung des Gewichts oder des Blutzuckers, und Interventionen, wie der Start der Diät, sind mit dem Wochenalter der Tiere dargestellt.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

Bei der Arbeit mit den Versuchstieren wurden die Richtlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS)¹¹⁰ eingehalten. Alle Teilnehmer der Studie hatten den Felasa B Kurs absolviert. Die Tiere wurden bis zur 14. Woche hinter einer Barriere in der Tierhaltung des UKEs gehalten. In der 14. Woche erfolgte ein Transfer in die Forschungseinrichtung Campus Forschung des UKEs.

2.2.4.1 Präparation genomischer Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

Aus Mausschwanzbiopsien

Zur Bestimmung des Genotyps der Tiere und die darauf beruhende Einteilung in die jeweilige Knockout (KO) oder Wildtyp (WT) Gruppe der tierexperimentellen Untersuchungen, erfolgte zuvor die Isolierung genomischer Desoxyribonukleinsäuren (DNA) aus Biopsien der Mausschwanzspitze innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt.

Für die Genotypisierung wurden zunächst der Tail III-Puffer und der low Tris-Ethylendiamintetraessigsäure (lowTE) Puffer angesetzt (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2). Um das Gewebe zu lösen und die Nukleinsäuren freizusetzen, wurde die Biopsie in einem 2mL Mikroreaktionsgefäß in 500 µL des zuvor mit 20 µL 20 mg/µL Proteinase K versetzten Tail III-Puffers bei 56 °C und 700 rpm über Nacht auf einem Orbitalschüttler

(ThermoMixer® Compact, Eppendorf AG) inkubiert. Nach der Inkubation wurde durch Zugabe von 500 µL DNA-Isolierungsreagenz, die Nukleinsäuren isoliert und das Gemisch fünf Minuten über Kopf invertiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 1 mL absoluten Ethanol, zehminütigem über Kopf Invertieren des Gemisches und dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Die so gefällte DNA wurde bei 4 °C und 12 000 rpm 15 Minuten zentrifugiert (5415R, Eppendorf AG), der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 100 µL 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 12 000 rpm für 15 Minuten wurde der Überstand erneut verworfen. Zum Trocknen des DNA-Pellets, wurden die restlichen Ethanol Rückstände mit einem Wattestäbchen entfernt und durch 15 Minuten über Kopf Lagern des Mikroreaktionsgefäßes bei Raumtemperatur abgedampft, wobei immer darauf geachtet wurde, dass das DNA-Pellet nicht berührt wurde. Das DNA-Pellet wurde in 100 µL lowTE-Puffer resuspendiert und auf dem Orbitalschüttler bei 37 °C und 700 rpm für 30 Minuten wieder gelöst. Die Reinheit und die Konzentration der gelösten DNA konnten mittels eines Mikrovolumenspektralphotometers (NanoDrop™ ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc.) bestimmt werden.

Aus Gewebeproben

Eine Nachgenotypisierung zur Verifikation des Genotyps der Tiere erfolgte anhand aus Nierengewebe isolierter genomischer DNA. Dabei erfolgte die Präparation der DNA aus den Gewebeproben analog zur Präparation aus Mausschwanzbiopsien. Da das Gewebe sich schwerer als die Mausschwanzbiopsie im Tail III-Puffer löste, wurde vor der über Nacht Inkubation 50 mg Gewebe in einer Kugelmühle (Qiagen® Tissue Lyser, Retsch GmbH) bei einer Frequenz von 30 Hz zweimal für zwei Minuten zerkleinert und homogenisiert.

2.2.4.2 Genotypisierung der Versuchstiere anhand genomischer DNA

Die Bestimmung des Genotyps der Mäuse erfolgte in zwei Schritten. Der erste Schritt bestand aus einer Amplifikation der jeweiligen WT- und KO-Gensequenz der DNA mittels einer Polymerase Kettenreaktion (PCR). Der zweite Schritt bestand in der Visualisierung dieser Gensequenzen nach einer den Molekülgrößen entsprechenden Auftrennung mittels einer Agarosegel-Elektrophorese.

Polymerase Kettenreaktion

fDDAH1-WT	5'-AAT CTG CAC AGA AGG CCC TCA A-3'
rDDAH1-WT	5'-ATT GTT ACA AGC CCT TAA CGC-3'
fDDAH1-KO	5'-TGC AGG TCG AGG GAC CTA ATA ACT-3'
rDDAH1-KO	5'-AAC CAC ACT GCT CGA TGA AGT TCC-3'

Tabelle 1: Gensequenz der verwendete DDAH1-Primer zur Bestimmung des Genotyps

Für die WT- bzw. KO-Gensequenzen wurde zunächst für jede Probe je ein Master Mix mit den spezifischen Primer der Tabelle 2 entsprechend hergestellt, kurz durchmischt und zentrifugiert. Danach wurden die Master Mixe der Probenmenge entsprechend in 0,2 mL Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und jeweils 2 µL der Proben-DNA bzw. nH₂O als negativ oder eine positiv Probe dazugegeben. Es wurde nukleasefreies Wasser verwendet, um die von Ribonukleasen verursachte Spaltung von Einzelstrang-DNA zu unterbinden. Der Polymerase-Puffer ermöglicht eine optimale Salzkonzentration und pH-Wert Einstellung im Aktivitätsmaximum der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase, die bei 72 °C arbeitet. Die Polymerase benötigt für ihre Aktivität MgCl₂, das zusätzlich die Hybridisierung, die Stabilität der Einzelstrang-DNA und die Bildung von Primer-Dimeren beeinflusst.

	Volumen pro Probe [µL]
nH ₂ O	17,4
Taq-DNA-Polymerase-Puffer 10 ×	2,5
MgCl ₂ 25 mM	1,5
dNTPs 10 mM	1
Taq-DNA-Polymerase 5 000 U/mL	0,2
forward Primer	0,2
reverse Primer	0,2

Tabelle 2: Zusammensetzung des Master Mixes pro Probe für die DNA-Amplifikation

Im Thermozykler (Mastercycler® Epigradient, Eppendorf AG) wurde ein Programm zur Amplifikation der DNA-Sequenzen entsprechend Tabelle 3 ausgewählt. Dieses erfolgte in 35 Zyklen mit drei Phasen, wobei sich die entsprechenden DNA-Abschnitte bei jedem Zyklus theoretisch duplizierten. In der ersten Phase wurde die Doppelstrang-DNA bei 94 °C denaturiert, das heißt die Konformation der Doppelstrang-DNA spaltete sich in Einzelstrang-DNA auf, so dass die Primer sich in der zweiten Phase, der Hybridisierung, an den komplementären Zielsequenzen der nun

Einzelstrang-DNA anlagern konnten. In der dritten Phase, der Elongation, begann die Polymerase von den Primer-Sequenzen ausgehend, die komplementäre DNA durch Einsetzen der entsprechenden Nukleotide zu synthetisieren. Durch die Abbrüche an den Primer-Sequenzen wurde vermehrt allein die Sequenz zwischen den Forward und Reverse Primer dupliziert. Die Amplifikation der DNA-Gensequenzen konnte somit nach 35facher Wiederholung beendet und diese bei 4 °C gelagert werden.

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	120	35 ×
Denaturierung	94	20	
Primer-Hybridisierung	54,9	20	
Elongation	72	45	
Finale Elongation	72	300	

Tabelle 3: Temperaturprogramm der PCR

Agarosegel-Elektrophorese

Für den zweiten Schritt wurde zunächst ein 2% Agarosegel in 0,5 × Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure (TBE) Puffer (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2) unter Zugabe von Ethidiumbromid hergestellt. Das Agarosegel bildete somit ein engmaschiges Netz, welches die Wanderung von Molekülen in Relation zu ihrer Molekülgröße verlangsamt. Ethidiumbromid dient, wegen der Fähigkeit sich in die DNA-Doppelstränge zu interkalieren und dem Absorptionsmaximum im ultravioletten (UV) Bereich, zur Visualisierung der DNA im Agarosegel.

Dafür wurde zunächst das Gestell mit einem Kamm aufgebaut um spätere Probenaschen zu generieren, 3 g Agarose wurde in 150 mL 0,5 × TBE-Puffer gegeben und durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen auf ca. 50 °C und noch im flüssigen Zustand wurde 7,5 µL Ethidiumbromid zugegeben und die Lösung gemischt. Daraufhin wurde die Agarose-Lösung in das Gestell gegossen, um dort auszuhärten. Die amplifizierten Proben wurden währenddessen mit 5 µL 6 × Loading Dye beschwert und 5 µL dieser Lösung in die Probenaschen des Agarosegels aufgetragen. Ein Molekulargewichtsmarker mit bekannten DNA-Größen wurde zusätzlich aufgetragen und eine elektrische Spannung von 110 V angelegt, um die Proben der Größe nach für 90 Minuten aufzutrennen. Die Nukleinsäuren wanderten dabei aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung der Anode und wurden aufgrund von der Molekülgröße abhängigen

unterschiedlichen Geschwindigkeit getrennt. Nach der Elektrophorese konnte das interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert und fotografiert (ChemieGenius² Bio Imaging System, Synoptics Ltd.) und anhand des mitgelaufenen Markers die Molekülgröße der Gensequenz bestimmt werden.

2.2.4.3 Blutentnahme

Vor jeder Blutentnahme erhielten die Tiere sechs Stunden keine Nahrung, um die nüchternen Blutglucose- und Plasma-Insulin-Konzentrationen zu erhalten. Die Blutentnahme der Tiere in der 8., 12. und 16. Woche erfolgte submandibulär durch Punktion der Vena facialis im Unterkieferbereich mit einer Lanzette. Die Stauung der Vene erfolgte durch die Fixation am Nacken der Tiere, wodurch zusätzlich die Gesichtshaut zurückgezogen und die Einstichstelle 3 mm bis 4 mm dorsokaudal des Haarwirbels am Unterkiefer freigelegt wurde. Dadurch konnten bis zu 150 µL Vollblut entnommen werden, das in einem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Blutentnahmegefäß aufgefangen wurde.

Die finale Blutentnahme erfolgte in Woche 18 unter Narkose mit Isofluran. Unter der Betäubung wurde die Bauch- und Brusthöhle geöffnet und mit einer Spritze eine Punktion des Herzens durchgeführt und das so entnommene Blut in ein EDTA-Blutentnahmegefäß überführt. Der Tod trat dadurch in der Narkose ein.

2.2.4.4 Bestimmung der Blutglucose-Konzentration

Die Messung der Glucose-Konzentration erfolgte im Vollblut, welches den Tieren entnommen und in ein EDTA-Blutentnahmegefäß überführt wurde. Dabei wurde ein Teststreifen in ein Blutzuckermessgerät (Freestyle Lite, Abbott GmbH & Co. KG) eingeführt, ca. 0,5 µL des Vollblutes mittels einer Mikropipette aufgetragen und die Blutglucose-Konzentration konnte direkt am Gerät abgelesen werden.

2.2.4.5 Gewinnung der Plasmaproben

Die Gewinnung der Plasmaproben aus dem Vollblut erfolgte durch Zentrifugation (5424R, Eppendorf AG) der Proben bei 4 °C und 5 000 rpm für 20 Minuten zügig nach der Blutentnahme und der Blutzuckermessung. Der Überstand wurde mittels einer Mikropipette in ein neues

1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt und zur weiteren Untersuchung bei -80 °C gelagert, während der Blutkuchen entsorgt wurde.

2.2.4.6 Organentnahme

Bei der Entnahme der Organe erfolgte primär der schnelle Zugriff auf die Aorta, die unbeschädigt und möglichst als Ganzes entnommen und in einem auf Eis gekühlten Organbadpuffer gelagert wurde. Danach wurden Herz, Lunge, Niere, Leber, Pankreas, Muskelgewebe vom Oberschenkel, epididymales (weißes) Fettpolster und braunes Fettgewebe entnommen. Die Organe wurden alle in phosphatgepufferter Lösung (PBS) gewaschen, in einer Aluminiumfolie eingewickelt und in flüssigem Stickstoff eingetaucht um einen schnellen Einfrierprozess zu gewährleisten. Nach Überführung in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß wurde das Gewebe bei -80 °C gelagert.

2.2.4.7 Wägung der Fettpolster

Die Bestimmung des Gewichts der epididymalen Fettpolster erfolgte mittels einer Analysenwaage (CP 225 D, Sartorius AG). Nach der Entnahme wurden die Fettpolster zweimal in PBS gewaschen und kurz auf einem Zellstofftuch getrocknet. Ein kleiner Teil der Fettpolster wurde für eventuelle weitere Untersuchungen bei -80 °C eingefroren, während der restliche Anteil in 4% Formaldehyd konserviert wurde.

2.2.5 Oraler Glucose-Toleranztest (OGTT)

In der 17. Woche wurde bei den Tieren ein oraler Glucose-Toleranztest (OGTT) durchgeführt, um die Reaktion der β -Zellen auf Glucosezufuhr und insbesondere die Insulinsensitivität zu untersuchen. Bei der verwendeten Methode¹¹¹ wurden die Tiere mindestens sechs Stunden vor der Untersuchung nüchtern gehalten. Die Tiere wurden gewogen und das Volumen einer 20% Glucose-Lösung errechnet, um eine Dosis von 2 g Glucose pro kg Gewicht zu erreichen. Den Tieren wurde durch Punktion der Vene am Mausschwanz Blut entnommen, um die basale Glucose-Konzentration mittels eines Blutzuckermessgeräts (Freestyle Lite, Abbott GmbH & Co. KG) zu bestimmen. Mithilfe einer Magensonde wurde den Tieren das errechnete Volumen der Glucose-Lösung verabreicht. Es folgten weitere Blutzuckermessungen nach 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten durch Punktion der

Mausschwanzvene. Aus den ermittelten Blutglucose-Werten konnte ein Verlauf erstellt werden, welcher Rückschlüsse auf die Insulinsensitivität der Tiere ermöglichte.

2.2.6 Untersuchung der Kontraktion und Relaxation von Aortensegmenten im Organbad

Die Funktionalität des Endothels wurde mit einem Organbad der Aortensegmente überprüft. Die präparierten Aorten wurden an einer Apparatur aufgehängt in ein Bad eingelassen. Die Aorten kontrahierten durch Zugabe von vasokonstruktivem Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Die dabei auf die Apparatur ausgeübte Zugkraft, konnte mithilfe eines elektrischen Messgerätes bestimmt werden. Durch Zugabe von Acetylcholin (ACh) dilatierten die Aorten und durch die Messung der Kraftabnahme konnte die endothelabhängige Vasodilatation gemessen und verglichen werden.

Vor der Untersuchung wurden ein Organbad-Puffer, eine 2 M Kaliumchlorid-Lösung, eine 0,01 M Prostaglandin $F_{\alpha 2}$ ($PGF_{2\alpha}$) Lösung und eine 0,01 M Acetylcholin-Stammlösung, wie in Kapitel 6.1.1.2 beschrieben, hergestellt. Nach der Entnahme wurden die Aorten im Organbad-Puffer gewaschen und in einer Petrischale mit Organbad-Puffer auf Eis überführt und präpariert. Die Aorten wurden mit einer feinen Schere und einer Pinzette vom umliegenden Bindegewebe befreit, wobei unter Zuhilfenahme einer Lupe darauf geachtet wurde weder das Endothel noch das Muskelgewebe der Aorten durch starkes Zupfen, Schneiden oder mechanischem Druck zu beschädigen. Die Aorta wurde in zwei 4 mm lange Segmente geschnitten und mithilfe einer Insulinspritze und einer Kanüle durchspült, um etwaige Blutreste im Lumen zu entfernen. Zwei zu Triangeln geformte Metalldrähte wurden vorsichtig durch das Lumen geführt, um damit die Aorten an der Apparatur aufzuhängen.

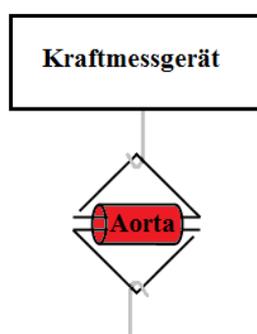


Abbildung 9: Aufhängung der Aortensegmente an den Drahttriangeln

Zwei Drahttriangeln wurden durch das Lumen der Aorta geführt und an die Apparatur aufgehängt. Eine Triangel wurde an eine feste unbewegliche Aufhängung montiert, die andere an ein Kraftmessgerät.

Die Triangeln wurden durch die Apparatur so weit auseinandergezogen, bis sich eine Spannung aufgebaut hatte. Die Gewichtskraft, die durch die Aorta ausgeübt wurde, konnte mittels eines Kraftmessgerätes (Isometric transducer, Kent Scientific Corporation) gemessen und in diesem Zustand tariert werden. Die Drahttriangeln wurden unter Beibehaltung der Spannung in 25 mL, auf 37 °C temperiertem, Organbad-Puffer eingetaucht, wobei dem Puffer kontinuierlich Carbongas (CO₂+O₂) zugeführt wurde, um in-vivo Bedingungen zu simulieren. Die ausgeübte Gewichtskraft wurde durch weiteres Auseinanderziehen der Triangeln, alle sieben Minuten in 0,2 g Schritten, auf einen Wert von 1,1 g erhöht. Nach weiteren sieben Minuten wurde durch die Zugabe von 1 mL 2 M Kaliumchlorid-Lösung die Aorta zur Kontraktion gebracht. Dadurch erhöhte sich die Spannung und dementsprechend die sich damit auswirkende Gewichtskraft. Würden die Aorten unter Zugabe von Kaliumchlorid nicht kontrahieren, wäre dieses ein Indiz für eine mechanische Beschädigung der Aorten. Jedoch traf dieses bei keiner der Aorten zu. Der Organbad-Puffer wurde daraufhin erneuert und wieder mit Kaliumchlorid versetzt, um die Funktionalität der Aorten zu bestätigen und diese auch ex-vivo zu konditionieren. Das Organbad und damit die Aortensegmente wurden zweimal mit dem Puffer durchspült und wieder in 25 mL Organbad-Puffer eingetaucht. Nach der Stabilisierung der Spannung bei 1,1 g wurde erneut 1 mL 2 M Kaliumchlorid-Lösung dazugegeben und ca. 20 Minuten gewartet, bis sich die Spannung wieder stabilisiert hatte. Dieser Vorgang wurde wiederholt und währenddessen eine Acetylcholin-Verdünnungsreihe (s. Kapitel 6.1.1.2) hergestellt. Nach weiteren 20 Minuten wurde 10 µL einer 0,01 M PGF_{2α}-Lösung dazugegeben und unter Umständen wiederholt, bis eine Gewichtskraft von 2,1 g erreicht wurde. Durch Zugabe der Acetylcholin-Verdünnungsreihe nach dem Schema in der Tabelle 4 erfolgte eine schrittweise Dilatation. Die Konzentration wurde in ca. zwei Minuten Intervallen, genau zu dem Zeitpunkt, zu dem sich nach dem Spannungsabfall ein Plateau eingestellt hatte, erhöht und die Gewichtskraft aufgezeichnet.

Konzentration ACh Lösung	Additive Zugabe ACh [μL]	Endkonzentration im Organbad [M]
10^{-6}	25	10^{-9}
10^{-6}	50	$10^{-8,5}$
10^{-5}	17,5	10^{-8}
10^{-5}	50	$10^{-7,5}$
10^{-4}	17,5	10^{-7}
10^{-4}	50	$10^{-6,5}$
10^{-3}	17,5	10^{-6}
10^{-3}	50	$10^{-5,5}$

Tabelle 4: Verabreichung der Acetylcholin (ACh) Verdünnungsreihe im Organbad

Nach zweimaligem Durchspülen mit dem Puffer, wurden die Aortensegmente wiederum in 25 mL Organbad-Puffer eingetaucht und 20 Minuten bis zur Stabilisierung der Spannung gewartet. Währenddessen wurde eine Nitroglycerin (NTG) Verdünnungsreihe (s. Kapitel 6.1.1.2) hergestellt. Nach der erneuten Zugabe von $\text{PGF}_{2\alpha}$ bis zum Erreichen einer Gewichtskraft von 2,1 g, wurde die Nitroglycerin-Verdünnungsreihe wie in Tabelle 5 beschrieben zugesetzt. Dabei wurden die Messung und die Zugabe erneut in 2 Minuten Intervallen durchgeführt, wenn sich die Gewichtskraft in einem Plateau befand.

Konzentration NTG Lösung [M]	Additive Zugabe NTG [μL]	Endkonzentration im Organbad [M]
10^{-6}	25	10^{-9}
10^{-6}	50	$10^{-8,5}$
10^{-5}	17,5	10^{-8}
10^{-5}	50	$10^{-7,5}$
10^{-4}	17,5	10^{-7}
10^{-4}	50	$10^{-6,5}$
10^{-3}	17,5	10^{-6}
10^{-3}	50	$10^{-5,5}$
10^{-2}	17,5	10^{-5}
10^{-2}	50	$10^{-4,5}$

Tabelle 5: Verabreichung der Nitroglycerin (NTG) Verdünnungsreihe im Organbad

2.2.7 Enzymgekoppelte Immunosorbenz Untersuchung von Insulin (Insulin-ELISA)

Die Messung der Insulin-Konzentration erfolgte aus den Plasmaproben der Tiere mit einer kommerziellen, enzymgekoppelten Immunosorbenz Untersuchung von Insulin (aus dem engl. enzymelinked immunosorbent assay, Insulin-ELISA) der Firma Mercodia AB, nach dessen Packungsbeilage die Lösungen und der Puffer angesetzt wurden und die Untersuchung durchgeführt wurde. Die Plasmaproben wurden dafür zunächst mit dem Kalibrator 0 im Verhältnis 1:1 verdünnt und jeweils 10 µL dieser Verdünnungen in einer Doppelbestimmung auf die mit Insulin-Antikörper beschichtete Platte vorgelegt. Die Kalibrator-Reagenzien mit den Konzentrationen 0,2 µg/L, 0,5 µg/L, 1,5 µg/L, 3 µg/L und 6,5 µg/L wurden ebenfalls in einer Doppelbestimmung aufgetragen. Das in den Proben enthaltene Insulin band sich dabei an den fixierten monoklonalen Insulin-Antikörper. Es wurde pro Well 100 µL Enzymkonjugat hinzugefügt und die versiegelte Platte auf einem Orbitalschüttler (MS1 Minishaker, IKA-Werke GmbH & Co. KG) bei 700 rpm zwei Stunden inkubiert. Während dieser Zeit band ein weiterer mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter monoklonarer Insulin-Antikörper an einen anderen Epitop des nun fixierten Insulins (s. Abbildung 10). Nach der Inkubation wurde die Platte sechsmal mit einem Waschautomaten (MRW AM60, Dynex Technologies GmbH) mit Überflussfunktion mit 700 µL Wasch-Puffer gewaschen und die restliche Flüssigkeit leicht auf einem Papiertuch abgeklopft, um überschüssigen Peroxidase-konjugierten Insulin-Antikörper zu entfernen. Nach Zugabe von 200 µL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten wurde die Reaktion mit 50 µL Stopp-Reagenz gestoppt. Das TMB diente dabei als Substrat für die Peroxidase, welches zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wurde und im Säuren zu einem gelben Farbstoff konvertierte.

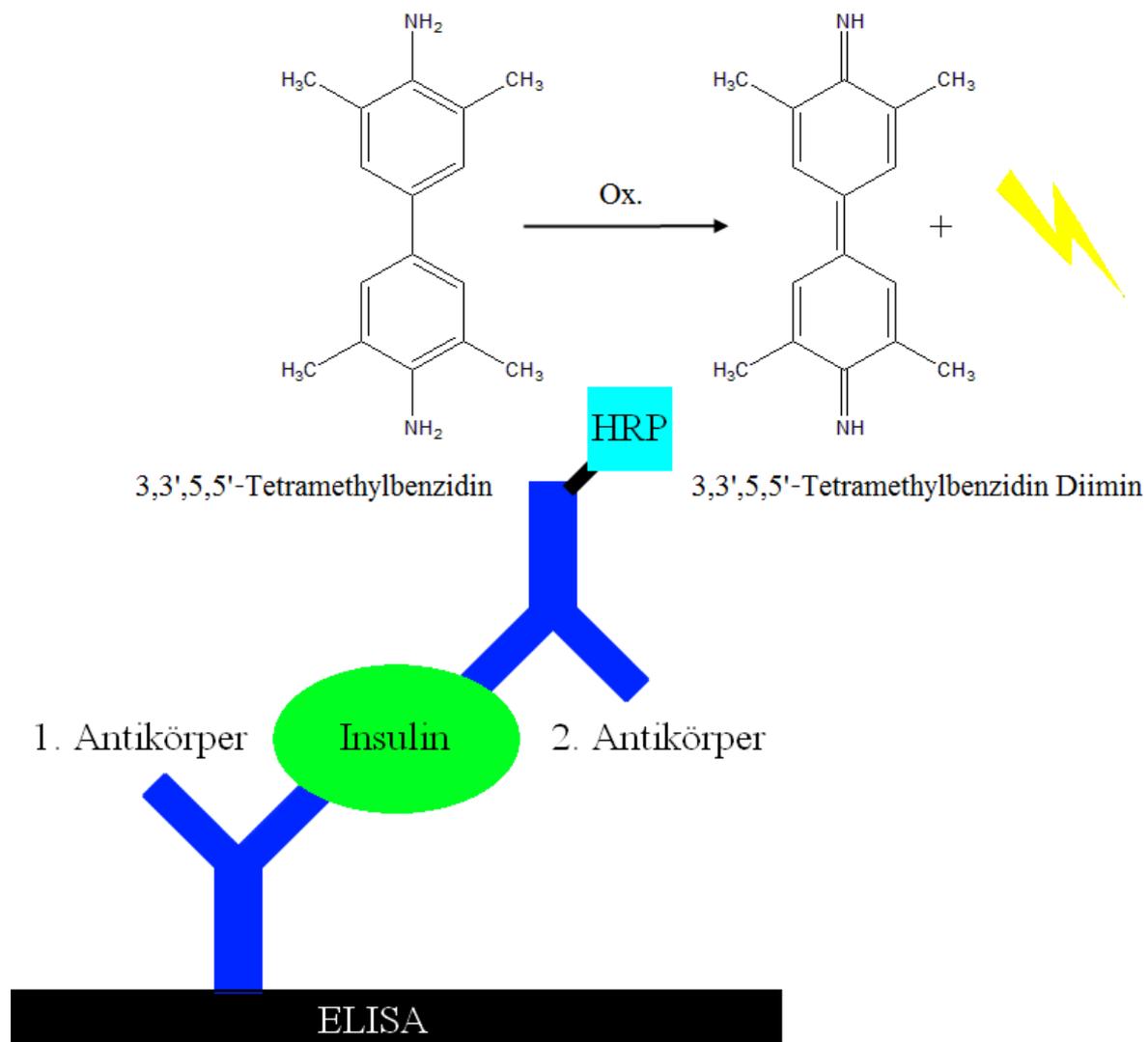


Abbildung 10: Insulin-ELISA mit Farbreaktion des TMB-Substrats

Die ELISA-Platte war mit dem ersten Antikörper beschichtet. Insulinmoleküle in den Proben banden an diesen Antikörper. Nach einem Waschschrift wurde ein zweiter HRP-konjugierter Antikörper dazugegeben, welcher an ein anderes Epitop des Insulins band. Nach Zugabe des Substrats TMB setzte die Peroxidase das TMB zum farbigen Diimin um.

Nach einer kurzen Durchmischung auf dem Orbitalschüttler konnte die Absorption bei 450 nm am Photometer (Safire²TM, Tecan Deutschland GmbH) innerhalb von 30 Minuten bestimmt und, durch die mittels polynomale Regression erstellte Kalibriergrade, die Insulin-Konzentrationen der Proben errechnet werden.

2.2.8 Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) Messung der Argininderivate in den Plasmaproben

Die Arginin-, ADMA-, und SDMA-Konzentration der Plasmaproben wurden nach einer chromatographischen Trennung mit einem Massenspektrometer gemessen. Dabei wurde eine an Dr. Edzard Schwedhelm und Kollegen¹¹² angelehnte etablierte Methode verwendet. Interner Standard, Kalibrier-Lösung, Qualitätskontrolle, 1 N butanolische Salzsäure, Proben-Puffer und 0,1 % Ameisensäure-Lösung wurden wie in Kapitel 6.1.1.2 beschrieben angesetzt. Zur Aufbereitung der Proben wurden je 100 µL eines methanolischen internen Standards in einer 96-Well-Filterplatte mit darunter positionierter 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. 25 µL der Plasmaproben wurden in einer Doppelbestimmung und 25 µL Kalibrier-Lösungen oder Qualitätskontrollen wurden in einer Dreifachbestimmung hinzu pipettiert und die Platte auf einem Orbitalschüttler (MS1 Minishaker, IKA-Werke GmbH & Co. KG) bei Raumtemperatur 15 Minuten geschüttelt. Dadurch wurden die enthaltenen Proteine durch Methanol gefällt. Danach erfolgte eine Zentrifugation (5415R, Eppendorf AG) bei 4 °C und 2 000 rpm für 10 Minuten. Die methanolische Phase wurde dabei eluiert und anschließend auf einem Heizblock (Dry Bath FB 15103, Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG) bei 75 °C vollständig abgedampft. Der Rückstand wurde wieder in 100 µL 1 N butanolischer Salzsäure gelöst und unter einer Abdeckmatte bei 65 °C für 30 Minuten inkubiert, wodurch die Aminosäuren zu Butylestern umgesetzt wurden und somit eine verbesserte chromatographische Retention der Analyten ermöglicht wurde. Die Platte wurde bei 4 °C und 2 500 rpm zentrifugiert und die restliche butanolische Salzsäure wurde auf dem Heizblock bei 75 °C eine Stunde lang abgedampft. Der Rückstand wurde dann in 100 µL Proben-Puffer aufgenommen, durch eine Klebefolie abgedeckt und auf dem Orbitalschüttler bei Raumtemperatur für 30 Minuten gelöst. Nach Überführung der Proben auf eine 96-Well-Filterplatte mit untergelagerter 96-Well-Mikrotiterplatte wurden die Proben erneut durch Zentrifugation bei 4 °C und 2 000 rpm für 5 Minuten filtriert, womit die Probenaufarbeitung abgeschlossen war und 12 µL des Filtrates injiziert werden konnte.

Bei der Flüssigchromatographie erfolgte die Trennung der Moleküle durch ihre unterschiedlichen Retentionszeiten, die sich aufgrund der Polarität der Polaris C18-Ether-Trennsäule ergaben. Die Argininderivate wurden dabei untereinander und von der biologischen Matrix getrennt.

Autosampler	Palo Alto, CA USA
HPLC System	Prostar Model 210
Trennsäule	Polaris C18-Ether (50 mm × 2,0 mm)
Mobile Phase	A: Acetonitril B: Ameisensäure 0,1 %
Flussmittelgradient	0:00 Minute: 95/5 0:30 Minute: 95/5 2:00 Minute: 50/50 2:20 Minute: 95/5 4:00 Minute: 95/5
Flussmittelgeschwindigkeit	0,3 mL/Minute
Messzeit	4 Minuten
Injektionsvolumen	12 µL

Tabelle 6: Chromatographische Parameter

Die Tandem-Massenspektrometrie (1200L Triple Quadrupole MS, Agilent Technologies Inc.) ermöglichte die Identifizierung und Quantifizierung der spezifischen Argininderivate. Nach der chromatographischen Trennung der Proben wurden diese durch einen Elektrospray-Interface (ESI) ionisiert.

System	Varian L1200 MS/MS
Software	Varian MS Workstation 6.9
Ionisierung	ESI positiver Modus (ESI+)
Kollisionsgas	Argon: 2Pa
Trägergas	Stickstoff: 90L/h

Tabelle 7: Parameter der Massenspektrometrie

Die zu bestimmenden Vorläuferionen wurden protoniert und im ersten Massenfilter (Quadrupol) selektiert. In einer Stoßzelle kollidierten diese Ionen mit Argonmolekülen, welche zu einer Fragmentierung führte. Die Stärke der Fragmentierung der Ionen wurde dabei von der Kollisionsenergie beeinflusst. Im zweiten Massenfilter wurden dann bestimmte Fragmente erneut selektiert, welche dann im Detektor erfasst werden konnten.

Derivat	Vorläuferion [m/Z]	Kollisionsenergie [eV]	Produktion [m/Z]	Messzeit [s]
L-Arginin	231,1	-22	70,0	0,02
L-[² H ₇]-Arginin	238,1	-22	77,0	0,02
ADMA	259,1	-16	214,1	0,35
SDMA	259,1	-14	228,1	0,35
[² H ₆]-ADMA	265,1	-16	220,1	0,35

Tabelle 8: Massenübergänge von Vorläufer- zum Produktion der Moleküle zur Identifizierung und Quantifizierung

Die Konzentration von Arginin, ADMA und SDMA in den Plasmaproben konnte anhand der Standardkurve durch das Peakflächenverhältnis mit dem internen Standard ermittelt werden.

2.3 In-vitro Untersuchungen in der Zellkultur

Alle Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, in sterilen Brutschränken (Heracell™ B 5050E, Heraeus Holding GmbH) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Die Untersuchungen der Säugetier-Zelllinien¹¹³ wurden unter aseptischen Bedingungen¹¹⁴ unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Bei allen Zelllinien handelt es sich um adhärenz- und fortlaufend geführte Zelllinien. Die Zellen wurden in 75cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und je nach Zellteilungsrate der Zelllinie regelmäßig passagiert. Für die Versuche wurden die Zellen in Zellkulturplatten überführt. Allen Medien wurden 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin zugesetzt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, um jegliche Kontamination zu verhindern. Alle Zusätze und Puffer wurden je nach Thermostabilität steril filtriert oder autoklaviert. Vor Gabe der Medien zu den Zellen, wurden alle Medien, wenn nicht anders angegeben, in einem Wärmeschrank auf 37 °C aufgewärmt.

2.3.1 3T3-L1-Adipozyten

Bei den 3T3-L1-Zellen handelt es sich um eine Subzelllinie der 3T3-Fibroblasten von Swiss Albino Mäusen, die erstmalig 1974 von Prof. Dr. Howard Green und Prof. Dr. Mark Meuth isoliert wurden. Diese Zellen differenzieren bei Zell zu Zell Kontakt zu insulinresistenten Adipozyten, die sich unter anderem durch Akkumulation von Lipiden kennzeichnen¹¹⁵. Zellen aus dem Fettgewebe, wie die 3T3-L1-Zellen, nehmen eine wichtige Funktion im Energiehaushalt des Körpers ein. Aus diesem Grund ist diese Zelllinie geeignet für die Untersuchungen in dieser Forschungsarbeit. Die Differenzierung der Zellen wird durch Zugabe von Insulin, Dexamethason und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) und einem hohen Serumgehalt im Medium beschleunigt und optimiert¹¹⁶.

Durch das Einsetzen der Differenzierung der Zellen bei interzellulärem Kontakt, wurden die Zellen nur bis maximal 60% Konfluenz im Kulturmedium (Dulbeccos modified eagle Medium mit 4,5 g/L Glucose (HG DMEM), 10% Kälberserum (CS) und 1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)) kultiviert und vor Erreichen dieser Konfluenz geteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage, wobei in der Regel bei jedem zweiten Mediumwechsel die Zellen im Verhältnis 1:4 geteilt wurden. Für die Versuche wurden 150 000 Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zur Konfluenz gehalten. Zwei Tage nach

Erreichen von 80% bis 100% Konfluenz, wurde das Medium für vier Tage auf das Differenzierungsmedium A (HG DMEM mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1 M HEPES und dem Zusatz von 1 µg/mL (~172 µM) Insulin, 0,25 µM Dexamethason, 0,5 mM IBMX, 252 µM Ascorbinsäure, 1 µM Biotin und 17 µM Pantothersäure aus den zuvor angesetzten Lösungen (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2)) geändert und alle zwei Tage gewechselt. Ab dem vierten Tag bis zur vollständigen Differenzierung am siebten Tag wurde das Differenzierungsmedium B (HG DMEM mit 10% FCS, 1 M HEPES, 1 µg/mL (~172 µM) Insulin, 252 µM Ascorbinsäure, 1 µM Biotin und 17 µM Pantothersäure) verwendet und alle zwei Tage gewechselt. Differenzierte Zellen wurden im Versuchsmedium (Dulbeccos modified eagle Medium mit 1 g/L Glucose (LG DMEM) und 10% FCS) für einen Tag nüchtern gehalten, ehe mit den Untersuchungen begonnen wurde.

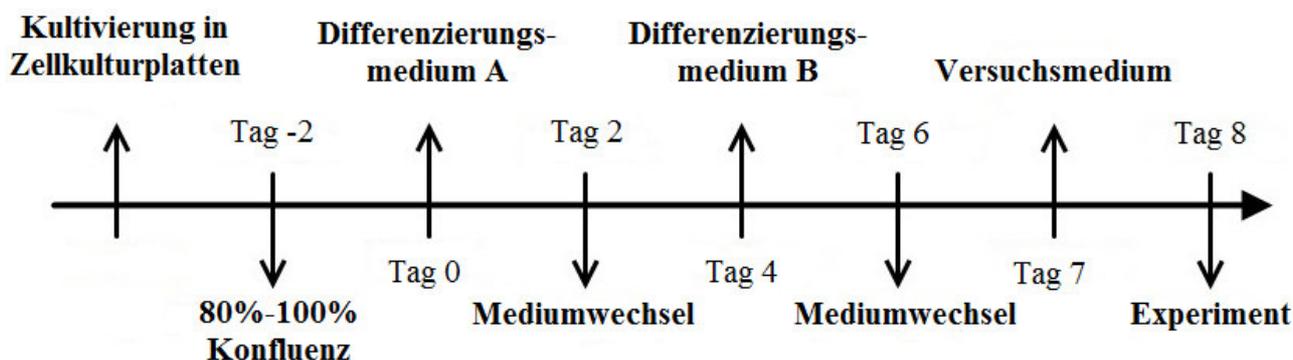


Abbildung 11: Zeitplan und Differenzierungsprotokoll der 3T3-L1-Adipozyten

Der Zeitplan zeigt von links nach rechts das Differenzierungsprotokoll der 3T3-L1-Zellen. Die Zellen wurden bis zur 80% bis 100% Konfluenz auf Zellkulturplatten kultiviert. Die anschließenden Änderungen der Medien und Zusätze zur optimalen Differenzierung sind mit den Zeitpunkten dargestellt. Das Differenzierungsmedium A bestand aus HG DMEM mit 1 M HEPES, 1 µg/mL Insulin, 0,25 µM Dexamethason, 0,5 mM IBMX, 252 µM Ascorbinsäure, 1 µM Biotin und 17 µM Pantothersäure. Das Differenzierungsmedium B setzte sich aus HG DMEM und den Zusatz von 1 M HEPES, 1 µg/mL Insulin, 252 µM Ascorbinsäure, 1 µM Biotin und 17 µM Pantothersäure zusammen. Als Versuchsmedium wurde LG DMEM mit dem Zusatz von 10% FCS verwendet.

2.3.2 C2C12-Myozyten

Die C2C12-Zelllinie wurde erstmals 1977 von Dr. David Yaffe und Dr. Ora Saxel¹¹⁷ beschrieben. Die Myoblasten entstammen ursprünglich C3H-Mäusen und differenzieren bei Zell zu Zell Kontakt über Myotuben zu Myozyten. Diese Muskelzellen verhalten sich wie die Adipozyten insulin sensitiv und eignen sich dadurch für Untersuchungen in Hinsicht auf die Rolle von Insulin.

Durch die Differenzierung der Zellen bei Zellkontakt wurden sie auch nur bis maximal 60% Konfluenz im Kulturmedium (HG DMEM mit 20% FCS) kultiviert und vor Erreichen dieser Konfluenz geteilt. Die Kultivierung fand bei 8% CO₂-Gehalt statt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage, wobei in der Regel bei jedem zweiten Mediumwechsel die Zellen im Verhältnis 1:4 geteilt wurden. Für die Versuche wurden 100 000 Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zur Konfluenz gehalten. Beim Erreichen der 80% bis 100% Konfluenz wurde das Medium auf Differenzierungsmedium (HG DMEM mit 2% Pferdeserum (HS) und dem Zusatz von 1 µg/ml Insulin) geändert und täglich für vier Tage bis zur vollständigen Differenzierung gewechselt. Differenzierte Zellen wurden im Versuchsmedium (LG DMEM mit 0,5% Bovines Serum Albumin (BSA) (Herstellung beschrieben in Kapitel 6.1.1.2)) für einen Tag mit geringer Glucose-Konzentration kultiviert, ehe mit den Untersuchungen begonnen wurde.

2.3.3 HIT-T15-Zellen

Die HIT-T15-Zellen sind eine β-Zelllinie, die von Dr. Robert F. Santerre erstmalig beschrieben wurde und ihren Ursprung in den pankreatischen Inselzellen des syrischen Goldhamsters hat¹¹⁸. Die Zellen wurden im Kulturmedium (Roswell Park Memorial Institut Medium (RPMI) mit einer Supplementation von 10% FCS und 5% HS) kultiviert, wobei das Medium alle drei bis vier Tage gewechselt und die Zellen dabei einmal wöchentlich im Verhältnis 1:5 geteilt wurden. Für die Untersuchungen der Insulinsekretion wurden 1 000 000 Zellen in 1,8 mL Kulturmedium in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für die Untersuchungen der Viabilität wurden 60 000 Zellen in 270 µl Kulturmedium in 48-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Kulturmedium gehalten, bevor für die Untersuchungen der Insulinsekretion 0,2 mL und für die Untersuchungen der Viabilität 30 µL RPMI mit Cytokin-Cocktail, mit Cytokin-Cocktail und 10mM ADMA, mit 10 mM ADMA alleine oder ohne Zusätze als Kontrolle zugegeben wurde. Der Cytokin-Cocktail setzte sich dabei aus 100 ng/mL Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), 200 ng/mL Interferon γ (IFN γ) und 10 ng/mL Interleukin 1β (IL 1β) (Herstellung beschrieben in Kapitel 6.1.1.2) zusammen, so dass dieselben Endkonzentrationen wie in den Versuchen mit den C2C12-Zellen (s. Kapitel 3.2.2) erzielt wurden. Bei der Untersuchung der Insulinsekretion und bei der Untersuchung der Viabilität wurden die Zellen für 48 Stunden unter Versuchsbedingungen gehalten.

2.3.4 Zellexperimentelle Untersuchungen

2.3.4.1 Kultivierung der Zellen

Die dauerhafte Aufbewahrung der Zellen erfolgte bei -195 °C in der Gasphase von flüssigem Stickstoff. Bei dieser Temperatur kommt der Stoffwechsel der Zellen vollständig zum Erliegen, so dass diese langfristig gelagert werden können. Unter diesen Bedingungen ist die Lebensfähigkeit der Zellen gewährleistet und diese können nach dem Auftauen wieder vollständig verwendet werden. Zum Kultivieren wurde die Zellsuspension zügig bei 37 °C aufgetaut und in 5 mL des jeweiligen Kulturmediums überführt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur und 850 rpm zentrifugiert (Rotina 35 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG), der Überstand abgesaugt, die Zellen in 10 mL des Kulturmediums resuspendiert und in eine 75 cm^2 -Zellkulturflasche überführt.

2.3.4.2 Kryokonservierung der Zellen

Zur Konservierung der Zellen für eine dauerhafte Aufbewahrung wurden diese bei -195 °C eingefroren. Dafür wurden die Zellen einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche zunächst mit 10 mL PBS (Herstellung beschrieben in Kapitel 6.1.1.2) gewaschen und anschließend mit 5 mL $1 \times$ Trypsin/EDTA (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2) für ca. drei Minuten, bis die Zellen sich vollständig vom Flaschenboden abgelöst hatten, im Brutschrank inkubiert. Der Verdau wurde mit mindestens der zweifachen Menge des jeweiligen Kulturmediums gestoppt und die Zellen bei Raumtemperatur und 850 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wurden erneut in 5 mL Kulturmedium mit 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) oder bei den 3T3-L1 Zellen in 4 mL Cryo-SFM resuspendiert und in 1 mL Aliquoten in ein Kryogefäß überführt. Es folgte ein langsamer und gleichmäßiger Einfrierprozess (1 °C pro Minute) in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter, in einem -80 °C Gefrierschrank über Nacht. Anschließend erfolgte die Überführung der Kryogefäße in einen Stickstofftank mit flüssigem Stickstoff zur dauerhaften Aufbewahrung bei -195 °C .

2.3.4.3 Subkultivierung der Zellen

Die adhärennten Zellen teilen sich kontinuierlich und müssen je nach Zelltyp, Zellteilungsrate und Zellmetabolismus regelmäßig subkultiviert werden, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten und eine Differenzierung während der Kultivierung zu unterbinden. Für die Subkultivierung wurden die Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche zunächst mit 10 mL PBS (s. Kapitel 6.1.1.2) gewaschen und anschließend mit 5 mL 1 × Trypsin/EDTA-Lösung (s. Kapitel 6.1.1.2) für ca. drei Minuten, bis sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden abgelöst haben, im Brutschrank inkubiert. Der Verdau wurde mit mindestens der doppelten Menge des jeweiligen Kulturmediums gestoppt und die Zellen bei Raumtemperatur und 850 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wieder in 10 mL Kulturmedium resuspendiert. Für die weitere Kultivierung wurde die Zellsuspension mit Kulturmedium verdünnt und in neue 75 cm²-Zellkulturflaschen überführt. Für fortführende Untersuchungen wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer erfasst und entsprechend in Zellkulturplatten ausgesät.

2.3.4.4 Zählung der Zellzahl in einer Suspension

Die Bestimmung der Konzentration an Zellen in einer Suspension wurde mithilfe eines Häemocytometers nach Neubauer (Neubauer-Zählkammer, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) durchgeführt. Hierzu wurde ein angefeuchtetes Deckglas auf die Neubauer-Zählkammer gelegt, so dass sich konzentrische Newtonsche Ringe auf der Berührungsfläche bildeten. Anschließend wurde 10 µL der Zellsuspension an die Kante des Deckglases pipettiert, wobei die Suspension durch die Kapillarkraft in den Zwischenbereich der Zählkammer gesogen worden ist. Die Zellen in der Kammer wurden unter einem Mikroskop nach einem standardisierten Verfahren gezählt und darauf basierend die Zell-Konzentration der gesamten Suspension errechnet. Für die Untersuchungen konnte somit die erforderliche Zellzahl pro Well in die Platten pipettiert werden.

2.3.4.5 Zellaufschluss

Die Gewinnung der Proteine erfolgte in 6-Well-Zellkulturplatten nach Entnahme des Mediums durch das zweimalige Waschen der Zellen mit kaltem PBS (s. Kapitel 6.1.1.2). Die weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt, wobei den 3T3-L1- und den C2C12-Zellen 80 µL eiskalter Lysis-Puffer A (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2) pro Well und den HIT-T15-Zellen

100 μ L eiskalter Lysis-Puffer B (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2) pro Well zugegeben wurde. Im Lysis-Puffer wird die Zellmembran aufgebrochen und die Proteine freigesetzt. Durch Zugabe eines Proteaseinhibitors wird der Abbau der Proteine verhindert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Plattenboden mit einem Zellschaber wurden diese durch, die mittels zehnmalem Aufsaugen und Abgeben der Suspension mit einer Gr. 20 Kanüle an einer 1mL Spritze erzeugten, Scherkräfte vollständig lysiert. Nach Überführung in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß konnten die Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 4 °C und 12 000 rpm für 15 Minuten (5415R, Eppendorf AG) von den Proteinen getrennt werden. Die Proteine im Überstand wurden mittels einer Mikropipette in ein neues 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt, nach der Bestimmung der Protein-Konzentration aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.4.6 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford

Die von Dr. Marion M. Bradford entwickelte Methode¹¹⁹ wurde zur Bestimmung der Protein-Konzentration einer Lösung verwendet. Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau G-250 an die Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Dafür wurde das Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:4 mit PBS und die Proben im Verhältnis 1:29 ebenfalls mit PBS verdünnt. Nach der Herstellung einer 1 mg/mL Albumin-Lösung (s. Kapitel 6.1.1.2) wurde die Albumin-Lösung weiter mit PBS verdünnt, um eine Standardreihe mit den Konzentrationen 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL und 0,5 mg/mL zu erhalten. In einer transparenten 96-Well-Mikrotiterplatte wurden in einer Doppelbestimmung, pro Probe und Standardreihe, 100 μ L des verdünnten Bradford-Reagenzes vorgelegt. Durch Zugabe von 10 μ L der Proben bzw. der Standardreihe bildete das Reagenz einen Farbkomplex mit den Proteinen, der bei 595 nm photometrisch detektiert (Safire²™, Tecan Deutschland GmbH) werden konnte. Anhand der Standardreihe konnte die unbekannte Protein-Konzentration der Proben ermittelt werden.

2.3.4.7 Färbung von Adipozyten mittels Oil Red O-Reagenz

Um die phänotypischen Veränderungen der 3T3-L1-Adipozyten während der Differenzierung zu visualisieren, wurden diese mit dem roten Azofarbstoff Oil Red O nach einem Protokoll von Dr. Dalei Shao und Dr. Mitchell A. Lazar angefärbt¹²⁰. Oil Red O ist ein lipophiler Farbstoff, welcher sich in den lipidhaltigen Fetttropfen der differenzierten 3T3-L1-Adipozyten anreichert. Hierfür wurde

eine Oil Red O-Stammlösung (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2) hergestellt und diese im Verhältnis 3:2 mit ddH₂O verdünnt. Die Adipozyten wurden dreimal mit PBS gewaschen und nach einer zweiminütigen Inkubation mit 2,4 mL 60% Isopropanol mit 2,4 mL 4% Formaldehyd bei Raumtemperatur für eine Stunde fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 mL verdünnter Oil Red O-Lösung für 15 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit ddH₂O für 15 Minuten, wurde das restliche überschüssige Oil Red O durch kurzes Inkubieren mit 60% Isopropanol entfernt, so dass die angefärbten Öltröpfen unter dem Mikroskop (ProgRes® Speed SF Core 5, Jenoptik AG) fotografiert werden konnten.

2.3.5 Analyse der Protein-Expression (Western-Blot)

Die qualitative und quantitative Analyse der Protein-Expression unterteilt sich in drei Schritte. Im ersten Schritt werden die aus dem Gewebe oder Zellen gewonnenen Proteine auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch der Molekulargröße entsprechend aufgetrennt. Im zweiten Schritt findet die elektrophoretische Übertragung der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran statt. Der dritte und letzte Schritt besteht aus einem Immuno-Blot, bei dem die Proteine über eine Immunreaktion mit einem spezifischen Antikörper markiert werden, und der Detektion der markierten Proteine über eine Chemilumineszenzreaktion. Vor Beginn der Analyse wurden eine 50% Glycerin-Lösung, Lower-Tris-Puffer, Upper-Tris-Puffer, 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS), Proben-Puffer, Load-Mix, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) Elektrophorese-Laufpuffer, Transfer-Puffer, Ponceau S-Lösung, trisgepufferte Lösung (TBS), trisgepufferte Tween-Lösung (TBST) und eine Blockier-Lösung hergestellt (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2).

SDS-PAGE-Elektrophorese

Zur Herstellung des denaturierenden Polyacrylamidgels wurden die dafür benötigten Lösungen und Puffer zunächst separat auf Eis gelagert und ein Gestell mit einem vertikal angelegten Freiraum zwischen zwei Glasplatten aufgebaut. Das Polyacrylamidgel bestand aus zwei Komponenten, die voneinander getrennt in den Freiraum gegossen wurden und zwischen den zwei Glasplatten polymerisierten. Die untere Komponente war ein 10% Trenngel, welches wie in der Tabelle 9 beschrieben zuerst gemischt und nach Zugabe der Polymerisationsstarter N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED) und 10% APS in den Freiraum gefüllt wurde. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet um eine klare Abgrenzung dieser Phase zu

erreichen und eine Verdunstung zu vermeiden. Nach ca. 45 Minuten war das Polyacrylamidgel ausgehärtet und der Isopropanolüberstand konnte abgegossen werden. Daraufhin wurde als obere Komponente das Sammelgel (s. Tabelle 9) zusammengesetzt, gemischt und nach Polymerisationsstart auf das Trenngel in den Freiraum gegossen. Dabei wurde ein Kamm in die obere Komponente eingesetzt, um somit Probenaschen zu erhalten. Nach ca. 20 Minuten war das Polyacrylamidgel vollständig ausgehärtet und der Kamm konnte entfernt werden.

Gelzusammensetzung	Sammelgel 4%	Trenngel 10%
Glycerin 50% [mL]	1,29	3,1
Acrylamid 40% [mL]	0,2	1,55
Lower-Tris 4× pH 8,8 [mL]	0	1,58
Upper-Tris 4× pH 6,8 [mL]	0,5	0
TEMED [μ L]	2	3
APS 10% [μ L]	15	32

Tabelle 9: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

Die Glasplatten mit dem Polyacrylamidgel wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-PAGE-Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt.

Während der Polymerisation wurden die Proben vorbereitet. 5 μ L Probe enthielten 30 μ g Protein und wurden mit 2 μ L Load-Mix und 13 μ L Proben-Puffer zusammen pipettiert. Zur Denaturierung wurde dieses Gemisch für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und danach bei 4 °C und 13 000 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert (5415R, Eppendorf AG). Die Proben und der Molekulargewichtsstandard wurden in die Probenaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 80 V für ca. 15 Minuten gestartet, damit die Proben in das Sammelgel wandern, um sich dort zu konzentrieren. Die Elektrophorese wird bei 150 V 90 Minuten fortgeführt, um die Proteine der molekularen Größe entsprechend aufzutrennen.

Nasser Transfer der Proteine

Beim Western-Blot wurden die Proteine mittels Elektrophorese vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach der SDS-PAGE-Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel vom Trenngel entfernt. Das Trenngel wurde zusammen mit den Schwämmen, dem Filterpapier und der Nitrocellulosemembran im Transfer-Puffer äquilibriert und nach dem Schema der Abbildung 12 in einem Transferkäfig

angeordnet. Der Transferkäfig wurde in eine mit kaltem Transfer-Puffer gefüllte und mit einem Kühlakku bestückte Kammer gesteckt. Diese Elektrophorese wurde für zwei Stunden bei konstanter Spannung von 90 V durchgeführt, wobei nach einer Stunde der Kühlakku gewechselt wurde.

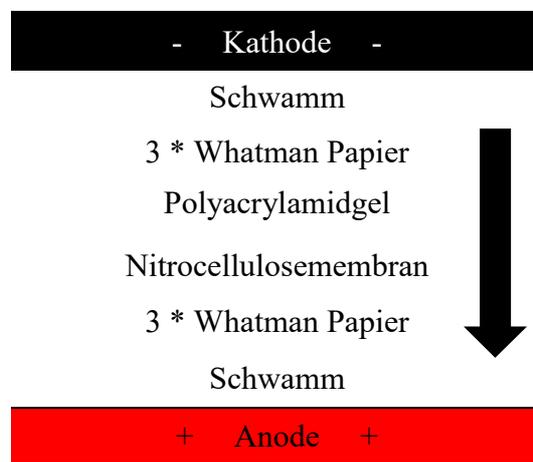


Abbildung 12: Anordnung der Komponenten in der Transferkammer für den Western-Blot

Die Proteine wandern bei der Elektrophorese von der Kathode zur Anode, so dass sie vom Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran übertragen werden.

Der erfolgreiche Transfer konnte anhand des sichtbaren Markers an der Nitrocellulosemembran verifiziert werden. Die Membran wurde dann fünf Minuten in ddH₂O äquilibriert. Durch die Färbung in einer Ponceau S-Lösung für zehn Minuten und mehreren kurzen Waschschritten in ddH₂O, wurden die Proteine sichtbar. Die Färbung diente auch der Überprüfung eines gleichmäßigen Transfers. Die Nitrocellulosemembran wurde dann in einer Weise geschnitten, dass die Bereiche mit den betreffenden Proteinen isoliert waren. Die mit Ponceau S gefärbte Nitrocellulosemembran wurden danach in TBST vollständig entfärbt.

Immuno-Blot (Western-Blot)

Für den Immuno-Blot wurde die Nitrocellulosemembran zuerst in 5% Blockier-Lösung auf einem Wippmischer (Duomax 1030, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Die Nitrocellulosemembran mit dem zu untersuchenden Protein wurde dann in einer 50 mL Zentrifugenflasche mit 5% Blockier-Lösung und dem antigenspezifischen primären Antikörper bei 4 °C unter Rotation mit einem Kipp- und Rollmischer (RM5 V-30, Ingenieurbüro CAT GmbH) über Nacht inkubiert. Durch dreimaliges Waschen in TBST für fünf Minuten wurde überschüssiger Antikörper entfernt und die Membranen erneut unter Rotation mit dem sekundären mit HRP-konjugierten Antikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die nicht

gebundenen Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen in TBST und einmaligem Waschen in TBS für jeweils fünf Minuten entfernt.

Die Nitrocellulosemembran wurde auf einem Papiertuch abgetupft und flächendeckend mit einem zuvor im Verhältnis 1:1 angesetzten Enhanced Chemielumineszenz-Reagenz (ECL) Gemisch beträufelt. Nach drei Minuten Inkubation konnten die Proteine mithilfe eines Chemilumineszenzdetektors (ChemieGenius² Bio Imaging System, Synoptics Ltd.) visualisiert und aufgezeichnet werden.

Antikörper	Lösungsmittel	Verdünnung	AK [μ L]	LM [mL]	2. Antikörper	MG [kDa]
Primärer Antikörper						
GLUT4	Blockier-Lösung	1:200	25	5	Rabbit	50-63
GAPDH	Blockier-Lösung	1:1000	5	5	Rabbit	37
Sekundärer Antikörper						
Anti-Rabbit	Blockier-Lösung	1:1000	5	5		

Tabelle 10: Verwendete Antikörper und Konzentrationen

2.3.6 Fluorometrische Messung der Nitrit-Konzentration im Überstand

Die Untersuchung der NO-Produktion der Zellen erfolgte indirekt über die Bestimmung der Nitrit-Konzentration im Zellüberstand. Aufgrund seiner reaktiven Eigenschaft ist NO nur kurz beständig, reagiert größtenteils zu Nitrit und Nitrat und ist daher nicht direkt messbar. Die Nitrit-Bestimmung lässt somit einen Rückschluss auf die NO-Konzentration zu und erfolgt im Überstand mithilfe eines modifizierten Griess Assays¹²¹.

Dafür wurden die eingefrorenen Proben auf Eis aufgetaut und kurz mit dem Vortexmischer geschüttelt. Eine 10 mM Natriumnitrit-Stammlösung (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2) wurde zunächst im Verhältnis 1:99 mit dem jeweiligen Versuchsmedium verdünnt, um eine 100 μ M Lösung zu erhalten. Eine Standardreihe wurde durch das weitere Verdünnen dieser 100 μ M Natriumnitrit-Lösung immer im Verhältnis 1:1 mit dem Versuchsmedium bis zur Konzentration von 1,56 μ M erhalten. Die 100 mM Diaminonaphthalin-Stammlösung (s. Kapitel 6.1.1.2) wurde unter Zusatz von Salzsäure, zu einer 1% Endkonzentration, mit ddH₂O im Verhältnis 1:9 versetzt. In einer Doppelbestimmung wurden jeweils 100 μ L der Proben und der Standardreihe in einer schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Jeweils 100 μ L der

Reagenz-Lösung wurden den Proben und der Standardreihe zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 100 μL einer 2 N NaOH-Lösung gestoppt und die Fluoreszenz mithilfe eines Fluorometers (Safire²TM, Tecan Deutschland GmbH) bei 355 nm Exzitation und 460 nm Emission gemessen. Anhand der Standardreihe konnten die Nitrit-Konzentrationen im Überstand errechnet werden.

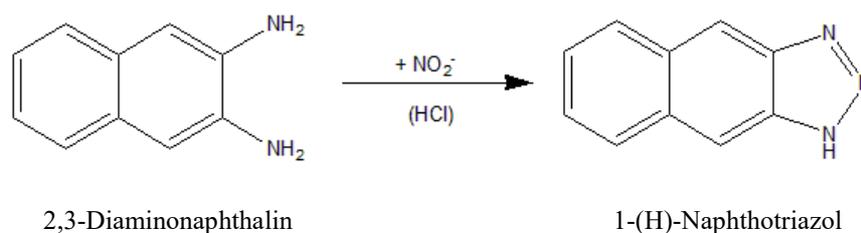


Abbildung 13: Reaktion von Nitrit mit Diaminonaphthalin

Das Substrat 2,3-Diaminonaphthalin reagiert mit dem Nitrit in den Proben zu fluoreszierendem 1-(H)-Naphthotriazol.

2.3.7 Untersuchung der ³H-Deoxy-D-Glucoseaufnahme

Die Untersuchung der Insulinsensitivität der Zellen erfolgte durch die Bestimmung der durch Insulin induzierten Aufnahme von ³H-Deoxy-D-Glucose in die Zelle nach einem Protokoll von Dr. Norio Yamamoto und Kollegen¹²². Deoxy-Glucose wurde dabei anstelle von Glucose verwendet, da es aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe nach der Aufnahme in die Zelle nicht weiter verstoffwechselt wird und daher detektiert werden kann.

Für die Untersuchung wurde zunächst das Inkubationsmedium, die 1 M Glucose-Lösung, die 1 mg/mL Insulin-Lösung und eine 100 mM Deoxy-Glucose-Lösung hergestellt (für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2). Die Zellen wurden mindestens vier Stunden vor Beginn der Untersuchungen im Hungermedium, bestehend aus LG-DMEM unter Zusatz von 0,5% BSA (s. Kapitel 6.1.1.2), inkubiert. Nach der Abnahme des Überstands wurden die Zellen dreimal mit 500 μL Inkubationsmedium gewaschen. Darauf folgte eine Vorinkubation der Zellen mit 975 μL Inkubationsmedium mit und ohne Zusatz von 100 nM Insulin bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt für 15 Minuten. Die Vorinkubation wurde nach Zugabe von 25 μL einer sterilen 1 M Glucose-Lösung für weitere 45 Minuten fortgesetzt, so dass sich die Glucose-Konzentration auf 25 mM erhöhte. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen wiederum dreimal mit 500 μL Inkubationsmedium gewaschen. Die Hauptinkubation erfolgte darauf mit 1 mL Inkubationsmedium unter dem Zusatz von 0,5 μL ³H-Deoxy-D-Glucose und 1 μL 100 mM Deoxy-Glucose-Lösung genau 5 Minuten lang bei

37 °C und 5% CO₂-Gehalt. Zum Verlangsamen jeglicher Zellaktivität wurden die Zellen dann auf Eis gestellt und dreimal mit 500 µL PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach dem letzten gründlichen Absaugen von PBS mit 1 mL 0,2 mM NaOH-Lösung für 40 Minuten bei 37 °C lysiert und anschließend mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgeschabt. Das Lysat wurde mit einer Pipette auf und ab pipettiert, in einem Mikroreaktionsgefäß überführt, mit einem Vortexmischer gemischt und bei Raumtemperatur und 12 000 rpm zentrifugiert (5415D, Eppendorf AG).

800 µL des Überstands wurden in ein Szintillationsbehältnis mit 3 mL vorgelegtem Szintillationslösungsmittel überführt und der Cherenkov-Zerfall in einem Szintillationsdetektor (Packard Tri-Carb 2900 TR, Perkin Elmer Inc.) gemessen. Die so erhaltenen Werte entsprachen der von den Zellen aufgenommenen Menge an ³H-Deoxy-D-Glucose.

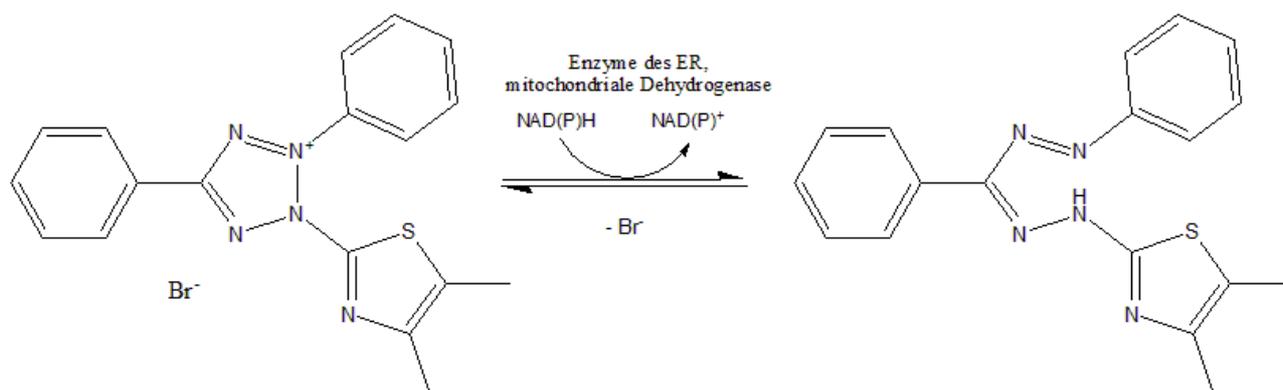
2.3.8 Insulin-ELISA

Die Messung des sezernierten Insulins im Überstand der HIT-T15-Zellen erfolgte entsprechend der Insulinmessung aus den Plasmaproben im Tierversuch (s. Kapitel 2.2.7), wobei ein ultrasensitives Insulin-ELISA verwendet wurde. Um Konzentrationen im Messbereich der Kalibrierung zu erheben, wurden die Proben dementsprechend im Verhältnis 1:49 verdünnt. Zusätzlich war ein Volumen von 25 µL anstelle von 10 µL pro Probe und Kalibrator-Reagenz nötig. Die Kalibrator-Reagenzien deckten die Konzentrationen von 0,025 µg/L, 0,075 µg/L, 0,2 µg/L, 0,5 µg/L bis 1,5 µg/L ab. Die Insulin-Konzentration im Überstand der Zellen wurden ins Verhältnis zur Protein-Konzentration der Zellen gesetzt.

2.3.9 Untersuchung der Viabilität

Um einen Rückschluss auf die toxische Wirkung des Cytokin-Cocktails bzw. den Anteil an lebenden Zellen während der Exposition mit den Cytokinen zu ziehen, wurde die Untersuchung der Viabilität mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Reagenz durchgeführt¹²³. Dafür wurde die MTT-Stammlösung (s. Kapitel 6.1.1.2) im Verhältnis 1:9 mit serumfreiem Medium verdünnt und auf 37 °C aufgewärmt. Nach Abnahme des Versuchsmediums wurden die Zellen mit 250 µL MTT-Reagenz versetztem Medium für zwei Stunden bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Während dieser Zeit wird das gelbe MTT hauptsächlich von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums und von mitochondrialen Reduktasen in Abhängigkeit der Cofaktoren

Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) zum violetten Formazan reduziert¹²⁴. Die umgesetzte Menge des Farbstoffes korreliert dabei sowohl mit der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und damit der Atmungskette als auch der Glycolyse¹²⁵ der Zelle und damit der Viabilität der Zellen.



3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan

Abbildung 14: Reaktion vom gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum violetten Formazan

Das gelbe MTT reagiert mittels Enzymen der mitochondrialen Dehydrogenase zum violetten Formazan.

Anschließend wurde den Zellen 250 μ L-Lysis-Puffer C (Für die Zusammensetzung s. Kapitel 6.1.1.2) zugegeben, womit die Farbe gelöst wurde und die Absorption bei 540 nm mit der Referenz bei 620 nm mittels eines Photometers (Safire²TM, Tecan Deutschland GmbH) gemessen werden konnte.

2.4 Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung und die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgten mit der Prism GraphPad Software. In den Graphiken wurde stets der arithmetische Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) abgebildet. Der statistischen Auswertung zwischen unabhängig voneinander erhobene Werten zweier Gruppen ging ein Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung voraus. Bei einer Normalverteilung wurde der zweiseitige t-Test zur statistischen Auswertung herangezogen. Konnte den statistischen Massen keine Gaußsche Normalverteilung konstatiert werden, wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test zur Auswertung ausgewählt. Die statistische Auswertung zwischen mehreren Gruppen in Abhängigkeit von der Zeit wurde, wenn nicht anders angegeben, mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (aus dem engl.: analysis of variance,

2way-ANOVA) erhoben und ein Bonferroni-Post-Test unter den einzelnen Gruppen angeschlossen. Von einer 2way-ANOVA wurde abgesehen und ein Mann-Whitney-Test durchgeführt, wenn eine Durchführung der Analyse aufgrund von fehlenden Daten nicht möglich war. Für alle Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 In-vivo Untersuchungen im Tiermodell

3.1.1 Genotypische und phänotypische Charakterisierung der DDAH1-defizienten Mäuse

Die Bestimmung des Genotyps der Tiere anhand aus der Mausschwanzspitze isolierter genomischer DNA diente der Zuordnung der Tiere in die entsprechende WT- bzw. KO-Gruppe. Darauf folgte eine weiterführende randomisierte Unterteilung der Tiere in die DIO- bzw. Non-DIO-Gruppe (Kontrollgruppe) des jeweiligen Genotyps.

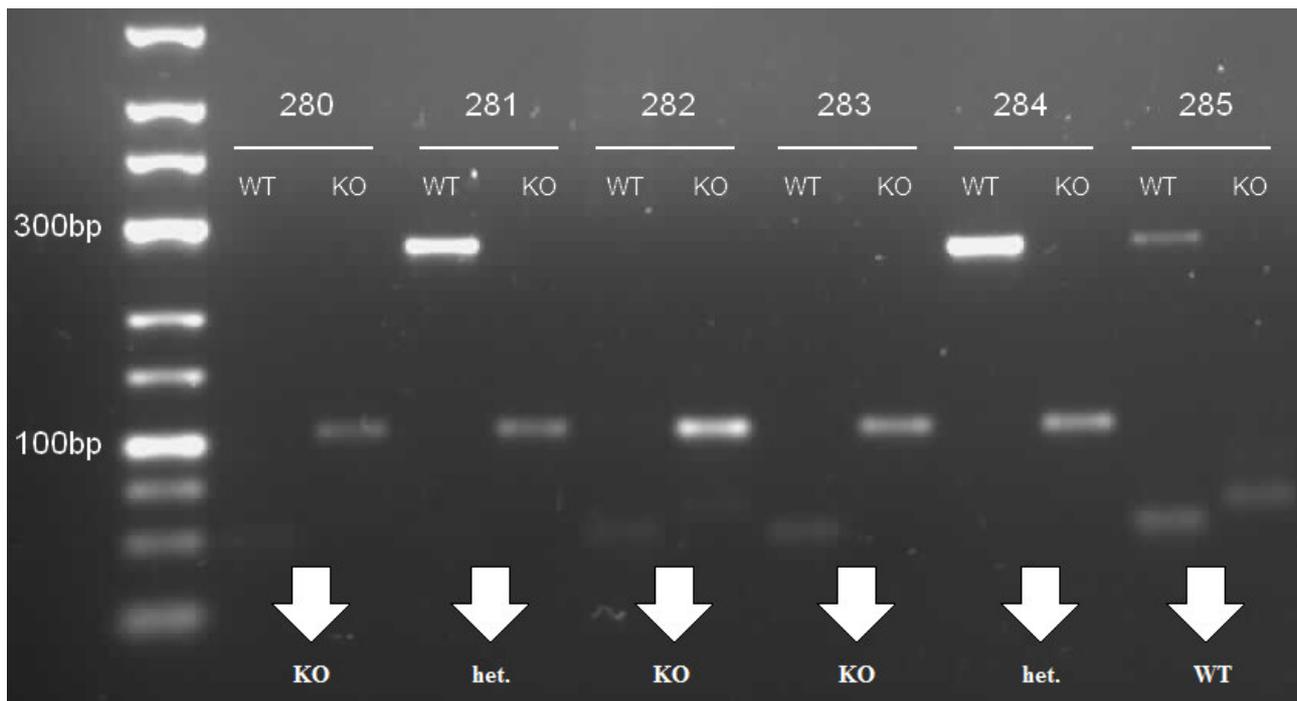


Abbildung 15: Exemplarische Aufnahme des Agarosegels zur Bestimmung des Genotyps

Nach Amplifikation der genomischen DNA-Proben mit den DDAH1-WT- bzw. DDAH1-KO-Primer, wurden die PCR-Produkte auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Beleuchtung und anhand des mitgelaufenen Markers war die WT-Gensequenz bei 270 bp bzw. die KO-Gensequenz bei 110 bp zu erkennen. Die DDAH1^{-/-}-Mäuse wurden chronologisch nummeriert (Eine Zahl entspricht somit einem Tier.) und die PCR-Produkte der Amplifikation mit der WT-Gensequenz und KO-Gensequenz der männlichen Tiere auf das Agarosegel aufgetragen. Die Bestimmung des Genotyps ist anhand der Pfeile zu erkennen: WT=DDAH1^{+/+}, het.=DDAH1^{+/-}, KO=DDAH1^{-/-}.

Erfolgte bei einer DNA-Probe ausschließlich die Amplifizierung einer 270 bp langen WT-Gensequenz, so wurde das Tier der WT-Gruppe zugeordnet. Äquivalent dazu wurde das Tier der KO-Gruppe zugeordnet, wenn ausschließlich die Amplifikation der 110 bp langen KO-Gensequenz zu detektieren war. Heterozygote Tiere, bei denen die Amplifikation beider Gensequenzen zu beobachten war, wurden genauso wie weibliche Tiere für die weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt. So ergab sich nach der randomisierten Unterteilung in die DIO- bzw. Non-DIO-Gruppe folgende Einteilung der Tiere:

DDAH1-WT		DDAH1-KO	
DIO-Gruppe	Non-DIO-Gruppe	DIO-Gruppe	Non-DIO-Gruppe
DDAH1-WT-DIO (WT+DIO)	DDAH1-WT-Non-DIO (WT-DIO)	DDAH1-KO-DIO (KO+DIO)	DDAH1-KO-Non-DIO (KO-DIO)
226	445	215	396
230	(453)	216	408
232	455	(227)	444
287	560	231	446
398	(561)	280	457
409	574	282	570
		283	585
		295	586

Tabelle 11: Einteilung der Tiere in zu untersuchenden Kohorten

Die Tiere wurden dem Genotyp entsprechend eingeteilt und weiterführend randomisiert der DIO-Gruppe oder der Kontrollgruppe zugewiesen. Jede Nummer entspricht einer Maus, die zur Identifikation chronologisch zugewiesen wurde. Bei den Tieren handelt es sich ausschließlich um männliche DDAH1-WT- bzw. DDAH1-KO-Mäuse. Tiere die aufgrund der Nachgenotypisierung von der Untersuchung ausgeschlossen wurden, sind in Klammern gesetzt.

Die Nachgenotypisierung anhand genomischer DNA der Niere diente zur Überprüfung der Zuordnung der Tiere. Der Genotyp der Tiere mit den Nummern 227, 453 und 561 konnte nicht bestätigt werden. Diese Tiere wurden deshalb ebenfalls von den Untersuchungen ausgeschlossen.

Um die Auswirkung der DDAH1-Defizienz auf die Metabolisierung von ADMA zu überprüfen, wurde die Plasma-ADMA-Konzentration der Tiere erhoben. Bei der Beurteilung der Auswirkungen des Genotyps konnte somit auch ein Bezug zu den tatsächlichen ADMA-Konzentrationen ermöglicht werden und nicht nur auf der Annahme, dass ADMA durch die DDAH1 abgebaut wird.

Die erfassten Plasma-ADMA-Konzentrationen der Tiere beider KO-Gruppen waren über die gesamte Zeit der Untersuchungen mit ca. 2 μM doppelt so hoch wie bei den WT-Gruppen mit ca. 1 μM (s. Abbildung 16). Eine signifikante Steigerung der ADMA-Konzentration war bei der KO+DIO-Gruppe im Vergleich zur WT+DIO-Gruppe ab der Woche 12 zu beobachten. Bei der KO-DIO-Gruppe stellte sich in der Woche 16 und 18 eine signifikante Steigerung der ADMA-Konzentration gegenüber der WT-DIO-Gruppe ein. Außergewöhnlich ist jedoch, dass innerhalb der KO+DIO-Gruppe die ADMA-Konzentration über die Zeit stieg. In der 18. Woche war mit 3 μM eine um mehr als 50% höhere ADMA-Konzentration ($p < 0,05$) als in der Woche 8, Woche 12 und Woche 16 zu beobachten. In der Woche 18 war die Plasma-ADMA-Konzentration der KO+DIO-Gruppe auch im Vergleich zur KO-DIO-Gruppe erhöht.

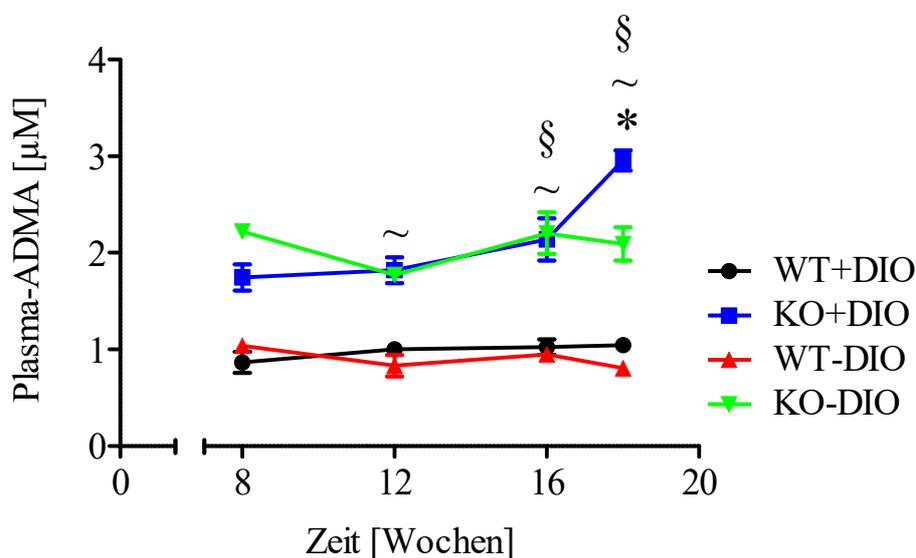


Abbildung 16: Plasma-ADMA-Konzentration der Versuchstiere

Dargestellt sind die mittels LC-MS/MS erhobenen Plasma-ADMA-Konzentrationen der Tiere über die Dauer der Untersuchungen.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $\text{MW} \pm \text{SEM}$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8); ~ KO+DIO vs. WT+DIO: $p < 0,05$; § KO-DIO vs. WT-DIO: $p < 0,05$; * KO+DIO vs. KO-DIO: $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test

Die Plasma-Arginin-Konzentration und Plasma-SDMA-Konzentration wurden ebenfalls gemessen, um mögliche Auswirkungen des DDAH1^{-/-} bzw. der hohen ADMA-Konzentration auf Arginin und andere Arginin-Derivate, die eine wichtige Rolle im NO-Stoffwechsel einnehmen, zu untersuchen. Weder Genotyp noch DIO-Diät zeigten einen Einfluss auf die Plasma-Arginin- (s. Abbildung 17) oder Plasma-SDMA-Konzentration (s. Abbildung 18). Eine mögliche kompensatorische Hochregulierung bzw. Runterregulierung dieser Argininderivate und damit eine Kaschierung möglicher Effekte konnte somit ausgeschlossen werden.

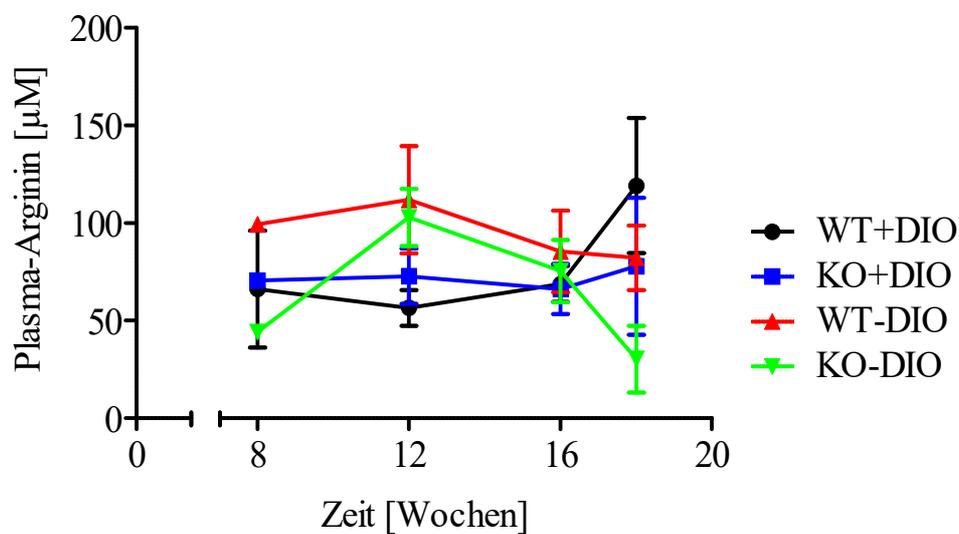


Abbildung 17: Plasma-Arginin-Konzentration der Versuchstiere

Abgebildet ist die durch die LC-MS/MS-Messung bestimmte Plasma-Arginin-Konzentration der Versuchstiere für die Zeit der gesamten Untersuchungen.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als MW±SEM; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8); Mann-Whitney-Test

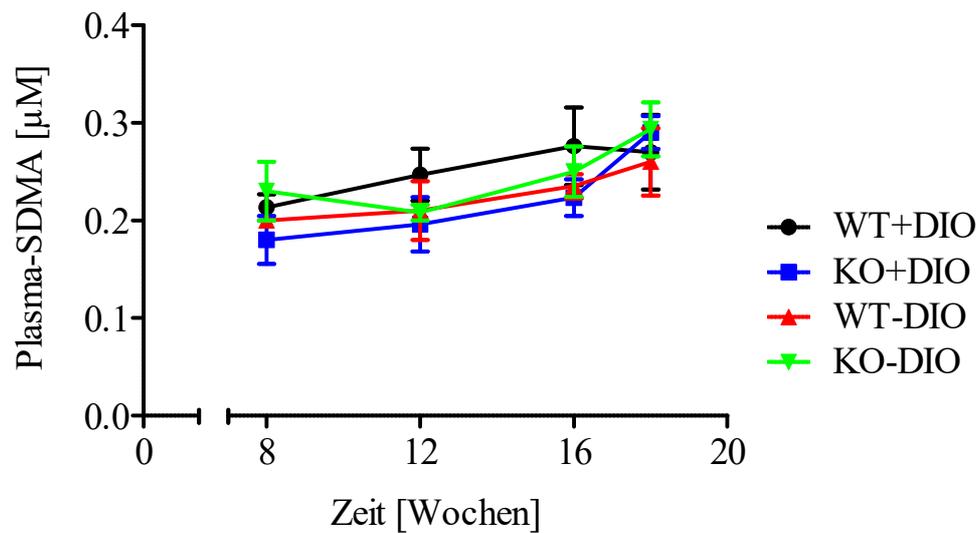


Abbildung 18: Plasma-SDMA-Konzentration der Versuchstiere

Abgebildet sind die Plasma-SDMA-Konzentrationen der Tiere über die Zeit der gesamten Untersuchungen.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8); Mann-Whitney-Test

3.1.2 Manifestation einer Adipositas

Zur Beurteilung der Auswirkung und zur Bestätigung des Erfolgs der Diät diente unter anderem das Gesamtgewicht als Maß für Adipositas. Wie in der Abbildung 19 zu erkennen ist, erreichten die Tiere der KO+DIO-Gruppe aufgrund der DIO-Diät mit $34,1 \pm 1,6$ g in der Woche 17 ein höheres Gewicht als die Tiere der KO-DIO-Gruppe mit $28,8 \pm 1$ g. Die höheren Gewichte der Tiere der KO+DIO-Gruppe waren auch in der Woche 16 signifikant. Hierbei ist zu beobachten, dass die WT+DIO-Mäuse mit $32,5 \pm 0,9$ g in der Woche 17 im Vergleich zu den WT-DIO-Mäusen mit $28 \pm 0,7$ g tendenziell erhöhte Gewichte hatten, diese aber aufgrund der geringen Tierzahl nicht signifikant unterschiedlich waren. In den Untersuchungen wurden tendenziell erhöhte, jedoch nicht signifikante Gewichte bei beiden KO-Gruppen im Vergleich zu den korrespondierenden WT-Gruppen ab den ersten Wochen nach der Geburt beobachtet. Da diese Beobachtung auch in früheren Untersuchungen der Tiere gemacht wurde, konnte eine eventuelle Auswirkung der DDAH1-Defizienz auf das Gesamtgewicht der Tiere nicht ausgeschlossen werden.

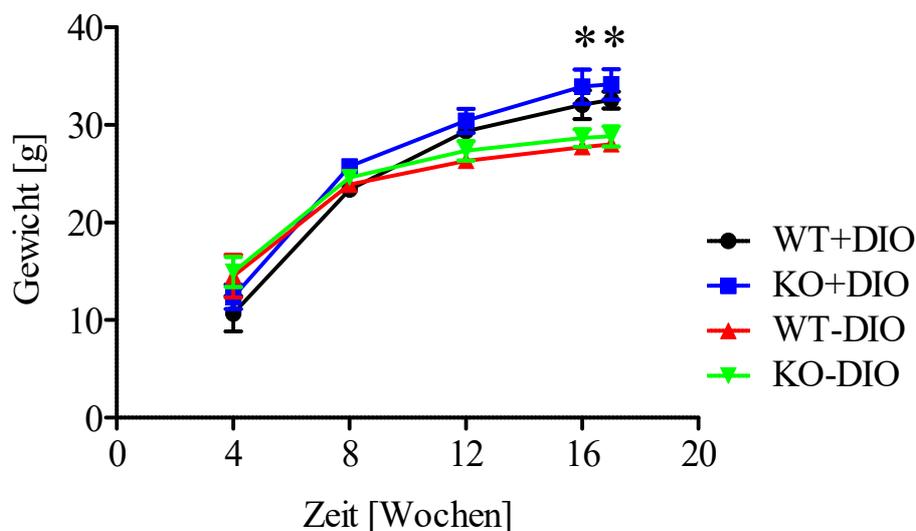


Abbildung 19: Gesamtgewicht der Versuchstiere

Die Gewichte der Tiere über die Zeit der gesamten Untersuchungen.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8);

* KO+DIO vs. KO-DIO; $p < 0,05$; 2way-ANOVA

Eine Korrelationsanalyse (Daten nicht abgebildet) zeigt, dass die Gewichte der Tiere mit den Plasma-ADMA-Konzentrationen stiegen ($r^2=0,068$; $p=0,032$). Betrachtet man jedoch die Gruppen einzeln, so ergab sich nur in der KO+DIO-Gruppe eine Korrelation ($r^2=0,202$; $p=0,041$) zwischen Gewicht und Plasma-ADMA-Konzentration.

Um den Erfolg der DIO-Diät jedoch unabhängig von individuellen Gewichtsunterschieden und eventuellen genotypischen Gewichtsunterschieden zu beurteilen, wurde die Gewichtszunahme der Tiere in Relation zum Gesamtgewicht in der achten Woche erhoben. Das Gewicht in der achten Woche wurde als Kontrolle verwendet, da der Einfluss des Alters auf das Gewicht geringer war, als in der vierten Woche, in der die Tiere 3,5 bis 4,5 Wochen alt waren. Außerdem ist zu erkennen, dass sich zu dieser Zeit noch keine merkbaren Einflüsse der Diät auf das Gewicht (s. Abbildung 19) ausgewirkt hatten. Bei der absoluten und relativen Gewichtszunahme stellte sich teilweise ab der zwölften Woche bereits ein Unterschied zwischen den DIO-Gruppen und der korrespondierenden Non-DIO-Gruppe ein. In der Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen sich bereits in der Woche 12 eine höhere Gewichtszunahme der Tiere in der WT+DIO-Gruppe mit $6,0 \pm 0,6$ g bzw. $126 \pm 3\%$ als in der WT-DIO-Gruppe mit $2,5 \pm 0,7$ g bzw. $110 \pm 3\%$. Bis zur Woche 17 blieb die erhöhte Gewichtszunahme der Tiere der WT+DIO-Gruppe mit $9,2 \pm 1$ g bzw. $140 \pm 5\%$ im Vergleich zur

WT-DIO-Gruppe mit $4,2 \pm 1,2$ g bzw. $118 \pm 6\%$ bestehen. Die Tiere der KO+DIO-Gruppe erreichten in der Woche 17 mit $8,4 \pm 1,1$ g bzw. $132 \pm 4\%$ eine höhere Gewichtszunahme gegenüber den Tieren der KO-DIO-Gruppe mit $4,2 \pm 0,7$ g bzw. $117 \pm 3\%$. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen etablierte sich erst ab der 16. Woche. Am Ende der Diät hatten die WT-Mäuse mit der DIO-Diät 5 g bzw. 22% und die KO-Mäuse 4 g bzw. 15% mehr Gewicht zugenommen als die dazugehörigen Kontrollen. Ein Einfluss der DDAH1-Defizienz auf die Gewichtszunahme war zwischen den beiden Non-DIO-Gruppen nicht zu verzeichnen. Die Tiere der WT-DIO-Gruppe und KO-DIO-Gruppe wiesen mit ca. 4,2 g bzw. 117% eine identische Zunahme an Gewicht auf. Bei den DIO-Gruppen wiesen die Tiere der KO+DIO-Gruppe tendenziell eine geringere Zunahme an Gewicht als die Tiere der WT+DIO-Gruppe auf, die jedoch nicht signifikant war.

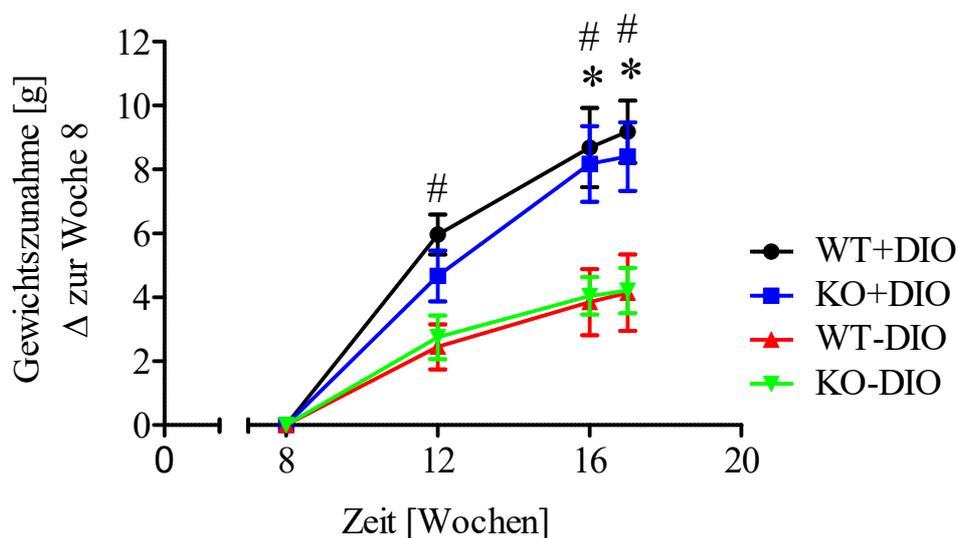


Abbildung 20: Absolute Zunahme an Gewicht der Versuchstiere

Die Gewichtszunahme der Versuchstiere wurde aus der Differenz zwischen dem Gewicht zum Messzeitpunkt und dem Gewicht desselben Tieres in der Woche 8 ermittelt.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8); # WT+DIO vs. WT-DIO: $p < 0,05$; * KO+DIO vs. KO DIO: $p < 0,05$; 2way-ANOVA

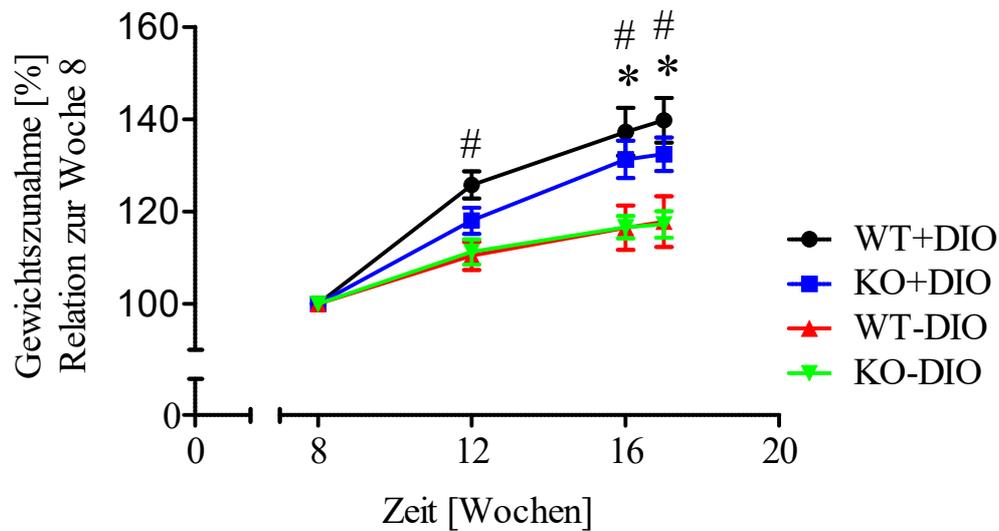


Abbildung 21: Relative Zunahme an Gewicht der Versuchstiere

Die Darstellung zeigt die Gewichtszunahme der DDAH1-defizienten Mäuse und ihrer WT-Geschwister in Relation zum Gewicht in der achten Woche über die Zeit.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8); # WT+DIO vs. WT-DIO: $p < 0,05$; * KO+DIO vs. KO DIO: $p < 0,05$; 2way-ANOVA

Sowohl die absolute ($r^2=0,270$; $p=0,016$) als auch die relative ($r^2=0,284$; $p=0,013$) Zunahme des Gewichtes korrelierte bei der KO+DIO-Gruppe mit der Plasma-ADMA-Konzentration (Daten nicht abgebildet), während sich in den weiteren Gruppen keine Korrelation ergab.

Ein weiteres Charakteristikum für Adipositas ist die gesteigerte Speicherung von Triglyceriden im Fettgewebe, was letztendlich bei einer hochkalorischen Diät zu vergrößertem Fettgewebe führt. Im Mausmodell diente das Gewicht der epididymalen Fettpolster, aufgrund seiner leichten Identifizierung und Isolierung vom Restgewebe, als weiterer Marker für die Adipositas. Das in der Abbildung 22 dargestellte Gewicht der Fettpolster war durch die Diät sowohl bei der WT+DIO-Gruppe mit 1670 ± 81 mg, als auch bei der KO+DIO-Gruppe mit 1540 ± 118 mg im Vergleich zu der WT-DIO-Gruppe mit 505 ± 82 mg bzw. zu der KO-DIO-Gruppe mit 310 ± 51 mg gestiegen.

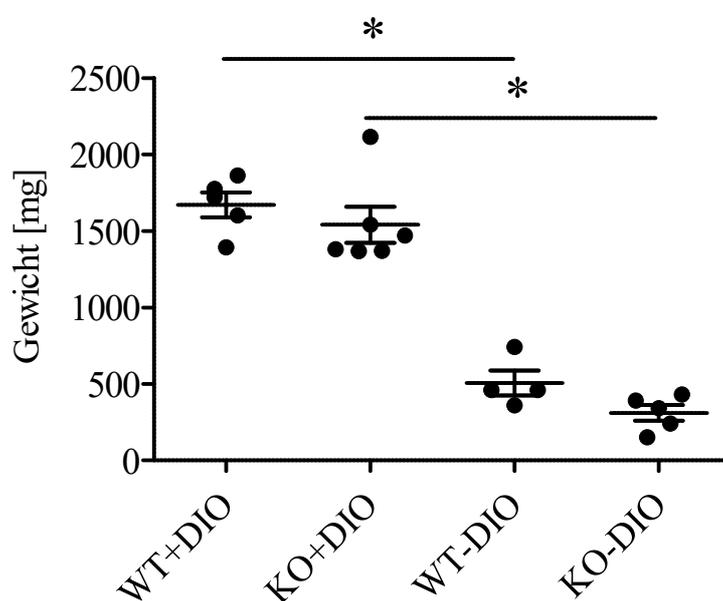


Abbildung 22: Absolutes Gewicht der Fettpolster

Die durchschnittlichen Gewichte der Fettpolster der jeweiligen Kohorte sind gegeneinander aufgetragen.
 WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter
 Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=5), KO+DIO (n=6), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=5); *: $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test

Die Betrachtung des relativen Gewichts der Fettpolster zum Gesamtgewicht der Tiere in der Abbildung 23 zeigt, dass sich auch der Fettpolsteranteil der WT+DIO-Gruppe mit $5,0 \pm 0,3\%$ bzw. der KO+DIO-Gruppe mit $4,4 \pm 0,2\%$ gegenüber der jeweiligen Kontrolle, der WT-DIO-Gruppe mit $1,8 \pm 0,3\%$ bzw. der KO-DIO-Gruppe mit $1,1 \pm 0,1\%$, erhöhte. Dadurch wurde sichergestellt, dass individuelle Gewichtsunterschiede berücksichtigt wurden.

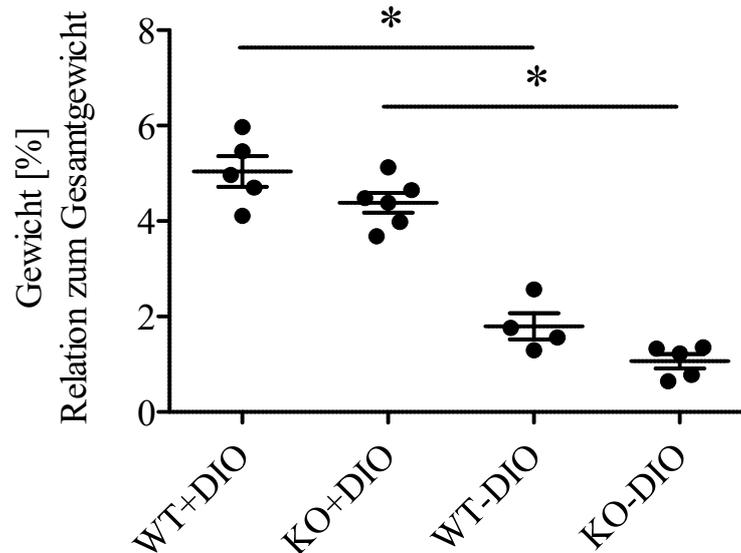


Abbildung 23: Relatives Gewicht der Fettpolster

Das Gewicht der Fettpolster der Versuchstiere wurde in Relation zum Gesamtgewicht desselben Versuchstiers gesetzt. WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter
 Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=5), KO+DIO (n=6), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=5); *: $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test

3.1.3 Insulinsensitivität und Glucosehomöostase

Die Entwicklung eines adipösen Stadiums ist ein Schritt in der Entstehung des Typ II Diabetes. Ein weiterer maßgebender Schritt, der sich dem anschließt, ist die Manifestation einer Insulinresistenz.

Ein Indikator, welcher für die Beurteilung der Insulinsensitivität herangezogen wurde, war die nüchterne Blutglucose-Konzentration. Höhere Glucose-Konzentrationen über einen Wert von 7 mmol/L weisen dabei auf eine gestörte Glucoseverwertung hin und lassen einen Rückschluss auf eine Insulinresistenz zu. Bereits in der achten Woche war bei der WT+DIO-Gruppe mit $7,58 \pm 0,41$ mmol/L eine erhöhte Glucose-Konzentration zu erkennen (s. Abbildung 24). Über die gesamte Dauer der Untersuchungen war eine Tendenz für höhere Glucose-Konzentrationen in den DIO-Gruppen zu beobachten. Diese manifestierte sich jedoch erst in der 16. Woche sowohl in der WT+DIO-Gruppe mit $8,15 \pm 0,59$ mmol/L gegenüber der WT-DIO-Gruppe mit $4,95 \pm 0,78$ mmol/L, als auch in der KO+DIO-Gruppe mit $7,61 \pm 0,61$ mmol/L gegenüber der KO+DIO-Gruppe mit $5,63 \pm 0,56$ mmol/L.

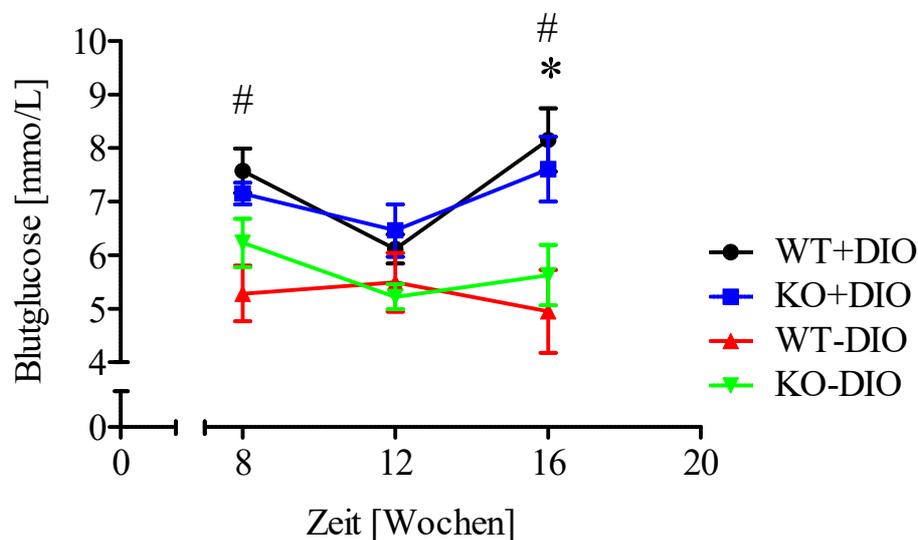


Abbildung 24: Blutglucose-Konzentration der Versuchstiere

Die nüchterne Blutglucose-Konzentration der Tiere wurde nach 6 Stunden Fasten aus dem Vollblut bestimmt.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8); # WT+DIO vs. WT-DIO: $p < 0,05$; * KO+DIO vs. KO DIO: $p < 0,05$; 2way-ANOVA

In der WT-DIO-Gruppe korrelierten höhere Blutglucose-Konzentrationen ($r^2=0,628$; $p=0,004$) mit niedrigeren Plasma-ADMA-Konzentrationen (Daten nicht abgebildet), während sich in den weiteren Gruppen keine Korrelationen ergaben.

Das zirkulierende Plasma-Insulin wird durch die Insulinausschüttung beeinflusst und konnte somit als ein weiterer Marker für die Insulinsensitivität betrachtet werden. Bei einer Insulinresistenz ist die Wirkung von Insulin abgeschwächt, welche kompensatorisch zu einer gesteigerten Bildung und Sekretion von Insulin führt. Dementsprechend weisen höhere Plasma-Insulin-Konzentrationen auf eine Insulinresistenz hin. Eine signifikante Erhöhung der Plasma-Insulin-Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe mit 69 ± 9 pmol/L war ausschließlich bei der WT+DIO-Gruppe mit 197 ± 46 pmol/L in der 16. Woche zu beobachten. Die KO+DIO-Gruppe zeigte mit 379 ± 171 pmol/L im Vergleich zu der KO-DIO-Gruppe mit 74 ± 26 pmol/L eine tendenziell erhöhte Plasma-Insulin-Konzentration, die jedoch aufgrund der hohen Varianz nicht signifikant war (s. Abbildung 25).

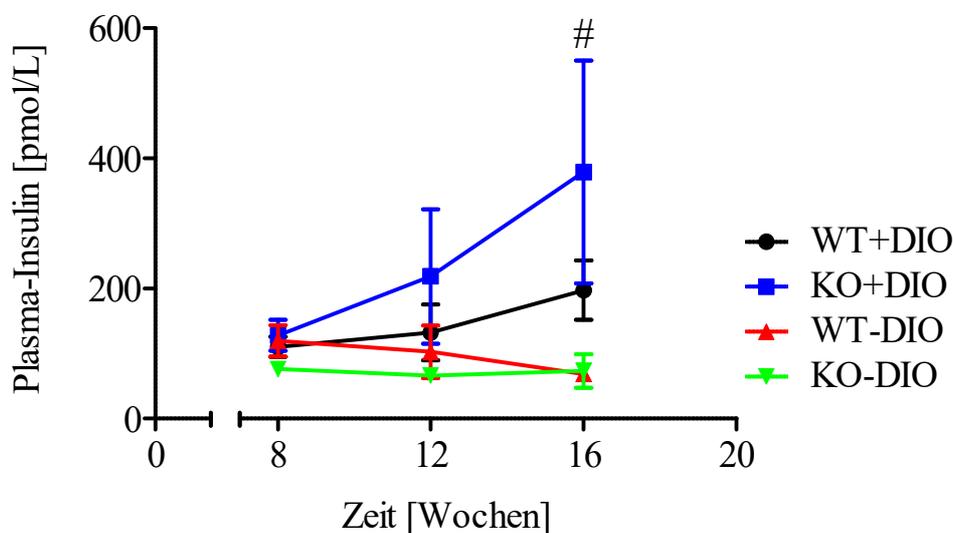


Abbildung 25: Plasma-Insulin-Konzentration der Versuchstiere

Die Insulin-Konzentration der Versuchstiere wurde nach 6 Stunden Fasten mit einem kommerziellen Insulin-ELISA anhand 10 μ L verdünntem Plasma bestimmt.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW\pm SEM$; WT+DIO ($n=6$), KO+DIO ($n=7$), WTDIO ($n=4$), KO-DIO ($n=8$); # WT+DIO vs. WT-DIO: $p<0,05$; Mann-Whitney-Test

Eine Korrelation zwischen den Plasma-Insulin-Konzentrationen und den Plasma-ADMA-Konzentrationen bestand nicht (Daten nicht abgebildet).

Die homöostatische Bewertungsmethode (aus dem engl.: homeostatic model assessment, HOMA) mittels des HOMA-Index stellt einen weiteren diagnostischen Messwert für die Insulinresistenz dar, der die Insulin- und Glucose-Konzentration gleichermaßen berücksichtigt. Der HOMA-Index wird aus dem Produkt von Blutglucose- und Plasma-Insulin-Konzentration gebildet.

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Insulin-Konzentration} \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{mL}} \right) \times \text{Glucose-Konzentration} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)}{22,5}$$

In der Abbildung 26 ist zu erkennen, dass in der 16. Woche sowohl die WT+DIO-Gruppe mit $11,68 \pm 2,51$ gegenüber $2,63 \pm 0,63$ der WT-DIO-Gruppe, als auch die KO+DIO-Gruppe mit $21,04 \pm 9,3$ im Vergleich zur KO-DIO-Gruppe mit $2,90 \pm 0,92$ einen höheren HOMA-Index entwickelten.

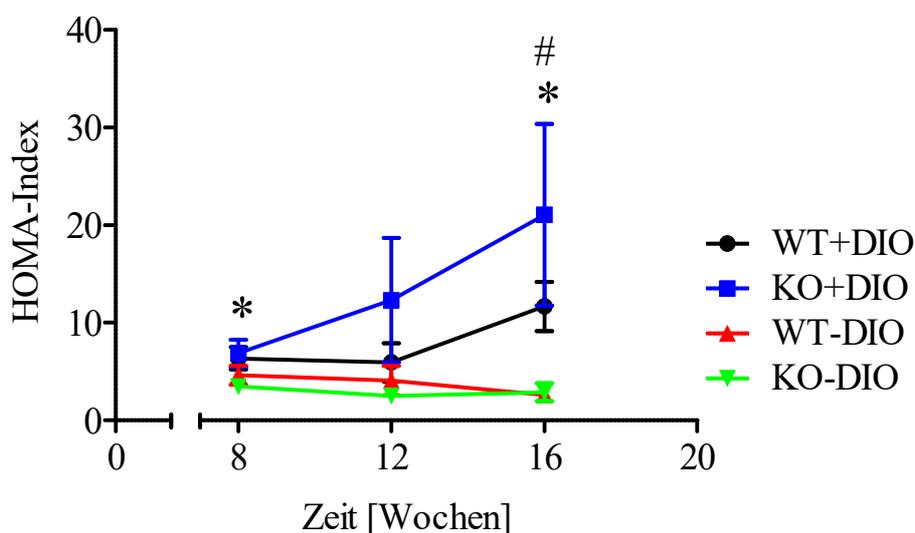


Abbildung 26: Errechneter HOMA-Index der Versuchstiere

Der HOMA-Index errechnet sich aus dem Produkt der Glucose- und Insulin-Konzentration der Versuchstiere nach 6 Stunden Fasten.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8); # WT+DIO vs. WT-DIO: $p < 0,05$; * KO+DIO vs. KO DIO: $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test

In keiner Gruppe korrelierte der HOMA-Index mit der Plasma-ADMA-Konzentration (Daten nicht abgebildet).

Als relevanteste und aussagekräftigste diagnostische Methode zur Beurteilung der Insulinsensitivität wurde indes der OGTT herangezogen. Die Insulinausschüttung und –wirkung als biochemische Reaktion des Körpers auf eine Glucosezufuhr wurde anhand der Glucose-Konzentration bewertet. Die Glucosezufuhr imitierte dabei die physiologischen Bedingungen unter Nahrungsaufnahme. Hier machte sich hingegen in keiner der Gruppen ein Unterschied bemerkbar. Wie zu erwarten war, stiegen die Glucose-Konzentrationen aller Gruppen innerhalb der ersten 30 Minuten nach der Glucosegabe an. Nach zwei Stunden erreichten die Blutglucose-Konzentrationen aller Gruppen wieder die basale Konzentration vor der Glucosegabe, womit keine Störung der Insulinwirkung bzw. Insulinsensitivität festgestellt werden konnte (s. Abbildung 27). Bei einer Insulinresistenz würden die gestiegenen Blutglucose-Konzentrationen nach der Glucosegabe innerhalb der zwei Stunden nicht erneut bis zur basalen Konzentration sinken.

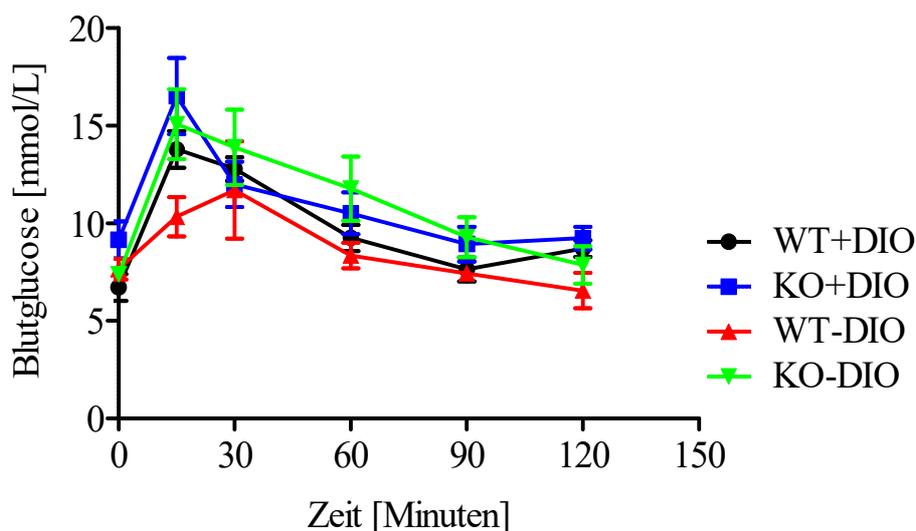


Abbildung 27: OGTT der Versuchstiere in der Woche 17

Die Abbildung zeigt die Blutglucose-Konzentration der Versuchstiere über zwei Stunden nach einer oralen Glucosegabe von 2 mg/kg. Die Glucose-Konzentrationen wurden mittels eines Blutzuckermessgeräts anhand aus der Mausschwanzvene durch Punktion erhaltene Vollblutropfen bestimmt.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als MW±SEM; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8); 2way-ANOVA

Eine andere Möglichkeit Konzentrations-Zeit-Kurven auszuwerten, ist die Bestimmung der Fläche unterhalb der Kurve (aus dem engl.: area under the curve; AUC). Die AUC entspricht bei pharmakokinetischen Untersuchungen der Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes, in diesem Fall der Glucose, und stellt eine Größe für die Verwertung bzw. Metabolisierung der Glucose dar. Bei der Bestimmung der AUC des OGTTs waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen bei der Verstoffwechslung von Glucose zu registrieren (s. Abbildung 28).

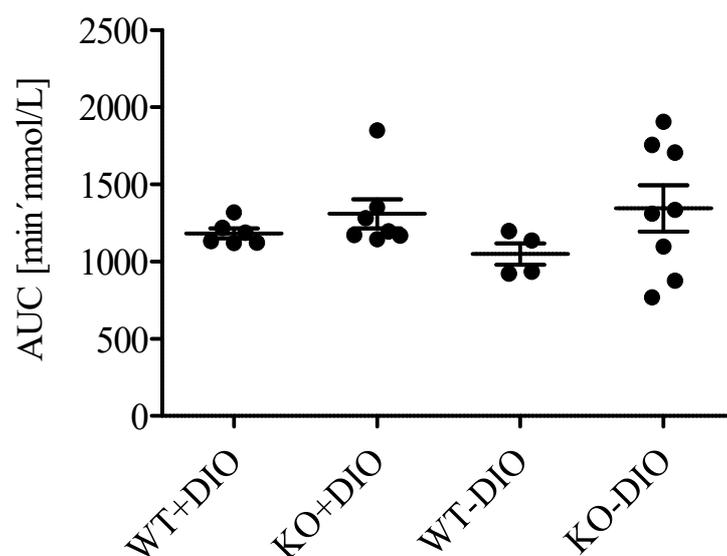


Abbildung 28: AUC des OGTTs in der Woche 17

Die AUC berechnet sich aus der Fläche unterhalb der Kurve des OGTTs (s. Abbildung 27) und entspricht der mittleren Verweildauer der Glucose im Körper.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=7), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=8); Mann-Whitney-Test

3.1.4 Funktionalität des Endothels

Ein weiterer zu beachtender Aspekt der DDAH1-Defizienz auf die Gesundheit der Tiere war die Auswirkung der höheren Plasma-ADMA-Konzentration und der DIO-Diät auf die Funktionalität des Endothels der Aorten bzw. der Gefäße. Eventuelle positive Auswirkungen hoher Plasma-ADMA-Konzentrationen auf die Insulinresistenz könnten somit der Beeinträchtigung der Endothelfunktion durch diese hohen ADMA-Konzentrationen gegenübergestellt werden. Hierzu wurde nach der Tötung der Tiere ein Organbad der Aortensegmente, zur Erfassung des Dilatationsvermögens der Aorten, in den Laboren von der Arbeitsgruppe um

Prof. Dr. Stephan Baldus (Universitäres Herzzentrum (UHZ), Hamburg; jetzt: Herzzentrum, Köln) durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Gewichtskraft der maximalen Relaxationsfähigkeit, entsprechend der Kraft vor Zugabe der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Lösung, von der Gewichtskraft der minimalen Relaxationsfähigkeit nach Zugabe der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Lösung abgezogen und die Gewichtskraft der Relaxation durch die Zugabe von Acetylcholin bzw. Nitroglycerin in Relation dazu gesetzt. So ergab sich ein Verlauf der Relaxation in Abhängigkeit von der Acetylcholin- bzw. Nitroglycerin-Konzentration in Relation zum Gesamtreaxationsvermögen.

Die Messung der Relaxation mit Acetylcholin im Organbad entsprach dabei der endothelabhängigen Relaxation der Aorta. Die endothelunabhängige Relaxation der Aorta konnte mittels Nitroglycerin erfasst werden. Dieses diente primär dazu, dass andere Gründe außer der Funktionalität des Endothels bei eventuellen Unterschieden in der endothelabhängigen Relaxation auszuschließen waren. Beschädigungen im Muskelgewebe hätten bereits bei der Erfassung der endothelunabhängigen Relaxation zu einem Unterschied geführt, die sich auch bei der Beurteilung der endothelabhängigen Relaxation niedergeschlagen hätte. Wie die Abbildung 29 zeigt, ergaben sich keine Unterschiede in der Wirkung von Nitroglycerin auf das Relaxationsvermögen, so dass eventuelle Unterschiede bei der Messung der endothelabhängigen Relaxation mit Acetylcholin ausschließlich auf Abweichungen der Funktionalität des Endothels zurückzuführen waren.

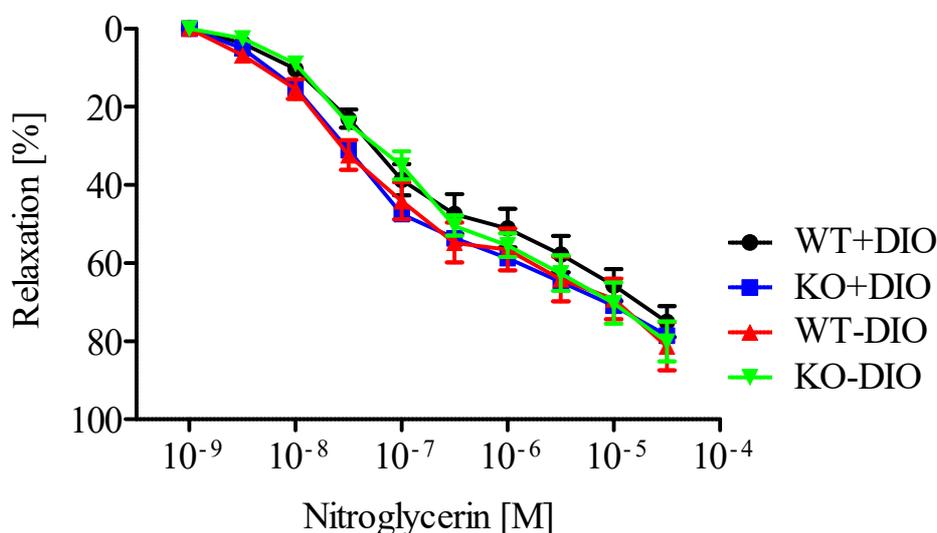


Abbildung 29: Relaxationsvermögen der Aorten durch die Zugabe von Nitroglycerin

Die Dosis-Wirkungskurve zeigt die Relaxation der Aorten in Abhängigkeit von einer exponierten Nitroglycerin-Konzentration von 10⁻⁹ M bis 10⁻⁴ M. Die Relaxation steht im Bezug zur maximal möglichen Relaxation, die vor Zugabe von Prostaglandin F2 α erfasst wurde.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als MW \pm SEM; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=6), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=6); 2way-ANOVA

Die endothelabhängige Relaxation wurde im Organbad durch Zugabe einer Acetylcholin-Verdünnungsreihe ermittelt (s. Abbildung 30). Der Verlauf der endothelabhängigen Relaxation war in allen Gruppen identisch, womit weder Genotyp noch DIO-Diät einen merkbaren Einfluss auf die Endothelfunktion ausübten.

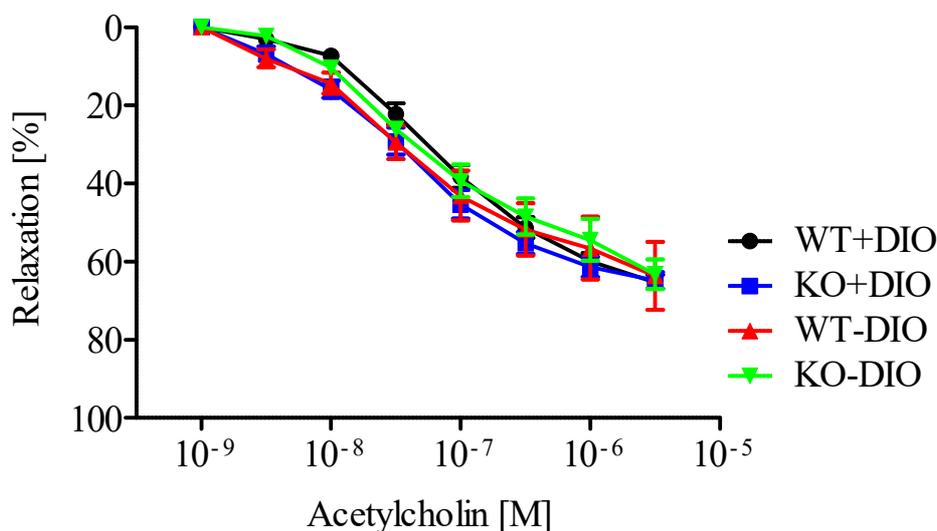


Abbildung 30: Relaxationsvermögen der Aorten durch die Zugabe von Acetylcholin

Die Dosis-Wirkungskurve zeigt die Relaxation der Aorten in Abhängigkeit von einer exponierten Acetylcholin-Konzentration von 10^{-9} M bis 10^{-5} M. Die Relaxation steht im Bezug zur maximal möglichen Relaxation, die vor Zugabe von Prostaglandin $F2\alpha$ erfasst wurde.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=6), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=6); 2way-ANOVA

Etwaige bei der Dosis-Wirkungskurve unberücksichtigte Auswirkungen konnten durch Ermittlung des EC_{50} -Werts, der Konzentration an Acetylcholin bzw. Nitroglycerin, bei der die Hälfte des maximalen Effekts (Relaxation) erreicht wurde, kenntlich gemacht werden. Das Erreichen der EC_{50} bei niedrigeren Konzentrationen, konnte auf eine verbesserte Empfindlichkeit gegenüber vasodilativer Substanzen gedeutet werden. Hier konnte bei der endothelabhängigen Relaxation sowohl ein Unterschied zwischen der WT+DIO-Gruppe mit einem EC_{50} -Wert von $10^{-7,13} \pm 10^{-0,07}$ M und der KO+DIO-Gruppe mit $10^{-7,45} \pm 10^{-0,09}$ M, als auch zwischen der WT+DIO-Gruppe und der WT-DIO-Gruppe mit einem EC_{50} -Wert von $10^{-7,54} \pm 10^{-0,22}$ M festgestellt werden (s. Abbildung 31).

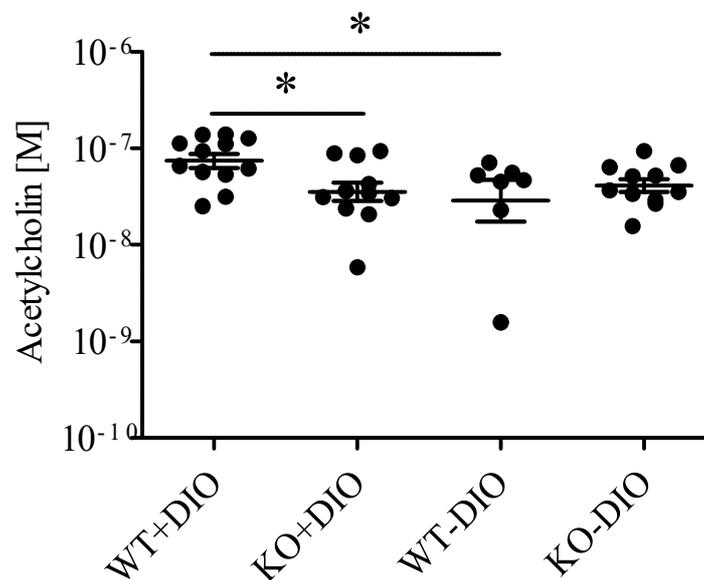


Abbildung 31: EC_{50} -Werte der Relaxation mit Acetylcholin im Organbad der Aorta

Die EC_{50} -Werte wurden mit der Prism GraphPad Software aus dem Relaxationsverlauf der Aorten durch Zugabe der Acetylcholin-Verdünnungsreihe errechnet.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=6), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=6); *: $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test

Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch auch in der endothelunabhängigen Vasodilatation zu beobachten (s. Abbildung 32). Hier zeigen die EC_{50} -Werte auch, dass die WT+DIO-Gruppe mit $10^{-7,03} \pm 10^{-0,16}$ erst bei einer höheren Nitroglycerin-Konzentration als die WT-DIO-Gruppe mit $10^{-7,61} \pm 10^{-0,16}$ und die KO+DIO Gruppe mit $10^{-7,56} \pm 10^{-0,08}$ 50% der maximalen Relaxation erreichten. Somit konnten auch andere Faktoren, wie z. B. physikalische Gewebeschäden bei der Aortenpräparation, als die Funktionalität des Endothels für diese Unterschiede verantwortlich sein. Dadurch wies weder der Genotyp noch die DIO-Diät einen Einfluss auf die Funktionalität des Endothels auf.

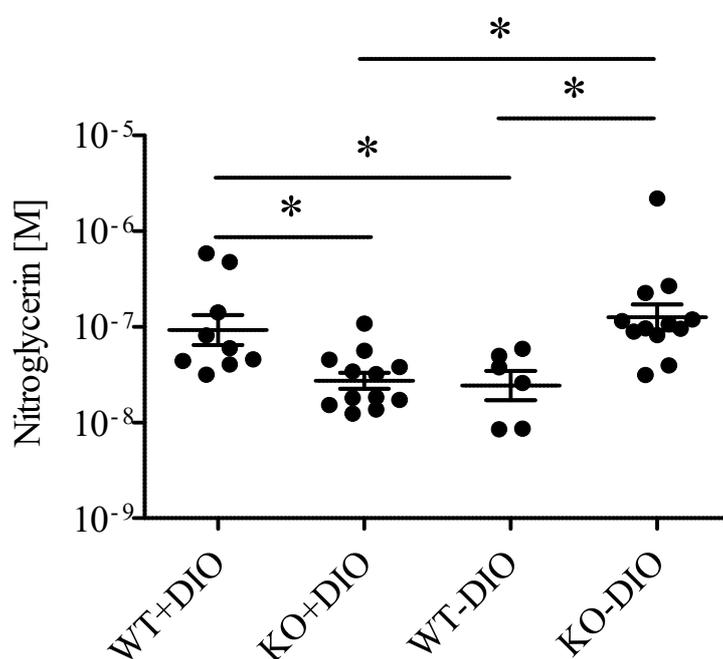


Abbildung 32: EC_{50} -Werte der Relaxation mit Nitroglycerin im Organbad der Aorta

Anhand der Relaxation der Aorten im Organbad unter Zugabe einer Nitroglycerin-Verdünnungsreihe wurden die EC_{50} -Werte mit der Prism GraphPad Software errechnet.

WT+DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, KO+DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit hochkalorischer Nahrung, WT-DIO: DDAH1-Wildtyp Mäuse mit Standardfutter, KO-DIO: DDAH1-defiziente Mäuse mit Standardfutter

Daten sind abgebildet als $MW \pm SEM$; WT+DIO (n=6), KO+DIO (n=6), WT-DIO (n=4), KO-DIO (n=6); *: $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test

3.2 In-vitro Untersuchungen in der Zellkultur

3.2.1 Charakterisierung der Zelllinien

Ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Untersuchungen war die reproduzierbare Differenzierung der verwendeten 3T3-L1-Adipozyten sowie der C2C12-Myozyten. Bei der Differenzierung vollzog sich sowohl eine phänotypische als auch eine genotypische Entwicklung. Wichtig für die weiteren Untersuchungen war die Expression des Glucosetransporters Typ 4, dem insulinabhängigen Glucosetransporter, welcher eine zentrale Rolle in der durch Insulin-vermittelten Glucoseaufnahme der Zellen einnimmt. Die HIT-T15-Zellen durchgingen keinen Differenzierungsprozess, womit keine Charakterisierung der Zelllinie als Bestätigung der erfolgreichen Differenzierung nötig war.

3T3-L1-Adipozyten

Bei dieser Zelllinie werden Fibroblasten zu Adipozyten differenziert, die im differenzierten Zustand Fetttropfen bilden. Diese Fetttropfen können mit einem lipophilen Farbstoff angefärbt werden. Aufgrund geringer Differenzierung der Zellen, wurde ein neues Batch an 3T3-L1-Adipozyten, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Herzig (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ; Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden, differenziert.

Die durch das Differenzierungsmedium initiierten phänotypischen Veränderungen sind leicht unter dem Mikroskop zu erkennen. Die anfänglichen Fibroblasten wuchsen während der Differenzierung zusammen und zeigten sieben Tage nach Beginn der Differenzierung die phänotypischen Merkmale von Adipozyten mit den gebildeten intrazellulären Fetttropfen. Diese sind in den Bildern als weiße Punkte zu erkennen (s. Abbildung 33).

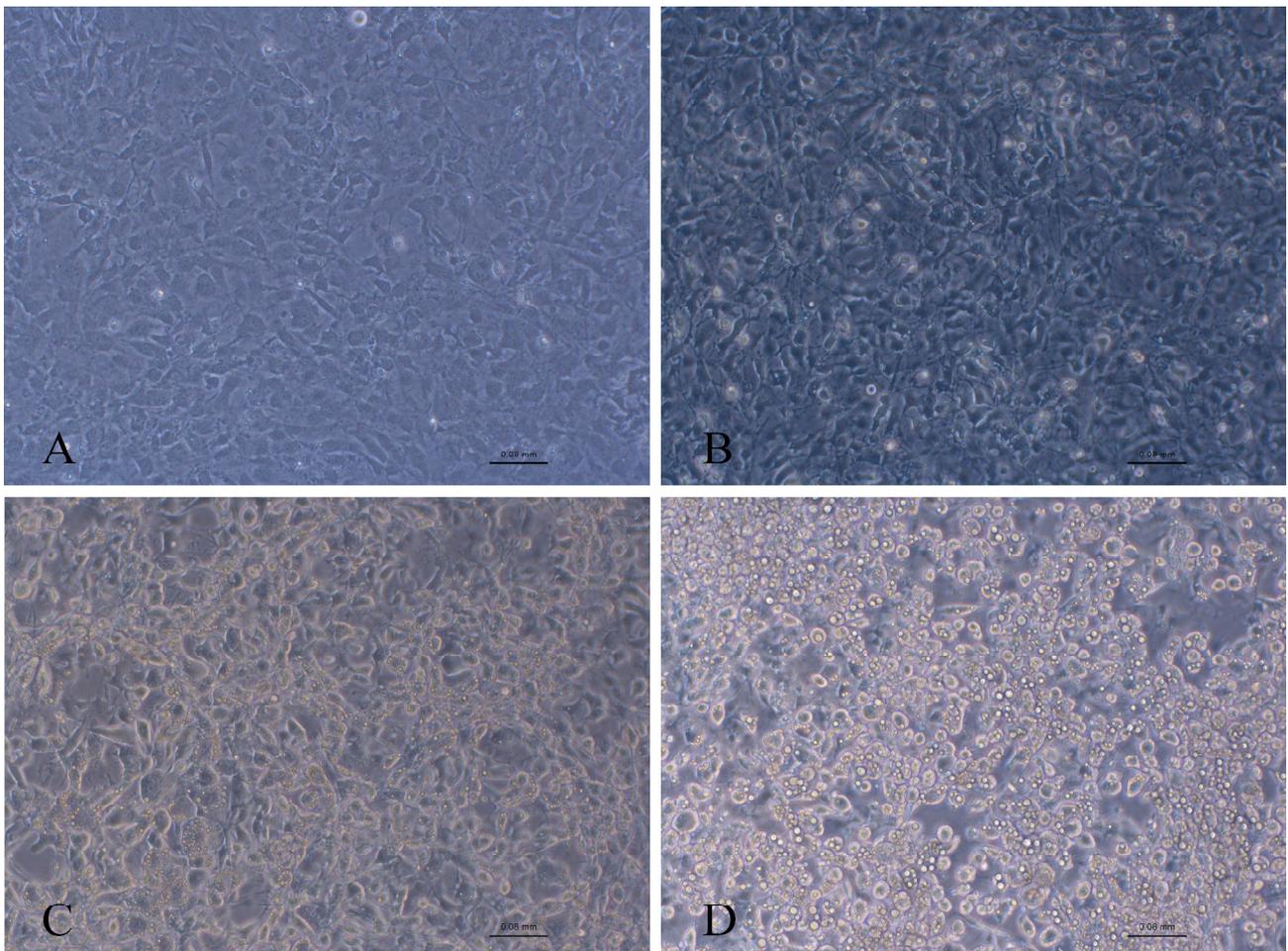


Abbildung 33: Mikroskopische Aufnahmen der 3T3-L1-Zellen während der Differenzierung

Die Bilder zeigen die 3T3-L1-Zellen nach 0 (A), 2 (B), 4 (C) und 7 (D) Tagen Differenzierung in einer $10\times$ Vergrößerung. Der Balken entspricht 0,08 mm. Die Zellen wurden zwei Tage nach Erreichen von 80% bis 100% Konfluenz mit dem Differenzierungsmedium A (HG DMEM mit 10% FCS, 1 M HEPES, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin, 0,25 μM Dexamethason, 0,5 mM IBMX, 252 μM Ascorbinsäure, 1 μM Biotin und 17 μM Pantothenensäure) und nach weiteren vier Tagen mit dem Differenzierungsmedium B (HG DMEM mit 10% FCS, 1 M HEPES, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin, 252 μM Ascorbinsäure, 1 μM Biotin und 17 μM Pantothenensäure) inkubiert, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde.

Die Identifizierung der Fetttropfen erfolgte nach der Methode von Dr. Dalei Shao und Dr. Mitchell A. Lazar mit dem lipophilem Farbstoff Oil Red O¹²⁰. In der Abbildung 34 ist die erfolgreiche Färbung der Fetttropfen zu beobachten, welche auf einen morphologischen Veränderungsprozess dieser Zellen zurückzuführen war. Somit konnte von einer ausreichenden Differenzierung dieser Zellen ausgegangen werden.

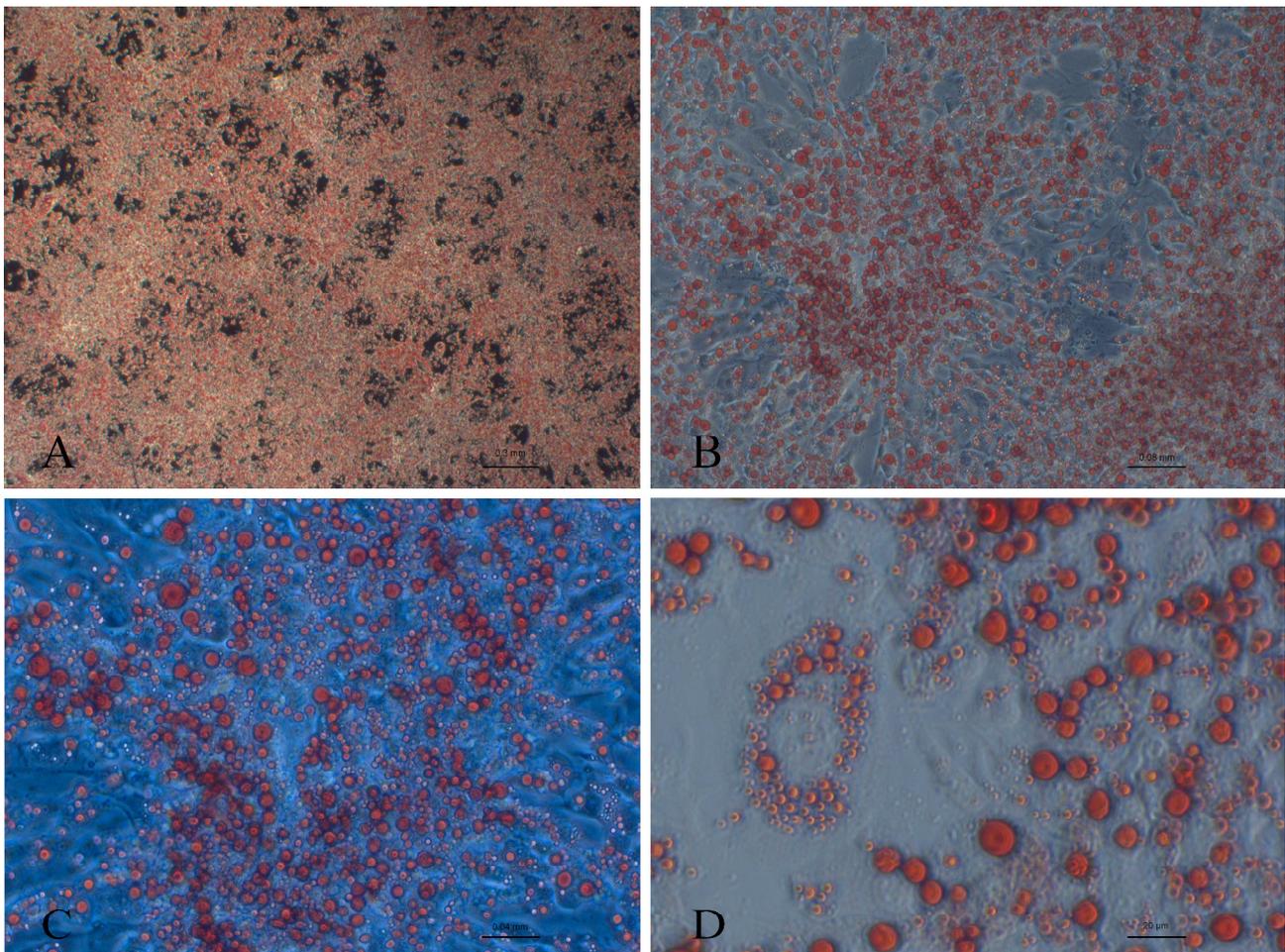


Abbildung 34: Mikroskopische Aufnahmen der Färbung der differenzierten 3T3-L1-Adipozyten mittels Oil Red O nach Dr. Dalei Shao und Dr. Mitchell A. Lazar

Die spezifische Färbung der Lipidtropfen ist in der $20\times$ (C, Balken entspricht 0,04 mm) und $40\times$ (D, Balken entspricht 0,02 mm) Vergrößerung genauso zu erkennen, wie die umfangreiche Ausprägung der Fetttropfen in den Zellen in der $2,5\times$ (A, Balken entspricht 0,3 mm) und $10\times$ (B, Balken entspricht 0,08 mm) Vergrößerung. Die Zellen wurden zwei Tage nach Erreichen von 80% bis 100% Konfluenz mit dem Differenzierungsmedium A (HG DMEM mit 10% FCS, 1 M HEPES, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin, 0,25 μM Dexamethason, 0,5 mM IBMX, 252 μM Ascorbinsäure, 1 μM Biotin und 17 μM Pantothenensäure) und nach weiteren vier Tagen für drei Tage mit dem Differenzierungsmedium B (HG DMEM mit 10% FCS, 1 M HEPES, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin, 252 μM Ascorbinsäure, 1 μM Biotin und 17 μM Pantothenensäure) inkubiert, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde. Für die Färbung wurden die Zellen in 0,5% Oil Red O-Lösung für 15 Minuten inkubiert.

C2C12 Myozyten

Bei dieser Zelllinie differenzieren die trapezförmigen Myoblasten zu länglichen Myotuben, die dann zu mehrkernigen spindelförmigen Myozyten verschmelzen. Der Differenzierungsprozess ist auch bei diesen Zelltypen unter dem Mikroskop leicht nachzuverfolgen. Die anfänglichen Myoblasten wuchsen zusammen und bildeten nach fünf Tagen die spiralförmigen Myozyten (s. Abbildung 35).

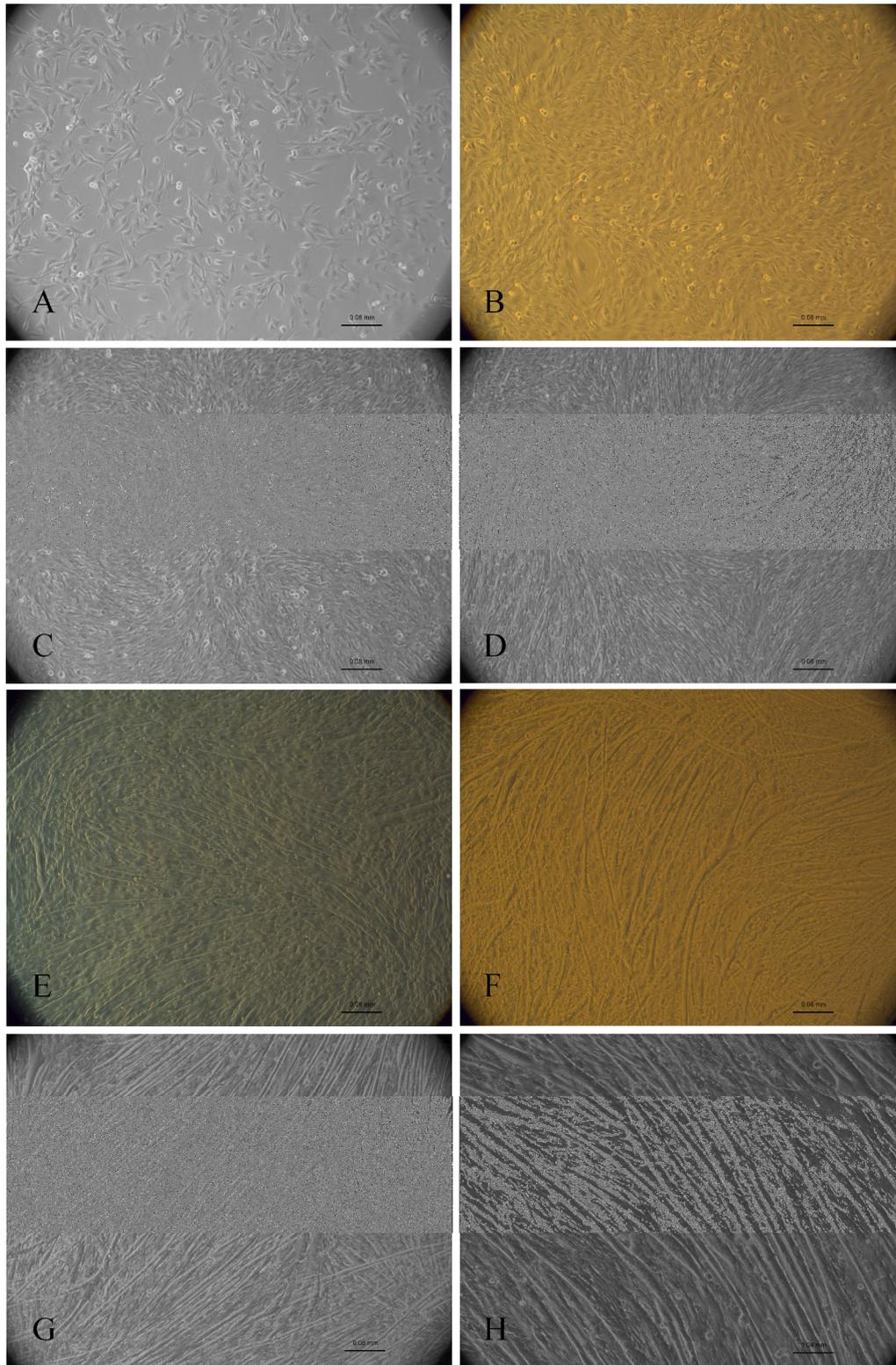


Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahmen der C2C12-Zellen während der Differenzierung

Die Bilder zeigen die C2C12-Zellen 2 (A) und 1 (B) Tage vor Beginn der Differenzierung, beim Differenzierungsbeginn (C) und nach 1 (D), 2 (E), 3 (F) und 4 (G) Tagen Differenzierung in einer $10\times$ Vergrößerung (Balken entspricht 0,08 mm). Die $20\times$ (H) Vergrößerung (Balken entspricht 0,04 mm) verdeutlicht die phänotypischen Merkmale der Muskelfaser. Bis zum Differenzierungsbeginn wurden die Zellen mit Kulturmedium (HG DMEM mit 20% FCS) und danach mit Differenzierungsmedium (HG DMEM mit 2% HS und $1\ \mu\text{g/ml}$ Insulin) inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte vor Differenzierungsbeginn alle zwei bis drei Tage und danach täglich.

Im Prozess der Differenzierung durchlaufen die Zellen nicht nur phänotypische sondern auch genotypische Veränderungen, die auch zu einer veränderten Protein-Expression führen. Das wichtigste Protein für die weiterführenden Untersuchungen stellte der insulinabhängige GLUT4 dar. Die Untersuchung der Protein-Expression des GLUT4, erfolgte durch die Analyse der Proteine im Zellaufschluss der differenzierten Zellen.

3T3-L1 Adipozyten

Der Immuno-Blot (Abbildung 36) zeigt, dass die Zellen trotz phänotypischer Veränderungen zu keiner Zeit der Differenzierung das GLUT4 exprimierten. Somit konnten die 3T3-L1-Zellen nicht für die Auswirkung eines Cytokin-Cocktails und ADMA auf die Insulin-vermittelte Glucoseaufnahme herangezogen werden.

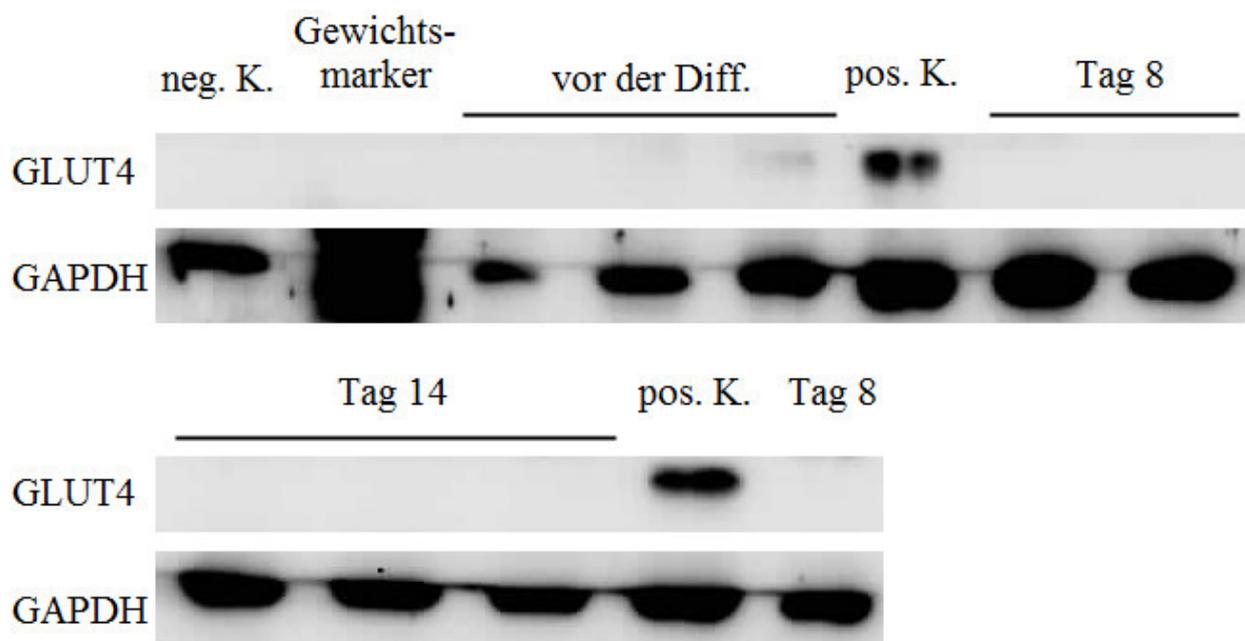


Abbildung 36: Analyse der GLUT4-Expression der 3T3-L1-Adipozyten

Der Immuno-Blot zeigt die Expression des GLUT4 1 Tag vor, 8 und 14 Tage nach Beginn der Differenzierung. Auf ein 10% SDS-PAGE wurden 20 µg Protein aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als negativ Kontrolle (neg. K.) diente ein Zellaufschluss von HEK-293-Zellen und als positiv Kontrolle (pos. K.) ein Zellaufschluss aus dem Muskelgewebe der DDAH1^{-/-}-Maus.

C2C12-Myozyten

Die Proteinanalyse der C2C12-Myozyten in der Abbildung 37 zeigt, dass bereits nach drei Tagen eine Expression vom GLUT4 vorliegt. Nach vier Tagen ist die Protein-Expression am stärksten ausgeprägt, um die insulinabhängige Glucoseaufnahme zu untersuchen.

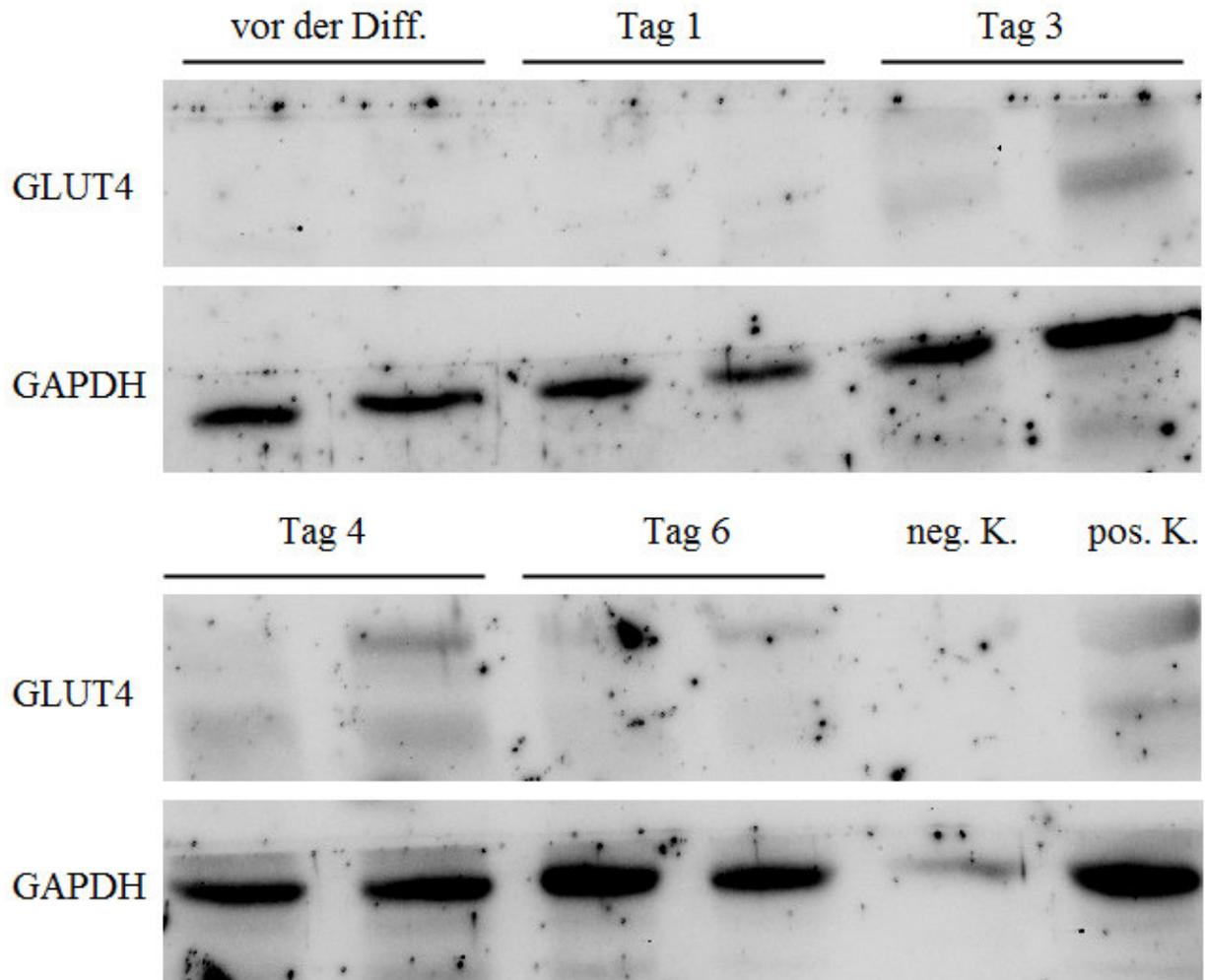


Abbildung 37: Analyse der GLUT4-Expression der C2C12-Myozyten

Der Immuno-Blot zeigt die Expression des GLUT4 vor, 1, 3, 4 und 6 Tage nach Beginn der Differenzierung. Auf ein 10% SDS-PAGE wurden 20 µg Protein aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als negativ Kontrolle (neg. K.) dienen aus HEK-293-Zellen gewonnene Proteine und als positiv Kontrolle (pos. K.) Proteine aus dem Muskelgewebe der DDAH1^{-/-}-Maus.

3.2.2 Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

In den Untersuchungen mit den insulin sensitiven C2C12-Zellen wurde der Zustand der chronischen, subklinischen Inflammation der Patienten mit Diabetes mellitus Typ II durch Zugabe eines Cytokin-Cocktails simuliert. In diesem Zustand weist die iNOS eine erhöhte Aktivität bzw. eine vermehrte Expression auf¹²⁶. Das Produkt der iNOS, exzessive Mengen an NO, kann sich negativ auf die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme auswirken. In diesem Zusammenhang kann eine protektive Eigenschaft hoher ADMA-Konzentrationen mit ihrer inhibitorischen Wirkung auf die iNOS erklärt werden. Die erfolgreiche Wirkung des Cytokin-Cocktails auf die iNOS konnte mit dem Konzentrationsanstieg dessen Produkts und die Hemmung durch ADMA mit der Abnahme des Produkts gemessen werden. Die Messung der Nitrit-Konzentration im Überstand der Zellen diente daher als Verfahren zur Beurteilung der iNOS-Induktion.

Zuerst wurde eine geeignete Zusammensetzung der Cytokine für den Cocktail gesucht, die die Inflammation beim Diabetes mellitus prägen. Dabei wurde sich an einem zur iNOS-Induktion etablierten Cytokin-Cocktail aus 10 ng/mL TNF α , 20 ng/mL IFN γ und 10 μ g/mL Lipopolysaccharide (LPS) orientiert¹²⁷, in welchem die Zellen für 24 Stunden inkubiert wurden. Aufgrund der verwendeten LPS, war dieser Cocktail eher für Untersuchungen bezüglich einer Fragestellung zum Thema Infektion anstatt zum Diabetes mellitus geeignet. Dieser Cytokin-Cocktail wurde jedoch als Grundlage für eine neue Cytokin-Kombination und als positiv Kontrolle benutzt. Für die Überprüfung der geeigneten Zusammensetzung des Cytokin-Cocktails wurde jede Kombination aus 10 ng/mL TNF α , 20 ng/mL IFN γ und als Ersatz für die LPS 10 ng/mL IL 1 β verwendet.

Die Zellen, die mit den verschiedenen Cytokin-Kombinationen behandelt wurden, wiesen, wie die Abbildung 38 zeigt, alle eine um ein Vielfaches höhere Nitrit-Konzentration im Überstand auf als die Kontrolle mit $5,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$). Aus den verschiedenen Cytokin-Kombinationen hob sich die Kombination aus allen drei Cytokinen mit $43,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ab, die äquivalent zu der Referenz-Kombination mit $42,3 \pm 0,5 \mu\text{M}$ zu höheren Nitrit-Konzentrationen führte, als alle Kombinationen aus jeweils zwei Cytokinen. Die Inkubation mit der Kombination aus $\text{TNF } \alpha$ und $\text{IFN } \gamma$ resultierte zwar in höhere Nitrit-Konzentrationen als bei den anderen Kombinationen mit ausschließlich zwei Cytokinen, jedoch war die Nitrit-Konzentration im Überstand immer noch niedriger als bei der Referenz-Kombination und der Kombination aus allen drei Cytokinen. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher die Kombination aus den drei Cytokinen $\text{TNF } \alpha$, $\text{IFN } \gamma$ und $\text{IL } 1\beta$ verwendet.

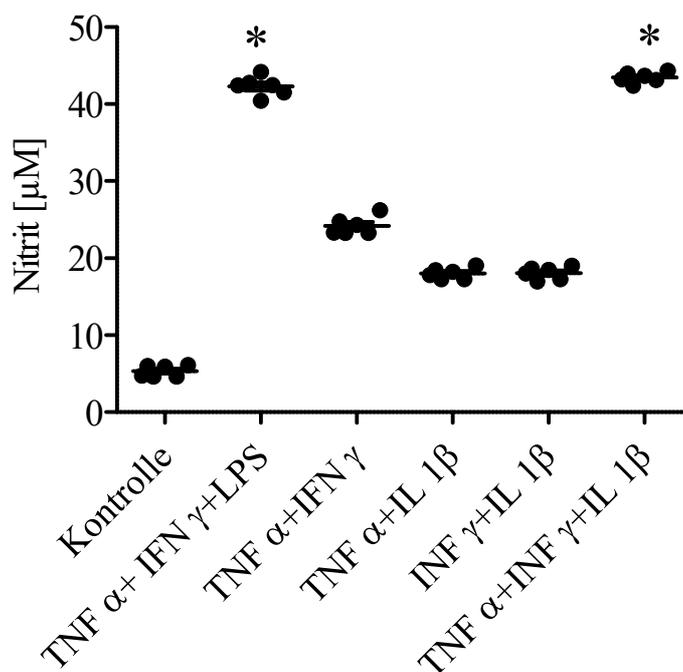


Abbildung 38: Auswirkung der Cytokin-Kombination auf die Nitrit-Konzentration nach 24 Stunden

Nitrit-Konzentrationen im Überstand der C2C12-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit den verschiedenen Cytokin-Cocktails. Die Endkonzentration vom $\text{TNF } \alpha$ im Überstand betrug immer 10 ng/mL , die von $\text{IFN } \gamma$ 20 ng/mL , die vom LPS $10 \mu\text{g/mL}$ und die von $\text{IL } 1\beta$ 10 ng/mL . Die Nitrit-Konzentrationen im Überstand wurden anhand eines modifizierten Griess Assays bestimmt.

Daten sind abgebildet als $\text{MW} \pm \text{SEM}$; $n=6$; *: $p < 0,05$; t-Test

Darauf aufbauend wurde die geeignete Konzentration an IL 1 β zur optimalen Erhöhung der iNOS-Aktivität ermittelt. Die Behandlung der Zellen mit den Cytokin-Cocktails mit verschiedenen IL 1 β -Konzentrationen resultierten alle in einer höheren Nitrit-Konzentration im Überstand als in der Kontrolle mit $9,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (s Abbildung 39) ($p < 0,05$). Unter den Cytokin-Cocktails war die Nitrit-Konzentration im Überstand lediglich bei der mit 3 ng/mL IL 1 β niedriger als bei den anderen. Dies sollte keine weitere Beachtung finden, da kein Konzentrations-Wirkungs-Effekt zu erkennen war und die Nitrit-Konzentration im Überstand dem der anderen Cytokin-Cocktails ähnelte. Da mit 1 ng/mL IL 1 β eine Nitrit-Konzentration von $52,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ und damit schon der maximale Effekt von $53,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ der Referenz-Kombination erreicht wurde, und durch eine Konzentrationserhöhung des IL 1 β die Nitrit-Konzentration nicht weiter stieg, wurde diese Konzentration weiterhin verwendet.

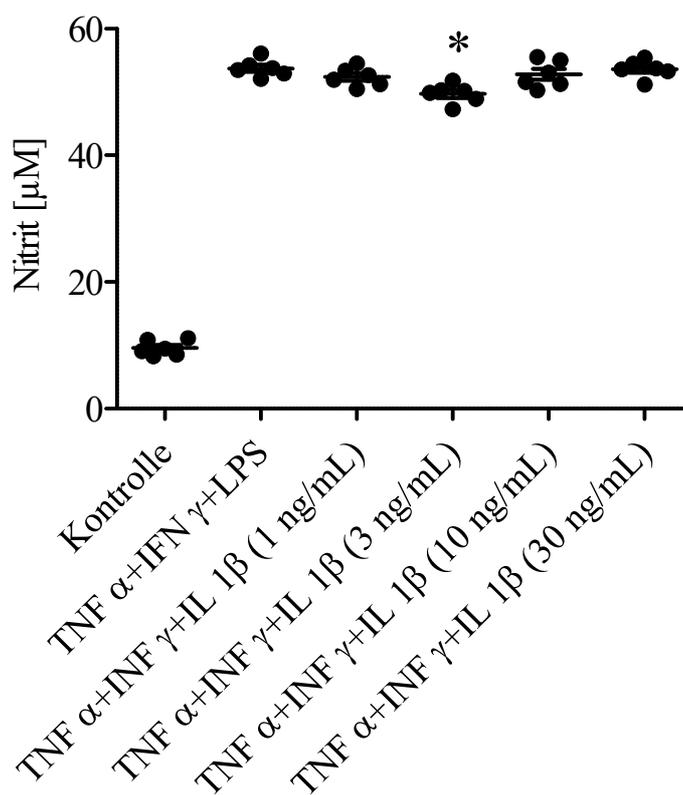


Abbildung 39: Auswirkung der IL 1 β -Konzentration auf die Nitrit-Konzentration nach 24 Stunden

Die Darstellung zeigt die Nitrit-Konzentrationen im Überstand der C2C12-Zellen nach 24 Stunden Exposition mit den verschiedenen Cytokin-Cocktails. Die Endkonzentration vom TNF α im Überstand betrug immer 10 ng/mL, die von IFN γ 20 ng/mL, die vom LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ und die von IL 1 β variierte wie angegeben. Zur Bestimmung der Nitrit-Konzentrationen im Überstand wurden ein modifizierter Griess Assay verwendet. Daten sind abgebildet als MW \pm SEM; n=6; *: $p < 0,05$; t-Test

Die weitere Optimierung bestand darin, den geeigneten Expositionszeitraum für die Induktion der iNOS zu ermitteln. Dafür wurde die Nitrit-Konzentration nach 6, 12 und 24 Stunden Inkubation mit dem Cytokin-Cocktail ermittelt. Schon nach 6 Stunden ist in der Abbildung 40 eine Steigerung der Nitrit-Konzentration mit $6,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ im Überstand zu erkennen, der nach 12 Stunden weiter auf $14,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ und nach 24 Stunden auf $25,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ steigt. Die Kontrolle ohne Gabe von Cytokinen erreichte nach 24 Stunden eine Nitrit-Konzentration von $4,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Die Steigerung der Expositionszeit trug jedes Mal auch zur Steigerung der Nitrit-Konzentration ($p < 0,05$) bei. Die Nitritproduktion wurde durch die gleichzeitige Zugabe von $0,1 \text{ M}$ ADMA erst nach 12 Stunden mit einer Nitrit-Konzentration von $12,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ bzw. nach 24 Stunden mit $19,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ gehemmt.

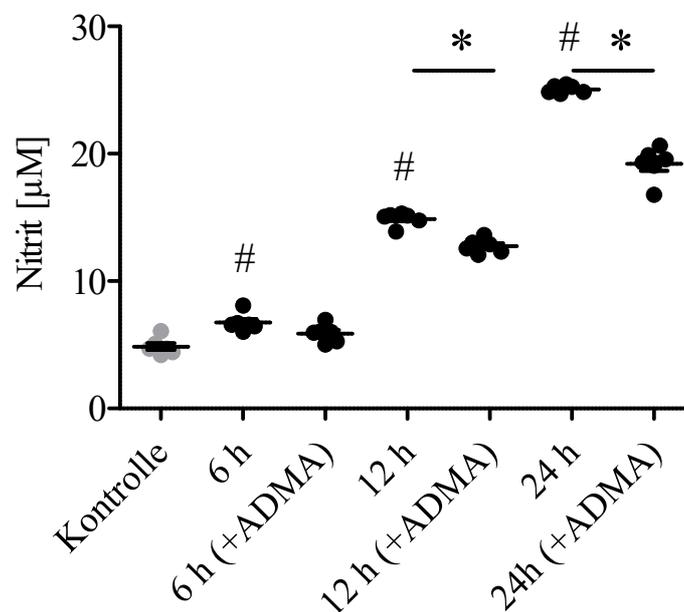


Abbildung 40: Auswirkung der Expositionszeit auf die Nitrit-Konzentration

Die Nitrit-Konzentrationen im Überstand der C2C12-Zellen nach verschiedenen Expositionszeiten mit dem Cytokin-Cocktail aus $10 \text{ ng/mL TNF } \alpha$, $20 \text{ ng/mL IFN } \gamma$ und $1 \text{ ng/mL IL } 1\beta$. Den Zellen wurde, wie angegeben gleichzeitig $0,1 \text{ mM ADMA}$ zugesetzt. Die Bestimmung der Nitrit-Konzentrationen im Überstand erfolgte anhand eines modifizierten Griess Assays.

Daten sind abgebildet als $\text{MW} \pm \text{SEM}$; $n=6$; # vs. Kontrolle: $p < 0,05$; *: $p < 0,050$; Mann-Whitney-Test

Um eine ausreichende Inhibierung der NO-Produktion zu ermöglichen, wurde in einer Konzentrationsreihe von ADMA die optimale Konzentration bestimmt, um die induzierte iNOS zu hemmen ohne sich schädlich auf die Zellen auszuwirken. Abbildung 41 zeigt die Erhöhung der Nitrit-Konzentration ($p < 0,05$) von $2,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ auf $34,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Durch gleichzeitige Zugabe vom Cytokin-Cocktail und $0,1 \text{ mM ADMA}$ stieg die Nitrit-Konzentration nur auf $28,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Die Erhöhung der Nitrit-Konzentration wurde durch die gleichzeitige Zugabe von 1 mM ADMA auf

19,7±0,6 µM und von gleichzeitiger Zugabe von 10 mM ADMA auf 4,5±0,4 µM verringert. Eine Erhöhung der ADMA-Konzentration führte zu einer Verringerung der Nitritproduktion. Die alleinige Gabe von 0,1 mM ADMA und 1 mM ADMA hatte keine Auswirkung auf die Nitritproduktion, während die Gabe von 10 mM ADMA eine geringe Erhöhung der Nitrit-Konzentration mit 2,6±0,1 µM aufwies. Daher wurde eine 1 mM ADMA-Konzentration für die weiteren Untersuchungen verwendet. So setzte sich der Cytokin-Cocktail für die weiteren Untersuchungen aus 10 ng/mL TNF α, 20 ng/mL IFN γ und 1 ng/ml IL 1β zusammen und die ADMA-Konzentration zur Hemmung der iNOS lag bei 1 mM.

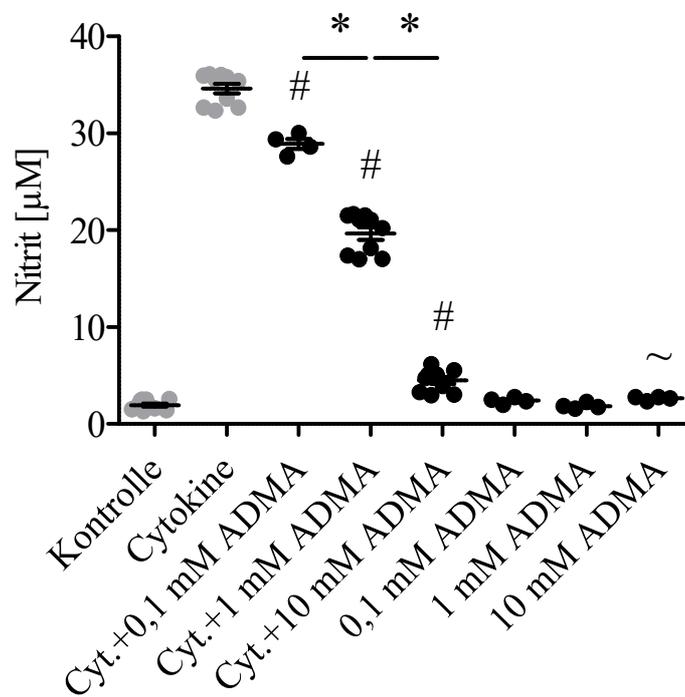


Abbildung 41: Auswirkung der ADMA-Konzentrationsreihe auf die Nitrit Konzentration nach 24 Stunden

Abgebildet sind die Nitrit-Konzentrationen im Überstand der C2C12-Zellen nach 24 Stunden Expositionszeit mit dem Cytokin-Cocktail aus 10 ng/mL TNF α, 20 ng/mL IFN γ und 1 ng/mL IL 1β. Den Zellen wurden, wie angegeben gleichzeitig verschiedene Konzentrationen an ADMA zugesetzt. Die Bestimmung der Nitrit-Konzentrationen im Überstand erfolgte anhand eines modifizierten Griess Assays.

Daten sind abgebildet als MW±SEM; Kontrolle (n=10), Cytokine (n=10), Cytokine+1 mM ADMA (n=10), Cytokine+10 mM ADMA (n=10), Cytokine+0,1 mM ADMA (n=4), 0,1 mM ADMA (n=4), 1 mM ADMA (n=4), 10 mM ADMA (n=4); # vs. Cytokine: p<0,05; ~ vs. Kontrolle: p<0,05; *: p<0,05; Mann-Whitney-Test

3.2.3 Einfluss von NO auf die insulinabhängige Glucoseaufnahme

Zur Bestimmung des Einflusses des NO-Stoffwechsels auf die Insulinsensitivität wurde die Insulin-induzierte Aufnahme von isotope-markierter Deoxy-Glucose in die C2C12-Zelle untersucht.

Dabei wurde die aufgenommene Menge an ^3H -Deoxy-D-Glucose unter Einfluss von Insulin in Relation zur aufgenommenen ^3H -Deoxy-D-Glucose ohne Insulin gesetzt.

Die Insulin-vermittelte Glucoseaufnahme in Bezug zur basalen Glucoseaufnahme senkte sich durch die Gabe von Cytokinen von $148\pm 3\%$ auf $118\pm 5\%$ (s. Abbildung 42). Unter gleichzeitiger Zugabe von ADMA konnte die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme nicht wieder erhöht werden ($p=0,5377$) und blieb mit $111\pm 11\%$ im Vergleich zur Kontrolle niedriger. ADMA alleine hatte mit $138\pm 6\%$ keine Auswirkung auf die Insulin-induzierte Glucoseaufnahme, die im Vergleich mit der Gabe vom Cytokin-Cocktail erhöht war.

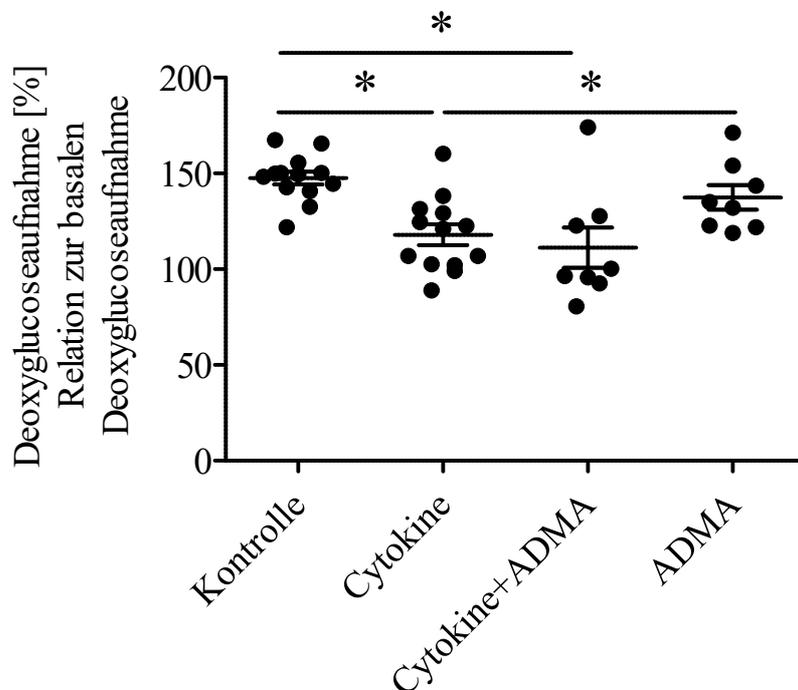


Abbildung 42: Insulin-induzierte ^3H -Deoxy-D-Glucoseaufnahme der C2C12-Myozyten unter Cytokin-Exposition

Die Insulin-induzierte Glucoseaufnahme der C2C12-Zellen wurde nach 24 Stunden Expositionszeit mit dem Cytokin-Cocktail aus 10 ng/mL TNF α , 20 ng/mL IFN γ und 1 ng/mL IL 1 β und der gleichzeitigen Zugabe von 1 mM ADMA bestimmt. Die Aufnahme von ^3H -Deoxy-Glucose mit dem Zusatz von 100 nM Insulin wurde dabei in Relation zur Aufnahme von ^3H -Deoxy-Glucose ohne dem Zusatz von Insulin gesetzt.

Daten sind abgebildet als $\text{MW}\pm\text{SEM}$; Kontrolle (n=13), Cytokine (n=13), Cytokine+ADMA (n=8), ADMA (n=8); *: $p<0,05$; t-Test

Die Nitrit-Konzentrationen der Überstände dieser Zellen zeigten durch Gabe von Cytokinen eine Erhöhung um $8,8\pm 1,6 \mu\text{M}$ gegenüber der Kontrolle (s. Abbildung 43). Durch die gleichzeitige Zugabe von Cytokinen und ADMA steigerte sich die Nitrit-Konzentration nur noch um $2,5\pm 1,1 \mu\text{M}$ und durch die alleinige Gabe von ADMA um $1,4\pm 1,5 \mu\text{M}$. Zwar war die Nitrit-Konzentration der

gleichzeitigen Zugabe von Cytokinen und ADMA gegenüber der Kontrolle erhöht, jedoch gegenüber der alleinigen Gabe von Cytokinen erniedrigt.

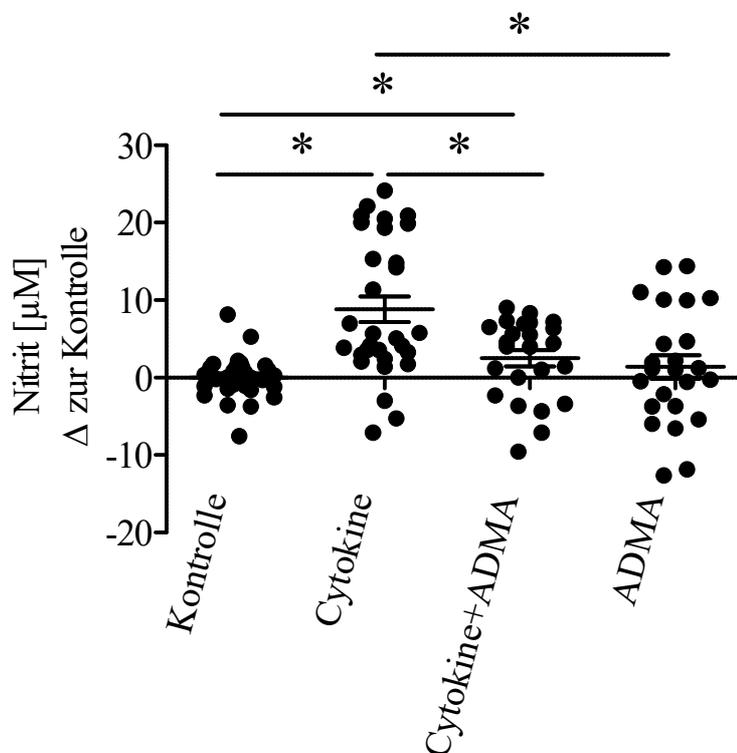


Abbildung 43: Differenz der Nitrit-Konzentrationen im Überstand der C2C12 unter Cytokin-Exposition

In der Abbildung sind die Nitrit-Konzentrationen im Überstand der C2C12-Zellen nach 24 Stunden Expositionszeit mit dem Cytokin-Cocktail aus 10 ng/mL TNF α , 20 ng/mL IFN γ und 1 ng/mL IL 1 β dargestellt. Den Zellen wurde, wie angegeben gleichzeitig 1 mM ADMA zugesetzt. Die Bestimmung der Nitrit-Konzentrationen im Überstand erfolgte anhand eines modifizierten Griess Assays.

Daten sind abgebildet als MW \pm SEM; Kontrolle (n=30), Cytokine (n=30), Cytokine+ADMA (n=24), ADMA (n=24); *: p<0,05; Mann-Whitney-Test

3.2.4 Einfluss von NO auf die Insulinsekretion und Viabilität Insulin-produzierender β -Zellen

Ein weiterer möglicher Aspekt der Wirkung des NO-Stoffwechsels auf den Diabetes mellitus, der untersucht wurde, war der Einfluss auf die Insulin-produzierenden β -Zellen. Dafür wurde zunächst die glucoseunabhängige und die Glucose-vermittelte Insulinsekretion durch Messung der Insulin-Konzentration im Überstand bestimmt. Die auf den Proteingehalt normalisierte Insulinsekretion wurde für die Auswertung im Verhältnis zur glucoseunabhängigen Insulinsekretion

der Kontrolle gesetzt. Zur Auswertung der Viabilität wurden die gemessenen Absorptionen in Relation zur Absorption der Kontrolle gesetzt.

Die Insulinsekretion wird durch die Gabe von Cytokinen sowohl basal mit 0,4 mM Glucose von 100% auf $82\pm 3\%$ als auch Glucose-stimuliert mit 20 mM Glucose von $186\pm 9\%$ auf $126\pm 7\%$ verringert. Jedoch wird die Verringerung weder basal mit $86\pm 7\%$ noch Glucose-stimuliert mit $139\pm 8\%$ durch die gleichzeitige Zugabe von ADMA verhindert. Eine Verringerung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion ist durch die gleichzeitige Zugabe von ADMA in Bezug zur Kontrolle zu erkennen. Die alleinige Gabe von ADMA hatte keine Auswirkung im Vergleich zur Kontrolle und ist sowohl basal mit $110\pm 8\%$ ($p=0,0055$) als auch Glucose-stimuliert mit $176\pm 15\%$ ($p=0,0099$) höher als die bei der Exposition mit Cytokinen. Die basale Insulinsekretion mit Cytokinen und ADMA ist gegenüber ADMA alleine erniedrigt ($p=0,0391$).

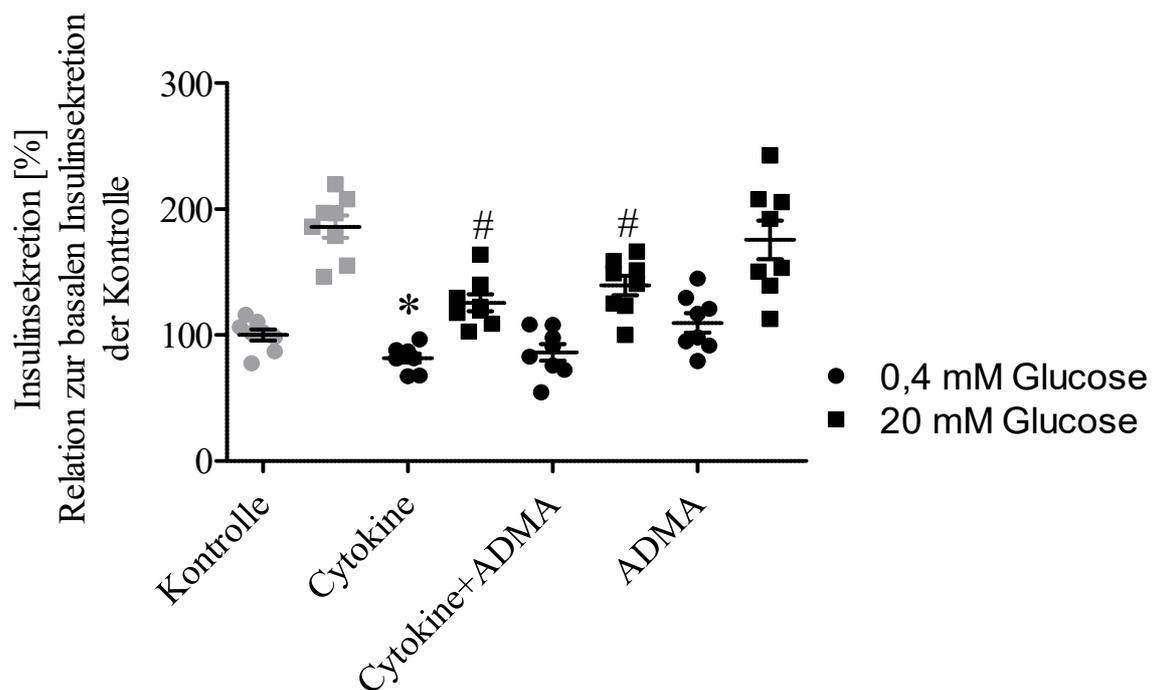


Abbildung 44: Insulinsekretion der HIT-T15- β -Zellen unter Cytokin-Exposition

Die Insulinsekretion der HIT-T15-Zellen wurde entweder mit 0,4 mM Glucose oder mit 20 mM Glucose für zwei Stunden stimuliert und die Insulin-Konzentration im Überstand bestimmt. Die Insulin-Konzentrationen wurden auf die Gesamtproteinmenge normalisiert und in Relation zur basalen Insulinsekretion der Kontrolle gesetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden ohne Zusätze, mit einem Cytokin-Cocktail, mit einem Cytokin-Cocktail und 1 mM ADMA oder 1 mM ADMA alleine behandelt. Der Cytokin-Cocktail bestand aus 10 ng/mL TNF α , 20 ng/mL IFN γ und 1 ng/mL IL 1 β .

Daten sind abgebildet als $MW\pm SEM$ ($n=8$), * vs. Kontrolle 0,4 mM Glucose: $p<0,05$; # vs. Kontrolle 20 mM Glucose: $p<0,05$; t-Test

Ein weiterer möglicher Einfluss der verstärkten NO-Produktion war die Beeinträchtigung der Viabilität der Zellen. Daher wurde untersucht, inwieweit sich der Cocktail cytotoxisch auf die β -Zellen auswirkte und ob dieser Effekt durch ADMA verhindert werden konnte. In der Abbildung 45 ist dargestellt wie die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle durch die Gabe von Cytokinen von 100% auf $83\pm 4\%$ gesenkt wurde. Diese wurde jedoch durch gleichzeitige Zugabe von ADMA wieder auf $120\pm 9\%$ erhöht. Die Viabilität war bei der alleinigen Gabe von ADMA mit $110\pm 7\%$ ebenfalls gegenüber der Exposition mit dem Cytokin-Cocktail erhöht.

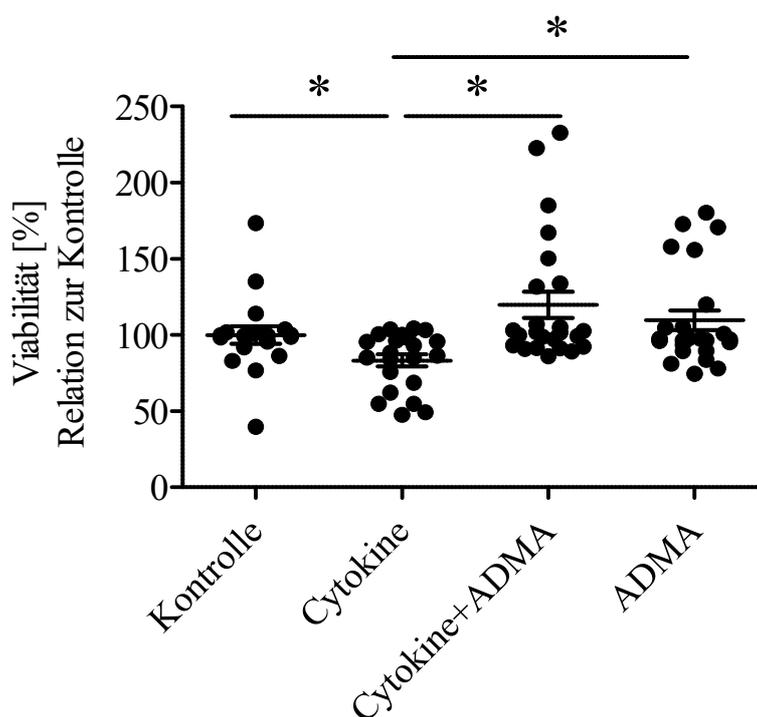


Abbildung 45: Viabilität der HIT-T15- β -Zellen unter Cytokin-Exposition

Die Viabilität der HIT-T15-Zellen wurde mittels MTT-Reagenz bestimmt und in Relation zur Kontrolle gesetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden ohne Zusätze, mit einem Cytokin-Cocktail, mit einem Cytokin-Cocktail und 1 mM ADMA oder 1 mM ADMA alleine behandelt. Der Cytokin-Cocktail bestand dabei aus 10 ng/mL TNF α , 20 ng/mL IFN γ und 1 ng/mL IL 1 β .

Daten sind abgebildet als MW \pm SEM; Kontrolle (n=19), Cytokine (n=22), Cytokine+ADMA (n=24), ADMA (n=24); *: p<0,05; Mann-Whitney-Test

4 Diskussion

4.1 In-vivo Untersuchungen im Tiermodell

Für die Beurteilung der Zusammenhänge hinsichtlich des NO-Stoffwechsels, der Adipositas und des Glucosestoffwechsels im Tiermodell ist die Überprüfung, der durch die Interventionen bedingten Veränderungen bestimmter Grundparameter Voraussetzung. So ist festzustellen, ob das genetische Ausschalten der DDAH1-Expression tatsächlich zu einem erhöhten Aufkommen von ADMA führt und auszuschließen, dass kompensatorische biochemische Mechanismen zu einer Erhöhung bzw. Erniedrigung weiterer Argininderivate führen. Dadurch wird verhindert, dass mögliche Effekte im Zuge inhibitorischer bzw. kaschierender Einflüsse dieser Argininderivate unberücksichtigt bleiben. Ferner ist es wichtig zu beurteilen, ob die hochkalorische DIO-Diät auch tatsächlich zu einer erhöhten Gewichtszunahme bzw. Adipositas führt und ob sich diese auch in biochemischen Prozessen der Glucosehomöostase auswirkt. Erst nach der Überprüfung des Modells, wenn beide angewandte Maßnahmen auch die erwünschten Effekte auf die ADMA-Werte und die Insulinsensitivität bzw. die Entwicklung von Adipositas hervorbrachten, konnten auch etwaige Interaktionen und Korrelationen beurteilt werden.

4.1.1 Einfluss des DDAH1^{-/-} auf die Argininderivate

Zur Beurteilung der Auswirkung der DDAH1-Defizienz auf ADMA wurden die Plasma-ADMA-Konzentrationen der Mäuse erhoben. Die Abbildung 16 zeigt, dass die Plasma-ADMA-Konzentration der WT+DIO-Gruppe und WT-DIO-Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum bei ca. 1 µM lagen, während die KO+DIO-Gruppe und KO-DIO-Gruppe Plasma-ADMA-Konzentrationen um 2 µM aufwiesen. Lediglich in der 18. Woche stieg die Plasma-ADMA-Konzentration der KO+DIO-Gruppe auf 3 µM, worauf im Folgenden näher eingegangen wird (s. Kapitel 4.1.2). Die Plasma-ADMA-Konzentration der KO+DIO-Gruppe gegenüber der WT+DIO-Gruppe war jedoch erst ab Woche 12 und der KO-DIO-Gruppe gegenüber der WT-DIO-Gruppe ab Woche 16 erhöht. Dieses ist eher der geringen Anzahl an Proben in den ersten Wochen zuzurechnen, als dass dieser Effekt in der Zeit davor tatsächlich nicht vorhanden war. Insgesamt ist in den ersten Wochen das Volumen an entnommenen Blut aufgrund der geringeren Größe der Tiere limitiert. Da die Priorität auch vielmehr auf die Blutglucose- und

Plasma-Insulin-Bestimmung gelegt worden ist, reichte bei einigen Tieren die Menge an erhaltenem Plasma nicht mehr zur Bestimmung der Konzentration der Argininderivate aus. Die sich daraus ergebende geringe Probenzahl stellt somit ein statistisches Problem dar, womit schon vor Entstehung der statistischen Signifikanz von der Erhöhung der Plasma-ADMA-Konzentration in den beiden KO-Gruppen ausgegangen werden darf. Ungeachtet dieser technischen Probleme resultierte das Ausschalten der DDAH1-Expression auch tatsächlich in einer Steigerung der Plasma-ADMA-Konzentrationen der Versuchstiere um ca. 100%.

Die mit der LC-MS/MS-Methode erhobenen Plasma-Arginin-Konzentrationen werden immer in einer dreifachen Messung bestimmt, womit für jede Probe 75 μ L Plasma erforderlich ist. Wie zuvor beschrieben, war teilweise nicht genug Plasma (25 μ L) vorhanden, um eine Messung durchzuführen. Daher musste die Plasma-Arginin-Konzentration anhand einer einfachen Bestimmung ermittelt werden. Dementsprechend ist die Beurteilung der Plasma-Arginin-Konzentrationen zu relativieren, da sich dies auch in der breiten Streuung der Werte widerspiegelt (s. Abbildung 17). Die erhobenen Plasma-Arginin-Konzentrationen weisen auf keinen Einfluss des Knockouts oder der DIO-Diät hin. Auch die Plasma-SDMA-Konzentrationen der Tiere unterscheiden sich weder durch Genotyp noch durch DIO-Diät, wie die Abbildung 18 zeigt. Somit können für die Betrachtung weiterer Daten Interaktionen bzw. Kaschierungen aufgrund kompensatorischer Einflüsse von L-Arginin oder SDMA ausgeschlossen werden.

Insgesamt erschwert die geringe Zahl der Proben die Erhebung der Daten und die Ermittlung von Korrelationen. Das geringe Volumen an gewonnenem Plasma war dafür verantwortlich, dass bei einigen Tieren insbesondere in der ersten Erhebung für die Plasma-ADMA- und Plasma-SDMA-Konzentrationen keine Proben vorhanden waren. Hinzu kommt, dass drei Tiere bei der Nachgenotypisierung von der Auswertung ausgeschlossen worden sind, wodurch sich die Zahl der Proben verkleinerte. Zusammengefasst kann jedoch von erhöhten Plasma-ADMA-Konzentrationen bei den DDAH1^{-/-}-Mäusen ausgegangen werden. Des Weiteren ist die Beeinflussung der Plasma-Arginin- und Plasma-SDMA-Konzentration durch den Knockout oder die DIO-Diät auszuschließen.

4.1.2 Manifestation einer Adipositas

Die Entstehung von Adipositas stellt den initialen und somit einen elementaren Schritt in der Entwicklung vom Typ II Diabetes dar. Deshalb ist das primäre Ziel der DIO-Diät die Manifestation

von Adipositas bei den Mäusen. Bei der Betrachtung der Gewichte (s. Abbildung 19) sieht man, dass die Tiere der KO+DIO-Gruppe in Woche 16 und Woche 17 mehr wiegen als die Tiere der KO-DIO-Gruppe. Dieser Effekt ist jedoch nicht zwischen den WT-Gruppen zu beobachten. Auch hier handelt es sich mehr um ein Problem der geringen Anzahl an Tieren in der WT-DIO-Gruppe mit vier Tieren als um einen fehlenden Effekt. Wird ein Mann-Whitney-Test anstatt des 2way-ANOVAs mit Bonferroni-Post-Test zur Beurteilung der Signifikanz angewendet, so ergibt sich sowohl in der 16. Woche ($p=0,0325$) als auch in der 17. Woche ($p=0,0190$) ein höheres Gewicht der Tiere in der WT+DIO-Gruppe im Vergleich zur der WT-DIO-Gruppe.

Aussagekräftiger ist jedoch die Entwicklung der Gewichtszunahme der Tiere. Somit kann eine Aussage bezüglich der DIO-Diät getroffen werden, die unabhängig von den individuellen Gewichtsunterschieden ist. Sowohl die Betrachtung der absoluten (Abbildung 20) als auch der relativen Gewichtszunahme (Abbildung 21) zeigen im Verlauf der Untersuchungen bei beiden DIO-Gruppen eine erhöhte Gewichtszunahme im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen. Während sich zwischen der WT+DIO-Gruppe und der WT-DIO-Gruppe schon ab der zwölften Woche ein differenziertes Bild bezüglich der Gewichtszunahme entwickelte, stellt sich bei der KO+DIO-Gruppe gegenüber der KO-DIO-Gruppe eine Erhöhung erst ab der 16. Woche ein. Die spätere Entstehung von Adipositas könnte ein erster Hinweis eines möglichen protektiven Effekts von erhöhten Plasma-ADMA-Konzentrationen sein. Während die relative Gewichtszunahme der WT-DIO-Gruppe und KO-DIO-Gruppe ähnlich verliefen, war bei der WT+DIO-Gruppe zu erkennen, dass die Versuchstiere tendenziell mehr Gewicht zunahmten als die KO+DIO-Gruppe. Dieser mögliche Effekt könnte den erhöhten Plasma-ADMA-Konzentrationen der KO-Gruppen zugesprochen werden. Ob ADMA nur das Einsetzen der Adipositas verzögert, wie die Daten nahe legen, oder auch über einen längeren Zeitraum die Adipositas abmildert, ist aufgrund der kurzen Beobachtungsphase nicht weiter zu evaluieren.

Die Rolle von weißem Fettgewebe, woraus das epididymale Fettpolster hauptsächlich besteht, in der Entwicklung der Insulinresistenz wurde in den letzten Jahrzehnten neu definiert. Weißes Fettgewebe nimmt mit der Speicherung von Lipiden nicht nur eine wichtige Bedeutung im Energiemetabolismus des Körpers ein, sondern fungiert durch die Sekretion von Adipokinen auch als endokrines Organ^{128,129}. Über 50 solcher Adipokine, die von den Adipozyten freigesetzt werden, wurden bisher identifiziert. Bei adipösen Tier- und Zellmodellen werden neben Adiponektin¹³⁰, Leptin¹³¹ und freien Fettsäuren auch Cytokine wie TNF α ¹³² oder IL 1 β durch Adipozyten vermehrt sezerniert. Die Freisetzung von Adipokinen wird unter anderem durch die Stimulation von IL 1 β potenziert¹³³.

Zusätzlich sind Makrophagen im Fettgewebe präsent, die durch Ausschüttung weiterer Cytokine die Freisetzung der Adipokine auch potenzieren können. Diese Adipokine wirken systemisch an verschiedenen Zielorganen und können zur chronisch subklinischen Inflammation bei Diabetes und Adipositas beitragen^{134,135}. Die chronisch subklinische Inflammation steht wiederum im Bezug zur Entwicklung der Insulinresistenz und des metabolischen Syndroms^{136,137}. Ein vermehrtes Vorkommen von Makrophagen im Fettgewebe tritt im adipösen Zustand auf¹³⁸. Die Inflammation durch Makrophagen¹³⁹ und Adipozyten^{140,141} resultiert in einer verstärkten Expression der iNOS. Eine Milderung der durch das Fettgewebe bedingten subklinischen Inflammation durch die erhöhten ADMA-Konzentration der DDAH1-defizienten Mäuse wäre möglich.

Auch der Einfluss der DIO-Diät auf die epididymalen Fettpolster machte sich in höheren Gewichten dieser (s. Abbildung 22) bemerkbar. Bei der Betrachtung des relativen, vom Gesamtgewicht unabhängigen Anteils der Fettpolster (s. Abbildung 23) zeigt sich, dass die DIO-Gruppen auch vermehrt Fett ansetzten. Letztendlich war die DIO-Diät im Bezug zur Adipositas als erfolgreich zu beurteilen. Sowohl die WT-Gruppe als auch die KO-Gruppe verzeichneten im Zuge der DIO-Diät eine stärkere Gewichtszunahme und bildeten vermehrt Fettpolster. Der Genotyp hatte keinen deutlichen Einfluss auf die Gewichte der Fettpolster.

Eine weitere Erkenntnis über Adipositas in Bezug auf die Plasma-ADMA-Konzentration ist, dass sich in der KO+DIO-Gruppe die Plasma-ADMA-Konzentrationen in der Woche 18 erhöhten. Dies lässt einen Einfluss von Adipositas auf den NO-Stoffwechsel vermuten. Die Plasma-ADMA Konzentration steigerte sich gegenüber der KO-DIO-Gruppe um 50%. Dieser Effekt war in den WT-Gruppen nicht zu beobachten. Ein Grund dafür könnte eine kompensatorisch erhöhte Expression bzw. Aktivität der DDAH1 sein, die in den KO-Gruppen ausgeschaltet ist. Dadurch würde eine durch die Diät-induzierte Erhöhung der Plasma-ADMA-Konzentration nicht sichtbar sein. Hier ist die kurze Beobachtungszeit hinderlich, um die weitere Entwicklung bezüglich der Plasma-ADMA-Konzentration auszuwerten. Die Korrelationsanalyse ergab hauptsächlich in der KO+DIO-Gruppe eine positive Assoziation zwischen Plasma-ADMA-Konzentration und Gesamtgewicht bzw. absoluter oder relativer Gewichtszunahme. Dies spricht dafür, dass mit steigendem Gewicht höhere Plasma-ADMA-Konzentrationen auftreten, wenn diesen nicht durch einen kompensatorisch verstärkten Metabolismus über die DDAH1 entgegen reguliert wird. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Assoziation schwach ausgeprägt ($r^2=0,202-0,284$) ist. Ob die Plasma-ADMA-Konzentration nur durch die Gewichtszunahme oder durch das eventuelle Einsetzen einer Insulinresistenz bedingt ist, bleibt zu klären. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen,

dass erhöhte ADMA-Konzentrationen bei Insulinresistenz auftreten und durch eine verbesserte Insulinresistenz wieder sinken^{142,143}. Jedoch können erhöhte ADMA-Konzentrationen auch durch eine Gewichtsreduktion sinken¹⁴⁴. Ein direkter Zusammenhang zwischen verbesserter Glucosehomöostase und ADMA-Konzentrationen wurde bereits in klinischen Studien gezeigt^{91,145}. Der kausale Zusammenhang zwischen einer verbesserten Glucosehomöostase und erhöhter Plasma-ADMA-Konzentrationen wurde bis jetzt jedoch nicht geklärt. Eine Regulierung der DDAH1 und damit die Metabolisierung von ADMA durch Glucose wurde in Erwägung gezogen und diskutiert^{146,147}. Jedoch kann es bei den DDAH1-defizienten Versuchstieren nicht zutreffen, so dass andere mögliche Mechanismen in Erwägung gezogen werden müssen.

Zusammengefasst gibt es zwei Ansatzpunkte für einen Zusammenhang zwischen Adipositas und der Plasma-ADMA-Konzentration. Zum einen erhöht sich bei einer Manifestation von Adipositas die Plasma-ADMA-Konzentration der Tiere. Andererseits wirkt ein hoher Plasma-ADMA-Spiegel retardierend und eventuell sogar abmildernd auf die Gewichtszunahme in der Entwicklung von Adipositas.

4.1.3 Insulinsensitivität und Glucosehomöostase

Der Typ II Diabetes mellitus geht zusammen mit der Insulinresistenz einher, wenn sich die gesteigerte Kalorienzufuhr nicht nur auf das Gewicht der Tiere, sondern auch auf die Glucosehomöostase auswirkt. Die Beurteilung der Insulinsensitivität erfolgte durch die Nüchtern-Blutglucose-Konzentration, die Nüchtern-Plasma-Insulin Konzentration, dem sich daraus ergebenden HOMA-Index und maßgeblich durch den OGTT in der 17. Woche.

In der 16. Woche ergaben sich höhere Blutglucose-Konzentrationen in beiden DIO-Gruppen im Vergleich zu den jeweiligen Non-DIO-Gruppen (s. Abbildung 24), welche auf den Einfluss der hochkalorischen Nahrung zurückzuführen war. Tendenziell sind bei beiden DIO-Gruppen gegenüber den Non-DIO-Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum höhere Blutglucose-Konzentrationen zu verzeichnen. Die WT+DIO-Gruppe zeigte mit 7,58 mmol/L, 6,12 mmol/L und 8,15 mmol/L und die KO+DIO-Gruppe mit 7,15 mmol/L, 6,46 mmol/L und 7,61 mmol/L meist höhere Konzentrationen als die 7 mmol/L für die Diagnose von Diabetes, während die WT-DIO-Gruppe mit 5,29 mmol/L, 5,50 mmol/L, und 4,95 mmol/L und KO-DIO-Gruppe mit 6,23 mmol/L, 5,23 mmol/L und 5,63 mmol/L stets unter diesem Wert bleiben. Die erhöhten Blutglucose-Konzentrationen weisen somit auf eine Insulinresistenz hin.

Erhöhte Glucose-Konzentrationen sind ein Indikator für eine beeinträchtigte Insulinsensitivität, jedoch ist für eine fortgeschrittene Insulinresistenz erst eine gleichzeitige Erhöhung der Plasma-Insulin-Konzentration aussagekräftig, da diese auch ein Symptom von erhöhtem Insulinbedarf ist. Erhöhte Plasma-Insulin-Konzentrationen setzten erst in der Woche 16, und das nur in der WT+DIO-Gruppe ein (s. Abbildung 25), während sich zwischen der KO+DIO-Gruppe und der Kontrollgruppe keine Signifikanz einstellte. Als Ursache hierfür kann einerseits die hohe Plasma-ADMA-Konzentration in der KO+DIO-Gruppe verantwortlich sein. Andererseits ist eher die hohe Varianz in den Werten dieser Gruppe ein Grund dafür, dass keine statistische Signifikanz zu ermitteln war. Die durchschnittliche Plasma-Insulin-Konzentration war tendenziell sogar höher als bei der WT+DIO-Gruppe. Dieser starke Anstieg und die hohe Varianz waren aufgrund zweier Werte zustande gekommen, die aber keine Ausreißer waren. Somit ist eine erhöhte Plasma-ADMA-Konzentration als Grund für die geringe Plasma-Insulin-Konzentration im adipösem Zustand und damit auch eine mögliche protektive Eigenschaft von ADMA auf die Entwicklung von Insulinresistenz unwahrscheinlich. Zusammengefasst war zwar ein Anstieg der Plasma-Insulin-Konzentration über die Zeit zu erkennen, jedoch fand relativ spät eine signifikante Differenzierung statt und diese war auch nur in den WT-Gruppen zu finden. Somit war anhand der Plasma-Insulin-Konzentrationen ein Einsetzen der Insulinresistenz in der KO+DIO-Gruppe nicht zu erkennen.

Mit dem HOMA-Index, als Produkt beider Indikatoren, können die Ergebnisse beider Methoden zusammengefasst werden. Wie die Abbildung 26 zeigt, war der HOMA-Index in der Woche 16 sowohl bei der WT+DIO-Gruppe als auch bei der KO+DIO-Gruppe im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle erhöht. Das spricht erneut für eine einsetzende Insulinresistenz in der 16. Woche bei beiden DIO-Gruppen. Zwar gab es eine negative Korrelation zwischen der Plasma-ADMA-Konzentration und der Blutglucose-Konzentration innerhalb der WT-DIO-Gruppe, jedoch ist diese aufgrund der Tierzahl ($n=4$) in dieser Gruppe differenziert zu berücksichtigen. Weitere Korrelationen zwischen den ADMA-Konzentrationen und den Plasma-Insulin-Konzentrationen bzw. dem HOMA-Index konnten nicht ermittelt werden.

Als letzte und maßgebende Methode zur Bewertung der Insulinsensitivität wurde ein OGTT durchgeführt. Die erfassten Ergebnisse darüber zeigen aber keine Anzeichen auf eine, durch die DIO-Diät verursachte Insulinresistenz. Die Blutglucose-Konzentrationen der DIO-Gruppen blieben nach Glucosegabe innerhalb von zwei Stunden weder über der Basalkonzentration, noch unterschieden sie sich weiter im Vergleich zu der Kontrollgruppe (s. Abbildung 27). Auch die

mittlere Verweildauer der zugeführten Glucose war in allen Gruppen identisch (s. Abbildung 28). Dies widerspricht teilweise den Rückschlüssen, die durch die Blutglucose- und Plasma-Insulin-Konzentrationen bezgl. der Insulinsensitivität gezogen worden sind. Verschiedene Gründe können hierfür verantwortlich sein und müssen auch bei der Beurteilung der Insulinsensitivität beachtet werden. Zum einen zeigt der OGTT eine Momentaufnahme, während die Erhebung der Glucose- und Insulin-Werte über den gesamten Verlauf der Untersuchungen erfolgte. Der OGTT besitzt auch methodische Schwierigkeiten. Die Tiere stehen bei der Untersuchung über einen längeren Zeitraum unter einer Stresssituation, in der vermehrt Hormone wie Cortison ausgeschüttet werden. Cortison zeigt sowohl katabole Eigenschaften als auch eine verstärkende Eigenschaft des Effekts von Adrenalin und Glucagon auf die Glucosehomöostase. Der durch den OGTT ausgelöste Stress hat somit unter anderem auch einen Einfluss auf die Insulinsekretion und spiegelt sich in erhöhten Glucose-Konzentrationen wider¹⁴⁸. So waren schon die basalen Glucose-Konzentrationen der WT+DIO-Gruppe mit 6,72 mmol/L, der KO+DIO-Gruppe mit 9,15 mmol/L, der WT-DIO-Gruppe mit 7,66 mmol/L und der KO-DIO-Gruppe mit 7,39 mmol/L erhöht. Zuzüglich ist die Messung mit durch Punktion der Mausschwanzvene entnommenen Blutes durch eventuell austretende Lymphe gestört. Zum anderen ist der OGTT als eine akute Insulinreaktion auf akute Glucosezufuhr, die geeignetste Methode, um eine Insulinresistenz zu identifizieren. Die methodischen Schwierigkeiten, die Ausschüttung von Stresshormonen und Verunreinigung durch Lymphe wirkten sich auf die DIO-Gruppen und die Kontrollgruppen gleichermaßen aus. Dennoch ergab sich kein Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen. Da die hohe Varianz der Plasma-Insulin-Konzentrationen, die späte Beeinträchtigung der Glucosehomöostase und vor allem, dass nicht alle Daten eindeutig auf eine gestörte Insulinsensitivität deuteten, konnte keine Insulinresistenz oder gestörte Glucosehomöostase geschlussfolgert werden.

Nach Evaluierung aller Daten konnte gezeigt werden, dass die DIO-Diät eine Adipositas induziert hatte, aber diese nicht in einer gestörten Glucosehomöostase mit eindeutiger Insulinresistenz resultierte. Dafür können verschiedene Gründe verantwortlich sein. Für die Bewertung der Insulinsensitivität mit der Blutglucose-Konzentration war, neben der Erhebung der Daten in der Woche 8, Woche 12 und Woche 16, auch eine Messung in der Woche 18 vorgesehen. Bei der Erhebung der Daten fiel mit der Woche 18 ein ganzer Messzeitpunkt weg, da die Blutentnahme in der Woche 18 nach Betäubung mit Isofluran erfolgte, womit die Messung der Blutglucose- und Plasma-Insulin-Konzentration beeinflusst^{149,150} wurde. Dies war bei der Planung der Untersuchungen nicht berücksichtigt worden und führte dazu, dass obwohl ein Trend in den ersten Wochen vorhanden war und eine ausreichende Beobachtungszeit ausgewählt wurde, nur bei einem Zeitpunkt, der

Woche 16, eindeutig erhöhte Blutglucose-Konzentrationen messbar waren. Selbige Problematik zeigte sich auch bei der Erhebung der Plasma-Insulin-Konzentrationen und schlug sich auch bei der Betrachtung des HOMA-Indexes nieder. In der 16. Woche war eine Steigerung des HOMA-Indexes bei beiden DIO-Gruppen und der Plasma-Insulin-Konzentration bei der WT+DIO-Gruppe zu beobachten. Diese Steigerung zeigte, dass eine Veränderung des biochemischen Glucosemetabolismus einsetzte. Die Entwicklung einer Insulinresistenz war auch erst ab der zwölften Woche zu erwarten, jedoch fehlt aufgrund des Wegfallens der Daten in der Woche 18 eine Bestätigung des Effekts der Diät in der Woche 16, um einerseits die Datenmenge für eine statistische Auswertung zu erhöhen und andererseits eine klare Beurteilung hinsichtlich der Insulinsensitivität zu treffen. Ausschlaggebend jedoch dafür, dass keine Insulinresistenz diagnostiziert werden konnte, war der OGTT. Beim OGTT, als relevanteste Methode zur Beurteilung der Insulinresistenz, konnte keine beeinträchtigte Glucosehomöostase festgestellt werden. Bei der Beurteilung hätten die methodischen Schwierigkeiten des OGTTs von Bedeutung sein können und zu einer stärkeren Berücksichtigung der Blutglucose- und Plasma-Insulin-Konzentration geführt, jedoch nur, wenn bei diesen eine eindeutige Insulinresistenz über einen längeren Zeitraum aufgetreten wäre.

In einem ähnlichen Modell einer anderen Arbeitsgruppe, in dem C57BL/6J-Mäuse eine DIO-Diät mit und ohne Supplementation von N(G)-Nitro-L-arginin-methylester (L-NAME) erhielten, konnte eine Verbesserung der Insulinresistenz gezeigt werden¹⁵¹. L-NAME ist ein weiteres Argininderivat, welches die NOS kompetitiv hemmt. Diese Tiere entwickelten mit einer hochkalorischen Nahrung, mit 80% Fettanteil, eine Insulinresistenz mit erhöhten Gesamtgewichten, vermehrtem Fettgewebe und Adipozyten, erhöhte Blutglucose-Konzentrationen, erhöhte Insulin-Konzentrationen und verschlechterter Glucose-Toleranz. Durch die Zugabe von 100 mg/kg L-NAME pro Tag im Trinkwasser konnten alle Auswirkungen der DIO-Diät verringert werden. Ähnliche Ergebnisse resultierten in einem Modell mit iNOS-defizienten Mäusen, die vier Monate lang mit einer hochkalorischen Nahrung mit 55% Fettanteil gefüttert wurden. Die iNOS^{-/-}-Mäuse hatten unter der DIO-Diät zwar mehr Kalorien zu sich genommen, entwickelten dadurch ein höheres Gesamtgewicht und mehr Fettgewebe als ihre WT-Geschwister, jedoch verringerte sich bei ihnen die Blutglucose-Konzentration und die Insulin-Konzentration. Die Glucose-Toleranz der iNOS^{-/-}-Mäuse war erhöht und die isolierten Muskelzellen zeigten eine verbesserte Insulin-induzierte Glucoseaufnahme als die WT-Geschwister⁹⁷. Die PI3K-Aktivität und die Phosphorylierung der Akt/PKB war in den Muskelzellen der WT-Geschwister unter der DIO-Diät erniedrigt und konnte durch die iNOS-Defizienz wieder hergestellt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die DIO-Diät in den Mäusen zu einer verstärkten Expression der iNOS im weißen Fettgewebe führte⁹⁷.

Dadurch wird die wichtige Rolle der chronisch subklinischen Inflammation bei Adipositas in der Entwicklung der Insulinresistenz verdeutlicht. Eine erhöhte Gewichtszunahme und größere Fettanteile reichten nicht aus, um eine Insulinresistenz zu induzieren. Die erhöhte sekretorische Eigenschaft des Fettgewebes scheint essentiell für eine gestörte Insulinsensitivität zu sein. Ein Grund der unbeeinträchtigten Insulinsensitivität der DDAH1^{-/-}-Mäuse, trotz erhöhter Gewichtszunahmen unter der DIO-Diät, könnte durch die fehlende Inflammation begründet sein. In einem weiteren Tiermodell konnte die Verknüpfung zwischen Adipositas und Insulinresistenz durch gentechnisches Ausschalten eines inflammatorischen Transkriptionsfaktors aufgehoben werden¹⁵².

Sowohl die Untersuchung der mit L-NAME supplementierten Tiere als auch der iNOS^{-/-}-Mäuse sind starke Indizien dafür, dass ADMA als ein relevanter Inhibitor der NOS einen positiven Einfluss auf die Insulinsensitivität einnehmen könnte. Jedoch bleibt noch zu klären, welche Plasma-ADMA-Konzentration für eine ausreichende Hemmung der iNOS nötig wäre. Die durch die Supplementation mit L-NAME erreichten L-NAME-Konzentrationen wurden nicht erhoben und wären nicht vergleichbar. Außerdem sind erhöhte Plasma-Konzentrationen von ADMA als relevanter Marker für verschiedene Erkrankungen des kardiovaskulären Systems komplexer zu beurteilen. Eventuelle schädigende Einflüsse erhöhter ADMA-Konzentrationen auf die endotheliale Funktion müssten protektiven Wirkungen auf die Insulinsensitivität gegenübergestellt werden.

Die geplante und beantragte Zahl der Versuchstiere war höher und könnte für eine erhöhte Probenzahl und eine stärkere statistische Signifikanz ausgelastet werden. So würden die zuvor genannten statistischen Problematiken keine Relevanz haben und auch die drei Tiere, die bei der Nachgenotypisierung ausgeschlossen wurden, ersetzt werden. Jedoch wurde davon abgesehen, da der OGTT eindeutig keine Insulinresistenz vermuten ließ und sich die Beurteilung durch eine höhere Tierzahl nicht verändert hätte. Außerdem wären bei mehr Versuchstieren immer noch keine Daten für die 18. Woche zu erheben. Insgesamt scheint die Dauer der DIO-Diät als zu gering, um eine eindeutige Insulinresistenz zu etablieren, so dass keine weiteren Tiere verwendet wurden. Ein Grund dafür, dass die DIO-Diät der Jackson Laboratory beim DDAH1^{-/-}-Mausmodell zeitlich nicht zur Entwicklung einer Insulinresistenz ausgereicht hatte, kann eine unterschiedliche genetische Disposition sein. Zwar handelt es sich um Inzuchtstämme, bei denen die genetische Varianz gerade deswegen vermieden wird, jedoch kann dieses durch die Zucht und beim Generieren des Knockouts nicht vollständig ausgeschlossen werden. Ein anderer Grund dafür könnte sein, dass die Tiere teilweise alleine im Käfig gehalten wurden und dadurch weniger Nahrung zu sich genommen hatten.

Letztendlich ist die Dauer der DIO-Diät nicht ausreichend, um eine eindeutige Störung der Insulinsensitivität zu induzieren. Aufgrund dessen wurde von den weiteren geplanten Untersuchungen, wie Genexpressionsanalysen und Analysen der Protein-Expression der Insulinkaskade abgesehen.

4.1.4 Funktionalität des Endothels

Da ADMA hauptsächlich eine Rolle in der Funktionalität des Endothels spielt und dort unter anderem die endothelabhängige Vasodilatation hemmt, wurde die Auswirkung der DIO-Diät und des Genotyps auf die Funktionalität des Endothels kontrolliert. Bereits zuvor wurde von einer Reduzierung des Relaxationsvermögens der Aortensegmente um die Hälfte bei heterozygoten DDAH1^{+/-}-Tieren berichtet¹⁵³. Um auszuschließen, dass etwaige positive Einflüsse der erhöhten Plasma-ADMA Konzentrationen auf die Insulinsensitivität nicht mit negativen Auswirkungen auf die Dilatationsfähigkeit der Blutgefäße einhergehen oder um eventuelle negative Einflüsse der DIO-Diät auf die Gefäßaktivität zu relativieren, wurde ein Organbad der Aortensegmente durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf zwei Arten. Bei der ersten Methode wurde der Verlauf der Relaxationsfähigkeit der Aorten unter Zugabe von Acetylcholin für die endothelabhängige Relaxation und Nitroglycerin für die endothelunabhängige Relaxation ausgewertet. Dabei spielte auch die maximale Relaxation unter der höchsten Dosis an Acetylcholin bzw. Nitroglycerin eine Rolle. Die endothelunabhängige Fähigkeit zur Relaxation diente dabei als Kontrolle, dass keine anderen Beschädigungen außerhalb des Endothels für etwaige Unterschiede in Frage kämen. Hier zeigte sich weder in der endothelunabhängigen noch in der endothelabhängigen Relaxation eine Diskrepanz aufgrund der DIO-Diät oder des Genotyps. Als zweite Methode der Auswertung dienten die EC₅₀-Werte der Untersuchungen der Aortensegmente im Organbad. Die EC₅₀-Werte beschreiben die Konzentration, bei der die Hälfte des maximalen Effekts, in diesem Fall der Relaxation, erreicht wird und stellt unabhängig von der maximalen Relaxationsfähigkeit einen Bezug zum Verlauf der Acetylcholin- bzw. Nitroglycerin-Konzentration zur Relaxation dar. Da dabei schon bei der endothelunabhängigen Relaxation Unterschiede auftraten, sind Unterschiede, die bei der endothelabhängigen Konzentration beobachtet wurden, nicht eindeutig der Funktionalität des Endothels zu zuschreiben. Zusammengefasst kann man sagen, dass in diesen Untersuchungen weder Genotyp noch DIO-Diät einen merklichen Einfluss auf die Funktionalität der Aorta ausübten. Dies widerspricht den Erkenntnissen¹⁵³ aus dem Labor um Dr. James Leiper, die in heterozygoten DDAH1^{+/-}-Mäusen ein verschlechtertes Relaxationsvermögen der Aortensegmente zeigten. In einer

klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass genetische Variationen der DDAH1 sich zwar in den ADMA-Konzentrationen widerspiegelten, jedoch nicht die endothelabhängige Vasodilatation beeinflussten¹⁵⁴.

4.2 In-vitro Untersuchungen in der Zellkultur

Um in den in-vitro Untersuchungen Rückschlüsse auf die Auswirkung von ADMA auf eine induzierte Insulinresistenz zu ziehen, waren Versuche für zwei unabhängige, aber insulinsensitive Zelllinien, die wichtige Organe repräsentieren, geplant. Beide Zelllinien, sowohl die 3T3-L1 als auch die C2C12 durchlaufen eine Differenzierung, bei der die Zellen sich phänotypisch und genotypisch verändern. Dabei stand vor allem die Expression des GLUT4 im Vordergrund. Bei den 3T3-L1-Zellen war trotz phänotypischer Differenzierung (s. Abbildung 33, Abbildung 34) die Expression des GLUT4 ausgeblieben (s. Abbildung 36). Für die weiteren Untersuchungen bezgl. der Insulinsensitivität wurden daher nur die C2C12-Zellen verwendet, die neben der phänotypischen Charakterisierung (s. Abbildung 35) auch den GLUT4 exprimierten (s. Abbildung 37).

Für die Untersuchung in den Zellen wurde zuerst ein geeignetes Modell zur Imitation der chronisch subklinischen Inflammation bei Diabetikern gesucht. Eine Erhöhung für typische Inflammationsmarker, wie TNF α und IFN γ wurde bei Diabetikern bereits festgestellt^{136,155}. Zudem ist bekannt, dass diese Cytokine zu einer Erhöhung der iNOS-Expression führen¹⁵⁶. Ein weiteres Cytokin, das bei diesen Untersuchungen zur Beobachtung kam, war das IL 1 β . Auch IL 1 β spielt eine wichtige Rolle bei der chronisch subklinischen Inflammation¹⁵⁷ beim Diabetes mellitus und bei der Expression der iNOS¹⁵⁸.

Wie in der Abbildung 38 zu sehen ist, ist die Kombination aus TNF α , IFN γ und IL 1 β geeignet, um eine Induktion der iNOS-Expression mit höheren Nitrit-Konzentrationen zu erreichen, und ist dabei mit der Wirkung des Kontroll-Cocktails gleichwertig. Die optimale Konzentration an IL 1 β , bei der durch eine Erhöhung der Konzentration die NO-Produktion in den Zellen nicht weiter steigt, liegt bei 1 ng/mL (s. Abbildung 39). Die geeignete Expositionszeit, um die Expression der iNOS um ein Vielfaches zu erhöhen, liegt bei 24 Stunden (Abbildung 40). Außerdem wurde die geeignete Konzentration an ADMA ermittelt, um die durch die Cytokine hervorgerufene Induktion wieder zu senken (Abbildung 41). Somit wurde für alle weiteren Untersuchungen eine Expositionszeit von 24 Stunden verwendet, der Einsatz an Cytokinen betrug 10 μ g/mL an TNF α , 20 μ g/mL an IFN γ sowie 1 ng/mL an IL 1 β und zur Hemmung der iNOS wurde 1 mM ADMA verwendet.

4.2.1 Einfluss von NO auf die Insulinsensitivität

Bei der Beurteilung der Insulinsensitivität der Zellen, anhand der Aufnahme von isopenmarkierter Deoxy-Glucoseaufnahme, wurde zuerst die Zunahme der Nitrit-Konzentration im Überstand der Zellen gemessen, um auch einen Bezug zur iNOS-Expression herzustellen. Eine verstärkte Expression der iNOS resultiert auch in einer verstärkten Bildung von NO. Da NO reaktiv ist und im Überstand zu Nitrit reagiert, konnten erhöhte Nitrit-Konzentrationen auf eine verstärkte Bildung von NO zurückgeführt werden. Abbildung 43 zeigt, dass bei den Zellen mit denen die Deoxy-Glucoseaufnahme Untersuchungen durchgeführt worden sind, die iNOS-Expression durch Cytokin-Exposition gesteigert und durch Zugabe von ADMA wieder erniedrigt wurde. ADMA alleine hatte keine Auswirkung auf die NO-Produktion. Die Insulin-induzierte Glucoseaufnahme der Zellen hatte sich durch Exposition mit den Cytokinen verschlechtert (Abbildung 42). Dies wurde schon vorher in einigen Veröffentlichungen für C2C12-Zellen¹⁵⁹ und anderen Muskelzellen¹⁶⁰ gezeigt. Jedoch konnte diese Cytokin-induzierte Insulinresistenz der Zellen durch gleichzeitige Exposition mit ADMA nicht unterbunden werden, da auch hier eine verringerte Deoxy-Glucoseaufnahme ermittelt wurde. Dies kann mehrere Gründe haben. Zum einen ist die Expositionszeit im Zellversuch aussagekräftig für eine akute Inflammation. Die chronische Auswirkung von Cytokinen, die beim Diabetes mit einer subklinischen Inflammation auftritt, und ADMA kann sich anders verhalten und ist vielmehr im Tiermodell zu untersuchen. So kann es sein, dass ADMA langfristig einen positiven Einfluss auf die Insulinsensitivität besitzt. Zum anderen ist die in den Zelluntersuchungen verwendete Konzentration an Cytokinen darauf ausgelegt einen starken Effekt auszuüben, so dass die Nitrosylierung der Proteine der Insulinrezeptorsignalkaskade so stark ausgeprägt ist, dass ADMA dies nicht verhindern kann. Bei einer Insulinresistenz kann die subklinische Inflammation eine Nitrosylierung hervorrufen¹⁶¹, die noch von ADMA verhindert werden kann. Ein weiterer zu beachtender Aspekt ist, dass die Cytokine nicht nur eine verstärkte Expression der iNOS bewirken, sondern auch weitere inflammatorische Mechanismen aktivieren. Die Auswirkung der iNOS-Expression alleine und die Inhibition durch ADMA kann daher unter Umständen überlagert sein. Letztendlich ist bei den Untersuchungen kein klarer Einfluss von ADMA auf die durch Cytokine-induzierte Insulinresistenz zu ermitteln, so dass andere eventuelle Angriffspunkte von ADMA zu erforschen sind.

4.2.2 Einfluss von NO auf die Insulinsekretion und Viabilität

Die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ II kann in verschiedene Phasen unterteilt werden, in der sich die biochemischen und pathologischen Zustände, je nach Phase, stark unterscheiden können. Die Entwicklung des Diabetes unterscheidet sich dabei individuell nach Begleiterkrankungen und Therapie und kann sich über Jahrzehnte erstrecken. Eine Adipositas entsteht primär durch erhöhte Nahrungsaufnahme und mangelnde körperliche Betätigung. Die erhöhte Glucosezufuhr zeichnet sich dabei durch eine postprandiale Hyperglykämie aus, die sich immer mehr zu einer chronischen Hyperglykämie entwickelt, bei der der Körper die Menge an Glucose nicht verwerten kann. Die erhöhte Glucosebelastung führt zu einer Insulinresistenz, bei der in den Zielzellen die Signaltransduktion am Insulinrezeptor und der nachgeschalteten Kaskade abnimmt. Die Wirkung von Insulin ist in diesem Zustand abgeschwächt und die insulinabhängige Glucoseaufnahme der Zellen verringert. Eine kompensatorisch gesteigerte Insulinsekretion soll der Insulinresistenz entgegenwirken, um die Blutglucose-Konzentration zu senken. Langfristig äußert sich die diabetische Erkrankung in einer progredienten Abnahme der Insulin-produzierenden β -Zellen. Die Apoptose der β -Zellen ist zu Teilen auch durch eine Inflammation verursacht¹⁶², die über Adipokine vermittelt wird. Dadurch könnten die Wirkung von Cytokinen und die Rolle von ADMA in diesen Zellen interessant sein. Eine durch verstärkte Expression der iNOS erhöhte NO-Konzentration kann von Cytokinen unabhängig die β -Zell-Apoptose verursachen¹⁶³, wodurch die protektive Eigenschaft von ADMA auf die Viabilität erklärt werden könnte. Auch beim Typ I Diabetes ist der Untergang der β -Zellen durch eine Immunreaktion vermittelt. Jedoch ist für diese Insulitis vielmehr eine Autoimmunreaktion mit spezifisch gegen die β -Zellen ausgerichteten Antikörpern verantwortlich. Dadurch erscheint ein Effekt von ADMA auf diesen Prozess eher fragwürdig, da die iNOS-vermittelte Inflammation vielmehr eine allgemeine Immunreaktion vermittelt.

Die Untersuchungen in den Insulin-produzierenden Zellen (s. Abbildung 44) zeigt, dass unter Einfluss von Cytokinen die glucoseunabhängige und Glucose-vermittelte Insulinsekretion gehemmt war, während die gleichzeitige Exposition mit Cytokinen und ADMA keine positive Auswirkung auf diese Hemmung hatte. ADMA alleine zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine Auswirkung auf die Insulinsekretion. Die im Überstand der Zellen gemessenen Insulin-Konzentrationen wurden auf den gesamten Proteingehalt der Zellen normalisiert, so dass die Insulinsekretion der Zellen unabhängig von der Viabilität der Zellen gemessen wurde.

Um bei einer chronischen Exposition der Insulin-produzierenden Zellen mit Cytokinen deren Überlebensfähigkeit und die Wirkung von ADMA zu betrachten, wurde die Viabilität dieser Zellen untersucht. Dabei erkennt man, dass die Cytokine die Viabilität der Zellen beeinträchtigen und ADMA die Cytokin-induzierte Toxizität verhindert (s. Abbildung 45). Die Viabilität der β -Zellen hat großen Einfluss auf den Verlauf und Ausgang des Diabetes. Die durch Cytokine induzierte Apoptose der β -Zellen, als Folge chronisch subklinischer Inflammation, wird zu Teilen durch eine iNOS-Induktion vermittelt. Die positive Auswirkung von ADMA als Inhibitor der iNOS beim Typ II Diabetes könnte somit mit der verbesserten β -Zell-Viabilität erklärt werden.

Eine verringerte β -Zell-Funktion und die Apoptose von β -Zellen tritt beim Typ II Diabetes auf^{164, 42}. Neben den Cytokinen $\text{TNF } \alpha$ ¹⁶⁵, $\text{IFN } \gamma$ ¹⁶⁶ und $\text{IL } 1\beta$ ¹⁶⁶ induzieren auch zirkulierende, freie Fettsäuren¹⁶⁷ die Apoptose der β -Zellen. Die verringerte β -Zell-Funktion durch die Cytokine sowie Adipokine wird dabei hauptsächlich über die induzierte iNOS und NO vermittelt^{166, 168}. Ein Mechanismus der β -Zell-Apoptose bei Typ II Diabetikern ist der endoplasmatische Stress¹⁶⁹, der sich durch eine fehlerhafte Faltung der Proteine im endoplasmatischen Retikulum äußert. Die Cytotoxizität von NO in insulinsensitiven Zellen ruft unter anderem auch den endoplasmatischen Stress hervor¹⁷⁰. Der positive Einfluss hoher ADMA-Konzentrationen könnte durch die Inhibierung der iNOS erklärt werden.

4.3 Ausblick

Das DDAH^{-/-}-DIO-Mausmodell hat Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Adipositas und ADMA geliefert. So verzögern höhere ADMA-Konzentrationen bei einer erhöhten Kalorienzufuhr das Einsetzen einer Adipositas. Umgekehrt führten erhöhte Gewichte im Tiermodell auch zu höheren Plasma-ADMA-Konzentrationen. In wie weit sich diese auch in der Entwicklung der Insulinresistenz bzw. auf die Glucosehomöostase fortsetzt, wäre in einem Tiermodell mit einer längeren Beobachtungszeit zu evaluieren. Im Zusammenhang der Erkenntnisse über den Einfluss von ADMA auf die Viabilität der β -Zellen, kann die Beobachtungsphase sogar über das Auftreten einer Insulinresistenz hinaus, bis zum Einsetzen der Apoptose der β -Zellen ausgeweitet werden. So kann auch die Auswirkung von ADMA auf die β -Zellen in einer in-vivo Untersuchung ermittelt werden. Bei einer verlängerten DIO-Diät können nach dem Auftreten einer Insulinresistenz auch Expressionsanalysen der Insulinsignalkaskade auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt werden, um biochemische Prozesse genauer zu untersuchen.

Obwohl keine Auswirkung von ADMA auf die durch Cytokine-induzierte Senkung der Glucoseaufnahme festgestellt wurde, kann eine Untersuchung der Insulinsensitivität immer noch in Betracht kommen. Ein Cytokinmodell wurde deshalb ausgewählt, um die chronisch subklinische Inflammation beim Diabetes möglichst genau nachzuempfinden. Das Ausmaß des Effekts der iNOS-Induktion kann jedoch, je nach Inflammation, auch von anderen biochemischen Mechanismen überlagert sein, so dass die Untersuchung der Insulinsensitivität mit einer iNOS-Induktion unabhängig von Cytokinen sinnvoll erscheint. Eine gesteigerte Expression der iNOS durch Transfektion eines Vektors war in den Untersuchungen der Insulinsensitivität auch geplant. Eine stabile Transfektion konnte nur in HEK-293-Zellen erfolgreich verwirklicht werden. In den differenzierten insulinsensitiven C2C12-Zellen konnte kein iNOS-Vektor transfiziert werden. Um ausschließlich den direkten Einfluss der iNOS und ADMA auf die Insulinsensitivität zu kontrollieren, wäre ein Modell mit der Transfektion eines iNOS-Vektors vorteilhaft. Vielversprechend ist die weitere Erforschung der Erkenntnisse über die Cytokin-induzierte Zellapoptose der Insulin-produzierenden β -Zellen und die protektive Wirkung von ADMA. Zum einen kann auch hier das Ausmaß der Apoptose durch die verstärkte Expression der iNOS mithilfe einer Transfektion eines iNOS-Vektors bestimmt werden. Zum anderen können die genauen Signalwege der Apoptose bestimmt werden. Durch die Cytokine wird die extrinsische Signalkaskade gestartet¹⁷¹. Welche zellregulatorischen Mechanismen von Bedeutung sind und an welcher Stelle ADMA eine Funktion einnimmt, bleibt zu klären.

Des Weiteren könnte in klinischen Studien im Zusammenhang mit ADMA und Typ II Diabetes der Fokus auf die Insulinproduktion bzw. -sekretion erweitert werden. Die Erfassung des Grades an Inflammation der diabetischen Patienten könnte eine differenzierte Beurteilung hinsichtlich der Rolle von ADMA ermöglichen.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Die erhebliche Rolle von ADMA in Erkrankungen des kardiovaskulären Systems bleibt unbestritten. Das Argininderivat dient, aufgrund der kompetitiven Hemmung der eNOS und den negativen Prognosen in Bezug zu hohen Plasma-ADMA-Konzentrationen, als unabhängiger Marker für kardiovaskuläre Ereignisse und den Tod. In Bezug auf inflammatorische Erkrankungen, ganz im Speziellen bei der Sepsis, kann ADMA durch die Inhibition der iNOS jedoch auch einen protektiven Effekt aufweisen. Eine Erkrankung, bei der sich die Rolle von ADMA widersprüchlich gestaltet, ist Diabetes mellitus. Bei dieser komplexen Erkrankung, die auch in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen steht, konnten einige positive Effekte von ADMA gezeigt werden.

Die Untersuchungen im Tiermodell zeigen, dass die Entstehung von Adipositas und die damit verbundene Gewichtszunahme bei hohen ADMA-Werten verzögert sind. Für eine weitere Betrachtung der Auswirkung hoher ADMA-Werte auf die Entwicklung einer Insulinresistenz, war die ausgewählte Beobachtungszeit zu kurz. Ergänzend konnte ein Einfluss der DIO-Diät auf die Metabolisierung von ADMA erkannt werden. So entwickelten die Tiere nach Auftreten der Adipositas höhere Plasma-ADMA-Konzentrationen. Hier war die geringe Beobachtungszeit hinderlich, um den weiteren Verlauf und die Auswirkungen zu überprüfen.

Weitergehend wurde in den in-vitro Untersuchungen gezeigt, dass die Cytokin-induzierte Hemmung der Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme durch ADMA nicht verhindert werden konnte. Die protektiven Eigenschaften von ADMA im diabetischen Zustand liegen vielmehr in der Erhaltung der Viabilität Insulin-produzierender β -Zellen. Zwar konnte kein akuter Einfluss auf die Insulinsekretion ermittelt werden, jedoch führt der Schutz vor Cytokin-induzierter Apoptose der Zellen langfristig auch zwangsläufig zu einer verbesserten Insulinsekretion.

5.2 Summary

The role of the L-arginine derivative asymmetric dimethylarginine has been an area of intensive interest in cardiovascular research for the last decades. As a competitive inhibitor of the endothelial nitric oxide synthase ADMA has evolved as a relevant regulator of nitric oxide formation in the endothelial cell. It plays a major role in the development of endothelial dysfunction and therefore has been identified as an independent marker for cardiovascular risk and mortality in different studies. However, in inflammatory diseases like sepsis ADMA can exhibit a protective role by inhibiting the inducible isoform of the NOS. Due to its inflammatory aspect and the correlation to cardiovascular disease, the role of ADMA in diabetic patients has been controversial so far, leading to investigations for the relationship between ADMA and diabetes.

The in-vivo-studies with the DIO-mouse-model showed, that ADMA affects the weight of the animals and even delays the onset of obesity. Further observations regarding the development of insulin resistance and glucose-homeostasis under influence of high ADMA-concentrations could not be obtained, since the chosen period of the DIO-diet was too short to assess insulin-resistance. The DIO-diet seemed to affect the metabolism of ADMA, leading to higher ADMA concentrations after the onset of obesity. Again the short observation period prohibited further investigations regarding the effect of the diet on the ADMA concentrations and vice versa.

Additionally, the in-vivo-studies showed that cytokine-induced inhibition of insulin-stimulated glucose-uptake could not be prevented by ADMA. Protective characteristics of ADMA in a diabetic state is more likely to be in insulin production system rather than in insulin responsive system by preservation of β -cell viability. Although acute insulin secretion in an inflammatory state is not affected by ADMA, the prevention of cytokine-induced apoptosis in β -cells leads to a long-term improvement of insulin secretion. Further investigations into this direction could help to clarify the biochemical mechanism underlying this observations and explain the outcome of diabetic patients with high plasma ADMA concentrations.

6 Anhang

6.1 Katalog

6.1.1 Materialien

6.1.1.1 Substanzen und Reagenzien

Substanz, Reagenz (Abkürzung)	Sicherheitshinweise: H- & P-Sätze	Hersteller (Produktnummer)
(2-Acetoxyethyl)trimethylammoniumchlorid (Acetylcholin)	H: 315-319-335 P: 261-305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (A2661)
(2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexanal Monohydrat (D-Glucose)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (49159)
(5R)-5-[(1S)-1,2-Dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-5-hydrofuran-2-on Natriumsalz (Natrium-L-Ascorbat)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (A4034)
(5Z,9 α ,11 α ,13E,15S)-9,11,15-Trihydroxyprosta-5,13-dienoic Säure Tris-Salz (Prostaglandin F _{2α})	H: 302-360 P: 201-308+313	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (P5069)
(R)-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)- β -alanin Hemicalciumsalz (Calcium-D-Pantothenat)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (P5710)
(S)-2-Amino-5-guanidinvaleriansäure Hydrochlorid (L-Arginin)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (A5131)
[1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl]essigsäure (Indometacin)	H: 300 P: 264-301+310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (I7378)

[² H ₆]-ADMA	H: / P: /	eigene Herstellung
1-([4-(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol (Oil Red O)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (O0625)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	H: / P: /	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (9105)
2- ³ H-Deoxy-D-Glucose 5-10 Ci/mmol (³ H-DOG)	H: / P: /	Perkin Elmer Inc., Waltham US (NET328A)
2,3-Diamononaphthalin	H: 302-315-319-335-350 P: 201-261-305+351+338-308+313	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D2757)
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	H: 315-319-335-341 P: 261-281-305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (M5655)
3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfon-Phthalein-Reagenz (Bromphenolblau)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (108122)
3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid-Reagenz (Ethidiumbromid)	H: 331-341 P: 261-280-304+340+311-403+233	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (46067)
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	H: 302 P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (I5879)
4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethyleneglycol (Triton™ X)	H: 302-318-411 P: 273-280-305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (X114)
4-Nonylphenylpolyethyleneglycol (Nonidet® P40)	H: 302-318-411 P: 280-301+312-305+351+338	AppliChem GmbH, Darmstadt (A1694)
5-[(3aS,4S,6aR)-2-Oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentansäure (Biotin)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (B4639)

9-Fluor-11 β ,17,21-trihydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion (Dexamethason)	H: 315-317-319-334-335 P: 261-280-282-284-304+340-342+311	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D4902)
Acetonitril	H: 225-302+312+332-319 P: 210-240-302+352-305+351+338-403+233	Merck KGaA, Darmstadt (100029)
Acetylchlorid	H: 225-302-314 P: 210-280-305+351+338-310	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (00990)
Acrylamid 40%, Rotiphorese®	H: 302+312-315-319-317-340-350-361f-372 P: 281-302+352-305+351+338-308+313	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (T802)
Agarose, Standard	H: / P: /	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (3810)
Albumin Standard 2 mg/mL, Pierce™	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (23209)
Albumin, Kälberserum Fraktion V (BSA)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (05479)
Ameisensäure 98-100%	H: 226-302-314-331 P: 210-280-301+330+331-304+340-305+351+338-308+310	Merck KGaA, Darmstadt (100264)
Ammoniumperoxodisulfat	H: 272-302-315-319-334-317-335 P: 221-210-285-305+351+338-405-501	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (161-0700)
Antikörper Glucosetransporter Typ 4 (GLUT4), [H61]	H: / P: /	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas US (SC 7938)

Antikörper Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase (GAPDH), [FL-335]	H: / P: /	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas US (SC25778)
Antikörper Kaninchen IgG, HRP-linked	H: / P: /	Cell Signaling Technology Inc., Danvers US (7074)
Argon N50	H: / P: /	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf (I2167RG)
Borsäure	H: 360FD P: 280-308+313	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (6943)
Bradford-Reagenz, protein assay dye reagent concentrate	H: 226-332-314-370 P: 210-303+361+353-305+ 351+338-310-405-501	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (500 0006)
Butanol	H: 226-302-315-318-335-336 P: 210-280-301+312+330- 304+340+312-305+351+338+ 310-403+235	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (34867)
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl × 2 H ₂ O)	H: 319 P: 305+351+338	Merck KGaA, Darmstadt (102382)
Cryo-SFM-Reagenz	H: / P: /	PromoCell GmbH, Heidelberg (C29910)
D-Deoxy-Glucose	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D8375)
Desoxyribonukleosidtriphosphate 10mM, Invitrogen™ (dNTPs 10mM)	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (18427)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (102931)
DNA-Isolierungsreagenz	H: 302-312-332 P: 262	AppliChem GmbH, Darmstadt (A3418)

DNA-Loading Dye 6 ×	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (R0611)
Enhanced Chemielumineszenz-Reagenz, Pierce™ (ECL)	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (32106)
Essigsäure 100% (Eisessig)	H: 226-290-314 P: 210-280-301+330+331- 305+351+338-308+310	Merck KGaA, Darmstadt (100063)
Ethanol, absolut	H: 225-319 P: 210-240-305+351+338- 403+233	Merck KGaA, Darmstadt (1085430)
Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)- tetraessigsäure (EGTA)	H: / P: /	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (3054)
Formaldehyd 4%, Roti®-Histofix	H: 302-317-341-350 P: 261-281-302+352-308+313	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (P087)
Futter, 60% Fettanteil	H: / P: /	sniff Spezialdiäten GmbH, Soest (EF R/M D12492 mod.)
Futter, 10% Fettanteil	H: / P: /	Bioserv, Flemington US (F4031)
Glucose 20%	H: / P: /	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (2356746)
Glycin	H: / P: /	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (3908)
HEPES 1 M, Gibco®	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (15630)
Insulin-ELISA	H: / P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (10-1247)
Beschichtete Platte	H: / P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3193)

Enzym Konjugat-Puffer	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3269)
Enzym Konjugat 11 ×	H: / P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3266)
Kalibrator 0	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3262)
Kalibrator 0,2 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3150)
Kalibrator 0,5 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3151)
Kalibrator 1,5 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3152)
Kalibrator 3 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3153)
Kalibrator 6,5 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3154)
Stopp-Reagenz	H: 314 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-2693)
TMB-Substrat	H: / P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-2629)
Wasch-Puffer 21 ×	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-6746)
Insulin-ELISA, ultrasensitiv	H: / P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (10-1249)
Beschichtete Platte	H: / P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3193)

Enzym Konjugat-Puffer	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3249)
Enzym Konjugat 11 ×	H: / P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3246)
Kalibrator 0	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3242)
Kalibrator 0,025 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3148)
Kalibrator 0,075 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3149)
Kalibrator 0,2 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3236)
Kalibrator 0,5 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3237)
Kalibrator 1,5 µg/L	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-3238)
Stopp-Reagenz	H: 314 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-2693)
TMB-Substrat	H: / P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-2629)
Wasch-Puffer 21 ×	H: 331-311-301-314-317-400-410 P: /	Mercodia AB, Uppsala SE (20-6746)
Insulin 10 mg/mL, human recombinat	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (I9278)

Isopropanol	H: 225-319-336 P: 210-280-305+351+338	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (6752)
Kaliumchlorid (KCl)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (104933)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (104873)
L-[² H ₇]-Arginin	H: 315-319 P: 305+351+338	Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury US (DLM-541)
Lipopolysaccharide (LPS)	H: 302+312+332 P: 261-301+312+330-302+ 352+312-304+340+312	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (L2630)
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ × 6 H ₂ O)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (105833)
Magnesiumchlorid 25mM (MgCl ₂ 25 mM)	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (R0971)
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ × 7 H ₂ O)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (105886)
Marker, GeneRuler low range DNA-Ladder	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (SM1191)
Marker, O'RangeRuler DNA-Ladder 50 bp	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (SM0613)
Medium, Dulbeccos modified eagle 1 g/L Glucose, Gibco® (LG-DMEM)	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (21885)
Medium, Dulbeccos modified eagle 4,5 g/L Glucose, Gibco® (HG-DMEM)	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (31966)

Medium, Roswell Park Memorial Institut Gibco® (RPMI)	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (61870)
Methanol	H: 225-301+311+331-370 P: 210-240-280-302+352-304+340-308+310-403+233	Merck KGaA, Darmstadt (106018)
Milchpulver	H: / P: /	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (T145)
Molekulargewichtsmarker, PAGE-Ruler™ Western-Blot-Ladder	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (26619)
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	H: 225-332-302-314 P: 210-233-280-301+330+331-305+351+338-309+310	Merck KGaA, Darmstadt (110732)
N,N-Dimethyl-L-arginin Dihydrochlorid (ADMA)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D4268)
N ^G ,N ^{G'} -Dimethyl-L-arginin Dihydrochlorid (SDMA)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (311204)
Natrium-3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfophenylazo]phenylazo)-2,7-naphthalenedisulfat, BioReagent (Ponceau S)	H: 315-319-335 P: 261-305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (P3504)
Natriumchlorid (NaCl)	H: / P: /	Avantor Performance Materials BV, Deventer NL (3624)
Natriumdodecylsulfat-Pellets (SDS)	H: 302-315-318-412 P: 280-301+312-302+352-305+351+338-332+313	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (CN30)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (106329)
Natriumhydroxid 1 M (NaOH 1 M)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (109141)

Natriumhydroxid 2 N (NaOH 2 N)	H: 314-290 P: 280-301+330+331-305+ 351+338-309+310	Merck KGaA, Darmstadt (109136)
Natriumnitrit (NaNO ₂)	H: 272-301-400 P: 273-309+310	Merck KGaA, Darmstadt (106549)
Nitrolingual akut Spray	H: / P: /	G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt (827981)
Penicillin & Streptomycin-Lösung 10 000 U/mL & 10 000 µg/mL, Gibco® (PenStrep)	H: 317-334-360-371 P: 302+352-304+340-201- 260-333+313-261	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (15140)
Phosphataseinhibitor, PhosStop	H: / P: /	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim (04 906 845 001)
Phosphatgepuffertes Salz, Dulbeccos	H: / P: /	Biochrom GmbH, Berlin (L182)
Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmono- laurat, Tween® 20 (Tween)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (P1379)
Primer, DDAH1-Knockout forward (fDDAH1-KO)	H: / P: /	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg (H624)
Primer, DDAH1-Knockout reverse (rDDAH1-KO)	H: / P: /	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg (H624)
Primer, DDAH1-Wildtyp forward (fDDAH1-WT)	H: / P: /	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg (H624)
Primer, DDAH1-Wildtyp reverse (rDDAH1-WT)	H: / P: /	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg (H624)

Propan-1,2,3-triol (Glycerin)	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (104093)
Proteaseinhibitor, Complete Mini	H: / P: /	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim (04 693 159 001)
Proteinase K 20 mg/mL	H: 334-316 P: 304+340-332+313-216- 342+311-284	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (25530-049)
Rekombinante murine Interferon γ (IFN γ)	H: / P: /	Peptrotech GmbH Germany, Hamburg (315-05)
Rekombinante murine Interleukin 1 β (IL 1 β)	H: / P: /	PromoCell GmbH, Heidelberg (D61122)
Rekombinante murine Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)	H: / P: /	ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ness- Ziona IL (Cyt252)
Salzsäure 1 N (HCl 1 N)	H: 290 P: /	Merck KGaA, Darmstadt (109057)
Salzsäure 37%, rauchend (HCl 37%)	H: 290-314-335 P: 280-304+340-305+351+ 338-310	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (X942)
Serum, fetales Kälberserum Superior (FCS)	H: / P: /	Biochrom GmbH, Berlin (S0615)
Serum, Kälberserum Gibco® (CS)	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (16170)
Serum, Pferdeserum Gibco® (HS)	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (16050)
Stickstoff, LC-MS/MS	H: / P: /	Stickstoffgenerator

Szintillationslösungsmittel, Rotiszint® eco plus	H: 302-315-318-412 P: 273-280-302+352-305+ 351+338-310	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (0016.2)
Taq-DNA-Polymerase 5 000 U/mL	H: / P: /	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main (M0273L)
Taq-Polymerase-Puffer 10 ×	H: / P: /	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main (B9014S)
Trinatriummethyldiamintetraacetat Dihydrat (EDTA)	H: 319 P: 305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (E6511)
Trinitrosan	H: / P: /	Merck KGaA, Darmstadt (02334691)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan- hydrochlorid, Trizma® Hydrochlorid (Tris-HCl)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (T3253)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Trizma® Base (Tris-Base)	H: / P: /	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (T1503)
Trypsin/EDTA-Lösung 10 ×	H: / P: /	Biochrom GmbH, Berlin (L2153)
Wasser, HPLC (HPLC-H ₂ O)	H: / P: /	Avantor Performance Materials BV, Deventer NL (4218)
Wasser, nukleasefrei (nH ₂ O)	H: / P: /	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (R0581)
β-Mercaptoethanol	H: 301+331-310-315-317-318- 373-410 P: 261-280-301+310+330- 302+352+310-305+351+338+ 310-403+233	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (M6250)

6.1.1.2 Lösungen und Puffer

Phosphatgepufferte-Lösung (PBS)

9,55 g	phosphatgepuffertes Salz	1 ×
1 L	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		

Insulin-Lösung 1 mg/mL

100 µL	Insulin 10 mg/mL	~172,18 µM
900 µL	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		

D-Glucose-Lösung 1 M (Glucose 1 M)

180,15 mg	D-Glucose	1 M
1 mL	ddH ₂ O	
Sterilfiltration		
Lagerung bei -20 °C in Aliquoten		

DNA-Präparation und Genotypisierung

Tail III-Puffer, pH 8,0

788 mg	Tris-HCl	50 mM
2,08 g	EDTA	50 mM
584,4 mg	NaCl	100 mM
500 g	SDS	0,5%
100 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		

low Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (lowTE), pH 7,4

788 mg	Tris-HCl	5 mM
208,1 mg	EDTA	0,5 mM
1 L	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		

Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer 0,5 × (TBE 0,5 ×), pH 8,0

5,45 g	Tris-Base	45 mM
2,78 g	Borsäure	45 mM
416,2 mg	EDTA	1 mM
1 L	ddH ₂ O	
Lagerung bei Raumtemperatur		

Organbad der Aortensegmente

Organbad-Puffer, pH 7,35

29,22 g	NaCl	100 mM
1,75 g	KCl	4,7 mM
1,84 g	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	2,5 mM
1,48 g	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	1,2 mM
10,5 g	NaHCO ₃	25 mM
0,7 g	KH ₂ PO ₄	1 mM
9,9 g	D-Glucose	11 mM
15 mL	Indometacin-Lösung	
17,88 mg	Indometacin	10 µM
15 mL	NaOH 1M	
4985 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei Raumtemperatur		

Kaliumchlorid-Lösung 2 M (KCl 2 M)

149,1 mg	KCl	2 M
1 mL	ddH ₂ O	
Sterilfiltration		
Lagerung bei -20 °C in Aliquoten		

Prostaglandin F_{2α}-Lösung 0,01 M (PGF_{2α} 10⁻² M)

4,76 mg	Prostaglandin F _{2α}	10 ⁻² M
1 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei -20 °C in Aliquoten		

Acetylcholin-Stammlösung 0,01 M (ACh 10⁻² M)

1,8 mg	Acetylcholin	10 ⁻² M
1 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei -20 °C		

Acetylcholin-Verdünnungsreihe:

10 ⁻³ M:		
100 µL	ACh 10 ⁻² M	10 ⁻³ M
900 µL	ddH ₂ O	
10 ⁻⁴ M:		
100 µL	ACh 10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
900 µL	ddH ₂ O	
10 ⁻⁵ M:		
100 µL	ACh 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M
900 µL	ddH ₂ O	
10 ⁻⁶ M:		
100 µL	ACh 10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M
900 µL	ddH ₂ O	

Nitroglycerin-Verdünnungsreihe:

10 ⁻² M:			
	320 µL	Trinitrosan	10 ⁻² M
	385 µL	ddH ₂ O	
10 ⁻³ M:			
	227 µL	Nitrolingual akut Spray	10 ⁻³ M
	773 µL	ddH ₂ O	
10 ⁻⁴ M:			
	100 µL	NTG 10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
	900 µL	ddH ₂ O	
10 ⁻⁵ M:			
	100 µL	NTG 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M
	900 µL	ddH ₂ O	
10 ⁻⁶ M:			
	100 µL	NTG 10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M
	900 µL	ddH ₂ O	

LC-MS/MS-Messung

L-Arginin-Lösung 100 mM			
42,13 mg	L-Arginin		100 mM
2 mL	ddH ₂ O		
Lagerung bei -20 °C			
ADMA-Lösung 10 mM			
5,50 mg	ADMA		10 mM
2 mL	ddH ₂ O		
Lagerung bei -20 °C			
SDMA-Lösung 10 mM			
5,50 mg	SDMA		10 mM
2 mL	ddH ₂ O		
Lagerung bei -20 °C			
L-Arginin-Lösung 25 mM			
0,5 mL	L-Arginin-Lösung 100 mM		25 mM
1,5 mL	ddH ₂ O		
Lagerung bei -20 °C			
ADMA-Lösung 100 µM			
20 µL	ADMA-Lösung 10 mM		100 µM
1980 µL	ddH ₂ O		
Lagerung bei -20 °C			
SDMA-Lösung 100 µM			
20 µL	SDMA-Lösung 10 mM		100 µM
1980 µL	ddH ₂ O		
Lagerung bei -20 °C			

Interner Standard		
0,53 mg	[² H ₆]-ADMA	2 µM
10,89	L-[² H ₇]-Arginin	50 µM
1 L	Methanol	
Lagerung bei 4 °C		
Kalibrier-Lösung 0		
0 µL	L-Arginin-Lösung 25 mM	0 µM
0 µL	ADMA-Lösung 100µM	0 µM
0 µL	SDMA-Lösung 100µM	0 µM
2000 µL	dialysiertes Plasma	
Lagerung bei 4 °C		
Kalibrier-Lösung 1 / Qualitätskontrolle 1		
4,8 µL	L-Arginin-Lösung 25 mM	60 µM
10 µL	ADMA-Lösung 100µM	0,5 µM
10 µL	SDMA-Lösung 100µM	0,5 µM
1975,2 µL	dialysiertes Plasma	
Lagerung bei 4 °C		
Kalibrier-Lösung 2 / Qualitätskontrolle 2		
9,6 µL	L-Arginin-Lösung 25 mM	120 µM
20 µL	ADMA-Lösung 100µM	1 µM
20 µL	SDMA-Lösung 100µM	1 µM
1950,4 µL	dialysiertes Plasma	
Lagerung bei 4 °C		
Kalibrier-Lösung 3		
20 µL	L-Arginin-Lösung 25 mM	250 µM
40 µL	ADMA-Lösung 100µM	2 µM
40 µL	SDMA-Lösung 100µM	2 µM
1900 µL	dialysiertes Plasma	
Lagerung bei 4 °C		
Butanolische Salzsäure 1N		
100 mL	Acetylchlorid	10%
900 mL	Butanol	
Lichtgeschützte Lagerung bei Raumtemperatur		
Proben-Puffer, pH 5,0		
300 mL	Methanol	50%
600 µL	Ameisensäure 100%	0,1%
300 mL	HPLC-H ₂ O	
Lagerung bei Raumtemperatur		
Ameisensäure-Lösung 0,1%		
1 mL	Ameisensäure 100%	0,1%
999 mL	HPLC-H ₂ O	
Lichtgeschützte Lagerung bei Raumtemperatur		

Zellkultivierung

Trypsin/EDTA-Lösung 1 ×		
1 mL	Trypsin/EDTA-Lösung 10 ×	1 ×
9 mL	PBS	
Lagerung bei -20 °C in Aliquoten		
Ascorbat-Biotin-Pantothenat-Stammlösung (ABP)		
10 mL	Ascorbat-Lösung 100 mg/mL	
1 g	Natrium-L-Ascorbat	252 mM
10 mL	ddH ₂ O	
0,5 mL	Biotin-Lösung 9,78 mg/mL	
4,89 mg	Biotin	1 mM
0,5 mL	NaOH 1 M	
9,5 mL	Pantothenat-Lösung 8,53 mg/mL	
81 mg	Calcium-D-Pantothenat	17 mM
9,5 ml	ddH ₂ O	
Zusammenmischen der Lösungen, Sterilfiltration		
Lagerung bei -20 °C in Aliquoten		
Dexamethason-Lösung 2,5 mM		
0,98 mg	Dexamethason	2,5 mM
500 µL	Ethanol	50%
500 µL	ddH ₂ O	
Sterilfiltration		
Lagerung bei -20 °C		
IBMX-Lösung 50 mM		
11,1 mg	IBMX	50 mM
100 µL	NaOH 1 M	0,1 M
900 µL	ddH ₂ O	
Sterilfiltration		
Lagerung bei -20 °C		
Oil Red O-Stammlösung		
500 mg	Oil Red O	0,5%
100 mL	Isopropanol	
Lösung über Nacht, Filtration		
Lagerung bei 4 °C		
Lipopolysaccharide-Lösung 10 mg/mL (LPS 10 mg/mL)		
10 mg	Lipopolysaccharide	10 mg/mL
1 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei -20 °C in Aliquoten		
Interferon γ-Lösung 0,01 mg/mL (IFN γ 0,01 mg/mL)		
20 µg	IFN γ	0,01 mg/mL
2 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei -20 °C in Aliquoten		

Interleukin 1 β -Lösung 0,01 mg/mL (IL 1 β 0,01 mg/mL)		
10 μ g	IL 1 β	0,01 mg/mL
1 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei -20 °C in Aliquoten		
Tumor Nekrose Faktor α -Lösung 0,1 mg/mL (TNF α 0,1 mg/mL)		
20 μ g	TNF α	0,1 mg/mL
200 μ L	ddH ₂ O	
Lagerung bei -20 °C in Aliquoten		
ADMA-Lösung 25 mM		
6,88 mg	ADMA	25 mM
1 mL	ddH ₂ O	
Sterilfiltration		
Lagerung bei -20 °C		
ADMA-Lösung 150 mM		
41,28 mg	ADMA	150 mM
1 mL	ddH ₂ O	
Sterilfiltration		
Lagerung bei -20 °C		
BSA im Medium 0,5%		
250 mg	BSA	0,5%
50 mL	Medium	
Sterilfiltration		
Lagerung bei 4 °C		

Zellaufschluss und Bestimmung der Protein-Konzentration

EGTA-Lösung 10mM, pH 8,0		
380,35 mg	EGTA	10 mM
100 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei Raumtemperatur		
Nonident® P40-Lösung 10% (NP 40 10%)		
10 mL	Nonident® P40	10%
90 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei Raumtemperatur		
Lysis-Puffer A		
20 mg	SDS	0,2%
1 Tablette	Proteaseinhibitor	
10 mL	PBS	
Lagerung bei 4 °C		

Lysis-Puffer B

87,7 mg	NaCl	150 mM
3,05 mg	MgCl ₂	1,5 mM
119 mg	HEPES	50 mM
1 mL	EGTA 10 mM	1 mM
1 mL	Glycerin	10%
0,5 mL	NP 40	0,5%
0,1 mL	Triton X	1%
1 Tablette	Proteaseinhibitor	
1 Tablette	Phosphataseinhibitor	
7,4 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		

Albumin-Lösung 1 mg/mL

1 mL	Albumin Standard 2 mg/mL	1 mg/mL
1 mL	PBS	
Lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C		

Analyse der Protein-Expression**Glycerin-Lösung 50%**

50 mL	Glycerin	50%
50 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei Raumtemperatur		

SDS-Lösung 20%

20 g	SDS	20%
100 mL	ddH ₂ O	
Lösen über Nacht		
Lagerung bei Raumtemperatur		

Lower-Tris-Puffer 4 ×, pH 8,8

18,17 g	Tris-Base	1,5 M
2 mL	SDS 20%	0,4%
98 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		

Upper-Tris-Puffer 4 ×, pH 6,8

6,06 g	Tris-Base	0,5 M
2 mL	SDS 20%	0,4%
98 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung 10% (APS 10%)

100 mg	Ammoniumperoxodisulfat	10%
1 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		

Proben-Puffer

2 mL	Glycerin 50%	10%
1,5 mL	SDS 20%	3%
1,25 mL	Upper-Tris	0,5 ×
0,5 mL	β-Mercaptoethanol	0,72 M
4,75 mL	ddH ₂ O	

Lagerung bei -20 °C in Aliquoten

Load-Mix

20 mg	Bromphenolblau	0,75 mM
20 mL	Glycerin	50%
20 mL	ddH ₂ O	

Lagerung bei -20 °C in Aliquoten

Tris-Glycin-Puffer 10 ×, pH 8,3

30 g	Tris-Base	250 mM
150 g	Glycin	2 M
1 L	ddH ₂ O	

Lagerung bei 4 °C

SDS-PAGE-Elektrophorese-Laufpuffer

100 mL	Tris-Glycin-Puffer 10 ×	1 ×
5 mL	SDS 20%	0,1%
895 mL	ddH ₂ O	

Zur direkten Verwendung hergestellt

Transfer-Puffer

100 mL	Tris-Glycin-Puffer 10 ×	1 ×
200 mL	Methanol	20%
700 mL	ddH ₂ O	

Lagerung bei 4 °C

Ponceau S-Lösung

1 g	Ponceau S	0,1%
50 mL	Essigsäure 100%	5%
950 mL	ddH ₂ O	

Lagerung bei Raumtemperatur

Trisgepufferte Lösung (TBS), pH 7,6

2,42 g	Tris-Base	20 mM
8,0 g	NaCl	137 mM
1 L	ddH ₂ O	

Lagerung bei Raumtemperatur

Trisgepufferte Tween-Lösung (TBST)

1 mL	Tween	0,1%
999 mL	TBS	

Lagerung bei Raumtemperatur

Blockier-Lösung		
2,5 g	Milchpulver	5%
50 mL	TBST	
Lösen über Nacht		
Lagerung bei 4 °C		

Bestimmung der Nitrit-Konzentration

Natriumnitrit-Stammlösung 10 mM (NaNO ₂ 10 mM)		
13,8 mg	NaNO ₂	10 mM
20 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		
2,3-Diaminonaphthalin-Stammlösung 100 mM (DAN 100mM)		
15,82 mg	2,3-Diaminonaphthalin	100 mM
1 mL	DMSO	
Lichtgeschützte Lagerung bei Raumtemperatur		

³H-Deoxy-D-Glucoseaufnahme

Krebs-Ringer-Phosphat-Stammlösung 10 × (KRP 10 ×)		
3,97 g	NaCl	1,36 M
175 mg	KCl	47 mM
680 mg	KH ₂ PO ₄	100 mM
123 mg	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10 mM
73,5 mg	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	10 mM
50 mL	ddH ₂ O	
Sterilfiltration		
Lagerung bei 4 °C		
HEPES-Lösung 1 M		
11,92 g	HEPES	1 M
50 mL	ddH ₂ O	
Sterilfiltration		
Lagerung bei 4 °C		
Inkubationsmedium		
10 mL	KRP 10 ×	1 ×
1 mL	HEPES 1 M	10 mM
500 mg	BSA	0,5%
100 mL	ddH ₂ O	
Lagerung bei 4 °C		
Deoxy-Glucose-Lösung 100 mM (DOG 100 mM)		
164,16 mg	D-Deoxy-Glucose	100 mM
10 mL	ddH ₂ O	
Sterilfiltration		
Lagerung bei -20 °C		

Untersuchung der Viabilität

MTT-Stammlösung		
5 mg	MTT	12 mM
1 mL	PBS	
Lagerung bei 4 °C		
Lysis-Puffer C		
1 g	SDS	10%
60 µL	Eisessig	0,6%
10 mL	DMSO	
Lösen über Nacht		
Lagerung bei Raumtemperatur		

6.1.1.3 Verbrauchsmaterialien und weitere Hilfsmittel

Verbrauchsmaterial	Hersteller (Produktnummer)
Abdeckmatte, MegaBlock® 96-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (95.1990.002)
Acetatfolie, 96-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (82.1586)
Blutzuckerteststreifen, Freestyle Lite	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden (435991)
Deckglas	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen (0350000)
Dialyse Kassette, Slide-A-Lyzer® 10K	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (66830)
Drahttriangeln, stainless steel	eigene Herstellung
EDTA-Blutentnahmegefäß, Microvette® 500 µL K3	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (02.1341)
Einfrierbehältnis, Nalgene™ cryo freezing container	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig (5100-0001)
Filterpapier, Whatman™ Grade 3 mm blotting paper	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (3030-917)
Filterplatte, Multiscreen 96-Well	Merck KGaA, Darmstadt (MSGVN2250)
Glasplatten Proteinanalyse, Mini-Protean®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (1653311)
Glasware	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Insulinspritze, Omnican® 100	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (9151133)

Kamm Agarosegel, 20-Well	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (1704447)
Kamm Polyacrylamidgel, Mini-Protean® 10-Well	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (1653359)
Kanüle, Sterican® Gr. 20	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (4657705)
Kanüle, Sterican® Gr.12	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (4657624)
Kryogefäß, CryoPure 1,6 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (72.380.007)
Kühlakku	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (1703934)
Lanzette, Freestyle	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden (365925)
Lupe, Tischlupe	VWR International GmbH, Darmstadt (630-1059)
Magensonde, Maus 25 mm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (18061-22)
Mikroreaktionsgefäß 8 × Kette, Multiply® Strip Pro	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (72.991.002)
Mikroreaktionsgefäß, SafeSeal 1,5 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (72.706)
Mikroreaktionsgefäß, SafeSeal 1,5 mL braun	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (72.706.001)
Mikroreaktionsgefäß, SafeSeal 2 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (72.695.500)
Mikrotiterplatte, 96-Well schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (655090)
Mikrotiterplatte, 96-Well transparent	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (655101)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen (0640130)
Nitrocellulosemembran, Whatman™ Protran BA85 blotting membrane	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (10401116)
OP-Besteck	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Parafilm, "M" 4 in	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (P7793)
Pasteurpipette, 23 cm	VWR International GmbH, Darmstadt (612-1702)
PCR-Klebefolie, optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (95.1994)

Pipette, serologisch 10 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (607180)
Pipette, serologisch 25 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (760180)
Pipette, serologisch 5 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (606180)
Pipettenspitze, 10 µL	Starlab GmbH, Hamburg (1111-3810)
Pipettenspitze, 10/20 µL XL	Starlab GmbH, Hamburg (1110-3800)
Pipettenspitze, 100 µl	Starlab GmbH, Hamburg (1111-0816)
Pipettenspitze, 1000 µL XL	Starlab GmbH, Hamburg (1122-1830)
Pipettenspitze, 5000 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (70.1183.102)
Pipettenspitze, Combitips Advanced® 5 mL	Eppendorf AG, Hamburg (0030089812)
Skalpell, Klinge	Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen (19)
Spritze, Injekt® 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (4606108V)
Spritze, Omnifix® F 1 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (9161406V)
Sterilfilter, Filtropour 500 mL 0,2 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (83.1823.101)
Sterilfilter, Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt (514-0073)
Stickstofftank, Dewar Transportgefäß Typ B	Karlsruher Glastechnisches Werk-Schieder GmbH, Karlsruhe (1204)
Szintillationsbehältnis, Mini-Vial 6 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (73.680)
Transferkäfig	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (1703931)
Trennsäule, Polaris C18-Ether	Agilent Technologies Inc., Santa Clara US (A2021050X020)
Tupfer, Pur-Zellin®	Paul Hartman AG, Heidenheim (112317)
Wattestäbchen	Karl Beese GmbH, Barsbüttel (617722)
Zellkulturflasche, Cellstar® 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (658175)
Zellkulturplatte, Cellstar® 48-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (677-180)

Zellkulturplatte, Cellstar® TC 6-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (657-160)
Zellkulturschale, Petrischale 10 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (83.1802.003)
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (83.1832)
Zentrifugenflasche, Cellstar® 15 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (188271)
Zentrifugenflasche, Cellstar® 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (227261)

6.1.1.4 Laborgeräte

Gerät, Bezeichnung	Hersteller
Abzug, Vint Air 9000	Vinitex Laboratoriuminrichtungen BV, Sint Oedenrode NL
Anästhesieverdampfer, SomnoSuite®	Kent Scientific Corporation, Torrington US
Autoklav, Evo® 120	MediTech Service GmbH, Norderstedt
Autosampler, Prostar	Agilent Technologies Inc., Santa Clara US
Blutzuckermessgerät, Freestyle Lite	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Brutschrank, HeraCell™ B 5050E	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Chemilumineszenzdetektor, ChemieGenius ² Bio Imaging System	Synoptics Ltd., Cambridge UK
Eismaschine, AF 103	Scotsman International, Mailand IT
Gefrierschrank -20 °C, Premium	Liebherr GmbH, Biberach
Gefriertruhe -80 °C, KLT 4785	Kryotec-Kryosafe GmbH, Hamburg
Heizblock, Dry Bath FB 15103	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig
Heizblock, Stuart® Block Heater SBH130D/3	Bibby Scientific Limited, Staffordshire UK
HPLC Pumpe, Prostar 210	Agilent Technologies Inc., Santa Clara US
Kammer Agarosegel, horizontal	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kammer Polyacrylamidgel, vertikal	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kammer, Western-Blot Transfer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kraftmessgerät, Isometric transducer	Kent Scientific Corporation, Torrington US

Kugelmühle, Qiagen® Tissue Lyser	Retsch GmbH, Haan
Kühlschrank 4 °C, Premium	Liebherr GmbH, Biberach
LC-MS/MS, 1200L Triple Quadrupole MS	Agilent Technologies Inc., Santa Clara US
Lichtmikroskop, Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer, MR 3002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mikroskop Kamera, ProgRes® Speed SF Core 5	Jenoptik AG, Jena
Mikrotiterplatte Waschautomat, MRW AM60	Dynex Technologies GmbH, Denkendorf
Mikrovolumenspektrophotometer, NanoDrop™ ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington US
Mikrowelle, Micromat	Electrolux Hausgeräte GmbH, Nürnberg
Mischer (Mikroreaktionsgefäß), Vortexmischer Reax Control	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mischer (Mikrotiterplatte), Wippmischer Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mischer (Zentrifugenflasche), Kipp- und Rollmischer RM5 V-30	Ingenieurbüro CAT GmbH, Staufen
Orbitalschüttler (Mikroreaktionsgefäß), ThermoMixer® Compact	Eppendorf AG, Hamburg
Orbitalschüttler (Mikrotiterplatte), MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Organbadapparatur	eigene Herstellung
pH-Meter, Five Easy™	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Photometer, Safire ² ™	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Pipette, Handystep® Multipipette	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette, Pipetus Accu-Jet®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette, Research® 8 × Kanal Mikropipette 300 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette, Research® Mikropipette 0,1-2,5 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette, Research® Mikropipette 0,5-10 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette, Research® Mikropipette 100-1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette, Research® Mikropipette 10-100 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette, Research® Mikropipette 500-5000 µL	Eppendorf AG, Hamburg

Spannungsversorgungsgerät (Agarosegel-Elektrophorese), Standard Power Pack 25	Biometra GmbH, Göttingen
Spannungsversorgungsgerät (Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Western-Blot Transfer), PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Stickstofftank, stationär 503-020-RF	Taylor-Wharton International LLC, Theodore US
Szintillationsdetektor, Packard Tri-Carb 2900 TR	Perkin Elmer Inc., Waltham US
Thermomagnetrührer, MR Hei-Tec	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Thermozykler, Mastercycler® Epigradient	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank	Eigenbau
Waage, Analysenwaage CP 225 D	Sartorius AG, Göttingen
Waage, Digitalwaage BP 3100 S	Sartorius AG, Göttingen
Wasseraufbereitungssystem, Milli-Q®	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserbad, Inkubationsbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Werkbank, HeraSafe™	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge (Tischzentrifuge), MC6	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifuge (Zellkulturflasche), Rotina 35 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge, (Mikroreaktionsgefäß) 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, (Mikroreaktionsgefäß) 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, (Mikroreaktionsgefäß) 5424R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, (Mikrotiterplatte) 5810R	Eppendorf AG, Hamburg

6.1.1.5 Software

Programm	Anwendung	Hersteller
GeneSnap 6.03.01	Visualisierung: Western-Blot	Synoptics Ltd., Cambridge UK
GeneTools 4.02.03	Auswertung: Western-Blot	Synoptics Ltd., Cambridge UK
GraphPad Prism 5.02	Abbildungen und Statistik	GraphPad Software Inc., La Jolla US
Mendeley Desktop 1.16	Literaturverwaltung	Mendeley Ltd., London UK
Nano Drop 1000 3.8.1	Bestimmung: DNA-Konzentration	Thermo Fisher Scientific BV & Co. KG, Braunschweig
Powerlab LabChart 4.0	Organbad	ADInstruments Ltd., Oxford UK
ProgRes® CapturePro 2.8.8	Fotographie: Mikroskop	Jenoptik AG, Jena
QuantaSmart 2.01	Detektion: Isotopen	Perkin Elmer Inc., Waltham US (NET328A)
Safire ² Excel-Anwendung	Auswertung: Photometer	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Varian MS Workstation 6.9	Auswertung: LC-MS/MS	Agilent Technologies Inc., Santa Clara US

6.1.2 Literaturverzeichnis

1. Ezzati, M. Worldwide trends in diabetes since 1980: A pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* **387**, 1513–1530 (2016).
2. Forouzanfar, M. H. *et al.* Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **386**, 2287–2323 (2015).
3. WHO (World Health Organization). Mortality database. at http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/ (Zuletzt besucht am 18.07.16).

4. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* **3**, 2011–2030 (2006).
5. Moore, D. J., Gregory, J. M., Kumah-Crystal, Y. A. & Simmons, J. H. Mitigating micro- and macro-vascular complications of diabetes beginning in adolescence. *Vasc. Health Risk Manag.* **5**, 1015–1031 (2009).
6. Moxey, P. W. *et al.* Lower extremity amputations - A review of global variability in incidence. *Diabet. Med.* **28**, 1144–1153 (2011).
7. Yau, J. W. Y. *et al.* Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* **35**, 556–64 (2012).
8. Bourne, R. R. A. *et al.* Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: A systematic analysis. *Lancet Glob. Heal.* **1**, e339-49 (2013).
9. Coresh, J., Astor, B. C., Greene, T., Eknoyan, G. & Levey, A. S. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third national health and nutrition examination survey. *Am. J. Kidney Dis.* **41**, 1–12 (2003).
10. Keane, W. F. *et al.* The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: The RENAAL study. *Kidney Int.* **63**, 1499–1507 (2003).
11. USRDS. 2015 USRDS Annual data report volume 2: Epidemiology of kidney disease in the United States. *United States Ren. Data Syst.* **2**, 1–274 (2016).
12. The Emerging Risk Factors Collaboration. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* **375**, 2215–2222 (2010).
13. Cappuccio, F. Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk factors from 1980 to 2010: A comparative risk assessment. *lancet. Diabetes Endocrinol.* **2**, 634–47 (2014).

14. Morrish, N. J., Wang, S. L., Stevens, L. K., Fuller, J. H. & Keen, H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* **44 Suppl 2**, S14-21 (2001).
15. Flegal, K. M., Graubard, B. I., Williamson, D. F. & Gail, M. H. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* **298**, 2028–37 (2007).
16. Levitan, E. B., Song, Y., Ford, E. S. & Liu, S. Is nondiabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease? A meta-analysis of prospective studies. *Arch. Intern. Med.* **164**, 2147–55 (2004).
17. Reaven, G. M. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): An expanded definition. *Annu. Rev. Med.* **44**, 121–31 (1993).
18. Kannel, W. B., Castelli, W. P., Gordon, T. & McNamara, P. M. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* **74**, 1–12 (1971).
19. Samuelsson, O. *et al.* Prognostic factors in treated hypertension. *J. Hypertens. - Suppl.* **3**, S497–S500 (1985).
20. Kannel, W. B., D’Agostino, R. B. & Belanger, A. J. Fibrinogen, cigarette smoking, and risk of cardiovascular disease: Insights from the Framingham Study. *Am. Heart J.* **113**, 1006–1010 (1987).
21. Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. & Shaw, J. The metabolic syndrome - A new worldwide definition. *Lancet* **366**, 1059–1062 (2005).
22. WHO (World Health Organization). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. 59 (1999).
23. Seuring, T., Archangelidi, O. & Suhrcke, M. The economic costs of type 2 diabetes: A global systematic review. *Pharmacoeconomics* **33**, 811–831 (2015).

24. Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J. & Moncada, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet (London, England)* **339**, 572–5 (1992).
25. Böger, R. H. *et al.* Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. *Circulation* **119**, 1592–1600 (2009).
26. Böger, R. H. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann. Med.* **38**, 126–136 (2006).
27. Schulze, F. *et al.* Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: Results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am. Heart J.* **152**, 493.e1-8 (2006).
28. Valkonen, V. P. *et al.* Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* **358**, 2127–8 (2001).
29. Abbasi, F. *et al.* Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* **88**, 1201–3 (2001).
30. Ito, A., Egashira, K., Narishige, T., Muramatsu, K. & Takeshita, A. Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circ. J.* **66**, 811–5 (2002).
31. Sugai, M. *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in the aqueous humor of diabetic patients. *Endocr. J.* **54**, 303–309 (2007).
32. Devangelio, E. *et al.* Soluble RAGE in type 2 diabetes: Association with oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 511–518 (2007).
33. Päivä, H. *et al.* Plasma concentrations of asymmetric-dimethyl-arginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. *Metabolism.* **52**, 303–307 (2003).

34. Anderssohn, M., Schwedhelm, E., Lüneburg, N., Vasan, R. S. & Böger, R. H. Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular disease and mortality: An intriguing interaction with diabetes mellitus. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **7**, 105–118 (2010).
35. Harrison, D. G., Freiman, P. C., Armstrong, M. L., Marcus, M. L. & Heistad, D. D. Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis. *Circ. Res.* **61**, II74-80 (1987).
36. Rother, K. Diabetes Treatment — Bridging the Divide. *J. Med.* **356**, 1499–1501 (2014).
37. Ley, S. H., Hamdy, O., Mohan, V. & Hu, F. B. Prevention and management of type 2 diabetes: Dietary components and nutritional strategies. *Lancet (London, England)* **383**, 1999–2007 (2014).
38. WHO (World Health Organisation). Global status report on noncommunicable diseases 2014. 176 (2014).
39. Vazquez, G., Duval, S., Jacobs, D. R. & Silventoinen, K. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: A meta-analysis. *Epidemiol. Rev.* **29**, 115–128 (2007).
40. Ludvik, B., Nolan, J. J., Baloga, J., Sacks, D. & Olefsky, J. Effect of obesity on insulin resistance in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetes* **44**, 1121–1125 (1995).
41. Lillioja, S. *et al.* Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of pima indians. *N.Engl.J.Med* **329**, 1988–1992 (1993).
42. Butler, A. E. *et al.* Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 102–110 (2003).
43. Polonsky, K. S., Given, B. D. & Van Cauter, E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J. Clin. Invest.* **81**, 442–448 (1988).
44. Tattersall, R. B. Mild familial diabetes with dominant inheritance. *QJM* **43**, 339–357 (1974).

45. Byrne, M. M. *et al.* Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes* **45**, 1503–1510 (1996).
46. Elsas, L. J., Endo, F., Strumlauf, E., Elders, J. & Priest, J. H. Leprechaunism: An inherited defect in a high-affinity insulin receptor. *Am. J. Hum. Genet.* **37**, 73–88 (1985).
47. Taylor, S. I. Lilly lecture: Molecular mechanisms of insulin resistance: Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes* **41**, 1473–1490 (1992).
48. Rabson, S. M. & Mendenhall, E. N. Familial hypertrophy of pineal body, hyperplasia of adrenal cortex and diabetes mellitus; report of 3 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **26**, 283–290 (1956).
49. Bellamy, L., Casas, J.-P., Hingorani, A. D. & Williams, D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet* **373**, 1773–1779 (2009).
50. Kim, C., Newton, K. M. & Knopp, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: A systematic review. *Diabetes Care* **25**, 1862–1868 (2002).
51. Östlund, I., Haglund, B. & Hanson, U. Gestational diabetes and preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **113**, 12–16 (2004).
52. Crowther, C. A. *et al.* Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2477–86 (2005).
53. Wendland, E. M. *et al.* Gestational diabetes and pregnancy outcomes - A systematic review of the World Health Organization (WHO) and the International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups (IADPSG) diagnostic criteria. *BMC Pregnancy Childbirth* **12**, 23 (2012).
54. Dugani, C. B. & Klip, A. Glucose transporter 4: Cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep.* **6**, 1137–42 (2005).
55. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526 (1987).

56. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 9265–9 (1987).
57. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
58. Wolf, A. *et al.* Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* **29**, 479–485 (1997).
59. Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D. N. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4651–5 (1991).
60. Garg, U. C. & Hassid, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **83**, 1774–1777 (1989).
61. Hogg, N., Kalyanaraman, B., Joseph, J., Struck, A. & Parthasarathy, S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett.* **334**, 170–174 (1993).
62. Böger, R. H. *et al.* Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* **117**, 273–284 (1995).
63. Ross, R. Inflammation or atherogenesis. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126 (1999).
64. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 907–16 (2001).
65. Schmidt, H. H. H. W. & Walter, U. NO at work. *Cell* **78**, 919–925 (1994).
66. Böger, R. H. Live and let die: Asymmetric dimethylarginine and septic shock. *Crit. Care* **10**, 169 (2006).
67. Palmer, R. M. J., Rees, D. D., Ashton, D. S. & Moncada, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1251–1256 (1988).

68. Moncada, S., Palmer, R. M. J. & Higgs, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from l-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1709–1715 (1989).
69. Closs, E. I., Simon, A., Vékony, N. & Rotmann, A. Plasma membrane transporters for arginine. *J. Nutr.* **134**, 2752S–2759S; discussion 2765S–2767S (2004).
70. Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. & Rachlin, E. M. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 87–94 (1988).
71. Stuehr, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 339–359 (1997).
72. Murad, F., Arnold, W. P., Mittal, C. K. & Braugher, J. M. Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **11**, 175–204 (1979).
73. Furchgott, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.* **53**, 557–573 (1983).
74. Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F. & Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **101**, 746–52 (1990).
75. Closs, E. I., Basha, F. Z., Habermeier, A. & Förstermann, U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **1**, 65–73 (1997).
76. McDermott, J. R. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem. J.* **154**, 179–84 (1976).
77. Leiper, J. M. *et al.* Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem. J.* **343 Pt 1**, 209–14 (1999).

78. Tran, C. T. L., Leiper, J. M. & Vallance, P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler. Suppl.* **4**, 33–40 (2003).
79. Böger, R. H. *et al.* Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction: Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* **98**, 1842–1847 (1998).
80. Böger, R. H. *et al.* Dietary L-arginine and α -tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. *Atheroscler. (Shannon, Ireland)* **141**, 31–43 (1998).
81. Herlitz, H., Petersson, A., Sigström, L., Wennmalm, A. & Westberg, G. The arginine-nitric oxide pathway in thrombotic microangiopathy. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **31**, 477–9 (1997).
82. Usui, M. *et al.* Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci.* **62**, 2425–30 (1998).
83. Dückelmann, C. *et al.* Asymmetric dimethylarginine enhances cardiovascular risk prediction in patients with chronic heart failure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2037–2042 (2007).
84. Surdacki, A. *et al.* Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **33**, 652–8 (1999).
85. Goonasekera, C. D. *et al.* Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J. Hypertens.* **15**, 901–9 (1997).
86. Wolf, C. *et al.* Urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a predictor of mortality risk in patients with coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.* **156**, 289–294 (2012).
87. Kiechl, S. *et al.* Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis* **205**, 261–265 (2009).
88. Krzyzanowska, K., Mittermayer, F., Wolzt, M. & Scherthaner, G. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **30**, 1834–1839 (2007).

89. Brusselle, G., Kips, J., Joos, G., Bluethmann, H. & Pauwels, R. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **12**, 254–259 (1995).
90. Shankar, R. R., Wu, Y., Shen, H. Q., Zhu, J. S. & Baron, A. D. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* **49**, 684–687 (2000).
91. Perticone, F. *et al.* Endothelial dysfunction, ADMA and insulin resistance in essential hypertension. *Int. J. Cardiol.* **142**, 236–241 (2010).
92. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830 (2003).
93. Torres, S. H. *et al.* Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J. Endocrinol.* **181**, 419–27 (2004).
94. Darley-Usmar, V. M., Hogg, N., O’Leary, V. J., Wilson, M. T. & Moncada, S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* **17**, 9–20 (1992).
95. Carvalho-Filho, M. A. *et al.* S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: A novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* **54**, 959–967 (2005).
96. Nomiya, T. *et al.* Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 639–647 (2004).
97. Perreault, M. & Marette, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat. Med.* **7**, 1138–1143 (2001).
98. Crabtree, M. J., Smith, C. L., Lam, G., Goligorsky, M. S. & Gross, S. S. Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**, H1530-40 (2008).

99. Vásquez-Vivar, J. *et al.* Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 9220–5 (1998).
100. Guzik, T. J. *et al.* Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **105**, 1656–1662 (2002).
101. Antoniades, C. *et al.* Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **30**, 1142–1150 (2009).
102. Sydow, K. & Münzel, T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler. Suppl.* **4**, 41–51 (2003).
103. Kaneki, M., Shimizu, N., Yamada, D. & Chang, K. Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 319–329 (2007).
104. Archuleta, T. L. *et al.* Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: Role of p38 MAPK. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1486–1493 (2009).
105. Beckman, J. & Koppenol, W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**, C1424–C1437 (1996).
106. Beckman, J. S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 836–844 (1996).
107. Schulz, E., Jansen, T., Wenzel, P., Daiber, A. & Münzel, T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1115–26 (2008).
108. Hu, X. *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1540–1546 (2011).

109. The Jackson Laboratory. Diet-induced obesity models. at <<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/surgical-and-preconditioning-services/diet-induced-obesity-models#>> (Zuletzt besucht am 18.07.2016).
110. GV-SOLAS. Tiergerechte Haltung von Labormäusen. 25 (2014).
111. Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C. & Proietto, J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E1323-32 (2008).
112. Schwedhelm, E. *et al.* High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **851**, 211–219 (2007).
113. Phelan, M. C. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 1**, Unit 1.1 (2007).
114. Coté, R. J. Aseptic technique for cell culture. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 1**, Unit 1.3 (2001).
115. Green, H. & Kehinde, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **5**, 19–27 (1975).
116. Gregoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783–809 (1998).
117. Yaffe, D. & Saxel, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725–727 (1977).
118. Santerre, R. F. *et al.* Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 4339–43 (1981).
119. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
120. Shao, D. & Lazar, M. A. Peroxisome proliferator activated receptor γ , CCAAT/enhancer-binding protein α , and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **272**, 21473–21478 (1997).

121. Ackman, R. G. *Methods in Biological Oxidative Stress. Trends in Food Science & Technology* **15**, (Humana Press, 2004).
122. Yamamoto, N. *et al.* Measurement of glucose uptake in cultured cells. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **71**, 12.14.1-12.14.26 (2011).
123. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
124. Berridge, M., Tan, A., McCoy, K. & Wang, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4–9 (1996).
125. Vistica, D. T. *et al.* Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* **51**, 2515–2520 (1991).
126. Williams, G., Becker, L., Bryant, D., Willis, S. & Giroir, B. P. Effects of transforming growth factor-beta 1 on nitric oxide synthesis by C2C12 skeletal myocytes. *Am. J. Physiol.* **270**, R145-52 (1996).
127. Kleinert, H., Euchenhofer, C., Ihrig-Biedert, I. & Förstermann, U. In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF- κ B. *J. Biol. Chem.* **271**, 6039–6044 (1996).
128. Trayhurn, P. & Beattie, J. H. Physiological role of adipose tissue: White adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* **60**, 329–339 (2001).
129. Trayhurn, P. & Wood, I. S. Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **92**, 347–355 (2004).
130. Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26746–26749 (1995).
131. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–32 (1994).

132. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87–91 (1993).
133. Alomar, S. Y., Gentili, A., Zaibi, M. S., Kępczyńska, M. A. & Trayhurn, P. IL-1 β (interleukin-1 β) stimulates the production and release of multiple cytokines and chemokines by human preadipocytes. *Arch. Physiol. Biochem.* **122**, 1–6 (2016).
134. Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D. A., Emeis, J. J. & Coppack, S. W. C-Reactive protein in healthy subjects: Associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: A potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 972–978 (1999).
135. Festa, A. *et al.* The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int. J. Obes.* **25**, 1407–1415 (2001).
136. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–445 (2011).
137. Yudkin, J. S. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: Inflammatory signals. *Int. J. Obes.* **27**, S25–S28 (2003).
138. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
139. Lumeng, C. N., DeYoung, S. M., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* **56**, 16–23 (2007).
140. Kapur, S., Marcotte, B. & Marette, A. Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am. J. Physiol.* **276**, E635–41 (1999).
141. Pektas, M. B. *et al.* Dietary fructose activates insulin signaling and inflammation in adipose tissue: Modulatory role of resveratrol. *Biomed Res. Int.* **2016**, 1–10 (2016).
142. Stühlinger, M. C. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* **287**, 1420 (2002).

143. Liu, A. *et al.* Differential intra-abdominal adipose tissue profiling in obese, insulin-resistant women. *Obes. Surg.* **19**, 1564–1573 (2009).
144. Krzyzanowska, K., Mittermayer, F., Kopp, H. P., Wolzt, M. & Schernthaner, G. Weight loss reduces circulating asymmetrical dimethylarginine concentrations in morbidly obese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 6277–6281 (2004).
145. McLaughlin, T. *et al.* Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations are elevated in obese insulin-resistant women and fall with weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 1896–1900 (2006).
146. Ellger, B. *et al.* Glycemic control modulates arginine and asymmetrical-dimethylarginine levels during critical illness by preserving dimethylarginine- dimethylaminohydrolase activity. *Endocrinology* **149**, 3148–3157 (2008).
147. Siroen, M. P. C. *et al.* Modulation of asymmetric dimethylarginine in critically ill patients receiving intensive insulin treatment: A possible explanation of reduced morbidity and mortality? *Crit. Care Med.* **33**, 504–510 (2005).
148. Coderre, L., Srivastava, A. K. & Chiasson, J. L. Role of glucocorticoid in the regulation of glycogen metabolism in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **260**, E927-32 (1991).
149. Pomplun, D., Möhlig, M., Spranger, J., Pfeiffer, A. F. H. & Ristow, M. Elevation of blood glucose following anaesthetic treatment in C57Bl/6 mice. *Horm. Metab. Res.* **36**, 67–69 (2004).
150. Tanaka, K. *et al.* Mechanisms of impaired glucose tolerance and insulin secretion during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* **111**, 1044–51 (2009).
151. Tsuchiya, K. *et al.* Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology* **148**, 4548–4556 (2007).
152. Maris, M. *et al.* Deletion of C/EBP homologous protein (Chop) in C57Bl/6 mice dissociates obesity from insulin resistance. *Diabetologia* **55**, 1167–1178 (2012).

153. Leiper, J. *et al.* Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat. Med.* **13**, 198–203 (2007).
154. Lind, L. *et al.* Genetic variation in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 gene (DDAH1) is related to asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels, but not to endothelium-dependent vasodilation. *Vasc. Med.* **18**, 192–199 (2013).
155. Schmidt, M. I. *et al.* Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): A cohort study. *Lancet* **353**, 1649–1652 (1999).
156. Green, S. J. *et al.* Nitric oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol. Lett.* **43**, 87–94 (1994).
157. Spranger, J. *et al.* Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: Results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Diabetes* **52**, 812–817 (2003).
158. Knowles, R. G. & Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249–58 (1994).
159. del Aguila, L. F. *et al.* TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol.* **276**, E849-55 (1999).
160. Kapur, S., Bédard, S., Marcotte, B., Côté, C. H. & Marette, A. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: A novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* **46**, 1691–1700 (1997).
161. Ropelle, E. R. *et al.* Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. *Diabetes* **62**, 466–470 (2013).
162. Wang, L. *et al.* A low voltage-activated Ca²⁺ current mediates cytokine-induced pancreatic β -cell death. *Endocrinology* **140**, 1200–4 (1999).
163. Mandrup-Poulsen, T. β -cell apoptosis: Stimuli and signaling. *Diabetes* **50**, S58-63 (2001).

164. Clark, A. *et al.* Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: Quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res.* **9**, 151–159 (1988).
165. Eizirik, D. L. Interleukin-1 induced impairment in pancreatic islet oxidative metabolism of glucose is potentiated by tumor necrosis factor. *Acta Endocrinol* **119**, 321–325 (1988).
166. Cetkovic-Cvrlje, M. & Eizirik, D. L. TNF- α and IFN- γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* **6**, 399–406 (1994).
167. Kharroubi, I. *et al.* Free fatty acids and cytokines induce pancreatic β -cell apoptosis by different mechanisms: Role of nuclear factor- κ B and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* **145**, 5087–5096 (2004).
168. Darville, M. I. & Eizirik, D. L. Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. *Diabetologia* **41**, 1101–1108 (1998).
169. Marchetti, P. *et al.* The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* **50**, 2486–2494 (2007).
170. Kaneto, H. *et al.* Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **44**, 733–738 (1995).
171. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).

6.1.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Insulinrezeptor und nachgeschaltete Insulinsignalkaskade	8
Abbildung 2: Eigenschaften vom Stickstoffmonoxid im Endothel	11
Abbildung 3: Transport und enzymatische Umsetzung von L-Arginin in der Endothelzelle (EZ)	12
Abbildung 4: NO-vermittelte Vasodilatation in der glatten Muskelzelle	12
Abbildung 5: Interaktion zwischen ADMA und dem L-Argininstoffwechsel	13
Abbildung 6: Biosynthese und enzymatische Umsetzung von ADMA	14
Abbildung 7: Relation zwischen Plasma-ADMA-Konzentrationen und Mortalität in der Framingham-Offspring Studie	15
Abbildung 8: Zeitplan und Versuchsablauf des DDAH $1^{-/-}$ -DIO-Mausmodells	20
Abbildung 9: Aufhängung der Aortensegmente an den Drahttriangeln	26
Abbildung 10: Insulin-ELISA mit Farbreaktion des TMB-Substrats	30

Abbildung 11: Zeitplan und Differenzierungsprotokoll der 3T3-L1-Adipozyten	35
Abbildung 12: Anordnung der Komponenten in der Transferkammer für den Western-Blot	42
Abbildung 13: Reaktion von Nitrit mit Diaminonaphthalin	44
Abbildung 14: Reaktion vom gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum violetten Formazan	46
Abbildung 15: Exemplarische Aufnahme des Agarosegels zur Bestimmung des Genotyps	48
Abbildung 16: Plasma-ADMA-Konzentration der Versuchstiere	50
Abbildung 17: Plasma-Arginin-Konzentration der Versuchstiere	51
Abbildung 18: Plasma-SDMA-Konzentration der Versuchstiere	52
Abbildung 19: Gesamtgewicht der Versuchstiere	54
Abbildung 20: Absolute Zunahme an Gewicht der Versuchstiere	55
Abbildung 21: Relative Zunahme an Gewicht der Versuchstiere	56
Abbildung 22: Absolutes Gewicht der Fettpolster	57
Abbildung 23: Relatives Gewicht der Fettpolster	58
Abbildung 24: Blutglucose-Konzentration der Versuchstiere	59
Abbildung 25: Plasma-Insulin-Konzentration der Versuchstiere	60
Abbildung 26: Errechneter HOMA-Index der Versuchstiere	61
Abbildung 27: OGTT der Versuchstiere in der Woche 17	62
Abbildung 28: AUC des OGTTs in der Woche 17	63
Abbildung 29: Relaxationsvermögen der Aorten durch die Zugabe von Nitroglycerin	65
Abbildung 30: Relaxationsvermögen der Aorten durch die Zugabe von Acetylcholin	66
Abbildung 31: EC ₅₀ -Werte der Relaxation mit Acetylcholin im Organbad der Aorta	67
Abbildung 32: EC ₅₀ -Werte der Relaxation mit Nitroglycerin im Organbad der Aorta	68
Abbildung 33: Mikroskopische Aufnahmen der 3T3-L1-Zellen während der Differenzierung	70
Abbildung 34: Mikroskopische Aufnahmen der Färbung der differenzierten 3T3-L1-Adipozyten mittels Oil Red O nach Dr. Dalei Shao und Dr. Mitchell A. Lazar	71
Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahmen der C2C12-Zellen während der Differenzierung	73
Abbildung 36: Analyse der GLUT4-Expression der 3T3-L1-Adipozyten	74
Abbildung 37: Analyse der GLUT4-Expression der C2C12-Myozyten	75
Abbildung 38: Auswirkung der Cytokin-Kombination auf die Nitrit-Konzentration nach 24 Stunden	77
Abbildung 39: Auswirkung der IL 1 β -Konzentration auf die Nitrit-Konzentration nach 24 Stunden	78
Abbildung 40: Auswirkung der Expositionszeit auf die Nitrit-Konzentration	79
Abbildung 41: Auswirkung der ADMA-Konzentrationsreihe auf die Nitrit Konzentration nach 24 Stunden	80
Abbildung 42: Insulin-induzierte ³ H-Deoxy-D-Glucoseaufnahme der C2C12-Myozyten unter Cytokin-Exposition	81
Abbildung 43: Differenz der Nitrit-Konzentrationen im Überstand der C2C12 unter Cytokin-Exposition	82
Abbildung 44: Insulinsekretion der HIT-T15- β -Zellen unter Cytokin-Exposition	83
Abbildung 45: Viabilität der HIT-T15- β -Zellen unter Cytokin-Exposition	84

6.1.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gensequenz der verwendete DDAH1-Primer zur Bestimmung des Genotyps	22
Tabelle 2: Zusammensetzung des Master Mixes pro Probe für die DNA-Amplifikation	22
Tabelle 3: Temperaturprogramm der PCR	23

Tabelle 4: Verabreichung der Acetylcholin (ACh) Verdünnungsreihe im Organbad	28
Tabelle 5: Verabreichung der Nitroglycerin (NTG) Verdünnungsreihe im Organbad	28
Tabelle 6: Chromatographische Parameter	32
Tabelle 7: Parameter der Massenspektrometrie	32
Tabelle 8: Massenübergänge von Vorläufer- zum Produktion der Moleküle zur Identifizierung und Quantifizierung	33
Tabelle 9: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels	41
Tabelle 10: Verwendete Antikörper und Konzentrationen	43
Tabelle 11: Einteilung der Tiere in zu untersuchenden Kohorten	49

6.1.5 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ANOVA	zweifaktorieller Varianzanalyse
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unterhalb der Kurve
BH4	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serum Albumin
C3G	Cyanidin-3-glucosid
CAP	Cbl-bindendes Protein
Cbl	Casitas B Lymphomprotein
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cGTP	Cyclisches Guanosintriphosphat
CS	Kälberserum
DAN	2,3-Diaminonaphthalin
dd	Doppelt destilliert
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DIO	Diät-induzierte Adipositas
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	Enhanced Chemielumineszenz-Reagenz

EDRF	Endothelabhängiger Gefäß-relaxierendes Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelte Immunosorbens Untersuchung
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESI	Elektronenspray-Interface
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIP	Glucoseabhängige insulinotropes Peptid
GLP 1	Glucagonähnliches Peptid 1
GLUT4	Glucosetransporter 4
Grb2	Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenes Protein 2
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
HbA _{1C}	Hämoglobin A _{1C}
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HG DMEM	Dulbeccos modified eagle Medium 4,5 g/L Glucose
HOMA	Homöostatische Bewertungsmethode
HRP	Meerrettichperoxidase
HS	Pferdeserum
H-Sätze	Hazardous Sätze
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IFN γ	Interferon γ
IL 1 β	Interleukin 1 β
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRS 1	Insulinrezeptorsubstrat 1
IRS 2	Insulinrezeptorsubstrat 2
KO	Knockout
LC-MS/MS	Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LDL	Lipoproteine niederer Dichte
LG DMEM	Dulbeccos modified eagle Medium 1 g/L Glucose
L-NMMA	Monomethyl-L-Arginin

lowTE	Low Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
MODY	Juveniler Diabetes der bei Erwachsenen auftritt
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADHP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
neg.	Negativ
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NTG	Nitroglycerin
OGTT	Oraler Glucose-Toleranztest
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgel
PBS	Phosphatgepufferte Lösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDK	Phosphatidylinositolabhängige Proteinkinase
PGF2a	Prostaglandin F2a
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB, Akt	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
pos.	Positiv
PRMT	Protein-L-Arginin-Methyltransferase
P-Sätze	Precautionary Sätze
RAS	Rattensarkomvirus
RNS	Reaktive Nitrogenspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Medium

SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Sos	Son of sevenless
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Trisgepufferte Lösung
TBST	Trisgepufferte Tween-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
UHZ	Universitäres Herzzentrum
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

6.1.6 Hazardous und Precautionary (H und P) Sätze

H-Sätze (Hazard Statements)

H 200	Instabil, explosiv.
H 201	Explosiv; Gefahr der Massenexplosion.
H 202	Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H 203	Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H 204	Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H 205	Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
H 220	Extrem entzündbares Gas.
H 221	Entzündbares Gas.
H 222	Extrem entzündbares Aerosol.
H 223	Entzündbares Aerosol.
H 224	Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
H 225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H 226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H 228	Entzündbarer Feststoff.
H 229	Behälter steht unter Druck: kann bei Erwärmung bersten.
H 230	Kann auch in Abwesenheit von Luft explosionsartig reagieren.

- H 231 Kann auch in Abwesenheit von Luft bei erhöhtem Druck und/oder erhöhter Temperatur explosionsartig reagieren.
- H 240 Erwärmung kann Explosion verursachen.
- H 241 Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
- H 242 Erwärmung kann Brand verursachen.
- H 250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
- H 251 Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H 252 In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H 260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
- H 261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
- H 270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
- H 271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
- H 272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H 280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
- H 281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.
- H 290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- H 300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- H 301 Giftig bei Verschlucken.
- H 302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H 304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H 310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H 311 Giftig bei Hautkontakt.
- H 312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H 314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H 315 Verursacht Hautreizungen.
- H 317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H 318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H 319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H 330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H 331 Giftig bei Einatmen.
- H 332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H 334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H 335 Kann die Atemwege reizen.
- H 336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H 340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H 341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H 350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H 350i	Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
H 351	Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H 360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H 360F	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H 360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H 360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H 360Fd	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H 360Df	Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H 361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H 361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H 361d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H 361fd	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H 362	Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
H 370	Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H 371	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).
H 372	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).
H 373	Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H 300+310	Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt.
H 300+330	Lebensgefahr bei Verschlucken oder Einatmen.
H 310+330	Lebensgefahr bei Hautkontakt oder Einatmen.
H 300+310+330	Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H 301+311	Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt.
H 301+331	Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.
H 311+331	Giftig bei Hautkontakt oder Einatmen.
H 301+311+331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H 302+312	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt.
H 302+332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.

- H 312+332 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.
 H 302+312+332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
 H 400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
 H 410 Sehr giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
 H 411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
 H 412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
 H 413 Kann für Wasserorganismen langfristig schädlich sein.
 H 420 Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre.

P-Sätze (Precautionary Statements)

- P 101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
 P 102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
 P 103 Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.
 P 201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
 P 202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
 P 210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
 P 211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
 P 220 Von Kleidung/.../brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
 P 221 Mischen mit brennbaren Stoffen/... unbedingt verhindern.
 P 222 Keinen Kontakt mit Luft zulassen.
 P 223 Keinen Kontakt mit Wasser zulassen.
 P 230 Feucht halten mit
 P 231 Unter inertem Gas handhaben.
 P 232 Vor Feuchtigkeit schützen.
 P 233 Behälter dicht verschlossen halten.
 P 234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
 P 235 Kühl halten.
 P 240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
 P 241 Explosionsgeschützte elektrische Geräte/Lüftungsanlagen/ Beleuchtungsanlagen/... verwenden.
 P 242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
 P 243 Maßnahmen gegen elektrostatische Entladungen treffen.
 P 244 Ventile und Ausrüstungsteile öl- und fettfrei halten.
 P 250 Nicht schleifen/stoßen/.../reiben.
 P 251 Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach Gebrauch.
 P 260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
 P 261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
 P 262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
 P 263 Kontakt während der Schwangerschaft/und der Stillzeit vermeiden.
 P 264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
 P 270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.

- P 271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
- P 272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P 273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P 280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
- P 282 Schutzhandschuhe/Gesichtsschild/Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
- P 283 Schwer entflammare/flammhemmende Kleidung tragen.
- P 284 (Bei unzureichender Belüftung) Atemschutz tragen.
- P 231+232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
- P 235+410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P 301 Bei Verschlucken:
- P 302 Bei Berührung mit der Haut:
- P 303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
- P 304 Bei Einatmen:
- P 305 Bei Kontakt mit den Augen:
- P 306 Bei Kontakt mit der Kleidung:
- P 308 Bei Exposition oder falls betroffen:
- P 310 Sofort Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.
- P 311 Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.
- P 312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.
- P 313 Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P 314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P 315 Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P 320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P 321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P 330 Mund ausspülen.
- P 331 KEIN Erbrechen herbeiführen.
- P 332 Bei Hautreizung:
- P 333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:
- P 334 In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
- P 335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.
- P 336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
- P 337 Bei anhaltender Augenreizung:
- P 338 Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
- P 340 Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
- P 342 Bei Symptomen der Atemwege:
- P 351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P 352 Mit viel Wasser/... waschen.
- P 353 Haut mit Wasser abwaschen/duschen.

- P 360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P 361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P 362 Kontaminierte Kleidung ausziehen.
- P 363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P 364 Und vor erneutem Tragen waschen.
- P 370 Bei Brand:
- P 371 Bei Großbrand und großen Mengen:
- P 372 Explosionsgefahr bei Brand.
- P 373 Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe/Gemische/Erzeugnisse erreicht.
- P 374 Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
- P 375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P 376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P 377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
- P 378 ... zum Löschen verwenden.
- P 380 Umgebung räumen.
- P 381 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.
- P 390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- P 391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P 301+310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.
- P 301+312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.
- P 301+330+331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
- P 302+334 Bei Berührung mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
- P 302+352 Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser/... waschen.
- P 303+361+353 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P 304+340 Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
- P 305+351+338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P 306+360 Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P 308+311 Bei Exposition oder falls betroffen: Giftinformationszentrum/ Arzt/... anrufen.
- P 308+313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P 332+313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P 333+313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P 335+334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen/ nassen Verband anlegen.

- P 337+313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P 342+311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum/ Arzt/... anrufen.
- P 361+364 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P 362+364 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P 370+376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P 370+378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
- P 370+380 Bei Brand: Umgebung räumen.
- P 370+380+375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P 371+380+375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P 401 ... aufbewahren.
- P 402 An einem trockenen Ort aufbewahren.
- P 403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P 404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P 405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P 406 In korrosionsbeständigem/... Behälter mit widerstandsfähiger Innenauskleidung aufbewahren.
- P 407 Luftspalt zwischen Stapeln/Paletten lassen.
- P 410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P 411 Bei Temperaturen nicht über ... °C/... °F aufbewahren.
- P 412 Nicht Temperaturen über als 50 °C/122 °F aussetzen.
- P 413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg/... lbs bei Temperaturen nicht über ... °C/... °F aufbewahren.
- P 420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.
- P 422 Inhalt in/unter ... aufbewahren.
- P 402+404 An einem trockenen Ort aufbewahren. In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P 403+233 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.
- P 403+235 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.
- P 410+403 Vor Sonnenbestrahlung schützen. An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P 410+412 Vor Sonnenbestrahlung schützen. Nicht Temperaturen über 50 °C/122 °F aussetzen.
- P 411+235 Bei Temperaturen nicht über ... °C/... °F aufbewahren. Kühl halten.
- P 501 Inhalt/Behälter ... zuführen.
- P 502 Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen.

6.2 Lebenslauf

Name	Afshin Sobhi
Geburtstag	22. März 1985
Geburtsort	Teheran/Iran

Ausbildung

Seit 10.2011	Promotion am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
10.2013 – 09.2015	Aufbaustudium der Molekularbiologie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
03.2011	Approbation als Apotheker
04.2005 – 10.2010	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
06.2004	Allgemeine Hochschulreife an der Wichern-Schule in Hamburg

Berufserfahrung

Seit 03.2011	Angestellter Apotheker in einer öffentlichen Apotheke in Hamburg
05.2010 – 10.2010	Pharmaziepraktikum an der University of Florida in Gainesville/USA
11.2009 – 04.2010	Pharmaziepraktikum in der Dr. Walters Markt-Apotheke in Hamburg

6.3 Eidesstattliche Erklärung

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

Untersuchungen zur Rolle des asymmetrischen Dimethylarginins in der Pathophysiologie des Diabetes mellitus

im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger und der Betreuung durch Frau Prof. Dr. Elke Oetjen für den Fachbereich Chemie ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe.

Hamburg, 21.09.2016

Afshin Sobhi

6.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Böger, für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, das Überlassen des spannenden Promotionsthemas und die umfangreiche Unterstützung dieser Arbeit.

Ich möchte mich auch sehr bei Frau Prof. Dr. Oetjen für die Begutachtung der Arbeit, die Vertretung gegenüber dem Fachbereich Chemie und die zahlreichen Ratschläge bedanken.

Herrn Prof. Dr. Tidow und Frau Dr. Hoffmeister-Ullerich danke ich für die freundliche Zusage, als Prüfer an meiner Disputation teilzunehmen.

Weiterhin möchte ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie für Ihre vielen Hilfeleistungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Ich danke insbesondere Dr. Maike Anderssohn für die anfängliche Betreuung und ihr Vertrauen in meine Arbeit.

Meinen Eltern, die mir diesen Lebensweg ermöglicht haben, danke ich ganz herzlich für ihre Unterstützung. Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, meinen Brüdern, Ali, Arash und Aydin, und meinen Freunden.

Mit ganzem Herzen möchte ich mich auch bei Katharina bedanken, die mich immer unterstützt hat und zu motivieren wusste.