

---

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie,  
Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie  
der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

**Bedeutung endogener Inhibitoren der NO-Synthase für kardiovaskuläre  
Erkrankungen und ihre pharmakologische Therapie**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
im Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jennifer Albsmeier

Hamburg 2004

---

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. H.-J. Duchstein
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. R.-H. Böger

Tag der Disputation: 28. Oktober 2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. L-Arginin-NO-Stoffwechselweg .....	1
1.1.1. NO (Stickstoffmonoxid) .....	1
1.1.2. NO-Synthasen (NOS) .....	3
1.1.3. L-Arginin-Paradoxon .....	5
1.2. N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin (Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin, ADMA) .....	7
1.2.1. Charakterisierung des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin, ADMA).....	7
1.2.2. Biosynthese, Metabolismus und Exkretion des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA).....	8
1.2.2.1. Biosynthese .....	8
1.2.2.2. Metabolisierung des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) .....	10
1.2.2.3. Exkretion.....	12
1.2.3. Pathophysiologische Bedeutung des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) .....	13
1.2.4. Analyse des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) .....	17
1.2.5. Substanzen, die möglicherweise den Metabolismus des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) beeinflussen .....	18
1.2.5.1. HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine).....	18
1.2.5.2. Low-density Lipoproteine (LDL) und oxidierte Low-density Lipoproteine (oxLDL) .....	20
1.2.5.3. Peroxisome proliferator-activated Rezeptoren (PPAR).....	21
1.2.5.4. Angiotensin II.....	23
1.3. Beeinflussung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine).....	25
1.4. Zielsetzung .....	26
<b>2. METHODEN</b> .....	<b>27</b>
2.1. Untersuchung der endothelialen NO-Synthase(eNOS)-Aktivität in vitro .....	27
2.1.1. Bestimmung der Inkubationszeit.....	28
2.1.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS).....	28
2.1.3. Ermittlung enzymkinetischer Daten der endothelialen NO-Synthase (eNOS) unter dem Einfluss von ADMA .....	29
2.2. Endothelzellkultur .....	30

2.3.	Quantitativer Proteinnachweis.....	32
2.4.	Low density Lipoprotein(LDL)-Isolation und Gewinnung von oxLDL.....	33
2.5.	Nachweis der Zytotoxizität der HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine).....	33
2.6.	Bestimmung des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) mit Hilfe der HPLC.....	34
2.7.	Bestimmung des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) mit Hilfe der GC-MS.....	35
2.7.1.	Synthese des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-Dimethyl-L-Arginins ([ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-ADMA).....	37
2.8.	Bestimmung der Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH).....	37
2.9.	Bestimmung der Expression der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) auf mRNA-Ebene.....	39
2.9.1.	Isolation der RNA aus Endothelzellen.....	39
2.9.2.	Überprüfung der isolierten RNA.....	39
2.9.3.	Durchführung der Reversen Transkription (cDNA-Synthese).....	40
2.9.4.	Semiquantitative Analyse der cDNA mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction).....	41
2.9.4.1.	Durchführung der PCR und Überprüfung der PCR-Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.9.4.2.	Durchführung der semiquantitativen Bestimmung der DDAH 1 und DDAH 2 mit Hilfe des Light Cyclers.....	42
2.10.	Analyse der eNOS-, der DDAH- und der Angiotensin-Rezeptor-Expression auf Protein-Ebene.....	43
2.11.	Statistik.....	44
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>45</b>
3.1.	Klärung des Wirkmechanismus, dem die Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin (ADMA) unterliegt.....	45
3.1.1.	Beeinflussung der eNOS-Aktivität durch die NOS-Inhibitoren N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin (ADMA), N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin (L-NNA).....	46
3.1.2.	Ermittlung enzymkinetischer Daten der endothelialen NO-Synthase.....	47
3.2.	Entwicklung einer auf der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) basierenden Methode zur Analyse des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA).....	53
3.2.1.	Synthese, Charakterisierung und Quantifizierung des internen Standards N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-Dimethyl-L-Arginin ([ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-ADMA).....	54

3.2.2.	Validierung der GC-MS-Methode zur Analyse des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in Zellkulturüberständen, Zelllysaten und humanen Plasmaproben.....	57
3.2.3.	Vergleich der GC-MS- mit der HPLC-Methode hinsichtlich der Analyse des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in Plasmaproben.....	62
3.3.	Beeinflussung der Konzentration bzw. des Metabolismus des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in Endothelzellen .....	63
3.3.1.	Effekte der HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine).....	64
3.3.2.	Führen LDL und oxLDL im Endothelzellversuch zu einer Erhöhung der Konzentration des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA)? .....	68
3.3.3.	Spielen die „Peroxisome proliferator-activated receptor α und γ“ (PPARα, PPARγ) als Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der DDAH-Expression eine Rolle? .....	70
3.3.4.	Zeigt Angiotensin II (AT II) als stark vasokonstriktorisch wirksames Peptid einen Effekt auf die ADMA-Konzentration in Endothelzellen? .....	73
3.3.5.	Zusammenfassung der im Kapitel 3.3. dargestellten Ergebnisse.....	75
3.4.	Einfluss von HMG-CoA-Reduktasehemmern unterschiedlicher Halbwertszeit auf die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS).....	77
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
4.1.	Charakterisierung des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) als kompetitiven Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS) .....	81
4.2.	Analytik des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins mittels GC-MS.....	86
4.2.1.	Bedeutung des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-Dimethyl-L-Arginins ([ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-ADMA) als interner Standard.....	86
4.2.2.	Beurteilung der GC-MS-Methode zur Analyse von N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin (ADMA).....	87
4.3.	Diskussion über die Einflussnahme verschiedener Faktoren auf die Konzentration des N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginins (ADMA).....	90
4.3.1.	Effekte der HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine).....	91
4.3.2.	Einfluss von LDL und oxLDL.....	93
4.3.3.	PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)α- und γ-Agonisten und N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin (ADMA).....	96
4.3.4.	Deutung der Angiotensin II-Effekte .....	101
4.3.5.	Schlussfolgerung für die pharmakologische Therapie .....	103
4.4.	Interpretation des Expressionsmusters der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in Endothelzellen induziert durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine).....	104
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>107</b>

<b>6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>109</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>111</b>
<b>8. ANHANG</b> .....	<b>140</b>
Material.....	140
R- und S-Sätze.....	149
Ergebnistabellen.....	152
Lebenslauf.....	163
Publikationen.....	164
Erklärung.....	165
Danksagung.....	166

## 1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen mit über 4 Millionen Toten pro Jahr die häufigste Todesursache in Westeuropa dar. Herzinfarkt und Schlaganfall sind im Vergleich zu allen Krebsarten für die doppelte Anzahl von Todesfällen bei Frauen verantwortlich (American Heart Association 2004). Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hypertonie, Rauchen und Diabetes mellitus können nur etwa 80% der in der Bevölkerung der Industrienationen auftretenden koronaren Ereignisse erklären (Stamler et al. 1986, Stampfer et al. 2000). Zahlreiche neue Risikofaktoren sind in den letzten Jahren untersucht worden, wie z.B. C-reaktives Protein und Homocystein, deren pathophysiologische Bedeutung jedoch noch unklar ist (Pearson 2002). Innerhalb des Arterioskleroseprozesses, der im Zuge kardiovaskulärer Ereignisse von Bedeutung ist, spielt die Funktion des Endothels hinsichtlich der Veränderung der Gefäßwand und der Bildung arteriosklerotischer Plaques eine entscheidende Rolle (Vane et al. 1990). Einer der wichtigsten Faktoren, der vom intakten Gefäßendothel freigesetzt wird und eine zentrale Stellung für die Aufrechterhaltung des physiologischen Gefäßtonus und der Gefäßstruktur einnimmt, ist das Stickstoffmonoxid (NO). NO wird durch die NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. Dieses Enzym wird durch Analoge von L-Arginin, die an der Guanidinogruppe substituiert sind, gehemmt. Die bekanntesten Inhibitoren der NO-Synthase sind N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin, ADMA) und N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NNA). Während es sich bei L-NNA um eine synthetische Substanz handelt, werden L-NMMA und ADMA endogen im menschlichen Körper gebildet. ADMA wurde erstmals im Jahr 1992 von Vallance und Mitarbeitern im menschlichen Plasma und im Harn nachgewiesen und führte isoliert aus humanem Harn in vitro zu einer Hemmung der NO-Produktion (Vallance et al. 1992a). Inzwischen wird ADMA als ein neuer Marker bzw. Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen und stellt damit ein Ziel für die pharmakologische Therapie dar.

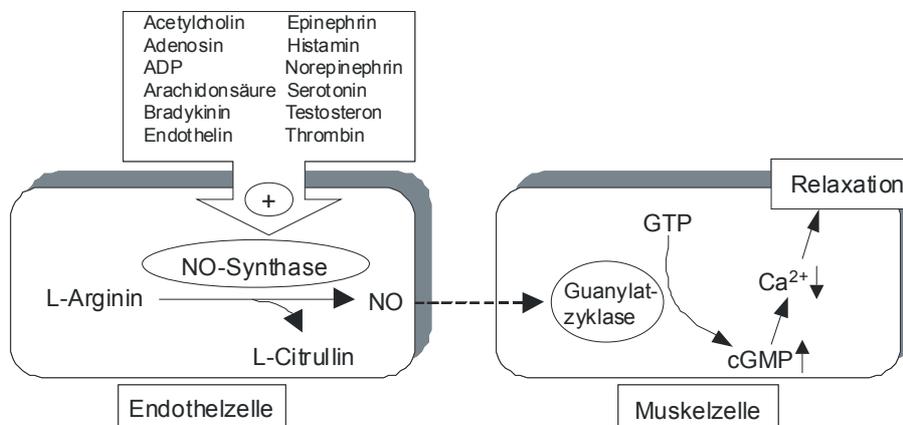
### 1.1. L-Arginin-NO-Stoffwechselweg

#### 1.1.1. NO (Stickstoffmonoxid)

1980 zeigten Furchgott und Mitarbeiter die Existenz einer vom Endothel produzierten Substanz, die erforderlich war, um die Relaxation von Blutgefäßen zu vermitteln (Furchgott und Zawadzki 1980). Sie bezeichneten diese Substanz als „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF). 1986 konnten Ignarro und Moncada unabhängig voneinander zeigen, dass

EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist (Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987, Moncada et al. 1988).

NO ist als das kleinste endogen gebildete, bioaktive Molekül anzusehen und reagiert als Radikal innerhalb von 20-40 Sekunden mit Sauerstoff und Wasser zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), die 1000-fach weniger wirksam sind als NO und im Urin ausgeschieden werden. NO wird sowohl im zentralen und peripheren Nervensystem, in Makrophagen als auch in Endothelzellen gebildet (Moncada et al. 1991). Im zentralen und peripheren Nervensystem ist NO an der langfristigen Modulation synaptischer Transmission beteiligt, während es im peripheren Nervensystem als atypischer Neurotransmitter über intrazelluläre Membranrezeptoren agiert und z.B. die relaxierende Komponente der peristaltischen Wellen des Darmplexus steuert. Die Produktion von NO in Makrophagen ist in unspezifische Abwehrreaktionen eingebunden, indem NO an eisenhaltige Enzyme in den Zielzellen bindet, direkt die DNA desaminiert oder via Peroxynitrit oxidativ schädigt (Tamir et al. 1996). Das in den Endothelzellen synthetisierte NO ist vor allem für das Herz-Kreislauf-System von großer Bedeutung. In erster Linie wirkt NO vasodilatatorisch, indem NO an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylatzyklase bindet, welches in einer Stimulation dieses Enzyms und einer gesteigerten cGMP-Bildung resultiert (Ignarro et al. 1982). Das ansteigende cGMP, der second messenger von NO, führt über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase-I (cGK-I) zur Relaxation des glatten Gefäßmuskels (Abb.1). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Regulation von Gefäßtonus und -struktur durch NO sowohl über cGMP-abhängige als auch cGMP-unabhängige Mechanismen große klinische Bedeutung besitzt. Verschiedene Faktoren sind in der Lage, die Synthese von NO entweder rezeptorvermittelt, wie Adenosindiphosphat (ADP) über P2-Purinrezeptoren oder Serotonin über HT-Rezeptoren, oder rezeptorunabhängig, wie Calcium Ionophor A-23187, zu induzieren (Abb.1). Auch auf physikalischem Weg ist durch gesteigerten Blutfluss („shear stress“) eine verstärkte NO-Synthese zu erreichen.



**Abbildung 1:** Synthese des NO und dessen vasorelaxierende Wirkung

Neben der Aufrechterhaltung eines konstanten, aktiven vasodilatierenden Gefäßtonus besitzt NO Bedeutung als Hemmer der Thrombozytenaggregation und der Proliferation glatter Muskelzellen (Radomski et al. 1987, Garg et al. 1989). Zudem führt NO zu einer Reduktion der Monozyten- und Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel und zeigt eine inhibitorische Wirkung auf Superoxidradikalanionen generierende Enzymsysteme, wie z.B. die NADPH-Oxidase (Kubes et al. 1991, Clancy et al. 1992). Diese Mechanismen unterstützen seine antiarteriosklerotischen Effekte und resultieren u.a. in einer herabgesetzten Oxidation von Lipoproteinen. In Abbildung 2 sind die Reaktionen des NO auf molekularer Ebene zusammengestellt, die die beschriebenen Effekte dieses Radikals z.T. erklären können.

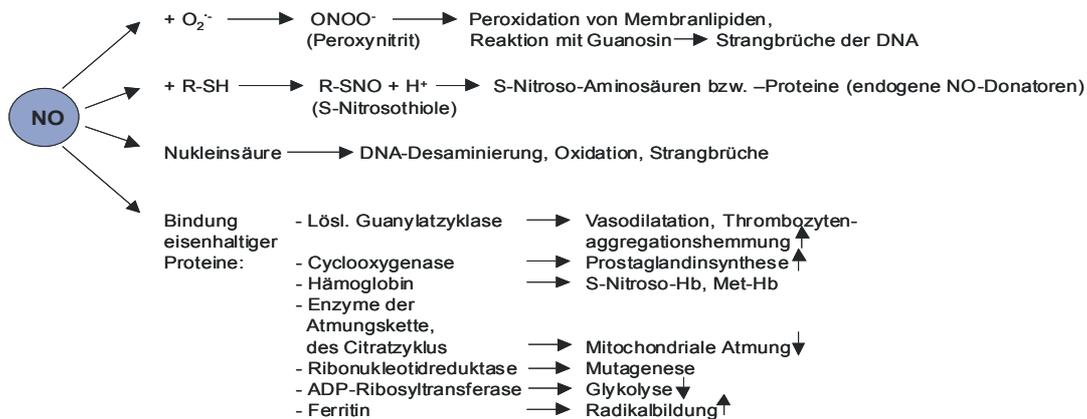


Abbildung 2: Wirkmechanismen von NO (nach Stichtenoth 1997)

### 1.1.2. NO-Synthasen (NOS)

NO wird aus L-Arginin mittels der NO-Synthasen (NOS) synthetisiert (Palmer et al. 1988). Die Biosynthese von NO erfolgt über die Oxidation von L-Arginin in zwei Schritten zu L-Citrullin. Zunächst findet eine 5-Elektronen-Oxidation eines Stickstoffatoms der Guanidinogruppe des L-Arginins statt, wobei N<sup>G</sup>-Hydroxy-L-Arginin als Zwischenprodukt entsteht, welches selbst als Substrat der NO-Synthasen fungieren kann (Griffith et al. 1995). In dem zweiten Oxidationsschritt wird die C=NOH-Bindung gespalten und es entstehen das freie NO-Radikal und L-Citrullin (Abb.3).

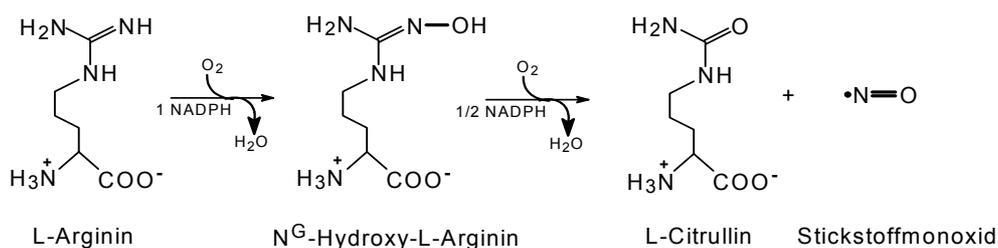
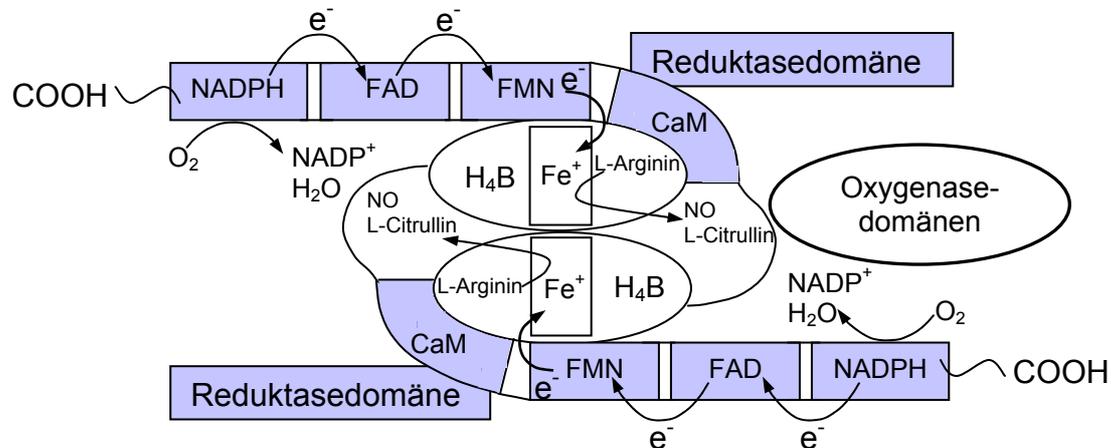


Abbildung 3: Synthese des Stickstoffmonoxids aus L-Arginin katalysiert durch die NOS

Die NO-Synthasen bestehen aus zwei identischen Monomeren, die in zwei große Domänen aufgeteilt werden können: in eine C-terminale Reduktase-Domäne und in eine N-terminale Oxygenase-Domäne (Andrew et al. 1999). Die Reduktase-Domäne besitzt Bindungsstellen für jeweils ein Molekül von NADPH, FAD und FMN, während die Oxygenase-Domäne Häm, Tetrahydrobiopterin und das Substrat L-Arginin bindet. Zwischen den beiden Gruppen liegt die Calmodulin-Bindungsstelle, welche eine Schlüsselrolle sowohl für die Struktur als auch für die Funktion der Enzyme spielt. Der Elektronentransport bei der Synthese des NO verläuft über FAD zu FMN, von wo aus die Elektronen unter dem Einfluss von Calmodulin auf das Häm-Eisen transferiert werden. Die Reduktion des Eisens führt zur Aktivierung des Sauerstoffs, die wiederum für die Oxidation des L-Arginins verantwortlich ist (Abb. 4). Unter suboptimalen Bedingungen, z.B. relativer Mangel an L-Arginin in Anwesenheit von LDL-Cholesterin, kann es zur NOS-Entkopplung kommen, welche die Synthese von Superoxidradikalanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) nach sich zieht (Pritchard et al. 1995). Außerdem scheint der Kofaktor Tetrahydrobiopterin bei der Superoxidradikalanionproduktion durch die NOS eine besondere Rolle zu spielen (Vasquez-Vivar et al. 1998). Die gesteigerte Synthese von Superoxidradikalanionen und die damit verbundene Inaktivierung des Stickstoffmonoxids unter Bildung von Peroxynitrit werden u.a. als ein möglicher Prozess im Zusammenhang mit der Hypercholesterinämie diskutiert (Li et al. 2000b).



**Abbildung 4:** Elektronentransfer in einem NOS-Dimer von der Reduktasedomäne zur Oxygenasedomäne

Drei Isoformen der NO-Synthasen sind bekannt (Andrew et al. 1999). Die endotheliale NOS (eNOS) wird konstitutiv im Endothel (eNOS) exprimiert, während die neuronale NOS (nNOS) konstitutiv in Neuronen vorliegt. Inzwischen konnte diese Isoform ebenfalls außerhalb des zentralen bzw. peripheren Nervensystems, u.a. in Gefäßmuskelzellen, identifiziert werden (Papapetropoulos et al. 1999). Beide Isoformen werden vornehmlich durch eine Erhöhung

der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit einer daraus resultierenden Bindung eines  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplexes aktiviert (Andrew et al. 1999). Die dritte Isoform (iNOS) liegt nicht konstitutiv vor. Ihre Expression wird insbesondere in Zellen des Immunsystems durch bakterielle Endotoxine oder inflammatorische Zytokine induziert (Papapetropoulos et al. 1999). Sie liegt an Calmodulin gebunden vor und bildet unabhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration große Mengen an NO. Sowohl die iNOS als auch die nNOS sind zytosolische Enzyme, während es sich bei der eNOS um ein membrangebundenes Enzym handelt (Pollock et al. 1993). Inzwischen gibt es jedoch Hinweise darauf, dass alle drei Isoformen sowohl im Cytosol als auch durch Protein-Protein-Interaktionen an der Membran gebunden vorliegen können (Alderton et al. 2001). Für die eNOS ist vor allem eine posttranskriptionale Modifikation von Bedeutung. Die N-terminale Myristilierung und Palmitoylierung sorgt für die Lokalisation der eNOS an der Caveole der Plasmamembran, deren variierender Lipidgehalt die NOS-Aktivität reguliert. Die Assoziation der eNOS mit dem Caveolin 1 und 3, Proteine die die Caveole umgeben, führt über die Beeinflussung der Calmodulin-Bindung und des Elektronentransports zur Hemmung der NOS-Aktivität (Ghosh et al. 1998).

Diskussionen bestehen hinsichtlich der Existenz weiterer NOS-Isoformen, wie z.B. einer mitochondrialen NOS oder einer mit Osteoarthritis assoziierten NOS in Chondrozyten (Alderton et al. 2001).

### 1.1.3. L-Arginin-Paradoxon

L-Arginin stellt - wie oben bereits erwähnt - das Substrat der NO-Synthasen und damit die Ausgangssubstanz für NO dar. Hierbei handelt es sich um eine basische, semiessentielle Aminosäure, die in Mengen von 5-6 g/Tag mit der Nahrung aufgenommen wird. Das in den Zellen verfügbare L-Arginin wird entweder aus Proteinen freigesetzt, über einen spezifischen Transporter in die Zellen transferiert oder aus L-Citrullin über die Argininsuccinatsynthase (AS) und die Argininsuccinatlyase (AL) recycelt (Hecker et al. 1990). Für den Transfer des L-Arginins sind vier unterschiedliche Transportsysteme beschrieben worden, der  $\gamma^+$ , der  $\text{B}^{0,+}$ , der  $\text{b}^{0,+}$  und der  $\gamma^+$ L-Transporter. Während der  $\gamma^+$ -Transporter zur Familie der Kation-spezifischen Transporter zählt (CAT), gehören die anderen drei Systeme zu den sogenannten „broad scope“ Transportern (BAT) und können auch neutrale Aminosäuren transportieren (Devés et al. 1998). Die Regulation dieser Systeme ist sehr komplex und noch nicht vollständig geklärt. Der  $\gamma^+$ -Transporter ist für ca. 70% der L-Arginin-Aufnahme verantwortlich.  $\text{N}^G$ -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA),  $\text{N}^G, \text{N}^G$ -Dimethyl-L-Arginin (ADMA) und

das N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (SDMA) stellen kompetitive Inhibitoren des L-Arginins an diesem Transporter dar (Closs et al. 1997).

Intrazelluläre L-Arginin-Konzentrationen liegen in einem Bereich von 100-800 µM (Baydoun et al. 1990), so dass die endotheliale NO-Synthase mit einem K<sub>M</sub>-Wert von 2,9 µM mit dem Substrat L-Arginin übersättigt zu sein scheint und eine Erhöhung der L-Arginin-Konzentration keinen Effekt hinsichtlich einer vermehrten NO-Produktion besitzen dürfte (Pollock et al. 1991). Diese Schlussfolgerung widerspricht jedoch den in vivo gemachten Beobachtungen, dass eine L-Arginin-Supplementierung und eine damit verbundene Erhöhung der L-Arginin-Plasmakonzentration zu einem Anstieg der NO-Freisetzung führen. So wurde u.a. beobachtet, dass die orale Supplementierung mit L-Arginin zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Relaxation isolierter Aortensegmente ex vivo bei Cholesterin-gefütterten Kaninchen führte (Cooke et al. 1991). Ebenso konnte an Cholesterin-gefütterten Kaninchen durch tägliche Gabe von L-Arginin eine Reduktion des Plasma L-Arginin/ADMA Verhältnisses und eine Normalisierung der Nitrat- und cGMP-Ausscheidung erreicht werden, wogegen die Cholesterin-Konzentrationen unbeeinflusst blieben. Die tägliche L-Arginin-Gabe blockierte die Progression von Plaques über die Erhöhung der Substratverfügbarkeit für die NO-Synthase und über die Reduktion von vaskulärem oxidativem Stress (Böger et al. 1997a). Durch intrakoronare Infusion von L-Arginin konnte die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation bei Menschen mit Hypercholesterinämie ebenfalls wiederhergestellt werden (Drexler et al. 1991). Neben der beschriebenen Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation bzw. erhöhten NO-Produktion konnte ebenfalls die klinische Symptomatik der Patienten verbessert werden, so dass bei AVK-Patienten nach täglicher L-Arginin-Einnahme eine Verlängerung der Gehstrecke beobachtet wurde, Patienten mit stabiler Angina pectoris von einer höheren Belastbarkeit bei sportlicher Aktivität profitierten und Patienten mit Herzinsuffizienz von einer Verbesserung ihrer Symptome sprachen (Böger et al. 1998a, Ceremuzynski et al. 1997, Rector et al. 1996).

Dieses Phänomen wird als L-Arginin-Paradoxon bezeichnet, für das ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase verantwortlich gemacht werden könnte. Die Aufnahme von extrazellulärem L-Arginin könnte zu einer Verdrängung dieses Inhibitors führen und so in einer Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase resultieren. Die Funktion des kompetitiven Inhibitors könnte das N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA), welches im folgenden Kapitel näher beschrieben wird, übernehmen.

## 1.2. $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginin (Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin, ADMA)

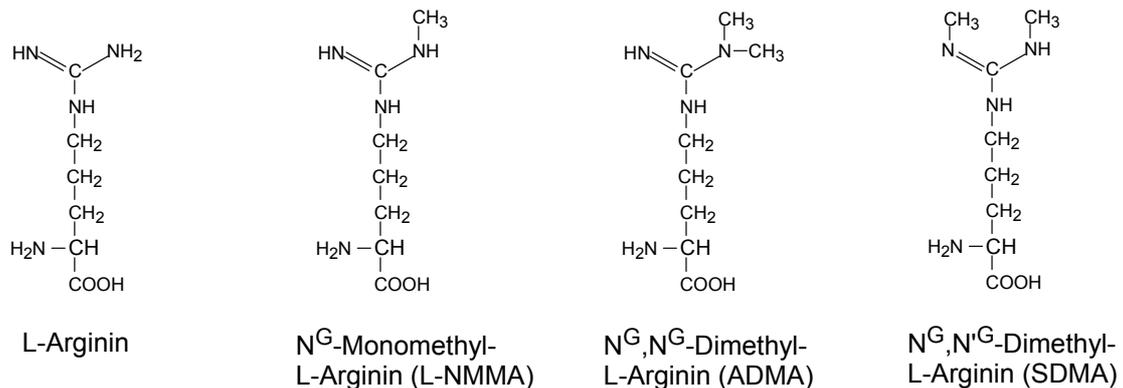
### 1.2.1. Charakterisierung des $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginins (Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin, ADMA)

$N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginin (asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin, ADMA) stellt eine Aminosäure dar, die auch als ein L-Arginin-Analogen angesehen werden kann. ADMA trägt im Vergleich zum L-Arginin zwei Methylgruppen, die zwei Wasserstoffatome an einem der Stickstoffatome der Guanidinogruppe substituieren. In diesem Zusammenhang ist auf ein zweites L-Arginin-Analogen hinzuweisen, das  $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginin (symmetrisches Dimethyl-L-Arginin, SDMA), welches zwei Wasserstoffatome an den beiden unterschiedlichen Stickstoffatomen der Guanidinogruppe durch zwei Methylgruppen substituiert hat. Diese Beschreibung und die Darstellung dieser Substanzen in Abbildung 5 machen deutlich, dass es sich bei der Bezeichnung asymmetrisches bzw. symmetrisches Dimethyl-L-Arginin um einen chemisch nicht korrekten Begriff handelt, da die chemische Struktur von ADMA kein chirales bzw. asymmetrisches Stickstoffatom aufweist bzw. die chemische Struktur des SDMA kein Symmetriezentrum erkennen lässt. Bei ADMA und SDMA handelt es sich keinesfalls um Stereoisomere, sondern um Strukturisomere. In der Medizin ist der Begriff asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin jedoch fälschlicherweise übernommen worden und hat sich in den Publikationen durchgesetzt, so dass im Verlauf dieser Doktorarbeit diese Bezeichnung Anwendung finden wird (Abb. 5).

Zum ersten Mal wurde in der Medizin von methylierten L-Argininen im Jahre 1971 als Bestandteil von Myelin und Histonen gesprochen (Brostoff et al. 1971). Seine Bedeutung erlangte ADMA jedoch erst durch die Erkenntnis, dass diese Substanz im Gegensatz zu SDMA als endogener NO-Synthase-Hemmer agiert (Vallance et al. 1992b). ADMA ist ebenso wie monomethyliertes L-Arginin ( $N^G$ -Monomethyl-L-Arginin, L-NMMA) und SDMA als Komponente von Polypeptiden identifiziert worden (Nakajima et al. 1971, Kakimoto et al. 1975). Es erscheint als freie Aminosäure im Gehirn und in anderen Geweben, zirkuliert im Plasma und wird im Urin ausgeschieden (Ueno et al. 1992, Park et al. 1988, Vallance et al. 1992a). Im menschlichen Plasma wurden in Abhängigkeit von der Analysemethode ADMA-Konzentrationen von 0,3-1  $\mu\text{M}$  bestimmt (siehe 1.2.4.), während die Konzentrationen von ADMA im menschlichen Urin im Bereich von 65  $\mu\text{M}/24\text{ h}$  bzw. von  $3,4 \pm 1,1\ \mu\text{mol}/\text{mmol}$  Kreatinin liegen (Vallance et al. 1992a, Tsikas et al. 2003).

Viele verschiedene Zelltypen besitzen die Fähigkeit sowohl ADMA als auch SDMA zu synthetisieren (Fickling et al. 1993). So konnte gezeigt werden, dass menschliche Endothelzellen neben Stickstoffmonoxid auch ADMA produzieren, was auf eine endogene NO-Regulation durch ADMA im Endothel hinweist. Zudem setzen diese Zellen wesentlich mehr ADMA als SDMA frei (Fickling et al. 1993). Die beiden L-Arginin-Derivate scheinen auf

unterschiedliche Arten synthetisiert zu werden und unterschiedliche physiologische Bedeutungen aufzuweisen. ADMA-Konzentrationen zwischen 1-10  $\mu\text{M}$  hemmen die endothelabhängige Vasodilatation und die NO-Synthase-Aktivität (Kurose et al. 1995, Fickling et al. 1993). Studien an isolierten Blutgefäßen und kultivierten Endothelzellen in Anwesenheit von L-Arginin führten zu der Festsetzung dieser Konzentrationsbereiche. Der Mechanismus, durch welchen ADMA synthetisiert und freigesetzt wird, ebenso wie die intrazelluläre Lokalisation und Konzentration, sind noch nicht vollständig geklärt.



**Abbildung 5:** Strukturvergleich der L-Arginin-Analoga

## 1.2.2. Biosynthese, Metabolismus und Exkretion des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA)

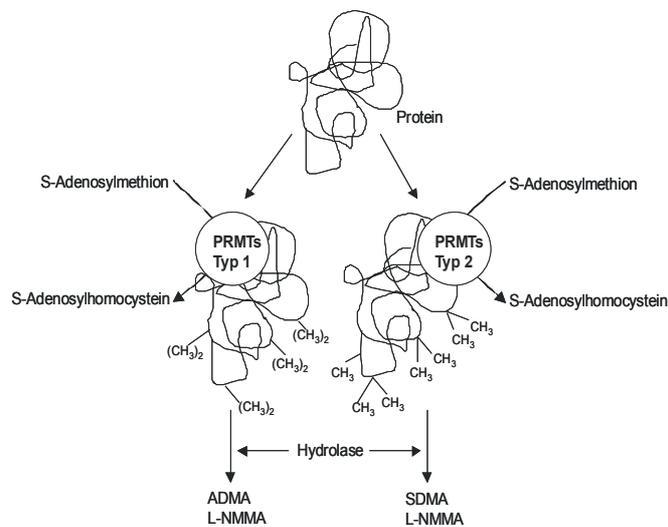
### 1.2.2.1. Biosynthese

ADMA entsteht durch posttranslationale Methylierung von L-Arginin in Proteinen gefolgt von der Hydrolyse der methylierten Proteine (Ghosh et al. 1988). Verschiedene Methyltransferasen scheinen für die Methylierung von L-Arginin verantwortlich zu sein. Inzwischen konnten die Gene, die diese Methyltransferasen codieren und spezifisch für die Katalyse der ADMA-Synthese sind, identifiziert werden. Auch für die symmetrische Dimethylierung des L-Arginins ist eine entsprechende Methyltransferase entdeckt worden, wobei die zelluläre Funktion dieser Reaktion noch nicht geklärt werden konnte (Gary et al. 1998). Die Einteilung dieser Enzymgruppe soll nun näher erläutert werden.

Kim und Paik haben drei verschiedene Proteinmethylasen charakterisiert, die wie folgt bezeichnet worden sind:

- Protein Methylase I (Protein-Arginin-Methyltransferase) (Paik et al. 1968)
- Protein Methylase II (Protein-Carboxyl-Methyltransferase) (Kim 1973)
- Protein Methylase III (Protein-Lysin-Methyltransferase) (Paik et al. 1970)

Für die Biosynthese von ADMA ist ausschließlich die Methylase I (Protein-Arginin-Methyltransferase) von Interesse. Enzyme mit der Aktivität der Methyltransferase I tragen die



**Abbildung 6:** Synthese von ADMA, L-NMMA und SDMA durch die PRMTs Typ 1 bzw. Typ 2 (nach Vallance et al. 2004)

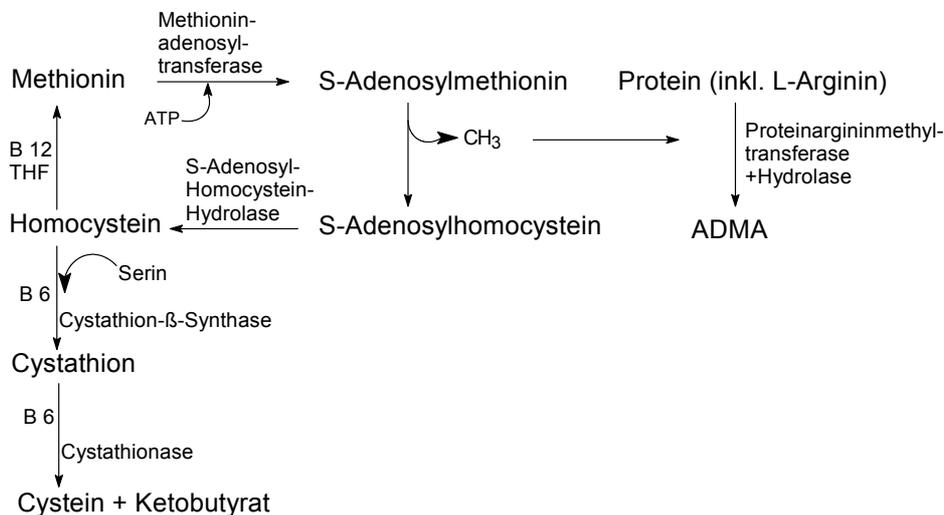
Bezeichnung PRMT (Protein-Arginin-MethylTransferase). Es existieren zwei Klassen von Protein-Arginin-Methyltransferasen. Typ 1 katalysiert die Bildung von N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und von ADMA, wogegen der Typ 2 für die Synthese des L-NMMA und des SDMA verantwortlich ist (Gary et al. 1998) (Abb. 6). 4 verschiedene Isoformen, die alle die Methyltransferase-Aktivität vom Typ 1 aufweisen, sich jedoch in Oligomerisation, subzellulärer Lokalisation, ihrer Substratspezifität und ihrer Regulation unterscheiden, sind

inzwischen analysiert worden (Gary et al. 1998). PRMT 1 scheint die biologische Aktivität des Interferons I positiv zu beeinflussen (Altschuler et al. 1999). Die cDNA eines weiteren Enzyms (PRMT 3) mit der Aktivität der Methyltransferase I Typ 1 ist 1998 von Tang und seiner Arbeitsgruppe aus Ratten und Menschen isoliert worden. HRMT 1L1 (PRMT 2) und HRMT 1L2, die dritte und vierte Isoform der Protein-Arginin-Methyltransferasen, sind von Scott und seiner Arbeitsgruppe 1998 im Menschen in einem Hefe-two-hybrid-screen identifiziert und charakterisiert worden (Scott et al. 1998). Innerhalb des kardiovaskulären Systems werden alle Isoformen im Herzen, in glatten Muskelzellen und in Endothelzellen exprimiert.

Die Funktionen der Protein-Arginin-Methyltransferasen und der Argininmethylierung sind noch nicht vollständig geklärt. Es konnte die Beteiligung bzw. Beeinflussung der Methyltransferasen an der Signaltransduktion bestimmt werden (Desrosiers et al. 1998). Zahlreiche Proteine, deren Argininreste asymmetrisch dimethyliert sind, sind im Kern lokalisiert und scheinen hier über die Auflösung der Carrier-Protein-Bindung Einfluss auf den Transfer bestimmter Proteine zwischen Kern und Zytoplasma zu nehmen. Auffällig sind ebenfalls die großen Mengen asymmetrischer Dimethyl-L-Argininderivate in Ribonukleoproteinen, die eine wesentliche Rolle in dem pre-mRNA-Processing spielen (Dreyfuss et al. 1988).

Allen Methyltransferasen dient das S-Adenosylmethionin als Methylendonator. Nach Aktivierung der Aminosäure Methionin durch ATP wird die Methylgruppe als CH<sub>3</sub><sup>+</sup> unter

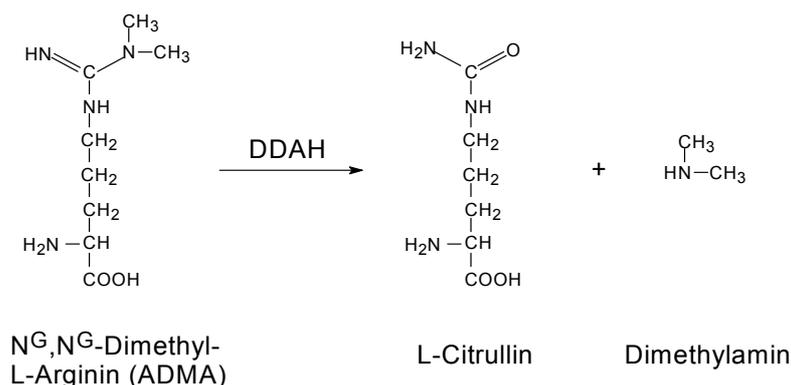
Entstehung einer reaktionsfähigen Sulfonium-Verbindung auf ein Atom mit freiem Elektronenpaar, z.B. auf das Stickstoffatom der Guanidinogruppe des L-Arginins, übertragen, so dass als weiteres Produkt ein Adenosinthioether, das Adenosylhomocystein, entsteht (Abb. 7). Unter Abspaltung des Adenosins wird hieraus das Homocystein freigesetzt (Karlson 1994). Homocystein kann nun über zwei unterschiedliche Wege umgesetzt werden. Der Remethylierungsprozess besitzt hier die größere Priorität. Unter diesem Stoffwechselweg wird ein wichtiger Syntheseweg der Aminosäure Methionin aus dem Homocystein verstanden. Die Reaktion wird durch die Methionin-Synthase katalysiert und benötigt Cobalamin (Vitamin B12) als prosthetische Gruppe und N<sup>5</sup>-Methyl-Tetrahydrofolat als Kofaktor bzw. als Methylendonator (Chiang et al. 1996). Nach Ausschöpfung der Remethylierungskapazität wird Homocystein über den Transulfurations-Stoffwechselweg metabolisiert (Abb. 7).



**Abbildung 7:** S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator für die Biosynthese von ADMA

### 1.2.2.2. Metabolisierung des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) durch das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)

Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) stellt ein Enzym dar, welches die Umsetzung von ADMA zu L-Citrullin und Dimethylamin katalysiert (Abb. 8). Entdeckt wurde das Enzym 1989 von Ogawa und seiner Arbeitsgruppe, die die DDAH aus der Rattenniere isoliert und deren Eigenschaften bestimmt haben (Ogawa et al. 1989). Es handelt sich hierbei um ein einzelsträngiges Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 33 kDA. Die DDAH ist spezifisch für ADMA und N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), während SDMA kein Substrat für dieses Enzym darstellt. Ein Kofaktor wird für die Reaktion nicht benötigt.



**Abbildung 8:** Metabolisierung von ADMA zu L-Citrullin und Dimethylamin durch die DDAH

Substanzen, wie  $\text{HgCl}_2$ , die SH-Gruppen zu blockieren vermögen, und divalente Metallionen, z.B.  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , können die Aktivität des Enzyms hemmen (Ogawa et al. 1989). Das Enzym ist aus zahlreichen Organen und Geweben der Ratte isoliert worden, z.B. aus der Niere, der Leber, dem Pankreas und dem Gehirn. In hohen Konzentrationen konnte es ebenfalls in der Aorta und in Makrophagen nachgewiesen werden (Kimoto et al. 1993). Auch in Endothelzellen vom Rind und vom Menschen wurde das Enzym entdeckt (Mac Allister et al. 1994a). Die cDNA der DDAH wurde zunächst aus der Rattenniere und schließlich aus der menschlichen Niere geklont und sequenziert (Kimoto et al. 1997, Kimoto et al. 1998). Die DDAH scheint ein durch die Evolution lang konserviertes Enzym zu sein, wofür der Nachweis desgleichen in primitivsten Organismen, u.a. in Bakterien, spricht (Tran et al. 2000).

Der synthetische DDAH-Inhibitor S-2-amino-4(3-methylguanidino)butansäure (4124W) diente der gezielten Aufklärung der Funktion dieses Enzyms (MacAllister et al. 1996). Die Zugabe von 4124W führte wie erwartet zu einem Anstieg von ADMA, während die SDMA-Konzentration unbeeinflusst blieb. 4124W besaß keine direkten Effekte auf die NO-Synthase, bewirkte aber eine endothelabhängige Kontraktion der Aorta von Ratten. Diese Kontraktion konnte durch eine Infusion von L-Arginin aufgehoben werden. Die Hemmung der DDAH-Aktivität liefert damit einen Mechanismus für die Hemmung der NO-Synthasen und scheint auf diese Weise eine pathophysiologische Bedeutung hinsichtlich der NO-Freisetzung zu besitzen.

Inzwischen wurde von diesem Enzym eine zweite Isoform identifiziert, die eine von dem ursprünglichen Enzym abweichende Verteilung im Gewebe aufweist (Leiper et al. 1999). Die DDAH 1 wird hauptsächlich in Geweben exprimiert, in denen die neuronale NO-Synthase vorliegt. So wurde die DDAH 1 als „nerve-injury associated molecule“ beschrieben, welches eine mit der nNOS übereinstimmende Hochregulation in Neuronen aufweist (Nakagomi et al. 1999). Die Isoform DDAH 2 dominiert dagegen in Geweben, in denen die endotheliale NO-Synthase lokalisiert ist, was auf eine für die beiden Isoformen spezifische Regulierung der NO-Synthasen über die Modulation der Methylargininkonzentrationen hinweist. Es muss in

diesem Zusammenhang jedoch vermerkt werden, dass diese Enzyme auch in Geweben gefunden worden sind, in denen keine NO-Synthasen exprimiert werden (Santa Maria 1999). Die DDAH scheint also weitere, bisher nicht identifizierte physiologische Funktionen zu besitzen.

Beide Isoformen sind hauptsächlich im Zytosol lokalisiert ohne spezifische Assoziation zu Organellen oder zur Plasmamembran (Birdsey et al. 2000). Sie scheinen eine Schlüsselrolle in der Sicherung niedriger Konzentrationen von Methylargininen in der gesamten Zelle unter physiologischen Bedingungen zu besitzen. Hinweise auf die mögliche Existenz einer zweiten Isoform dieses Enzyms gab es bereits durch die Tatsache, dass in einigen Studien die DDAH-Aktivität nicht mit der DDAH-Expression korrelierte. Z.B. könnten Erkenntnisse, dass TNF- $\alpha$  und oxLDL zu einer Akkumulation von ADMA im Medium von Endothelzellen führen, ohne eine Veränderung bezogen auf das DDAH 1-Protein zu induzieren (Ito et al. 1999), mit einer Downregulierung der DDAH 2 erklärt werden. Durch Entdeckung dieser Isoformen und deren unterschiedliche Verteilung im Gewebe sollte es nun möglich sein, molekulare, zelluläre und klinische Studien zu verbessern, um gezielte Erkenntnisse über die Rolle der Methylarginine im Hinblick auf die Pathogenese verschiedener Krankheiten zu erhalten. Die Aminosäuresequenzen der DDAH 1 und 2 zeigen, verglichen mit Sequenzen von Enzymen, die in den Metabolismus des L-Arginins eingebunden sind, keinerlei Homologie (Leiper et al. 1999), was als ein guter Ansatz zu sehen ist, um pharmakologische Agentien zu entwickeln, die spezifisch auf ADMA Einfluss nehmen können.

Jüngst konnte die Tertiärstruktur des klonierten und gereinigten Enzyms, die einen reaktiven Cysteinrest (Cys-249) im aktiven Zentrum der DDAH aufweist, mittels Kristallographie aufgeklärt werden (Murray-Rust et al. 2001). Dieser Cysteinrest stellt einen Angriffspunkt für Nitrosylierungen dar, die an der Regulation der DDAH-Aktivität beteiligt sind (Leiper et al. 2002). Ein direkter Rückkopplungsmechanismus scheint von Bedeutung, bei dem ansteigende NO-Konzentrationen über eine Hemmung des ADMA metabolisierenden Enzyms die eigene Synthese einschränken.

### **1.2.2.3. Exkretion**

In zahlreichen Studien konnte inzwischen gezeigt werden, dass bei terminaler Niereninsuffizienz die Plasmakonzentrationen sowohl von ADMA als auch von SDMA deutlich ansteigen (Kielstein et al. 2001). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass diese beiden L-Arginin-Analoga über die Niere ausgeschieden werden. Zudem konnten verschiedene Dialyseverfahren in unterschiedlichem Maße zu einer extrakorporalen Elimination der beiden Substanzen beitragen. Bei der Hämodialyse wurde nur eine geringe

Clearance für die beiden Substanzen beobachtet, die mit der Bindung derselben an Plasmaproteine erklärt werden könnte. Nicht veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Böger sprechen für eine Plasmaproteinbindung von über 90% für ADMA. Die Peritonealdialyse dagegen ließ hohe SDMA-Konzentrationen bei normalen ADMA-Konzentrationen erkennen (Kielstein et al. 1999). Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass die renale Exkretion der einzige verfügbare Eliminationsweg für SDMA ist, während für ADMA zusätzliche metabolische Eliminationswege, z.B. die oben beschriebene Metabolisierung durch die DDAH, zur Verfügung stehen.

### **1.2.3. Pathophysiologische Bedeutung des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA)**

Bei zahlreichen kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen wurden erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen nachgewiesen. Alle diese Erkrankungen gehen mit einer endothelialen Dysfunktion einher. In gesunden Personen liegen die ADMA-Konzentrationen in einem Bereich von ca. 0,5-1 µM (Vallance et al. 1992a). In Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren liegen die Plasmakonzentrationen um den Faktor 2 höher (Böger et al. 1998b). In Patienten mit klinisch manifester Arteriosklerose oder mit terminaler Niereninsuffizienz konnten sogar 3,5- und 10,4-fach höhere ADMA-Konzentrationen bestimmt werden (Böger et al. 1997b, Vallance et al. 1992a, Al Banchaabouchi et al. 2000, Zoccali et al. 2001).

An jungen Patienten mit Hypercholesterinämie konnte festgestellt werden, dass die ADMA-Konzentrationen doppelt so hohe Werte annahmen im Vergleich zu denen in gesunden Probanden (Böger et al. 1998b). Diese Erhöhung war mit der Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation und einer verringerten Nitrat-Ausscheidung gekoppelt, was auf eine reduzierte NO-Synthese hinwies. Durch die Applikation von L-Arginin konnten diese Effekte aufgehoben werden. In einer weiteren Studie an Patienten mit Hypercholesterinämie wurde neben den erhöhten ADMA-Werten auch eine Verstärkung der Monozyten- und T-Lymphozytenadhäsion festgestellt (Chan et al. 2000). Monozyten und T-Lymphozyten sind die dominanten Zellen, die in arteriosklerotischen Plaques eine entscheidende Rolle spielen. Diese Steigerung der Adhäsion konnte durch die Gabe von L-Arginin unter Normalisierung des ADMA/L-Arginin-Verhältnisses aufgehoben werden. Die Konzentrationen des Cholesterins, des ADMA, des Wachstumshormons und des Insulins blieben durch die L-Arginin-Applikation unbeeinflusst. Weitere Versuche an isolierten Zellen zeigten keinen direkten Effekt von ADMA auf das Adhäsionsverhalten von Monozyten und T-Lymphozyten, so dass die Wirkung von ADMA auch hier über die verminderte NO-

Freisetzung aus Endothelzellen erklärt werden muss. In dieser Studie konnte ebenfalls eine direkte Korrelation zwischen den ADMA-Konzentrationen und den Gesamtcholesterinkonzentrationen bzw. den LDL-Konzentrationen im Plasma belegt werden (Chan et al. 2000). Die Ursache für die erhöhten Plasmakonzentrationen von ADMA in Patienten mit Hypercholesterinämie ist unklar. ADMA könnte das Ergebnis einer gesteigerten Hydrolyse von methylierten Proteinen sein. In diesem Zusammenhang ist die Lipidperoxidation und die damit verbundene peroxidative Schädigung von Gewebeproteinen und eine erhöhte Proteolyserate zu sehen (Mahmoodi et al. 1995). Erhöhte ADMA-Konzentrationen sind ebenfalls bei Patienten mit peripherer Arterienverschlusserkrankung (pAVK) analysiert worden und korrelierten mit der Schwere der Krankheit und mit einer verminderten NO-Synthase-Aktivität (Böger et al. 1997b). Eine weitere Erkrankung, die mit erhöhten Plasmakonzentrationen von ADMA in Verbindung gebracht wurde, ist die Niereninsuffizienz. Vallance und seine Arbeitsgruppe waren die Ersten, die von erhöhten ADMA-Konzentrationen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz berichteten (Vallance et al. 1992a). Die ADMA-Konzentrationen bei Nierenkranken mit Arteriosklerose waren wiederum signifikant höher als bei Nierenkranken ohne Arteriosklerose. In beiden Fällen lagen jedoch keine veränderten L-Arginin-Konzentrationen vor. Es wurde daher angenommen, dass das vielfache Auftreten von Hypertonie, Arteriosklerose und immunologischer Dysfunktion bei Patienten mit Niereninsuffizienz in engem Zusammenhang mit dem beeinträchtigten L-Arginin/NO-Stoffwechsel und der Akkumulation von ADMA steht.

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie wurde festgestellt, dass die renale Exkretionsrate von Nitrat und Nitrit, Indikatoren für die NO-Synthese, erniedrigt, während die ADMA-Konzentrationen um den Faktor 2,2-2,3 erhöht waren (Surdacki et al. 1999). Die L-Arginin Konzentrationen und die SDMA-Konzentrationen bewegten sich im normalen Bereich. Außerdem wurden ADMA-Konzentrationen in der Schwangerschaft in Verbindung mit dem Blutdruck bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass Blutdruckabfälle in der frühen Schwangerschaft mit einem signifikanten Abfall der ADMA-Konzentrationen korrelierten (Holden et al. 1998). Sowohl ADMA als auch NO spielen scheinbar eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Blutdruckregulation in der Schwangerschaft.

Zudem korrelierten ADMA-Konzentrationen ebenfalls positiv mit dem Lebensalter, dem mittleren, arteriellen Blutdruck, der Glukosetoleranz und dem Ausmaß der Arteriosklerose (Miyazaki et al. 1999, Goonasekera et al. 1997, Zoccali et al. 2002a). Eine Zusammenstellung der Krankheiten bzw. Umstände, die mit erhöhten ADMA-Konzentrationen verbunden sind, zeigt Tabelle 1.

**Tabelle 1**

<u>Erkrankung</u>	<u>Spezies</u>	<u>Literaturangabe</u>
Niereninsuffizienz	Mensch	Vallance et al. 1992a Al Banchaabouchi et al. 2000
Bluthochdruck	Mensch	Goonasekera et al. 1997 Surdacki et al. 1999 Fujiwara et al. 2000
Schwangerschafts-bedgt. Bluthochdruck	Mensch	Chen et al. 1997
Präeklampsie	Mensch	Holden et al. 1998
Experimentell induzierter Bluthochdruck	Ratte	Matsuoka et al. 1997
Pulmonaler Hochdruck verbunden mit angeborener Herzkrankheit	Mensch	Gorenflo et al. 2001
Arteriosklerose	Mensch	Böger et al. 1997b Miyazaki et al. 1999
	Kaninchen	Böger et al. 1998c
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	Mensch	Böger et al. 1997b
Hypercholesterinämie	Mensch	Böger et al. 1998b Chan et al. 2000 Jang et al. 2000 Lundman et al. 2001
	Kaninchen	Böger et al. 1997a
Thrombotische Mikroangiopathie	Mensch	Herlitz et al. 1997
Herzinsuffizienz	Mensch	Usui et al. 1998
	Ratte	Feng et al. 1998
Syndrom X	Mensch	Piatti et al. 2003
Alloxan induzierte Hyperglykämie	Kaninchen	Masuda et al. 1999
Diabetes mellitus	Mensch	Abbasi et al. 2001 Asagami et al. 2002
	Mensch	Böger et al. 2001 Stühlinger et al. 2001 Yoo et al. 2001
Hyperhomocysteinämie	Affen	Böger et al. 2000a
Schlaganfall	Mensch	Yoo et al. 2001
Hyperthyreose	Mensch	Hermenegildo et al. 2002
Hohes Lebensalter	Mensch	Miyazaki et al. 1999
Schizophrenie	Mensch	Das et al. 1996
Multiple Sklerose	Mensch	Rawal et al. 1995
Muskeldystrophie	Mensch	Inoue et al. 1979

Diese Beobachtungen können die Frage noch nicht beantworten, ob die erhöhten ADMA-Konzentrationen ein Grund oder eine Folge der kardiovaskulären Erkrankung darstellen bzw. ob ADMA als Risikofaktor oder nur als Risikomarker angesehen werden kann.

Dass ein kausaler Zusammenhang zwischen den ADMA-Konzentrationen und dem Auftreten koronarer Ereignisse besteht, wurde erstmals durch eine Studie von Miyazaki und seiner

Arbeitsgruppe nachgewiesen (Miyazaki et al. 1999). ADMA-Konzentrationen korrelierten eindeutig bei gesunden Probanden ohne Anzeichen einer koronaren oder peripheren arteriellen Gefäßerkrankung mit der Intima/Media-Dicke der Aorta Carotis. Der Nachweis, dass ein Zusammenhang zwischen der Dicke der Intima/Media der Aorta Carotis und dem Auftreten schwerwiegender koronarer Ereignisse besteht, ist bereits in zahlreichen Studien erbracht worden, so dass ADMA als ein neuer Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen postuliert wurde. Eine prospektive Studie konnte an Hämodialysepatienten zeigen, dass ADMA-Konzentrationen und das Lebensalter signifikante Prädiktoren für das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen als auch für die Gesamtmortalität darstellten (Zoccali et al. 2001). Eine weitere Studie aus der Arbeitsgruppe von Zoccali belegte, dass ADMA einen diagnostisch verwertbaren Vorhersagewert für das Auftreten einer konzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels besitzt (Zoccali et al. 2002b). Die signifikante Beziehung zwischen ADMA-Konzentrationen und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse besteht ebenfalls in nierengesunden und nichtrauchenden Männern mittleren Lebensalters, die mit ADMA-Konzentrationen oberhalb von  $0,62 \mu\text{M}$  ein 3,9-fach erhöhtes Risiko für ein akutes koronares Ereignis besitzen (Valkonen et al. 2001). Damit erhält ADMA diagnostische Bedeutung als neuer kardiovaskulärer Risikomarker (Lu et al. 2003, Böger 2003).

Hinweise darauf, dass ADMA als Verursacher dieser Erkrankungen anzusehen ist, geben Untersuchungen, in denen eine chronische Hemmung der NO-Synthase zur Hypertonie führte und eine Steigerung der Arteriosklerose im Tiermodell verursachte (Baylis et al. 1992, Nahruße et al. 1994). Die Arbeitsgruppe von Vallance hat in einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie gesunden, männlichen Probanden ADMA infundiert und festgestellt, dass es u.a. zu einem signifikanten Anstieg des Blutdrucks und des Pulses im Vergleich zu Placebo kam (Achan et al. 2003). Diese Ergebnisse konnten durch die Infusion von  $0,0125\text{-}0,25 \text{ mg/kg/min}$  ADMA in sechs gesunden Probanden bestätigt werden (Kielstein et al. 2004). Die Beeinträchtigung des NO-Syntheseweges durch ADMA scheint demzufolge direkt an der Entwicklung bzw. dem Fortschreiten kardiovaskulärer Krankheiten beteiligt zu sein. Der Mechanismus, durch welchen es zu dieser veränderten L-Arginin-NO-Stoffwechsellage kommt, konnte bisher nicht geklärt werden. Sicherlich handelt es sich hier um eine multifaktorielle Erscheinung, die u.a. den Anstieg freier Sauerstoffradikale, die Akkumulation von ADMA und eine verminderte NO-Synthase-Aktivität beinhaltet.

#### 1.2.4. Analyse des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA)

Publikationen zur Analytik von methylierten L-Argininderivaten existieren seit Jahrzehnten, lange bevor ADMA als endogener NO-Synthase Inhibitor an Bedeutung gewann. Die Bestimmung von Aminosäuren und deren methylierten Derivaten wurde zunächst mit Hilfe eines Aminosäure-Analyzers, der colorimetrisch die zuvor chromatographisch getrennten Ninhydrinderivate detektierte, durchgeführt (Kominz et al. 1962). Die Analyse, der Aminosäurezusammensetzung, z.B. von Pflanzen oder von Myelin, unterschied schon damals zwischen N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) und dem Strukturisomer N<sup>G</sup>,N<sup>G'</sup>-Dimethyl-L-Arginin (SDMA) (Deibler et al. 1973). Die Arbeitsgruppe von Vallance, die 1992 die physiologische Bedeutung von ADMA erkannte, verwendete die Kapillarelektrophorese zur Bestimmung der ADMA-Konzentrationen im Plasma und im Urin. Dieser Analyse ging jedoch eine aufwendige Aufreinigung über zwei verschiedene Bondelutsäulen (SCX (strong cation exchange), CBA (carboxylic acid)) und eine chromatographische Trennung über eine C<sub>18</sub>-Säule mit Hilfe der HPLC voraus (Vallance et al. 1992a). Im gleichen Jahr wurde von einer Methode berichtet, die die Aminosäuren bzw. deren Analoga nach dreifacher Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie und Derivatisierung mit Phenylthiocarbamat über eine ODS(octadecylsulfat)-H-Säule über die HPLC analysierten (Ueno et al. 1992). Eine verbesserte Trennung und damit zuverlässigere Analyse von ADMA und SDMA sowie eine Verkürzung der Analysezeit wurde durch die Methode von der Arbeitsgruppe Bode-Böger erreicht (Bode-Böger et al. 1996). Nach der Aufreinigung der Proben über CBA-Kartuschen wurden diese mit ortho-Phthaldialdehyd derivatisiert, mit Hilfe der HPLC über eine Phenylsäule getrennt und mittels Fluoreszenzdetektor analysiert. Zahlreiche Variationen dieser Methode wurden publiziert, die sich in der Wahl der Aufarbeitung und der HPLC-Säule unterschieden (Pettersson et al. 1997, Pi et al. 2000, Böger et al. 1998b, Teerlink et al. 2002, Marra et al. 2003). Die Nachteile dieser Methoden liegen in dem Auftreten von Interferenzen mit anderen Aminosäuren, in der aufwendigen Aufreinigung und langen Analysezeit und in dem Gebrauch von einem Plasmavolumen von 200-1000 µl, welches bei der Gewinnung von Plasmaproben aus Mäusen oder Ratten deutlich unterschritten wird. Zudem wurde eine Validierung für Zellkulturüberstände nie vorgenommen.

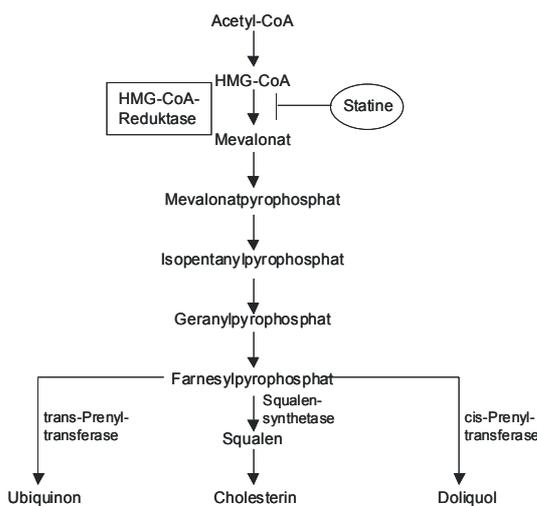
### **1.2.5. Substanzen, die möglicherweise den Metabolismus des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) beeinflussen**

In dem Maße, in dem das Verständnis über die Rolle von ADMA in pathophysiologischen Prozessen des Herz-Kreislauf-Systems zunahm, wurde ADMA ein Ziel pharmakotherapeutischer Interventionen. Da es sich bei der Synthese von ADMA um einen Prozess handelt, der zwei Enzymsysteme beinhaltet, die Methyltransferase und die Hydrolase, liegt der Fokus auf der Metabolisierung von ADMA durch die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH). Mögliche Regulationsmechanismen und die Auswirkung von therapeutisch bereits verwendeten Substanzen, wie die HMG-CoA-Reduktasehemmer, auf die ADMA-Konzentration bzw. auf die DDAH sollten in vitro untersucht werden. Die postulierten Zusammenhänge zwischen ADMA und den HMG-CoA-Reduktasehemmern, den Low density Lipoproteinen (LDL), den Peroxisome proliferator-activated Rezeptoren (PPAR) und dem Angiotensin werden in den folgenden Abschnitten näher erklärt.

#### **1.2.5.1. HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine)**

In der Therapie der Hypercholesterinämie finden u.a. die HMG-CoA-Reduktasehemmer (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymA-Reduktasehemmer) Anwendung. Diese Verbindungen, auch Statine genannt, hemmen die Cholesterinproduktion in den Hepatozyten über die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase. In der Synthese des Cholesterins gilt die Bildung von Mevalonsäure aus 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA mit Hilfe der HMG-CoA-Reduktase als geschwindigkeitsbestimmender Schritt (Abb.9). Dieser Syntheseschritt wird durch die Statine über die Nachahmung der Mevalonsäurestruktur gehemmt. Infolge der verminderten intrazellulären Cholesterinkonzentration kommt es zu einer Aktivierung der sog. Sterol-Regulatory Element Binding Proteine (SREBP's) und zu einer Translokation in den Zellkern. Als Transkriptionsfaktoren beeinflussen sie hier die Transkription der mRNA des LDL-Rezeptors. Die Hochregulation der LDL-Rezeptor-Expression an der Zelloberfläche ist der wesentliche Mechanismus, der zum Absinken des Serum-LDL-Cholesterins beiträgt. Die Statine führen zu einer Abnahme des LDL von bis zu 40%, zu einem HDL-Anstieg von bis zu 15% und zu einer Abnahme der Triglyceridkonzentration um ca. 25%. Die Triglyceridsynthese wird u.a. über die Hemmung des Schlüsselenzyms der Fettsäuresynthese der Acetyl-CoA-Carboxylase erreicht. HMG-CoA-Reduktasehemmer gelten zur Zeit als die effektivsten Wirkstoffe im Hinblick auf die Senkung der LDL-Cholesterinspiegel und werden in den meisten Ländern als Mittel der Wahl zur Behandlung der Hypercholesterinämie eingesetzt (Blumenthal et al. 2000).

Darüber hinaus konnte in einigen Langzeitstudien gezeigt werden, dass es durch die Behandlung mit Statinen über 5-6 Jahre zu einer Reduktion der Morbiditäts- und der Mortalitätsrate bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit kommt (4S 1994, Sacks et al. 1996, LIPID 1998). Statine zeigen ebenfalls antiarteriosklerotische Effekte, die nicht mit der Beeinflussung der LDL-Cholesterin-Konzentrationen korrelieren. O'Discoli und seine Arbeitsgruppe konnten nachweisen, dass eine Behandlung mit Statinen unabhängig einer Änderungen der Serumcholesterinspiegel zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führt (O'Discoli et al. 1997). Außerdem scheinen Statine für einen Anstieg der Expression und der Aktivität der endothelialen NO-Synthase verantwortlich zu sein (Laufs et al. 1998, Endres et al. 1998, Kaesemeyer et al. 1999). Die Abnahme der Zelladhäsion, die Hemmung der Proliferation von arteriellen Myozyten, die verminderte Superoxidbildung sowie die Beeinträchtigung der Endothelin-1-Synthese und -Expression wurden ebenfalls als Statineffekte identifiziert (Masaaki et al. 1997, Corsini et al. 1993, Giroux et al. 1993, Hernandez-Perera et al. 1998). Inzwischen sind zusätzlich zahlreiche direkte antiarteriosklerotische Wirkungen der Statine charakterisiert worden (Corsini et al. 1999).



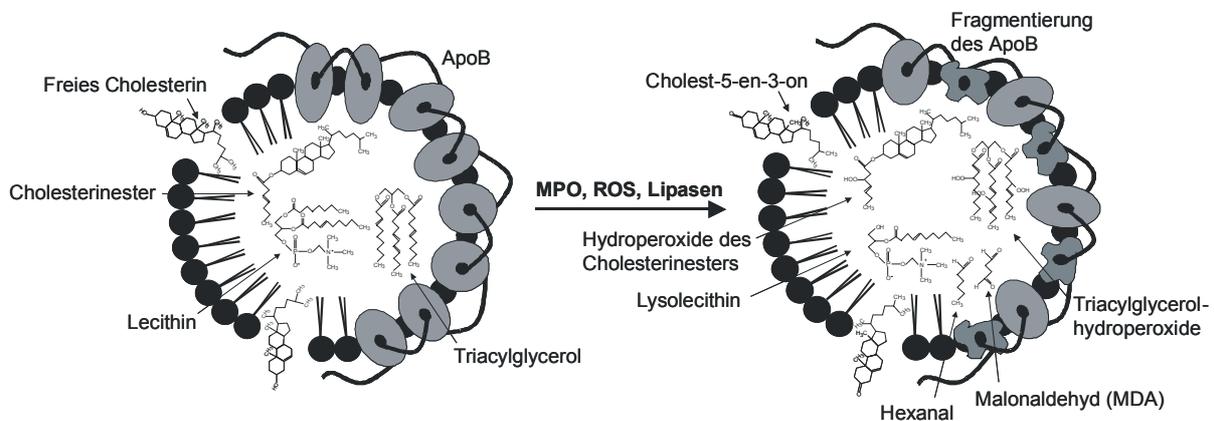
**Abbildung 9:** Hemmung der Synthese der Mevalonsäuremetabolite durch die Statine

Als HMG-CoA-Reduktasehemmer beeinträchtigen die Statine nicht nur die Synthese des Cholesterins, sondern auch die anderer Metabolite der Mevalonsäure, wie die Isoprenoide, die Geranoide und Farnesoide (Abb. 9). Zahlreiche Proteine erlangen erst in Form von Farnesyl- oder Geranylpyrophosphaten ihre Funktionsfähigkeit, die ihnen erlaubt, in verschiedensten Zellprozessen, wie z.B. in der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und in Transportprozessen, eine Rolle zu spielen. Unter Berücksichtigung dieser Interaktionen sind zumindest einige der direkten antiarteriosklerotischen Statineffekte zu erklären.

Inwieweit Statine über diese Mechanismen Einfluss auf die DDAH nehmen können, um eine Senkung von ADMA-Konzentrationen zu erzielen, und damit über eine additive Steigerung der NO-Synthase positive Effekte auf das Gefäßsystem besitzen, ist bisher nicht untersucht worden.

### 1.2.5.2. Low-density Lipoproteine (LDL) und oxidierte Low-density Lipoproteine (oxLDL)

Das Low-density Lipoprotein (LDL) zirkuliert im Blut wie alle Plasmalipoproteine in Form von Mizellen und dient dem Transport von Lipiden und Proteinen. Der hydrophobe Kern, bestehend aus Cholesterinestern und Triglyceriden, wird von freiem Cholesterin, Phospholipiden und Apolipoproteinen umgeben (Abb. 10). Das sehr Cholesterin-reiche LDL bzw. die oxidierte Form, das oxLDL, ist direkt an der Ausbildung arteriosklerotischer Plaques beteiligt, die aus einer Ansammlung von Lipiden und Zelltrümmern, umgeben von einer Bindegewebsmatrix und einer sklerosierenden Zone proliferierender glatter Muskelzellen, bestehen. Der Prozess der Arteriosklerose wird u.a. durch die Entstehung einer Endotheldysfunktion vorangetrieben, deren Entwicklung ebenfalls durch zahlreiche Effekte von LDL und oxLDL begünstigt wird.



**Abbildung 10:** Oxidation der Low-density Lipoproteine in vivo durch Myeloperoxidasen (MPO), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Lipasen, z.B. erfolgt die Umsetzung von Lecithin zu Lysolecithin durch die Phospholipase A<sub>1</sub>

Die Hypercholesterinämie zählt neben der arteriellen Hypertonie, Diabetes mellitus und Rauchen zu einem der bedeutendsten kardiovaskulären Risikofaktoren, die zu einer Endotheldysfunktion führen. Die mit der Hypercholesterinämie assoziierte Endotheldysfunktion kann zum einen auf eine vermehrte Inaktivierung von NO durch Superoxidradikalanionen, zum anderen auf eine verminderte NO-Synthese zurückgeführt werden. Erste Hinweise auf die Beteiligung von oxidativen Prozessen gaben die erfolgreichen Behandlungen mit der Superoxid-Dismutase (SOD) und Antioxidantien, wie Vitamin E und Procubol, die bei cholesterin-gefütterten Kaninchen zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führten (Mügge et al. 1991, Keaney et al. 1993, Keaney et al. 1995, Keaney et al. 1996). Der direkte Nachweis einer vermehrten Superoxidradikalanion-Bildung in der arteriellen Gefäßwand bei Hypercholesterinämie konnte schließlich mit Hilfe von Chemilumineszenz- und Elektronenspin-Resonanz-Untersuchungen erbracht werden (Ohara

et al. 1993, Mügge et al. 1994, Warnholtz et al. 1999). Die Ursache für die gesteigerte Freisetzung von Superoxidradikalanionen ist zum einen in einer vermehrten Produktion durch die NO-Synthase selbst (Pritchard et al. 1995) und in einer erhöhten Aktivität der NADH-/NADPH-Oxidase und der Xanthinoxidase zu sehen (Warnholtz et al. 1999, White et al. 1996, Cardillo et al. 1997, Stepp et al. 2002). Der direkte Einfluss von oxLDL auf die endotheliale NO-Synthase ist von der Arbeitsgruppe von Shaul gut untersucht worden (Shaul et al. 2003). OxLDL ist für die Ablösung der endothelialen NO-Synthase von der Caveolae in der Zellmembran über die Bindung an den CD36-Rezeptor und die Freisetzung von Cholesterin aus der Caveole verantwortlich. Diese Umlagerung der eNOS resultiert in einer deutlichen Abnahme der Aktivität dieses Enzyms.

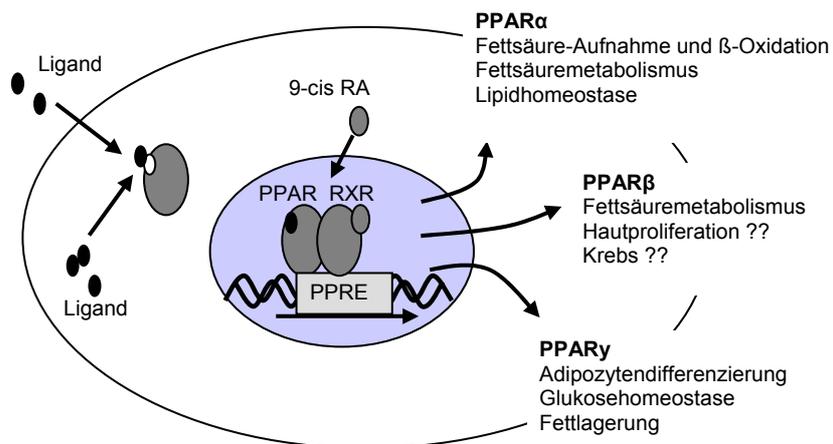
Eine verminderte NO-Synthase könnte ebenfalls durch die Erhöhung der ADMA-Konzentrationen in Endothelzellen erfolgen. Sowohl für LDL als auch für oxLDL konnte nachgewiesen werden, dass sie die ADMA-Konzentrationen in Endothelzellen erhöhen (Ito et al. 1999, Böger et al. 2000b). Die Mechanismen für diesen Anstieg der ADMA-Konzentrationen können in der Erhöhung der ADMA-Synthese mittels der Methyltransferasen und/oder in einem verminderten Abbau von ADMA über das Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) gesehen werden. Es ist bereits gezeigt worden, dass LDL und oxLDL zu einer Erhöhung der Expression aller 4 Isoformen der Methyltransferasen (PRMT1, PRMT2, PRMT3, HRMT1L2) führen (Böger et al. 2000b). Der Einfluss von LDL und oxLDL auf die DDAH wurde noch nicht vollständig aufgeklärt, insbesondere Untersuchungen hinsichtlich der Beeinträchtigung der 2. Isoform des Enzyms sind noch nicht abgeschlossen.

### **1.2.5.3. Peroxisome proliferator-activated Rezeptoren (PPAR)**

Die „Peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs) stellen Transkriptionsfaktoren dar, die zu der Superfamilie der Kernrezeptoren, wie die Glukokortikoid- bzw. Thyroidrezeptoren, gehören (Issemann et al. 1990). Die PPA-Rezeptoren regulieren die Expression zahlreicher Gene über die Bindung des 9-cis-Retinoid-X-Rezeptors (RXR) und spezifischer DNA-Sequenzen, den sogenannten „PPAR response elements“ (Tugwood et al. 1992) (Abb. 11). Drei Subtypen des PPA-Rezeptors sind inzwischen identifiziert worden, PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta/\beta$  und PPAR $\gamma$ . Diese weisen unterschiedliche Expressionsmuster auf und sind für die Lipid-Homeostase verantwortlich. PPAR $\alpha$  wird in der Leber, im Herzen, in der Muskulatur und in der Niere exprimiert und verstärkt den Fettsäurekatabolismus der Leber (Dreyer et al. 1993, Peters et al. 1997), während der PPAR $\gamma$  vor allem in Adipozyten und Makrophagen angereichert ist und eine bedeutende Rolle für die Differenzierung der Adipozyten, der

Fettlagerung und der Glukose-Homeostase einnimmt (Barak et al. 1999, Kubota et al. 1999, Rosen et al. 1999). PPAR $\delta$  ist bisher nicht sehr gut untersucht. Dieser Rezeptor wird im gesamten Körper exprimiert und scheint die Keratinozyten-Differenzierung, die Wundheilung und die Triglycerid-Konzentration über die Beeinflussung von VLDL (very low density lipoproteins) in Makrophagen zu kontrollieren (Michalik et al. 2001, Tan et al. 2001, Di-Poi et al. 2002, Chawla et al. 2003).

Fettsäurederivate, Eicosanoide und Fibrate sind als PPAR $\alpha$ -Agonisten bekannt, während Arachidonsäuremetabolite, Bestandteile des oxLDL und Thiazolidindione (Thioglitazone) die PPAR $\gamma$ -Isoform aktivieren.



**Abbildung 11:** Die Aktivierung der PPARs führt zur Akkumulation im Zellkern und zur Komplexbildung mit dem 9-cis-Retinoind-X-Rezeptor (RXR) (nach Bishop-Bailey 2000). Das PPAR: RXR Heterodimer bindet an eine DNA Sequenz in der Promotorregion des Zielgens namens PPAR response binding elements (PPRE), wodurch die Transkription induziert wird.

Inzwischen finden Agonisten dieser Rezeptoren therapeutische Anwendung. Die Wirkstoffgruppe der Fibrate, wie Fenofibrat oder Gemfibrozil, induziert eine Senkung der Triglyceride und einen Anstieg des HDL-Cholesterins über eine PPAR $\alpha$ -vermittelte Steigerung des Apolipoproteins CIII, der Lipoproteinlipase und des Fettsäuretransportproteins sowie der Apolipoproteine AI und AII (Staels et al. 1998). Die Steigerung der Insulin-Sensitivität bei Typ 2 Diabetikern mit Glitazonen ist PPAR $\gamma$  vermittelt und beinhaltet die verstärkte Expression von Insulinrezeptoren und Glukosetransportern (Saltiel et al. 1996). Aufgrund ihres Einflusses auf den Fettstoffwechsel und der inzwischen beobachteten anti-inflammatorischen Eigenschaften in Makrophagen und Endothelzellen wird die Involvierung dieser Rezeptoren in den Prozess der Arteriosklerose zunehmend diskutiert (Delerive et al. 2000, Michalik et al. 1999). Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass sowohl PPAR $\alpha$  als auch PPAR $\gamma$  in Zellen der Gefäßwand, d.h. in Muskelzellen, Endothelzellen und in Monozyten/Makrophagen sowie in arteriosklerotischen Läsionen exprimiert werden

(Bishop-Bailey et al. 2000, Marx et al. 1998, Ricote et al. 1998). Die Behandlung von Mäusen mit Rosiglitazon bzw. Troglitazon führte zu einer Verminderung der Arteriosklerose um 20-40% ohne eine Veränderung in Bezug auf die Glukose-, Insulin- oder Lipidkonzentrationen detektieren zu können, so dass direkte Einflüsse auf das Gefäßsystem diskutiert wurden (Li et al. 2000a, Chen et al. 2001, Collins et al. 2001). Es konnte nachgewiesen werden, dass PPAR $\gamma$  das Wachstum und die Proliferation sowie die Bewegungsfähigkeit von Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Monozyten vermindern (Hsueh et al. 2001a,b) und damit die Bildung der Neointima durch Muskelzellen, die Angiogenese durch Endothelzellen und die Chemokinin-stimulierte Monozytenmigration beeinträchtigen (Law et al. 1996, Xin et al. 1999, Kintscher et al. 2000, reviewed in Hsueh et al. 2003). Die beobachteten Effekte von PPAR $\alpha$  sind dagegen als kontrovers zu beurteilen. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass eine Überexpression des PPAR $\alpha$  in Mäusen zu einer gesteigerten Oxidation von Fettsäuren führte und ein verminderter Glukosetransport stattfand, welches phänotypisch in einem Diabetiker ähnlichen Herzen resultierte (Finck et al. 2002, Finck et al. 2003). Ebenso entwickelten PPAR $\alpha$ - und ApoE-knock-out Mäuse durch eine Cholesterin- und fettreiche Nahrung weniger arteriosklerotische Läsionen als die Wildtyp Tiere (Tordjman et al. 2001). Dennoch ist zu berücksichtigen, dass die klinische Anwendung der Fibrate (PPAR $\alpha$ -Agonisten) letztlich einen positiven Effekt auf das kardiovaskuläre System besitzt und in vier großen klinischen Studien in einer reduzierten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität resultierte (Helsinki Heart Study (Tenkanen et al. 1995), BECAIT (Ericsson et al. 1997), SENDCAP (Elkeles et al. 1998), VA-HIT (Robins et al. 2001)).

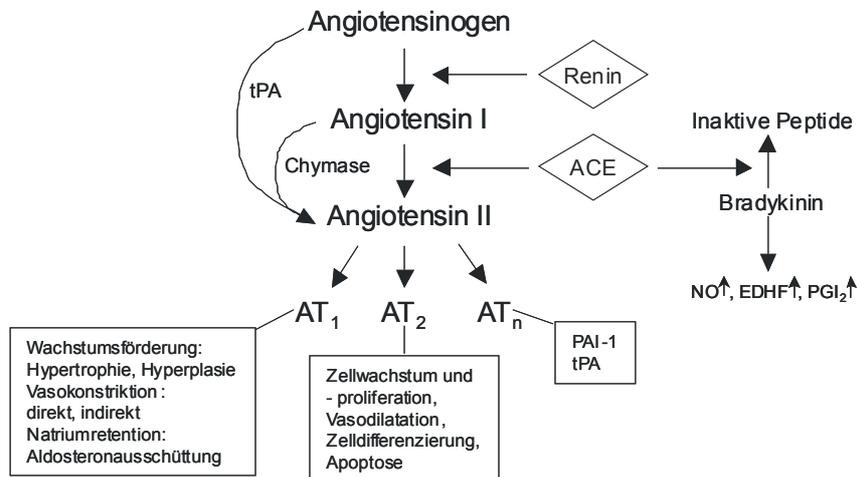
Die PPA-Rezeptoren scheinen wichtige Funktionen im Gefäßsystem zu übernehmen und eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu spielen, deren genaue Mechanismen jedoch noch einiger Untersuchungen bedürfen.

#### **1.2.5.4. Angiotensin II**

Neben NO werden im Endothel weitere vasoaktive Substanzen gebildet, wie z.B. das Angiotensin II, welches aus Angiotensin I durch Abspaltung von zwei Aminosäuren mit Hilfe des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) u.a. an der Endothelzelloberfläche entsteht (Abb. 12). Neben dem ACE sind in letzter Zeit eine Reihe weiterer Enzyme identifiziert worden, die Angiotensin II aus Angiotensin I bilden, z.B. im Herzen die Chymase bzw. das Tonin und das Cathepsin G. Angiotensin II ist ein potenter Konstriktor peripherer und renaler Arteriolen, der je nach Gefäß 10-40 mal stärker vasokonstriktorisch wirksam ist als Noradrenalin. Das Angiotensin II besitzt weitere Effekte, die über dessen Bindung an AT $_1$ - und AT $_2$ -Rezeptoren, die sich an der Oberfläche glatter Gefäßmuskelzellen befinden, erzielt werden (Unger 2002).

Während für die Zellkontraktion und -proliferation der  $AT_1$ -Rezeptor verantwortlich ist, bewirkt eine Stimulation des  $AT_2$ -Rezeptors Gewebewachstum, Proliferationshemmung und Zelldifferenzierung (Abb. 12).

### Renin-Angiotensin-Kaskade



**Abbildung 12:** Aktivierung und Wirkungsmechanismus des Angiotensin II (tPA: tissue Plasminogen-Aktivator, ACE: Angiotensin-converting Enzym, NO: Stickstoffmonoxid, EDHF: endothelium-derived hyperpolarization factor, PGI<sub>2</sub>: Prostacyclin, PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1)

Der  $AT_1$ -Rezeptor dominiert in Blutgefäßen und befindet sich in zahlreichen anderen Geweben, wogegen  $AT_2$ -Bindungsstellen unter anderem in der Nebenniere, dem Uterus, dem Herz und im Zentralnervensystem nachgewiesen wurden. Dieser Rezeptor ist hauptsächlich in der Fötalphase und unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. unter Bluthochdruck auftretender endothelialer Dysfunktion, verstärkt exprimiert (Unger et al. 2002).

Wechselwirkungen des Renin-Angiotensin-Systems mit dem L-Arginin-/NO-System sind in der Inaktivierung von Bradykinin durch das ACE zu sehen. Unter dem Einfluss von ACE wird Bradykinin in inaktive Produkte überführt, so dass weniger Bradykinin zur Verfügung steht, um über die Bindung eines Bradykinin-Rezeptors eine Freisetzung von NO, EDHF (endothelium-derived hyperpolarization factor) und PGI<sub>2</sub> (Prostacyclin) zu stimulieren und damit zur Verbesserung der Endothelfunktion beizutragen (Abb. 12).

Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms besitzen heute ihren festen Platz in der Therapie von Hypertonie und myokardialer Insuffizienz und wirken vornehmlich über die Hemmung der Vasokonstriktion des Angiotensin II und der stimulierten Aldosteronproduktion. In klinischen Studien führte die Anwendung von ACE-Hemmern bei Patienten mit Bluthochdruck und bei Patienten mit Diabetes mellitus zu einer Verbesserung der Endothelfunktion (Rizzoni et al. 1997, O'Discoll et al. 1999). Ebenso wurde unter der

Therapie mit Quinapril und Enalapril, Vertretern der ACE-Hemmer, eine deutlich gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz beobachtet (Hornig et al. 1998). Diese günstige Wirkung der ACE-Hemmer konnte vollständig durch die Anwendung von NO-Synthese-Antagonisten gehemmt werden (Hornig et al. 1998). Die Überlegung liegt nahe, dass Angiotensin neben den beschriebenen Mechanismen über eine veränderte ADMA-Konzentration Einfluss auf die NO-Synthase und damit auf die Endothelfunktion besitzen könnte.

### **1.3. Beeinflussung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine)**

Der Wirkmechanismus der HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine) wurde bereits in Kapitel 1.2.5.1. beschrieben. Das erneute Aufgreifen dieser Substanzgruppe ist bedingt durch eine im Jahre 2000 erschienene retrospektive Analyse von Cromwell (Cromwell et al. 2000), die zeigen konnte, dass unter der Anwendung von Atorvastatin ein sogenannter Tachyphylaxie-Effekt auftritt. Initial sinkt die Cholesterin-Konzentration um ca. ein Drittel des Ausgangswertes, der jedoch nach zwei bis drei Monaten nachlässt bis sich die LDL-Cholesterin-Konzentration schließlich auf einem Niveau einpendelt, welches einer 20%igen Senkung des LDL-Cholesterins entspricht. Unter der Anwendung anderer Statine konnte dieser Tachyphylaxie-Effekt nicht beobachtet werden. Ein von Cromwell und Kollegen vorgeschlagener Erklärungsansatz für dieses Phänomen liegt in den unterschiedlichen Halbwertszeiten der Statine. Atorvastatin besitzt eine Halbwertszeit von 14 Stunden, während alle anderen Statine, wie Simvastatin, Pravastatin und Fluvastatin, eine Halbwertszeit von unter 3 Stunden aufweisen. Die HMG-CoA-Reduktase stellt ein induzierbares Enzym dar, dessen Expression durch Inhibition zunimmt (Brown et al. 1978), so dass eine permanente Hemmung durch Atorvastatin zu einem verstärkten negativen Rückkopplungsmechanismus, d.h. zu einer verstärkten Expression dieses Enzyms, führen könnte. Studien an Mäusen und Schweinen bestätigen diese These und weisen unter der Applikation von Atorvastatin und Simvastatin unterschiedliche Ausmaße der HMG-CoA-Reduktase-Expression auf (Conde et al. 1999, Bisgaier et al. 1997).

Neben der HMG-CoA-Reduktase beeinflussen Statine die Expression der LDL-Rezeptoren und der NO-Synthase (siehe 1.2.5.1.). Experimentelle oder klinische Hinweise auf tatsächliche Unterschiede der einzelnen Statine auf den Zeitverlauf der Genexpression der HMG-CoA-Reduktase, des LDL-Rezeptors oder der für die pleiotropen Effekte der Statine wichtigen endothelialen NO-Synthase existieren jedoch bislang nicht.

#### 1.4. Zielsetzung

N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) kann inzwischen aufgrund seiner Eigenschaft als endogener NO-Synthase Inhibitor als Risikofaktor bzw. –marker für zahlreiche kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen werden. Der genaue Mechanismus der Hemmung der NO-Synthase durch ADMA sowie der Hintergrund der veränderten ADMA-Konzentrationen sind noch unklar. Die Aufklärung der Ursache der erhöhten ADMA-Konzentrationen könnte zu der Entdeckung neuer Targets für die therapeutische Intervention hinsichtlich der Reduktion der ADMA-Konzentrationen führen. Die Fragestellungen des ersten Teils dieser Arbeit lassen sich wie folgt unterteilen:

1. Ist ADMA als ein kompetitiver Inhibitor der endothelialen NO-Synthase anzusehen, so dass dieses L-Arginin-Analogon eine bedeutende Rolle im Hinblick auf das L-Arginin-Paradoxon spielen könnte?
2. Entwicklung einer Methode zur zuverlässigen Bestimmung von ADMA im Zellkulturüberstand, die als Voraussetzung für die unter Punkt 3 beschriebenen Zellversuche anzusehen ist.
3. Untersuchung des Einflusses von Statinen, LDL, oxLDL, PPAR $\alpha$ - und PPAR $\gamma$ -Agonisten und Angiotensin II auf die ADMA-Konzentration, sowie auf die Expression und Aktivität der DDAH in Endothelzellen und damit Erlangung von Hinweisen für die pharmakologische Therapie des NOS-Inhibitors.

Der zweite Teil der Arbeit ist gesondert zu sehen und beschäftigt sich mit dem Einfluss von Statinen auf die eNOS-Expression und mit der Frage, inwieweit pharmakokinetische und nicht substanzspezifische Unterschiede der Statine bei der Induktion der eNOS-Expression eine Rolle spielen. Die Untersuchung der Statineffekte auf die HMG-CoA-Reduktase- und die LDL-Rezeptor-Expression erfolgte anhand einer parallel durchgeführten Arbeit mit einer Hepatozytenzelllinie.

## 2. Methoden

### 2.1. Untersuchung der endothelialen NO-Synthase(eNOS)-Aktivität in vitro

Die in vitro-Untersuchungen wurden an einer rekombinanten endothelialen Rinder-NO-Synthase (NOS) durchgeführt. Zur Bestimmung der NOS-Aktivität wurden die oxidativen Metabolite des NO, Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), analysiert.

Die Experimente fanden alle in einem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 7,4 statt. Die NOS-Kofaktoren wurden in 5 ml Puffer verdünnt, so dass die folgenden Konzentrationen resultierten: 10  $\mu\text{M}$  Tetrahydrobiopterin ( $\text{H}_4\text{B}$ ), 5  $\mu\text{M}$  Flavinadeninindinukleotid (FAD), 5  $\mu\text{M}$  Flavinadeninmononukleotid (FMN), 500  $\mu\text{M}$  Calciumchlorid, 500 nM Calmodulin, 800  $\mu\text{M}$  Nicotinamidadenindinukleotidtriphosphat (NADPH).

Je 400  $\mu\text{l}$ -Aliquots wurden mit dem Substrat L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin versetzt und für 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der eNOS gestartet. Zum Stoppen der Reaktion wurden 100  $\mu\text{l}$ -Aliquots in 400  $\mu\text{l}$  eiskaltes Aceton überführt, dem ein auf das Volumen von 100  $\mu\text{l}$  bezogener interner Standard von 2,5  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{N}$ -Nitrit und  $^{14}\text{N}$ -Nitrat zugesetzt war. Die Proben wurden sofort zur vollständigen Denaturierung der NOS gemischt, mit 10  $\mu\text{l}$  Pentafluorobenzylbromid (PFB) versetzt und weiter für die GC-MS-Bestimmung von Nitrit und Nitrat aufbereitet (Tsikas et al. 2000a).

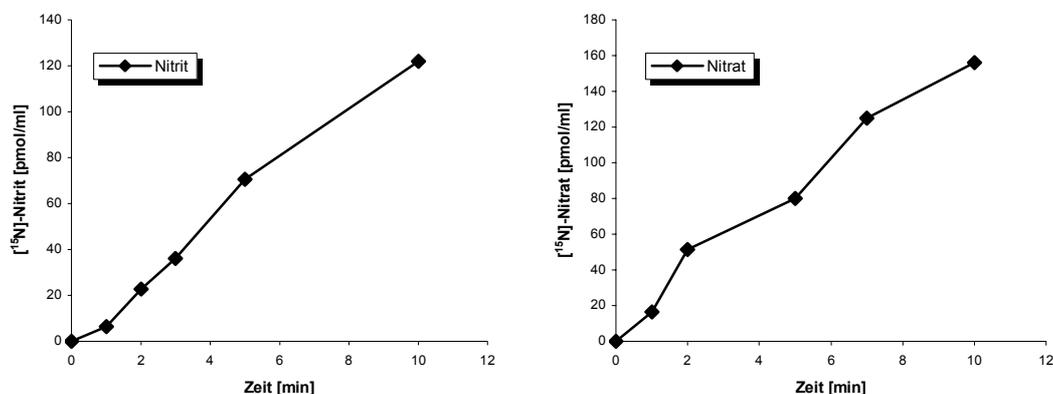
Die Inkubation des Reaktionsgemisches erfolgte bei 50°C für eine Stunde. Anschließend wurden die Proben auf ein Volumen von 100  $\mu\text{l}$  unter Stickstoffstrom eingeeengt und der wässrige Rückstand mit 500  $\mu\text{l}$  Toluol extrahiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 800 g zentrifugiert. 100  $\mu\text{l}$ -Aliquots der Toluol-Phase wurden in ein Autosamplergefäß mit einem 0,1 ml Mikroinsert pipettiert.

Die Analyse erfolgte mit Hilfe der GC-MS, die mit einer Kapillarsäule vom Typ DB-5 MS (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke) versehen war. Helium (70 kPa) diente als Trägergas. Das folgende Ofentemperaturprogramm wurde für die GC-Säule verwendet: 2 min 70°C, Erhöhung der Temperatur mit einer Rate von 5°C/min auf 100°C, gefolgt von einer Rate von 30°C/min auf 310°C. Als Ionisierungsgas im MS diente Methan unter NICI (negative ion chemical ionization)-Bedingungen. Konstante Temperaturen von 180, 280 und 200°C wurden an der Ionenquelle, Transferline und Injektor gehalten. Die Elektronenenergie und der Elektronenstrom wurden bei 230 eV und 300  $\mu\text{A}$  eingestellt. Die Elektronen-Multiplier-Spannung wurde mit 1,2 kV festgesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 1  $\mu\text{l}$  im splitless-Modus.

Die Fragmente mit der höchsten Intensität in den NICI Massenspektren von PFB- $\text{NO}_2$  bzw. PFB- $^{15}\text{NO}_2$  waren m/z 46 bzw. 47 und von PFB- $\text{NO}_3$  bzw. PFB- $^{15}\text{NO}_3$  m/z 62 bzw. 63.

### 2.1.1. Bestimmung der Inkubationszeit

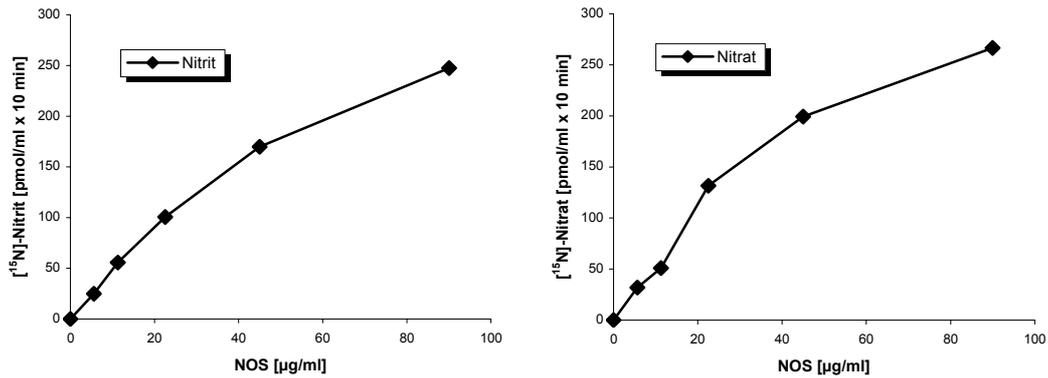
Unter Verwendung der oben angegebenen Reaktionsbedingungen und Konzentrationen der Kofaktoren zeigte sich über eine Dauer von 10 Minuten ein linearer Anstieg der NOS-katalysierten [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit- und [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrat-Bildung aus L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin (Abb. 13), so dass für die weiteren Versuche eine Inkubationszeit von 10 Minuten gewählt wurde.



**Abbildung 13:** Abhängigkeit der eNOS-katalysierten Bildung von [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit und [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrat aus L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin von der Inkubationszeit. 400  $\mu\text{l}$ -Aliquots enthielten eine L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin-Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  und wurden nach der 10-minütigen Vorinkubation bei 37°C mit 45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NOS versetzt. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurde die Reaktion durch Zugabe zu Aceton gestoppt.

### 2.1.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS)

Unter den bereits beschriebenen Bedingungen bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten eNOS-Konzentration und der [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit- bzw. der [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrat-Bildungsrate bis zu einer eNOS-Konzentration von 45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Abb. 14). Die mittlere spezifische Aktivität der verwendeten eNOS betrug nach diesem Experiment 405 pmol/min x mg für [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit und 480 pmol/min x mg für [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrat. Für die weiteren Untersuchungen wurde eine NOS-Konzentration von 45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gewählt. Die spezifische Aktivität des Enzyms und damit die Festlegung der einzusetzenden Konzentration der eNOS sollte für jede neue Charge des Enzyms durchgeführt werden.



**Abbildung 14:** Abhängigkeit der  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit- und der  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat-Bildungsrate aus L- $[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin von der eNOS-Konzentration. Die Ansätze mit allen Kofaktoren und L- $[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin (20  $\mu\text{M}$ ) in Puffer wurden 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe verschiedener eNOS-Konzentrationen (5,625, 11,25, 22,5, 45, 90  $\mu\text{g/ml}$ ) gestartet. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch das Versetzen mit Aceton gestoppt.

### 2.1.3. Ermittlung enzymkinetischer Daten der endothelialen NO-Synthase (eNOS) unter dem Einfluss von ADMA

Die Versuchsansätze wurden wie oben erwähnt gewählt und unter Berücksichtigung der unter 2.1.1. und 2.1.2. bestimmten Parameter durchgeführt.

Unter Verwendung verschiedener L- $[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin-Konzentrationen und in Gegenwart verschiedener ADMA-Konzentrationen (0, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) wurde die enzymatische Bildung von  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit und  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat aus L- $[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin untersucht. Der Versuch wurde für jede ADMA-Konzentration in Mehrfachbestimmung (0  $\mu\text{M}$  ADMA: n=3; 1  $\mu\text{M}$  ADMA: n=4; 2  $\mu\text{M}$  ADMA: n=4; 5  $\mu\text{M}$  ADMA: n=3; 10  $\mu\text{M}$  ADMA: n=4) durchgeführt. Dabei variierten die L- $[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin-Konzentrationen von 2,5 bis 40  $\mu\text{M}$ . Die Inkubationszeit betrug bei allen Versuchen 10 Minuten. Die  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit- und  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat-Bildungsgeschwindigkeiten wurden in Relation zu der eingesetzten eNOS-Konzentration bestimmt.

Zur Bestimmung von  $K_M$  (Michaelis-Menten-Konstante) und  $V_{\text{max}}$  (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) wurden sowohl die Lineweaver-Burk als auch die Hanes-Auftragung gewählt.

Die Inhibitionskonstante  $K_i$  für die Hemmung der eNOS durch ADMA wurde über die Sekundärauftragung nach Lineweaver-Burk und mittels Berechnungen nach Lineweaver-Burk bzw. nach Hanes ermittelt.

## 2.2. Endothelzellkultur

### Charakterisierung der Endothelzellen

Die in Abschnitt 3.3. beschriebenen Experimente wurden sowohl an einer permanenten, humanen Zelllinie, den EA.hy 926, als auch an primären humanen Koronararterienendothelzellen (HCAECs) durchgeführt (Abb. 15, 16).

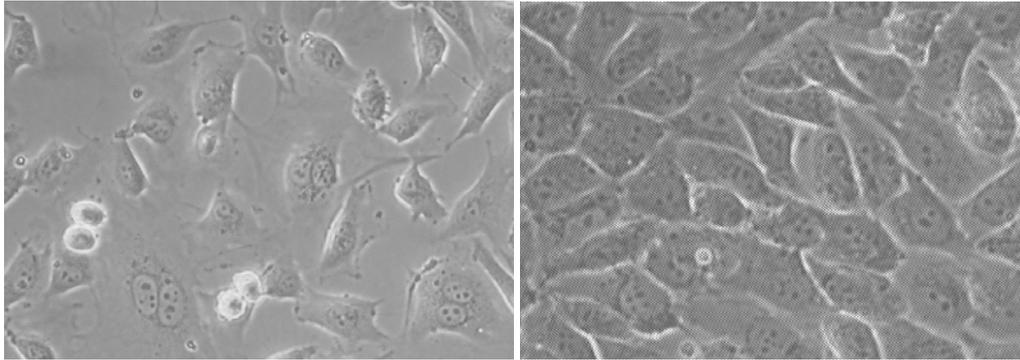
Die EA.hy 926 Hybridomzellen wurden über die Fusion von Endothelzellen einer menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC, human umbilical vein cell) mit Bronchialkarzinomzellen (A 549) gewonnen (Edgell et al. 1983). Die Zellen zeichneten sich durch ein pflasterartiges, einschichtiges Wachstumsverhalten aus und zeigten ein hohes Wachstumspotential, ohne spezielle Wachstumsanforderungen zu stellen.

Die Untersuchung dieser Zelllinie hinsichtlich endothelzellspezifischer Faktoren lässt den Schluss zu, dass diese Zellen viele biochemische und physiologische Eigenschaften der primären Endothelzellen beibehalten haben und als Modell für Endothelzellversuche geeignet sind. So synthetisieren diese Zellen ein Faktor VIII verwandtes Antigen, dessen Morphologie und Verteilung der in primären Endothelzellen entspricht. Außerdem sind in dieser Hybridomzelllinie Weibel-Palad-Körper zu finden, bei denen es sich um Organellen handelt, die ausschließlich in vaskulären Endothelzellen vorkommen (Edgell et al. 1990). Die EA.hy 926-Zellen produzieren zudem Prostacyclin, welches vorwiegend in Endothelzellen gebildet wird, um die Plättchenaggregation und die Vasodilatation positiv zu beeinflussen (Suggs et al. 1986).

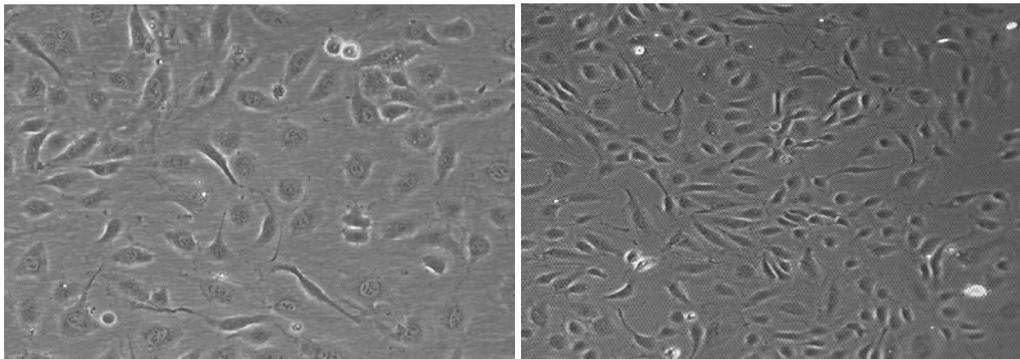
Weiterhin wurden die für die Arbeit spezifischen Enzyme, die für die Synthese bzw. den Metabolismus von ADMA verantwortlich sind, in den EA.hy 926-Zellen nachgewiesen. 3 der 4 Isoformen der Methyltransferasen, die die Methylierung des L-Arginins in Proteinen durchführen, und die 2 Isoformen der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) konnten mit Hilfe der PCR detektiert werden (siehe 2.9.4.).

Die HCAECs wurden von der Firma BioWhittaker aus einer männlichen Person von 58 Jahren isoliert, in der 3. Passage tiefgefroren und verschickt. Die Zellen wurden in unserem Labor aufgetaut, für eine weitere Passage proliferiert und bis zu den anstehenden Versuchen im flüssigen Stickstoff verwahrt. Für jeden Versuchsansatz wurden die Zellen der 4. Passage neu aufgetaut, so dass Verluste endothelzellspezifischer Faktoren im Zuge weiterer Passagen keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben konnten.

Das Wachstumsmuster schien dem der EA.hy 926-Zellen sehr ähnlich, die Wachstumsanforderungen waren dagegen als sehr hoch einzuschätzen. Ein regelmäßiger Mediumwechsel alle 2 Tage und ein rechtzeitiges Splitten der Zellen waren notwendig.



**Abbildung 15:** EA.hy 926



**Abbildung 16:** HCAEC

### **Endothelzell-Kultivierung**

Die Endothelzellen wurden in Zellkulturflaschen in einem herkömmlichen Begasungsbrutschrank bei 5.0% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) mit dem Zusatz von 10% Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS) und 2% HAT(Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)-Supplement diente als Kulturmedium für die EA.hy 926-Zellen.

Das HAT-Supplement unterstützte das Endothelzellwachstum insofern, als das durch Aminopterin die Purin- und Pyrimidinsynthese unterbunden wurde, die von Endothelzellen, nicht aber von Karzinomzellen, durch Reservestoffwechselwege, denen Hypoxanthin und Thymidin als Substrate dienen, ersetzt werden konnten. Auf diese Weise wurde ein Entarten bzw. ein Überwuchern der Hybridomzellen durch die Tumorzellen unterbunden.

Die HCAECs erhielten ein für mikrovaskuläre Zellen spezifisches Kulturmedium (EGM-2-MV der Firma BioWhittaker). Dem Basalmedium wurden vor Gebrauch folgende Substanzen zugesetzt: Epidermal-, Fibroblasten-, Vaskulärer-Endothelialer-, Insulin-ähnlicher-Wachstumsfaktor, Vitamin C, Hydrocortison, Gentamicin, Amphotericin-B und 5% FKS.

Sämtliche Endothelzellversuche wurden an einer sterilen Werkbank (Heraeus LaminAir) durchgeführt. Sowohl für die EA.hy 926-Zellen als auch für die HCAECs wurde die überwiegende Zahl der Zellversuche in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturschalen ausgeführt. Zunächst wurden

die Zellen nach Entfernung des alten Mediums mit PBS gewaschen und mit den für den Versuch vorgesehenen Chemikalien derart versehen, dass sich in 3 ml Zellkulturüberstand die jeweils gewünschte Versuchskonzentration wiederfindet. Als Zellkulturüberstand wurde für die EA.hy 926-Zellen DMEM mit 2% HAT ohne den Zusatz von FKS und für die HCAECs das übliche Kulturmedium verwendet. Nach einer in den meisten Fällen gewählten Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und bei einer Temperatur von -20°C gelagert, während die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit Accutase™ abgelöst wurden.

Bei der Accutase™ handelt es sich um einen Mix von Enzymen, der sowohl proteolytische als auch kollagenolytische Aktivität vereint. Die Zellen werden im Vergleich zu Trypsin schonender von der Zellkulturoberfläche abgelöst und behalten in der Lösung für mindestens 45 Minuten ihre Überlebensfähigkeit.

10% des Zell-Accutase-Mix wurde für die Proteinbestimmung in Eppendorfgefäße und der Rest zur Isolation der RNA in 15 ml-Röhrchen überführt. Das weitere Vorgehen geht aus folgendem Schema hervor:

#### **Proteingewinnung**

- Zentrifugation: 1000 rpm, 4°C, 10 min
- Waschen mit PBS
- Zentrifugation: 1000 rpm, 4°C, 5 min
- Aufnahme in 100 µl Wasser
- Einfrieren bei -20°C

#### **RNA-Isolation**

- Zusatz von PBS mit 10% FKS
- Zentrifugation: 1000 rpm, 4°C, 10 min
- Abnahme des Überstandes
- Schockgefrieren im flüssigen Stickstoff
- anschließende Lagerung bei -80°C

### **2.3. Quantitativer Proteinnachweis**

Die quantitative Proteinanalyse der Zelllysate erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Diese Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Polypeptide (MG > 3000) unter sauren Bedingungen. Sie ist mit einer Verschiebung der Wellenlänge von 465 nm nach 595 nm verbunden. Da der Farbwechsel nicht linear verläuft, muss bei jeder Bestimmung eine Standardkurve angefertigt werden.

Als Standard wurde Plasma  $\gamma$ -Globulin (Bio-Rad Protein Standard I) in Konzentrationen von 3,58 bis 14,3 µg in 0,8 ml Aqua bidest. verwendet. Die Proben wurden in Abhängigkeit von der zu erwartenden Proteinkonzentration verdünnt oder unverdünnt eingesetzt und mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 0,8 ml ergänzt. Unter Zusatz von 200 µl Bradford Reagenz wurde die Extinktion der Standardreihe bzw. der Proben nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

#### **2.4. Low density Lipoprotein(LDL)-Isolation und Gewinnung von oxLDL**

Das LDL-Cholesterin wurde aus eingefrorenen Plasmaproben der Blutbank des Uniklinikums Hamburg-Eppendorf gewonnen. Das gepoolte Plasma wurde mit dem Antioxidanz Butylhydroxytoluol (BHT; 20  $\mu$ M), EDTA (100 mg/100ml Plasma) und Kaliumbromid (1,63 g/100 ml Plasma) versetzt. Es erfolgte eine Ultrazentrifugation für 18 Stunden bei 45.000 R/min und 4°C. Aus jedem der Zentrifugenröhrchen wurde die LDL-Schicht, die sich direkt unter dem wässrigen Überstand befand, mit Hilfe von Spritze und Kanüle entnommen und vereint. Unter Zusatz von Kaliumbromid (0,0565g/ml LDL-Fraktion) wurde eine weitere Ultrazentrifugation unter den gleichen Bedingungen vorgenommen. Die hochkonzentrierte, gelb-orange LDL-Fraktion befand sich nun direkt unter dem Verschluss des Zentrifugenröhrchens und konnte problemlos ohne Verunreinigung abgenommen werden. Die anschließende Dialyse erfolgte über Nacht bei 4°C in einer mit EDTA (1 g/l) und BHT (20  $\mu$ M) versetzten isotonischen Kochsalzlösung (NaCl 0,9%). Für den Erhalt von oxLDL wurde das LDL gegen reine NaCl-Lösung (0,9%) ohne Zusatz von BHT oder EDTA dialysiert. Es erfolgte eine Oxidation mit Kupfersulfat in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M für 24 Stunden bei 4°C. Die Reaktion wurde mit EDTA (5  $\mu$ M) und BHT (20  $\mu$ M) gestoppt. Im Anschluss wurde erneut in NaCl (0,9%) mit EDTA (1 g/l) und BHT (20  $\mu$ M) über Nacht bei 4°C dialysiert. Die Lagerung des LDL-Cholesterins erfolgte für einen Zeitraum von höchstens einer Woche bei 4°C, lichtgeschützt und unter Begasung mit Argon.

Die Bestimmung der Cholesterin-Konzentration wurde photometrisch mit Hilfe des Cholesterin-20 Kits der Firma Sigma durchgeführt. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 500 nm ergab sich aus der Umsetzung von 4-Aminophenazon und p-Hydroxybenzolsulfonat mit Wasserstoffperoxid unter dem Einfluss einer Peroxidase zu einem Chinonimin-Derivat. Das Wasserstoffperoxid entstand bei der Oxidation von Cholesterin zu Cholest-4-en-3-on nach vorangegangener Hydrolyse der Cholesterinester zu Cholesterin und Fettsäuren.

#### **2.5. Nachweis der Zytotoxizität der HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine)**

Die Zytotoxizität von Statinen auf die Endothelzellen wurde mit Hilfe des Cytotoxicity-Detection-Kit der Firma Roche bestimmt, der auf der Messung der Laktatdehydrogenase-aktivität beruht.

Die Laktatdehydrogenase wird bei dem Tod bzw. der Schädigung von Zellen aus dem Zytosol in den Zellüberstand abgegeben. Dieses Enzym setzt Laktat zu Pyruvat unter der Bildung von NADH + H<sup>+</sup> um, welches für die Reduktion von Tetrazolium zu dem roten Farbstoff Formazan verwendet wird. Die Intensität dieses Farbstoffs kann schließlich photometrisch bestimmt werden.

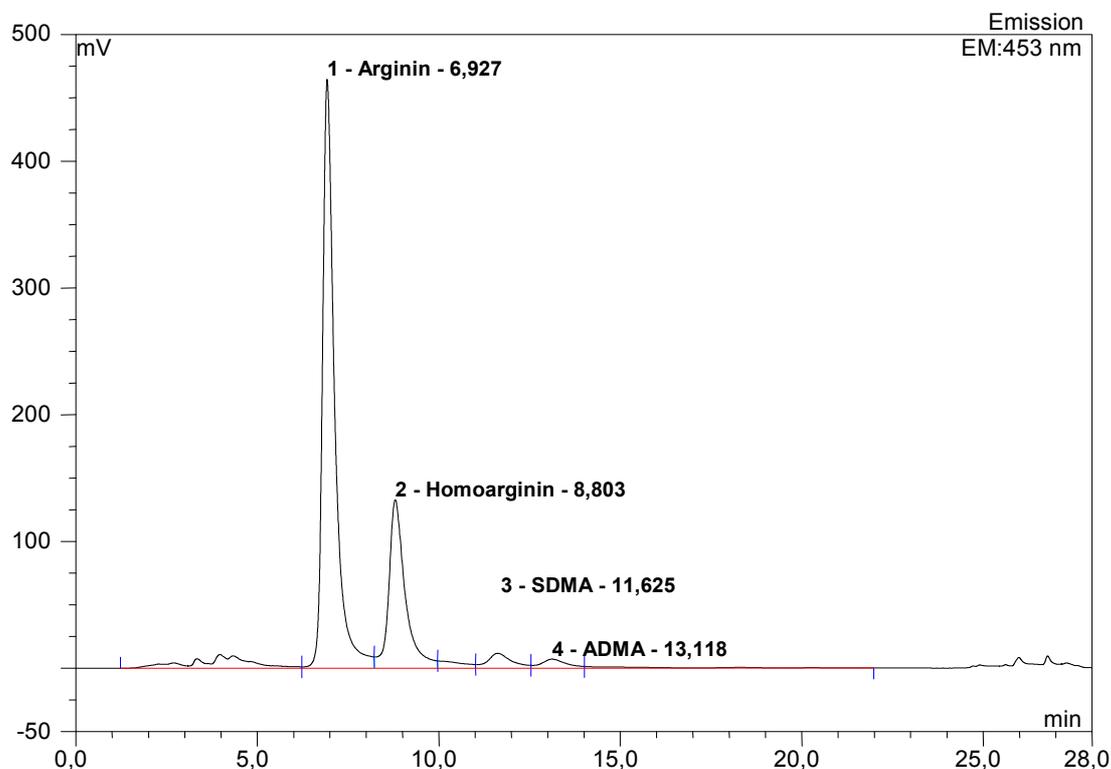
Die Endothelzellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> – Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz bewachsen und für 12, 24, 36 oder 48 Stunden mit den Statinen Atorvastatin, Cerivastatin und Pravastatin inkubiert. 400 µl des Zellüberstandes wurden mit 400 µl der Reagenzlösung des Cytotoxicity-Detection-Kits versetzt und für eine halbe Stunde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 µl Salzsäure (1 N) gestoppt. Die Extinktion wurde gegen Blank bei 500 nm gemessen. Die erhaltenen Absorptionen wurden auf die Proteine der Zelllysate bezogen. Als Positivkontrollen wurden Zellen für 12, 24, 36 bzw. 48 Stunden mit dem Detergent Triton X-100 (1%) versetzt.

## **2.6. Bestimmung des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) mit Hilfe der HPLC**

Die Konzentration von ADMA, SDMA und L-Arginin im Plasma wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) unter Verwendung einer Vorsäulen-Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA), modifiziert nach einer HPLC-Methode von Böger et al., bestimmt (Böger et al. 1998b). Die Plasmaproben wurden durch Zentrifugation der EDTA-haltigen Blutentnahmeröhrchen für 10 Minuten bei 4500 R/min gewonnen und bei –20°C gelagert. Die Aufarbeitung für die HPLC-Messung begann mit dem Versetzen von 500 µl Plasma mit dem internen Standard Homoarginin (10 µM) und der Ergänzung mit Aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl. Gleichermaßen wurde ein externer Standard mit L-Arginin (50 µM), Homoarginin (10 µM), ADMA (1 µM) und SDMA (1 µM) vorbereitet. Eine Aufreinigung der Proben erfolgte unter der Verwendung von CBA(carboxylic acid)-Kartuschen, die zu der Elimination von unpolaren Aminosäuren und Proteinen führen sollten. Nach Vorkonditionierung der Kartuschen mit Methanol und Wasser wurden die Plasmaproben aufgegeben und nach zweimaligem Waschen mit Wasser mit Ameisensäure (1 M) eluiert. Die Eluate wurden in der Speed-Vac getrocknet. Die Trocknungsrückstände wurden anschließend in 400 µl Wasser aufgenommen, gut gevortext und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. 100 µl der Proben wurden in Autosamplergefäße überführt und zur Messung in die HPLC gestellt.

Vor der Autoinjektion von 5 µl der Proben erfolgte eine 30-sekündige Inkubation mit dem OPA-Reagenz. Die entstandenen Derivate wurden isokratisch mit dem Eluenten A bei einem Fluss von 1 ml/min mit Hilfe einer Phenylsäule aufgetrennt und über den Fluoreszenzdetektor bei  $\lambda^{ex}= 340$  nm und  $\lambda^{em}= 453$  nm detektiert. Die jeweiligen Konzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin wurden berechnet unter der Kenntnis der entsprechenden Retentionszeit anhand der Peak-Höhen-Verhältnisse von Standard und Proben (Abb. 17). Das Peak-Höhen-Verhältnis von Homoarginin in Standards und Proben

diente der Ermittlung der Recovery der einzelnen Proben, die bei der Berechnung der Konzentrationen von L-Arginin, ADMA und SDMA berücksichtigt wurde. Die mittlere Recovery wurde mit 106,9% bestimmt. Die Intraassay-Variabilität und die Interassay-Variabilität betragen  $101,7 \pm 1,9\%$  bzw.  $102,3 \pm 1,3\%$ . Das Detektionslimit der Methode lag bei 3,75 nM für ADMA.

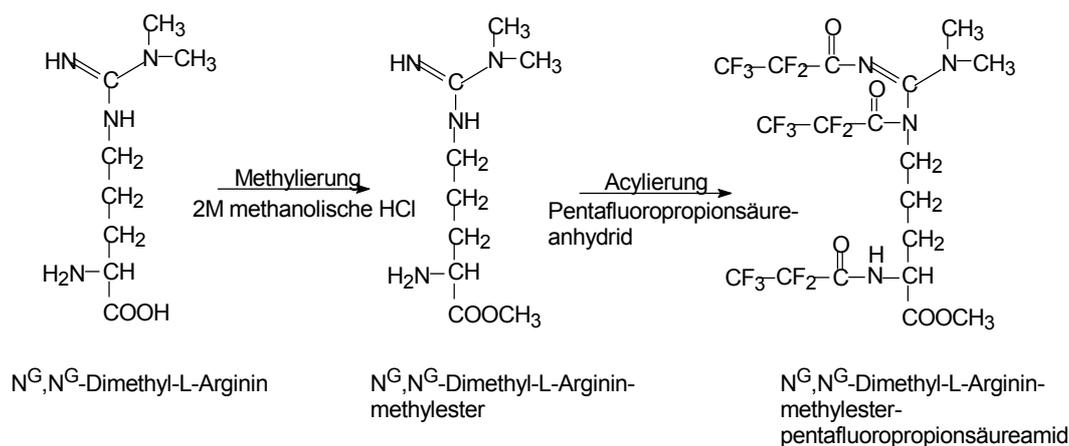


**Abbildung 17:** Typisches Chromatogramm eines injizierten Standards bestehend aus L-Arginin, Homoarginin, SDMA und ADMA.

## 2.7. Bestimmung des $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginins (ADMA) mit Hilfe der GC-MS

Für die Messung der Zellkulturüberstände wurden die Proben zunächst analog den Plasmaproben mit Hilfe der CBA-Kartuschen aufgereinigt (siehe 2.6.). 500  $\mu$ l Zellüberstand kamen hier unter dem Zusatz des selbst synthetisierten und quantifizierten Standards, dem  $N^G, N^G$ - $[^2H_6]$ -Dimethyl-L-Arginin ( $[^2H_6]$ -ADMA), zum Einsatz (siehe 2.7.1). Das aus der Aufreinigung erhaltene ameisensaure Eluat wurde ebenfalls in der Speed-Vac zur Trockne eingengt und in 100  $\mu$ l 2 molarer, methanolischer Salzsäure aufgenommen, gut gevortext und nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile in Autosamplergefäße überführt. Bei 80°C wurden die Proben für 1 Stunde inkubiert, um die Carboxylgruppe zu

verestern und vor der weiteren Derivatisierung zu schützen. Im weiteren Verlauf der Aufarbeitung wurden die Proben unter Stickstoff zur Trockne eingengt und mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFAA) bei 100°C 1 Stunde derivatisiert. Die wiederum zur Trockne eingengten Proben wurden nun mit 100 µl Borsäurepuffer und 500 µl Toluol versetzt, gründlich gevortext und bei 4°C und 800 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Toluolphase wurde anschließend in Autosamplergefäße mit 0,3 ml Mikroeinsätzen überführt. ADMA wurde auf diese Weise entsprechend der Abbildung 18 zum N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Argininmethylesterpentafluorpropionsäureamid, welches im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Methylester-PFA-Derivat bezeichnet wird, umgesetzt.



**Abbildung 18:** Derivatisierung von ADMA für die Analyse mit Hilfe der GC-MS

Die Validierung der Methode für Zelllysatsproben und geringe Volumina von Plasmaproben (50 µl) erforderte keine Vorbehandlung bzw. Aufreinigung über die CBA-Kartuschen. Es wurde lediglich eine Fällung der Proteine mit dem doppelten Probenvolumen an Aceton nach Zusatz des internen Standards vorgenommen. Nach Zentrifugation und Einengen des Überstandes unter Stickstoff wurden die Proben ebenfalls mit 2 molarer, methanolischer Salzsäure versetzt und wie oben bereits beschrieben derivatisiert.

Die GC-MS- und GC-Tandem-MS-Analyse für ADMA wurde mit einem Quadrupol Massenspektrometer 1200 (Varian, Walnut Creek, USA) verbunden mit einem Gaschromatographen CP-3800 (Varian) durchgeführt. Die gaschromatographische Trennung erfolgte mit Hilfe einer Kapillarsäule Optima-17 (Macherey-Nagel) der Dimension 30 m x 0,25 mm I.D. und der Filmdicke 0,25 µm. Mit folgendem Temperaturprogramm wurde die Kapillarsäule erwärmt: 2 min bei 80°C, Erhöhung der Temperatur auf 300°C mit einer Geschwindigkeit von 25°C/min. Helium diente bei einem konstanten Fluss von 1 ml/min als Trägergas. Der Injektor, die Transferline und die Ionenquelle wurden konstant bei 260°C, 250°C und 180°C gehalten. Unter den gewählten NICI(negative ion chemical ionization)-Bedingungen betrug die Ionisierungsenergie 70 eV und der Elektronenstrom 300 µA. Methan diente der chemischen Ionisation in der Ionenquelle. Das Injektionsvolumen betrug 1,0 µl.

Zur Detektion der Ionen wurde eine Spannung von 1,8 kV für ADMA und 1,1 kV für L-Arginin am Elektronen-Multiplier angelegt. Im SIM(single ion monitoring)-Modus wurden die Zielionen m/z 634,3 und m/z 640,3 für die Derivate von ADMA bzw. [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA bestimmt. Die Derivate von L-Arginin bzw. L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin resultierten in Fragmentionen mit m/z 586 und mit m/z 588.

Für die GC-tandem-MS-Messung dienten Methan (6 Torr) und Argon (1,4 mTorr Kollisionsdruck) bei einer Kollisionsenergie von 10 eV als Reaktions- bzw. Kollisionsgas. Das Fragmention m/z 378 wurde sowohl für ADMA als auch für [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA bestimmt.

### **2.7.1. Synthese des $\text{N}^G, \text{N}^G$ - $^{2}\text{H}_6$ -Dimethyl-L-Arginins ( $^{2}\text{H}_6$ -ADMA)**

Bei der Synthese von [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA wurde die Arbeit von Pundak und seiner Arbeitsgruppe zugrunde gelegt (Pundak et al. 1981).

1g Bromcyan-aktivierte Agarose wurde in 20 ml Salzsäure (1 mM) suspendiert und 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Agarose mehrmals mit Salzsäure (1 mM) und mit Wasser gewaschen. Die gewaschene Bromcyan-aktivierte Agarose wurde mit einem Kupfer-L- $^{2}\text{H}_6$ -Ornithin-Komplex versetzt, der sich wie folgt zusammensetzte: L- $^{2}\text{H}_6$ -Ornithin wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml in Wasser gelöst, Kupfercarbonat wurde bis zur Sättigung hinzugegeben, die Lösung wurde filtriert und mit Kaliumhydroxidlösung (10 N) auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt.

Der Ansatz wurde bei 4°C über Nacht vorsichtig geschüttelt und am nächsten Tag filtriert, so dass der Rückstand, der Cyan-Agarose-L- $^{2}\text{H}_6$ -Ornithin-Komplex, mit Salzsäure (1 N) und reichlich Wasser gewaschen werden konnte. Die Umsetzung von L- $^{2}\text{H}_6$ -Ornithin zu [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA erfolgte unter dem Zusatz einer wässrigen, 0,2%igen Dimethylaminlösung bei 50°C für 24 Stunden. Nach Beenden der Reaktion wurde erneut filtriert und dreimal mit Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde inklusive des Waschwassers zur Trockne eingengt. Das [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA wurde in Wasser aufgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **2.8. Bestimmung der Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylamino-hydrolase (DDAH)**

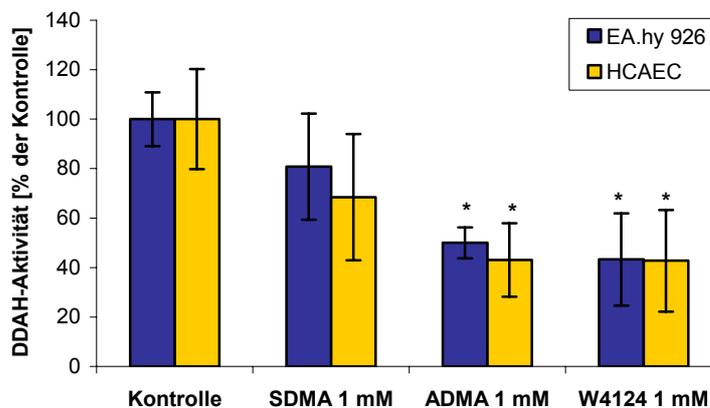
Die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) ist u.a. in den Endothelzellen lokalisiert und für die Metabolisierung der endogenen NO-Synthase-Inhibitoren,  $\text{N}^G, \text{N}^G$ -Dimethyl-L-Arginin (ADMA) und  $\text{N}^G$ -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), unter der Entstehung von L-Citrullin und Dimethylamin bzw. Monomethylamin verantwortlich (siehe 1.2.2.2.).

Für die Bestimmung der Aktivität des Enzyms wurde ein radioaktiver Assay gewählt, bei dem L-[<sup>14</sup>C]-NMMA den Endothelzellen zugesetzt und das entstandene L-[<sup>14</sup>C]-Citruillin mittels Flüssigkeits-Szintillationszählung bestimmt wurde (MacAllister et al. 1994a).

Die Endothelzellen wurden auf Zellkulturschalen (35 x 10 mm) ausplattiert und mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie zweimal mit 37°C warmem Krebs-Puffer gewaschen und mit 500 µl Assay Mix, in dem sich das radioaktiv markierte L-[<sup>14</sup>C]-NMMA (0,4 µCi/ml) befand, für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden mindestens 3 Zellkulturschalen als Negativkontrollen für den gleichen Zeitraum bei 4°C gelagert. Zum Stoppen der Reaktion erfolgten nach Abnahme des Überstandes zwei Waschschrte mit eiskaltem Krebs-Puffer und die Lyse der Zellen mit 1 ml 0,1%iger SDS-Lösung. 800 µl des Zelllysates wurden zur Trennung des radioaktiven L-NMMA von dem entstandenen radioaktiven L-Citruillin mit 700 µl des Ionenaustauscherharzes Dowex AG50W-X8 versetzt. Nach gründlichem Vortexen und anschließender Zentrifugation bei 12000 rpm für 5 Minuten wurde 1 ml des Überstandes unter dem Zusatz von 5 ml Szintillator ausgezählt. 10 µl des Zelllysates wurden der Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen.

Das Ionenaustauscherharz Dowex AG50W-X8 musste zunächst in die Na<sup>+</sup>-Form überführt werden. Das Harz wurde einige Male mit Aqua bidest. gewaschen und mit 1 N Natriumhydroxidlösung viermal versetzt. Anschließend musste das Harz erneut mit Aqua bidest. bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 7,0 gewaschen werden.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Assays wurden sowohl die EA.hy 926-Zellen als auch die HCAECs mit ADMA bzw. SDMA und dem DDAH-Inhibitor 4124W inkubiert. ADMA sollte als Substrat der DDAH die Umsetzung des L-[<sup>14</sup>C]-NMMA vermindern, während SDMA keinen Einfluss auf die Entstehung von L-[<sup>14</sup>C]-Citruillin haben dürfte (Abb. 19).



**Abbildung 19:** Inkubation der EA.hy 926-Zellen und der HCAECs mit SDMA, ADMA und 4124W (Mittelwert ± SD, n = 4, \*P<0,05)

## **2.9. Bestimmung der Expression der Dimethylarginin-Dimethylamino-hydrolase (DDAH) auf mRNA-Ebene**

### **2.9.1. Isolation der RNA aus Endothelzellen**

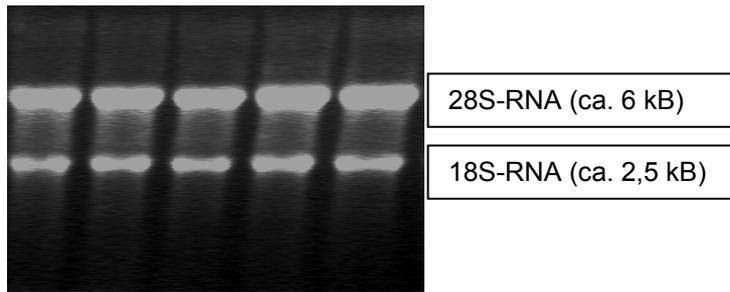
Die Isolation der RNA aus den Endothelzellen erfolgte nach einer Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit Hilfe des RNAzol (Wak Chemie). Grundsätzlich wurde die Präparation immer auf Eis durchgeführt, um der Gefahr der RNA-Degradation zu entgehen. Die bei einer Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Zellen wurden mit  $800\ \mu\text{l}$  RNAzol versetzt und 5 Minuten geschüttelt. Nach Überführung der Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß mit  $80\ \mu\text{l}$  Chloroform und gründlichem Vortexen erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Die Zentrifugation der Proben bei  $12000\ \text{rpm}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten ließ 3 Phasen erkennen, wobei die untere Phase die Phenol-Chloroform-Phase darstellte, die weiße Intermediärphase Proteine und DNA enthielt, während die obere wässrige Phase für die weitere Aufarbeitung von Interesse war und in ein Eppendorfgefäß mit  $480\ \mu\text{l}$  2-Propanol überführt wurde. Für 30 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  konnte die RNA präzipitieren. Um die präzipitierte RNA zu isolieren wurden die Proben erneut für 30 Minuten bei  $12000\ \text{rpm}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte ein Waschen der RNA mit  $150\ \mu\text{l}$  70%igem Ethanol. Die gut gevortexte Suspension wurde unter den oben erwähnten Bedingungen zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde nach kurzem Trocknen an der Luft in  $12\ \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser aufgenommen. Eine weitere Aufreinigung der RNA mit Hilfe der Lithiumchloridfällung bot keine Vorteile im Hinblick auf die Real-time PCR. Die Lagerung der RNA erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Die Konzentration der RNA wurde photometrisch ermittelt.  $1\ \mu\text{l}$  der Probe wurde in einer Verdünnung von 1:100 in einer Mikroküvette (Schichtdicke  $1\ \text{cm}$ ) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm vermessen.

Die RNA besitzt ein Absorptionsmaximum von 260 nm. Ist die optische Dichte im Bereich von 260 nm gleich eins, so entspricht dies einer RNA-Konzentration von  $4\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der RNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### **2.9.2. Überprüfung der isolierten RNA**

Die RNA wird schnell durch RNAsen degradiert und sollte vor der weiteren Verwendung auf ihren Zustand hin überprüft werden. Die Darstellung der RNA mittels der Agarosegel-Elektrophorese konnte aus praktischen Gründen nicht für alle Proben durchgeführt werden, sondern wurde stichprobenweise in Angriff genommen.

Das denaturierende RNA-Gel setzte sich aus 1% Agarose in MOPS-EDTA-Puffer unter Zusatz von 5% Formaldehyd zusammen. 5 µg RNA/Probe wurde nach Zugabe des Denaturierungspuffers bei 95°C für 2 Minuten denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 1/10 des Volumens an Ladefarbe versetzt. Nach Beladen des Gels mit den RNA-Proben wurde je nach Größe des Gels eine Spannung von 100 V für 2 Stunden angelegt. Die unter UV-Licht erscheinenden deutlichen Banden der 18S- und 28S-RNA sprachen für eine gute Qualität der RNA. Die hellen Banden ergaben sich aus der Interkalation des in dem Gel befindlichen Farbstoffes Ethidiumbromid zwischen die Basen der RNA (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel mit der elektrophoretisch aufgetrennten RNA (5µg/Spur) unter denaturierenden Bedingungen

### 2.9.3. Durchführung der Reversen Transkription (cDNA-Synthese)

Die aus den Endothelzellen isolierte RNA wurde schließlich über die Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

1,7 µg RNA kamen zum Einsatz und wurden auf ein Volumen von 10 µl mit RNase-freiem Wasser ergänzt. Nach Zugabe von je 1 µl Random Primer und den Nukleotid-Bausteinen für die cDNA, den dNTPs (je 10 µM), wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, so dass die Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen wurden und die Primer hybridisieren konnten, und anschließend auf Eis gestellt. Der Ergänzung mit 4 µl 5x-Puffer, 2 µl des Sulfidgruppenreduktors Dithiothreitol (0,1 M DTT) und 1 µl des RNase-Inhibitors RNAsin (40 U/ml) und der Vorinkubation bei 42°C für 2 Minuten schloss sich der Start der Reaktion, d.h. die Zugabe der SuperScript™ II, an. Die Reaktion lief für 50 Minuten bei 42°C ab und wurde durch Inaktivierung des Enzyms bei 72°C für 15 Minuten beendet. Die Lagerung der cDNA wurde bei einer Temperatur von -20°C vorgenommen.

Bei der SuperScript™ II handelt es sich um eine modifizierte MMLV(Moloney murine leukemia virus)-Reverse Transkriptase ohne intrinsischer RNase H-Aktivität, die eine höhere Ausbeute an cDNA im Vergleich zu anderen Reverse Transkriptasen liefert und cDNAs bis zu einer Länge von 12,3 kb produzieren kann.

## **2.9.4. Semiquantitative Analyse der cDNA mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)**

### **2.9.4.1. Durchführung der PCR und Überprüfung der PCR-Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese**

Die PCR wurde mit Hilfe der HotStarTaq-Polymerase durchgeführt. 1 µl cDNA diente als Template und wurde unter dem Zusatz der spezifischen Primer (Tab. 2) in einer Konzentration von 10 µM (2 µl) und des HotStarTaq Master Mix (15 µl) in einem Gesamtvolumen von 25 µl amplifiziert. Dieser Master Mix (Qiagen) enthielt neben Polymerasepuffer, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs die HotStarTaq-Polymerase, die erst durch hohe Temperaturen aktiviert wurde. So konnten unerwünschte Effekte, wie die Fehlhybridisierung der Primer oder die Primerdimerbildung, die im weiteren Verlauf zu schlechten Ausbeuten oder unspezifischen Produkten geführt hätten, vermieden werden. Die PCR erfolgte im PCR Heizblock Express (Hybaid) mit folgendem Programm: Aktivierung der Taq-Polymerase und initiale Denaturierung bei 95°C für 15 Minuten, 25-30 Zyklen bestehend aus jeweils einer Denaturierungsphase bei 94°C für 0,5 Minuten, einer Hybridisierungsphase der Primer an die einzelsträngige DNA in Abhängigkeit von dem gewählten Primer bei einer Temperatur von 54-58°C (Tab. 3) für 1 Minute und der Erhöhung der Temperatur auf 72°C für 2 Minuten auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Abschließend erfolgte eine finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten und ein Abkühlen der Proben auf 4°C. Die Amplifikate wurden auf einem 1,8%igem Agarosegel unter Zusatz von Ethidiumbromid in TBE-Puffer bei 100 V für 1,5 Stunden getrennt und unter UV-Licht betrachtet.

Bei der Wahl der Primer wurden die entsprechenden Kriterien, wie eine Basenlänge von 20-30 Nukleotiden, gleich häufige Verteilung der vier Basen in einem Primer, keine komplementären inter- bzw. intramolekularen Abschnitte an den 3'-Enden, keine Sequenzabschnitte aus Polyurinen bzw. Polypyrimidinen und die Suche nach Intron-überspannenden Sequenzen, berücksichtigt. Eine Überprüfung hinsichtlich der spezifischen Bindung an den zu amplifizierenden Abschnitt erfolgte mit Hilfe der Nukleotidsequenz-Datenbank des Europäischen Molekularbiologischen Instituts (EMBL). Nach Eingabe der Sequenzen wurden alle Gene, die die identische Basenfolge des Reversed Primers bzw. die revers-komplementäre Basenfolge des Forward Primers aufwiesen, angezeigt. Wurde ausschließlich das gewünschte Gen mit einer 100%igen Übereinstimmung gefunden, konnte der Primer akzeptiert werden.

**Tabelle 2:** Primer-Sequenzen zur Amplifikation der gewünschten Enzym-Isoformen mit Hilfe der PCR

Enzym	Forward Primer	Reversed Primer
GAPDH	GGCCAAGGTCATCCATGA	TCAGTGTAGCCCAGGATG
DDAH 1	ACGAGGTGCTGAAATCTTGG	CCAGTTCAGACATGCTCACG
DDAH 2	CTCAGCTCCCTCTGCTTGGTG	GAGGGAGGATTCACCCAGTGG
PRMT 1	TGCACCTGTGCGTCTGTCC	GCAGATGGTGTGAAGAAGG
PRMT 2	GCAGTTGGACATGAGAACCG	AGCGTGTTTGTCTGAAGG
PRMT 3	TTCACACTGTAAGTCTGAGC	GACACTAGTAGATGACGAGC
HRMT1L2	ACTCCATGTTTCATAACCGG	TAGAACACCGTCTGCTTCC
PPAR $\alpha$	ACGGAAAGCCCACTCTGCCCCCTCTC	CTTGTCCCCGCAGATTCTACATTCCG
PPAR $\gamma$	GCAGTGGGGATGTCTCATAATGC	CAGGGGGGTGATGTGTTTGAAC

**Tabelle 3:** PCR-Programme für die einzelnen Primer

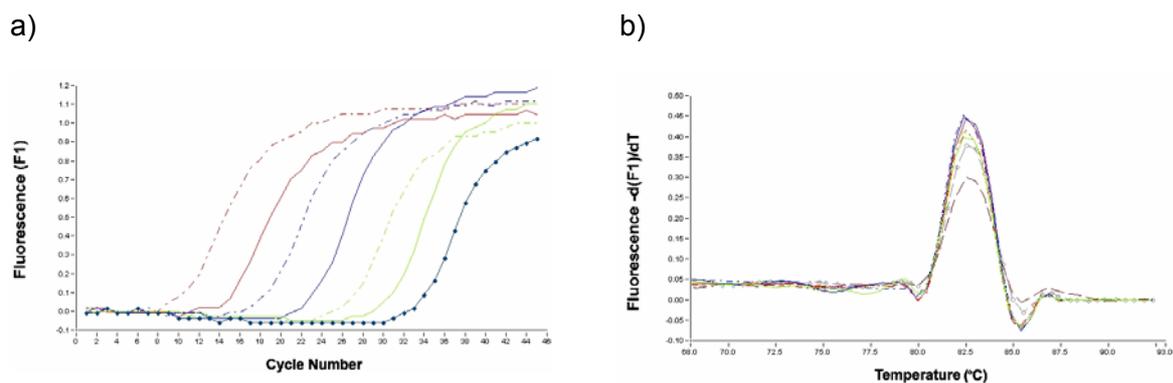
Enzym	Hybridisierungstemperatur	Zyklenzahl	Länge der PCR-Produkte
GAPDH	57°C	27	353 bp
DDAH 1	56°C	29	352 bp
DDAH 2	58°C	32	210 bp
PRMT 1	56°C	29	239 bp
PRMT 2 (HRMT1L1)	57°C	29	522 bp
PRMT 3	53°C	30	392 bp
HRMT1L2	57°C	28	681 bp
PPAR $\alpha$	60°C	30	265 bp
PPAR $\gamma$	60°C	30	328 bp

### 2.9.4.2. Durchführung der semiquantitativen Bestimmung der DDAH 1 und DDAH 2 mit Hilfe des Light Cyclers

Das QuantiTect™SYBR®Green PCR Kit (Qiagen) wurde für die semiquantitative Bestimmung der DDAH-Expression auf mRNA-Ebene mit Hilfe des Light Cyclers verwendet. Im Unterschied zu dem HotStarTaq Master Mix enthielt dieses Kit den Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green I, der unter Aussendung eines Fluoreszenz-Signals doppelsträngige DNA gebunden hat und ein Absorptions- und Extinktionsmaximum von 494 bzw. 521 nm besaß.

1  $\mu$ l cDNA, 1  $\mu$ l Primer (je 1  $\mu$ M) und 10  $\mu$ l Master Mix des QuantiTect™SYBR®Green PCR Kits wurden mit Wasser auf ein Volumen von 20  $\mu$ l ergänzt und in die für den Light Cycler spezifischen Glaskapillaren überführt. Nach vorsichtiger Zentrifugation bei max. 50 rpm für 10 Sekunden wurden die Kapillaren geschlossen, in den Light Cycler (Roche) gestellt und

das Programm für die jeweils zu bestimmende Sequenz gestartet. Die Programme für die DDAH 1 und 2 stimmten überein und führten die PCR bei einer Hybridisierungstemperatur von 56°C in 45 Zyklen durch, während die Amplifikation der GAPDH-cDNA, welche als Housekeeping-Gen der Normalisierung der Proben diente, bei einer Temperatur von 50°C für 50 Zyklen stattfand. Bei jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle, d.h. Wasser mit Master Mix ohne Template, und eine Standardkurve mitgeführt. Die Standardkurve bestand aus Plasmid-DNA der jeweiligen Zielsequenz in Konzentrationen von  $10^2$ - $10^8$  Molekülen/ $\mu$ l und diente der Angleichung der Crossing Points (C) (Abb. 21a), deren direkter Vergleich aufgrund der unterschiedlichen Effizienz der PCR für die einzelnen Zielgene nicht möglich war. Die Verhältnisse DDAH/GAPDH dienten der Beurteilung der Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene. Im Anschluss an die PCR wurde grundsätzlich eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen, bei der die spezifische Schmelztemperatur der PCR-Produkte bestimmt wurde und durch die Verunreinigungen bzw. die Amplifikation unspezifischer Produkte nachgewiesen werden konnten (Abb. 21b). Für die GAPDH, die DDAH 1 und 2 betragen die Schmelztemperaturen 85°C, 84,2°C bzw. 82,5°C.



**Abbildung 21:** a) Typische Amplifikationsgrafik einer Standardkurve  
b) Schmelzkurvenanalyse eines Light-Cycler-Laufs

## 2.10. Analyse der eNOS-, der DDAH- und der Angiotensin-Rezeptor-Expression auf Protein-Ebene

Für die Untersuchung der Proteinexpression wurden aus den Endothelzellen durch Lyse mit Murakami-Puffer unter Zusatz eines Protease-Inhibitor-Cocktails die Proteine gewonnen und der Proteingehalt mit Hilfe der bereits beschriebenen Methode nach Bradford bestimmt. Zwischen 30 und 50  $\mu$ g Gesamtprotein wurden im Immunoblot eingesetzt. Der eNOS-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000, der  $\beta$ -Tubulin-Antikörper in einer Verdünnung 1:750, die sekundären Antikörper in einer Verdünnung 1:2000 für die eNOS und 1:5000 für  $\beta$ -Tubulin, verwendet. Die Spezifität der Antikörper wurde durch die gleichzeitige

Detektion einer rekombinanten, bovinen eNOS (Cayman) überprüft. Die Verdünnungen der DDAH- und der Angiotensin-Rezeptor-Antikörper bzw. der entsprechenden sekundären Antikörper wurden wie folgt gewählt:

Antikörper	DDAH 1 (Maus)	Anti-Maus- IgG	DDAH 2 (Kaninchen)	Anti- Kaninchen- IgG	AT <sub>1</sub> - Rezeptor (Kaninchen)	Anti- Kaninchen- IgG	AT <sub>2</sub> - Rezeptor (Ziege)	Anti-Ziege- IgG
Verdg.	1:1000 (23 µg/µl Stlsg.)	1:1000	1:500	1:1000	1:300	1:4000	1:300	1:3000

Nach der Auftrennung der Proteine mittels der SDS-Page-Gelelektrophorese (10%iges Trenngel, 150 V) im Laufpuffer erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (1,5 h bei 150 mA in Transferpuffer). Nach Anfärben der Proteine mit Ponceau S zur Überprüfung des Transfers der Proteine und deren Beladung erfolgte das Entfernen der Färbelösung mit Hilfe von Wasser. Zur Absättigung der freien Proteinbindungsstellen auf der Membran schloss sich eine einstündige Inkubation in TBST-Puffer mit einem Anteil von 5% Milchpulver (w/v) bei Raumtemperatur an. Nach der dreimaligen Waschphase (je 5 Minuten) mit TBST wurde der Blot über Nacht bei 4°C mit der entsprechenden Antikörper-Lösung in TBST-Puffer mit 1% Milchpulver inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Blot erneut 3 x 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären, Horse-Radish-Peroxidase gekoppelten Antikörper in TBST-Puffer inkubiert. Nach abschließendem Waschen wurde die Membran mit Hilfe des „ECL Western blotting detection Systems“ der Fa. Amersham entwickelt, wobei die an den sekundären Antikörpern gebundene Horse-Radish-Peroxidase (HRP) Luminol oxidierte. Das Produkt fluoreszierte und schwärzte einen Röntgenfilm. Die Filme wurden eingescannt und mit der Software Zerodscan 1.0 ausgewertet.

## 2.11. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Software-Programm SPSS 11.5 herangezogen. Nach Überprüfung der Verteilung der Daten anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests und der Bestätigung der Normalverteilung wurde der Studentsche t-Test zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen hinsichtlich der Mittelwerte verwendet. Im Falle nicht gegebener Normalverteilung ersetzte der U-Test von Mann und Whitney den t-Test nach Student. Ein Wert von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich inhaltlich in 4 Abschnitte.

Im ersten Abschnitt (3.1.) wird die Charakterisierung von N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) als ein Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und des Mechanismus, dem diese Hemmung zugrunde liegt, vorgenommen.

Der zweite Abschnitt (3.2.) stellt die Entwicklung bzw. Validierung der GC-MS-Methode zur Analyse von ADMA sowohl in Zellüberständen und in Zelllysaten als auch in geringen Volumina von Plasmaproben dar. Diese Methode ist als Voraussetzung für die Ergebnisse des 3. Abschnittes anzusehen.

Der dritte Abschnitt (3.3.) beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit unterschiedliche Substanzgruppen, z.B. die HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine), Einfluss auf den ADMA-Metabolismus nehmen.

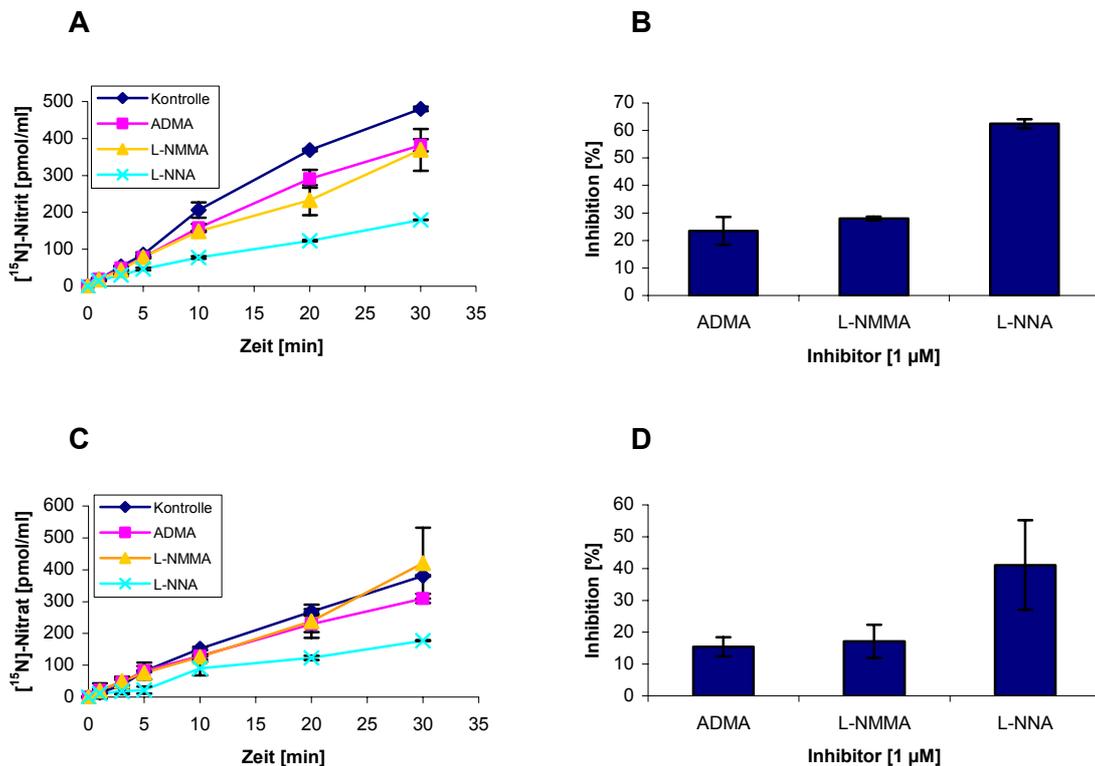
Abschnitt vier (3.4.) ist gesondert zu betrachten und gibt Auskunft über das Zusammenspiel von Statinen und der Expression der eNOS. Diese Ergebnisse unterstreichen den Erklärungsansatz zu den Beobachtungen der Tachyphylaxie bei der klinischen Anwendung des HMG-CoA-Reduktasehemmers Atorvastatin.

#### **3.1. Klärung des Wirkmechanismus, dem die Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) unterliegt**

Nach der unter 2.1. beschriebenen Charakterisierung der rekombinanten endothelialen Rinder-NOS und Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen für dieses Enzym erfolgte zunächst ein Vergleich der Inhibition der eNOS durch die bekannten NOS-Inhibitoren, N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA), N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NNA), bevor unter 3.1.2. der Frage nach einer kompetitiven Hemmung durch ADMA nachgegangen wurde.

### 3.1.1. Beeinflussung der eNOS-Aktivität durch die NOS-Inhibitoren N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA), N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NNA)

Die NOS-Inhibitoren N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA), N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NNA) zeigten ab einer Inkubationszeit von 10 Minuten einen deutlichen Effekt sowohl bezogen auf die [<sup>15</sup>N]-Nitrit-Konzentration als auch bezogen auf die [<sup>15</sup>N]-Nitrat-Konzentration (Abb. 22). L-NNA ist mit einer Hemmung von 60% hinsichtlich der [<sup>15</sup>N]-Nitrit-Produktion bzw. von 40% hinsichtlich der [<sup>15</sup>N]-Nitrat-Produktion als der stärkste Inhibitor der NOS anzusehen, gefolgt von L-NMMA und ADMA.



**Abbildung 22: A:** Inhibition der NOS-katalysierten Bildung von [<sup>15</sup>N]-Nitrit aus L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin durch ADMA, L-NMMA und L-NNA. L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin (20 µM) wurde mit allen Kofaktoren und der NOS (45 µg/ml) für die angegebenen Zeiten in Abwesenheit (Kontrolle) oder in Gegenwart der getesteten Inhibitoren (je 1 µM) inkubiert (Mittelwert ± SEM, n=2).

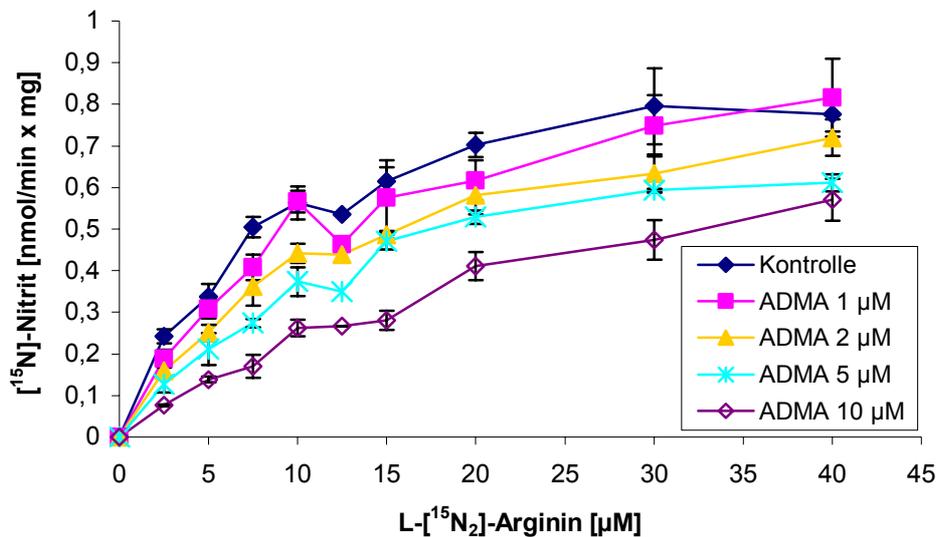
**B** zeigt das Ausmaß der Inhibition der NOS-Aktivität durch die verschiedenen Inhibitoren, welches sich aus den nach 10 Minuten gemessenen [<sup>15</sup>N]-Nitrit-Konzentrationen in A errechnen lässt (Mittelwerte ± SEM, n=2).

Die Grafiken **C** und **D** stellen die entsprechenden Daten für die [<sup>15</sup>N]-Nitrat-Bildung dar.

### 3.1.2. Ermittlung enzymkinetischer Daten der endothelialen NO-Synthese

Die enzymatische Bildung von [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit und [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrat durch die rekombinante, endotheliale NOS wurde in Abhängigkeit der eingesetzten L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin-Konzentrationen und der ADMA-Konzentrationen bestimmt. Dabei variierten die L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin-Konzentrationen von 2,5 bis 40  $\mu\text{M}$ , während ADMA in den Konzentrationen 0, 1, 2, 5 und 10  $\mu\text{M}$  verwendet wurde. Der Versuch wurde für jede ADMA-Konzentration in Mehrfachbestimmung (0  $\mu\text{M}$  ADMA: n=3; 1  $\mu\text{M}$  ADMA: n=4; 2  $\mu\text{M}$  ADMA: n=4; 5  $\mu\text{M}$  ADMA: n=3; 10  $\mu\text{M}$  ADMA: n=4) durchgeführt. Es wurde mit allen Kofaktoren und der entsprechenden L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin- und ADMA-Konzentration 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe der NOS gestartet. Die Inkubationszeit betrug jeweils 10 Minuten. Die weiteren Versuchsbedingungen sind unter 2.1. beschrieben worden.

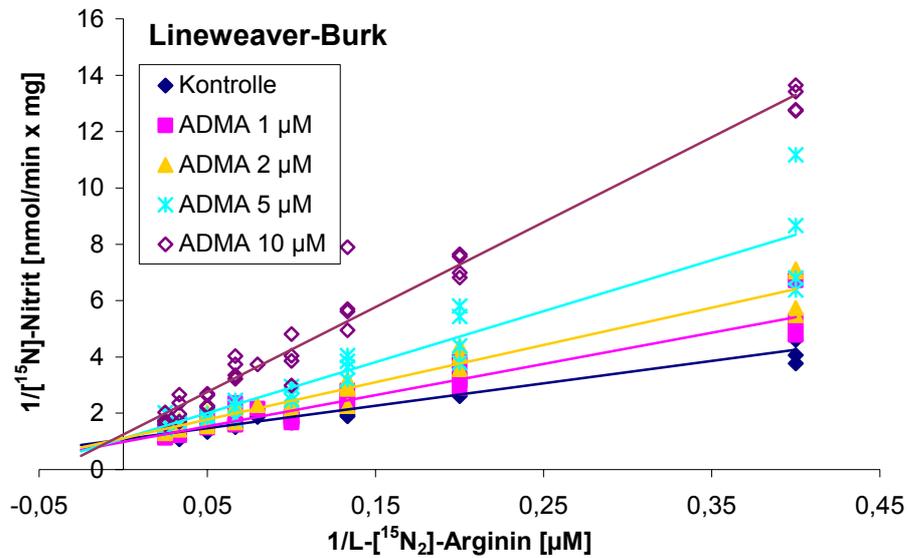
Unter den dargestellten Bedingungen konnte für die eNOS-abhängige Bildung von [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit und [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrat eine Michaelis-Menten-Kinetik postuliert werden (Abb. 23).



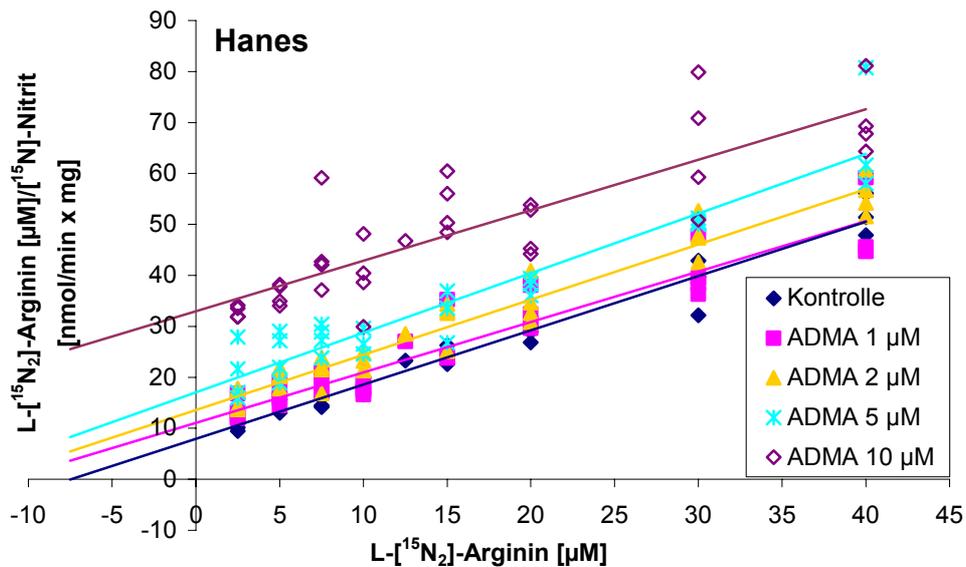
**Abbildung 23:** Effekt von ADMA (0, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) auf die eNOS-Aktivität in Anwesenheit verschiedener L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin-Konzentrationen (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 30; 40  $\mu\text{M}$ ) (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3-4).

Zur Bestimmung von  $K_M$  (Michaelis-Menten-Konstante) und  $V_{\text{max}}$  (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) wurden sowohl die Lineweaver-Burk- als auch die Hanes-Auftragung gewählt (Abb. 24 A, B).  $K_M$  betrug 7,40 bzw. 7,48  $\mu\text{M}$  L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin und  $V_{\text{max}}$  wurde mit 0,931 bzw. 0,940 nmol [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit/min x mg NOS bestimmt. Die Lineweaver-Burk-Auftragung zeigte Geraden, deren Schnittpunkte sich auf der y-Achse befanden, wogegen die Hanes-Auftragung in fast parallelen Geraden resultierte.

A

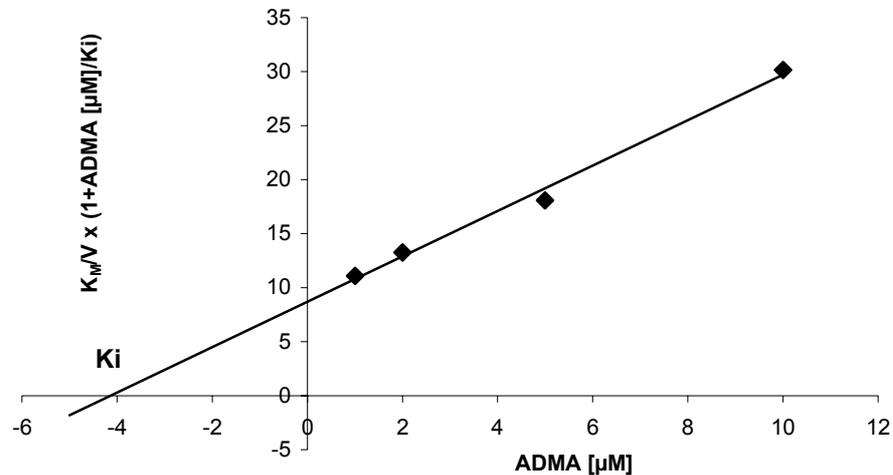


B



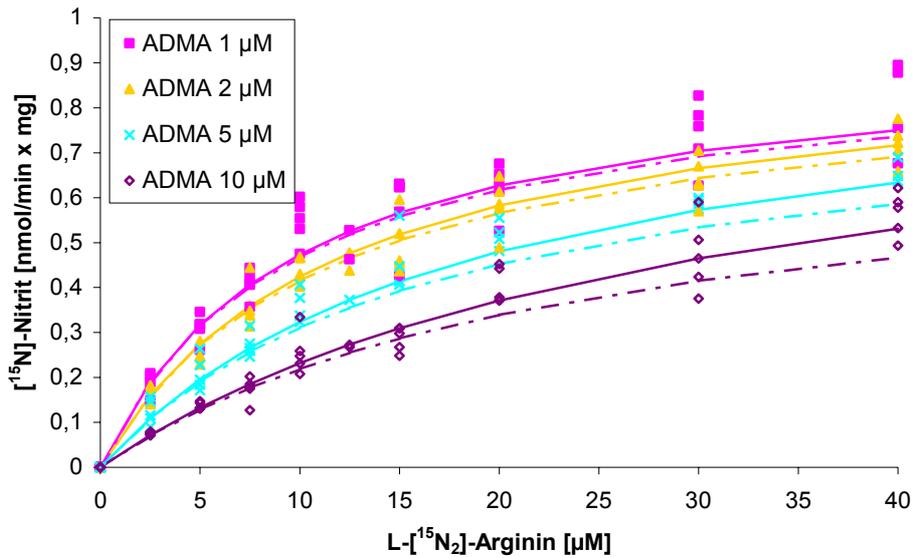
**Abbildung 24 A und B:** Lineweaver-Burk- und Hanes-Auftragungen der NOS-Aktivität, gemessen bei verschiedenen L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin-Konzentrationen (2,5-40 µM) in Gegenwart von ADMA (1, 2, 5, 10 µM). Die Gleichungen für die erhaltenen Regressionsgeraden lauten für **Lineweaver-Burk**: 0 µM ADMA:  $y = 7,95x + 1,07$ ,  $R^2 = 0,940$ ; 1 µM ADMA:  $y = 11,09x + 0,98$ ,  $R^2 = 0,924$ ; 2 µM ADMA:  $y = 13,25x + 1,11$ ,  $R^2 = 0,951$ ; 5 µM ADMA:  $y = 18,09x + 1,09$ ,  $R^2 = 0,878$ ; 10 µM ADMA:  $y = 30,16x + 1,24$ ,  $R^2 = 0,969$  und für **Hanes**: 0 µM ADMA:  $y = 1,06x + 7,95$ ,  $R^2 = 0,963$ ; 1 µM ADMA:  $y = 0,99x + 11,06$ ,  $R^2 = 0,90$ ; 2 µM ADMA:  $y = 1,08x + 13,60$ ,  $R^2 = 0,949$ ; 5 µM ADMA:  $y = 1,17x + 17,05$ ,  $R^2 = 0,893$ ; 10 µM ADMA:  $y = 0,99x + 33,0$ ,  $R^2 = 0,735$ .

Die Inhibitionskonstante  $K_i$  für die Hemmung der eNOS durch ADMA wurde über die Sekundärauftragung nach Lineweaver-Burk (Abb. 25) und mittels Berechnungen bestimmt.  $K_i$ , mit Hilfe der graphischen Darstellung ermittelt, betrug  $4,14 \mu\text{M}$ , die berechneten Werte nach Lineweaver-Burk bzw. nach Hanes betragen  $3,25 \pm 0,62$  bzw.  $3,23 \pm 0,80 \mu\text{M}$  für ADMA (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=4$ ).



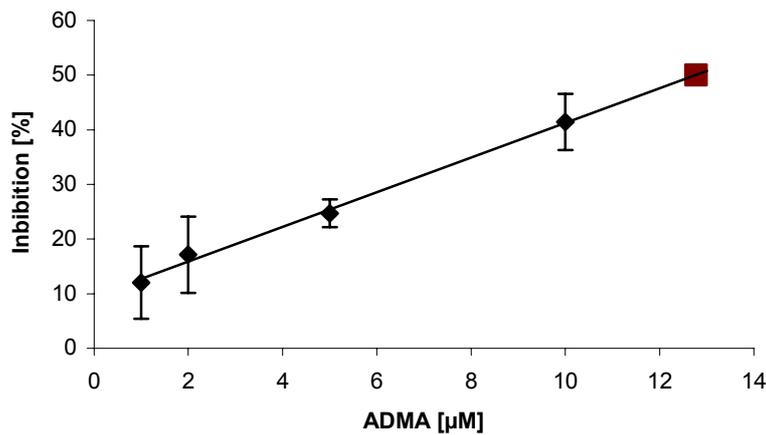
**Abbildung 25:** Sekundärauftragung nach Lineweaver-Burk zur Ermittlung der Inhibitionskonstante  $K_i$ . Die Geradengleichung lautet:  $y = 2,10x + 8,69$ ,  $R^2 = 0,992$ .

Unter Annahme einer kompetitiven Hemmung wurden für verschiedene L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin-Konzentrationen mit Hilfe der nach Lineweaver-Burk bzw. nach Hanes bestimmten Werte für  $K_M$ ,  $V_{\text{max}}$ , und  $K_i$  die [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit-Bildungsgeschwindigkeit berechnet. Es bestand eine gute Korrelation zwischen den berechneten und den experimentell ermittelten Werten (Abb. 26). Wurde die [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit-Bildungsgeschwindigkeit unter Annahme einer nicht-kompetitiven Hemmung und der über Lineweaver-Burk ermittelten zweiten Inhibitorkonstante ( $K_{ii} = 41,85 \mu\text{M}$ ) berechnet, so waren vor allem für die ADMA-Konzentrationen von 5 und  $10 \mu\text{M}$  und L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin-Konzentrationen von 30 und  $40 \mu\text{M}$  deutliche Abweichungen zu den experimentell ermittelten Werten zu erkennen (Abb. 26). Die berechneten [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten lagen niedriger als die experimentell erhaltenen Werte.



**Abbildung 26:** Vergleich der unter Verwendung der Konstanten  $V_{max}$ ,  $K_M$ ,  $K_i$  und  $K_{ii}$  berechneten  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten mit den gemessenen Werten. Die einzelnen Datenpunkte in der Grafik stellen die experimentell erhaltenen Messergebnisse dar, während die unter Annahme einer kompetitiven Hemmung berechneten Werte in Form der durchgehenden Linien und die unter Annahme einer nicht kompetitiven Hemmung berechneten Daten als gestrichelte Linien zu sehen sind.

Die sich aus diesen Daten ergebene  $IC_{50}$  bezogen auf die  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit-Bildungsrate betrug  $12,78 \mu\text{M}$  für ADMA (Abb. 27).



**Abbildung 27:** Abhängigkeit der Hemmung der NOS-katalysierten Bildung von  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit von der ADMA-Konzentration. Das Ausmaß der Inhibition im Vergleich zur Kontrolle für eine  $L\text{-}[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin-Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  wurde gegen die entsprechend eingesetzte ADMA-Konzentration aufgetragen. Die Geradengleichung lautet:  $y = 3,21x + 8,98$ ,  $R = 0,998$ .

Neben den  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten wurden ebenfalls die  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat-Bildungsgeschwindigkeiten bestimmt. Diese Daten zeigten, dass ADMA auf die  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat-Bildung einen ebenso hemmenden Einfluss besaß. Die Lineweaver-Burk- bzw. die Hanes-Auftragung ließen für die  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat-Bildungsgeschwindigkeit Geraden erkennen, die den für die  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit-Bildungsgeschwindigkeit bestimmten Verläufen entsprachen. Die Werte für  $K_M$  und  $V_{\max}$  betragen  $5,28 \mu\text{M}$  L- $[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin nach Lineweaver-Burk und  $5,44 \mu\text{M}$  L- $[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin nach Hanes bzw.  $0,959$  und  $0,985 \text{ nmol } [^{15}\text{N}]\text{-Nitrat}/\text{min} \times \text{mg NOS}$ .  $K_i$  wurde mit  $5,66 \pm 1,19$  bzw.  $3,97 \pm 0,58 \mu\text{M}$  (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=4$ ) für ADMA ermittelt; die graphische Darstellung zeigte  $K_i$  mit  $4,70 \mu\text{M}$  ADMA.

Die  $\text{IC}_{50}$  bezogen auf die  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat-Bildungsgeschwindigkeit wurde mit  $9,86 \mu\text{M}$  für ADMA bestimmt.

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Parameter der durch die NOS-katalysierten Bildung von  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit bzw.  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat

Parameter der $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit-Bildung	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ L- $[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin)	$V_{\max}$ ( $\text{nmol } [^{15}\text{N}]\text{-Nitrit}/$ $\text{min} \times \text{mg NOS}$ )	$K_i$ (graphisch) ( $\mu\text{M}$ ADMA)	$K_i$ (berechnet) ( $\mu\text{M}$ ADMA)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ADMA)
Lineweaver-Burk	7,40	0,931	4,14	$3,25 \pm 0,62$	
Hanes	7,48	0,940		$3,23 \pm 0,80$	
					12,78
Parameter der $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat-Bildung	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ L- $[^{15}\text{N}_2]$ -Arginin)	$V_{\max}$ ( $\text{nmol } [^{15}\text{N}]\text{-Nitrat}/$ $\text{min} \times \text{mg NOS}$ )	$K_i$ (graphisch) ( $\mu\text{M}$ ADMA)	$K_i$ (berechnet) ( $\mu\text{M}$ ADMA)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ADMA)
Lineweaver-Burk	5,28	0,959	4,70	$5,66 \pm 1,19$	
Hanes	5,44	0,985		$3,97 \pm 0,58$	
					9,86

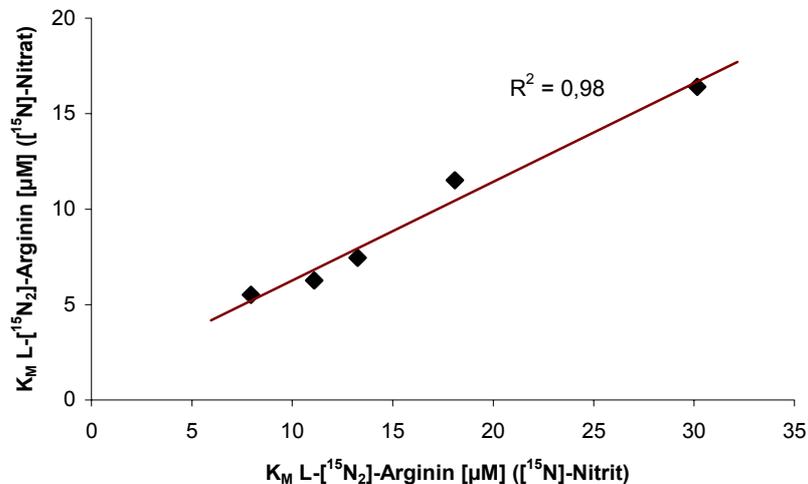
Zusammenfassend ist für die  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit- und für die  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat-Bildung festzuhalten, dass sich in der Darstellung nach Lineweaver-Burk die erhaltenen Geraden nahezu auf der y-Achse schnitten, während die Abbildung nach Hanes einen fast parallelen Verlauf der Geraden erkennen ließ. Diese Geradenverläufe sind typisch für den Mechanismus der kompetitiven Hemmung. Statistisch wurde diese Aussage unterstützt durch die Kovarianzanalyse und den F-Test auf Gleichheit. Die Nullhypothese über die Gleichheit der nach Hanes erhaltenen Regressionsparameter konnte nicht abgelehnt werden. Die berechneten P-Werte betragen  $0,406$  für  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrit und  $0,317$  für  $[^{15}\text{N}]$ -Nitrat. Weiterhin sprach der Vergleich der experimentell erhaltenen Daten mit den berechneten Werten für

den Mechanismus der kompetitiven Hemmung (Abb. 26). Die unter Annahme einer kompetitiven Hemmung berechneten Werte korrelierten eindeutig besser mit den Messergebnissen als die unter Annahme einer nicht kompetitiven Hemmung erhaltenen Daten.

Die Berechnung der  $IC_{50}$ , die den Einfluss auf die  $[^{15}N]$ -Nitrit-Bildungsgeschwindigkeit und auf die  $[^{15}N]$ -Nitrat-Bildungsgeschwindigkeit berücksichtigte, ergab einen Wert von  $10,94 \mu M$  für ADMA, der ADMA in diesen Experimenten als einen nicht sehr potenten Inhibitor der eNOS erscheinen ließ.

### Verhältnis der $[^{15}N]$ -Nitrit- zur $[^{15}N]$ -Nitrat-Bildungsgeschwindigkeit

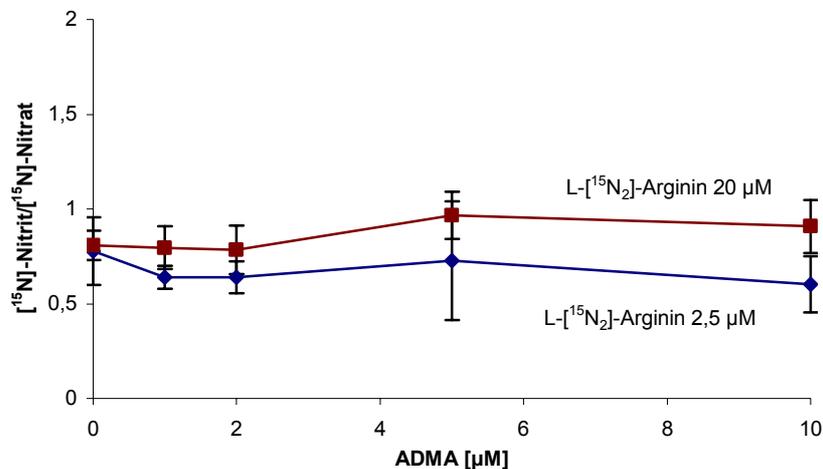
Die weitere Analyse der experimentell erhaltenen Daten beinhaltete den direkten Vergleich der durch die eNOS gebildeten Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen und die Untersuchung der Einflussnahme von ADMA auf das Nitrit/Nitrat-Verhältnis. Für die Inkubation mit den unterschiedlichen ADMA-Konzentrationen (0, 1, 2, 5,  $10 \mu M$ ) wurden die einzelnen  $K_M$ -Werte für L- $[^{15}N_2]$ -Arginin sowohl für die  $[^{15}N]$ -Nitrit- als auch für die  $[^{15}N]$ -Nitrat-Bildungsgeschwindigkeiten berechnet und gegeneinander aufgetragen (Abb. 28). Es ergab sich eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,98.



**Abbildung 28:** Lineare Regression der  $K_M$ -Werte ermittelt für die  $[^{15}N]$ -Nitrit-Bildung (x-Achse) und für die  $[^{15}N]$ -Nitrat-Bildung (y-Achse).

Diese gute Korrelation der  $K_M$ -Werte spricht für eine gleichstarke Hemmung der  $[^{15}N]$ -Nitrit- und der  $[^{15}N]$ -Nitrat-Bildung unter dem Einfluss steigender ADMA-Konzentrationen. ADMA besaß demzufolge keinen Effekt auf das  $[^{15}N]$ -Nitrit/ $[^{15}N]$ -Nitrat-Verhältnis, welches durch die Darstellung des Quotienten  $[^{15}N]$ -Nitrit/ $[^{15}N]$ -Nitrat in Abhängigkeit von den eingesetzten ADMA-Konzentrationen unter der Verwendung von 2,5 und  $20 \mu M$  L- $[^{15}N_2]$ -Arginin bestätigt

werden konnte (Abb. 29). Das  $^{15}\text{N}$ -Nitrit/ $^{15}\text{N}$ -Nitrat-Verhältnis lag unabhängig der eingesetzten ADMA-Konzentration für eine L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin-Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  bei  $0,68 \pm 0,06$  und für eine L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin-Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  bei  $0,85 \pm 0,07$  (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=18).



**Abbildung 29:** Änderung des Verhältnisses  $^{15}\text{N}$ -Nitrit zu  $^{15}\text{N}$ -Nitrat in Abhängigkeit von der ADMA- und der L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin-Konzentration (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4).

Bei der Analyse der Datenreihen für die unterschiedlichen ADMA-Konzentrationen mit Hilfe des ungepaarten, zweiseitigen T-Tests waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen, wurden jedoch alle Datenpunkte, die für die L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin-Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  erhalten wurden, den Ergebnissen für die L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin-Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  gegenübergestellt, so ergab sich ein signifikanter Unterschied mit einem P-Wert von 0,008.

### 3.2. Entwicklung einer auf der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) basierenden Methode zur Analyse des $\text{N}^G, \text{N}^G$ -Dimethyl-L-Arginins (ADMA)

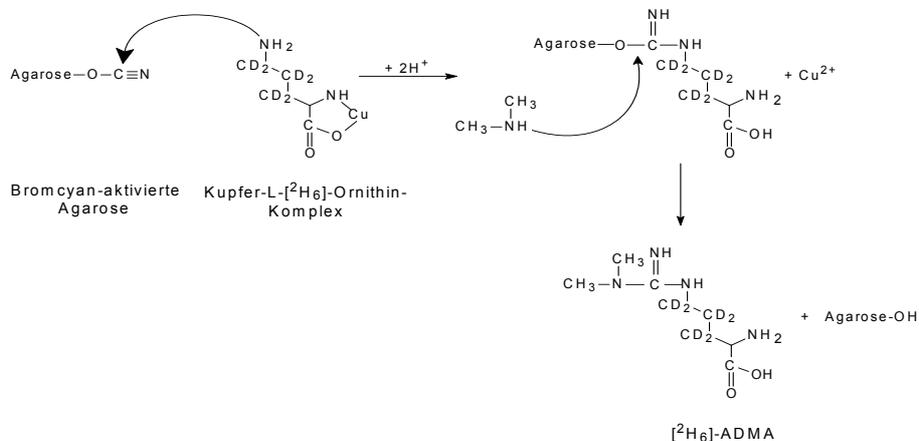
Die Analyse von  $\text{N}^G, \text{N}^G$ -Dimethyl-L-Arginin (ADMA) in Plasma erfolgt in zahlreichen Arbeitsgruppen mit Hilfe der HPLC nach einer Methode von Böger et al. (1998b), die unter 2.6. beschrieben wurde. Die Messung dieses methylierten L-Arginin-Analogons in Zellkulturüberständen führte jedoch zu statistisch inakzeptablen Intra- und Interday-Reproduzierbarkeiten, so dass die Entwicklung einer adäquaten Methode Ziel dieser Arbeit wurde. Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurde aufgrund ihrer Selektivität und hohen Empfindlichkeit gewählt. Die Validierung der Methode wurde nicht nur für die Messung von ADMA in Zellkulturüberständen vorgenommen, sondern auch für die

Analyse von ADMA in Zelllysaten und einem Volumen von 50 µl Plasma (siehe 2.7.). In zahlreichen Tierversuchen besteht das Problem, dass Tieren, z.B. Mäusen oder Ratten, nur geringe Volumina an Blut entnommen werden können, bei deren Analyse das Detektionslimit der HPLC unterschritten wird. Ein Vergleich der GC-MS- mit der HPLC-Methode wurde für Plasma durchgeführt (siehe 3.2.3.).

Voraussetzung für die Analytik mit Hilfe der GC-MS stellte die Existenz eines Isotopenmarkierten internen Standards dar, dessen Synthese unter 2.7.1 beschrieben ist und auf dessen Charakterisierung im folgenden unter 3.2.1. eingegangen wird.

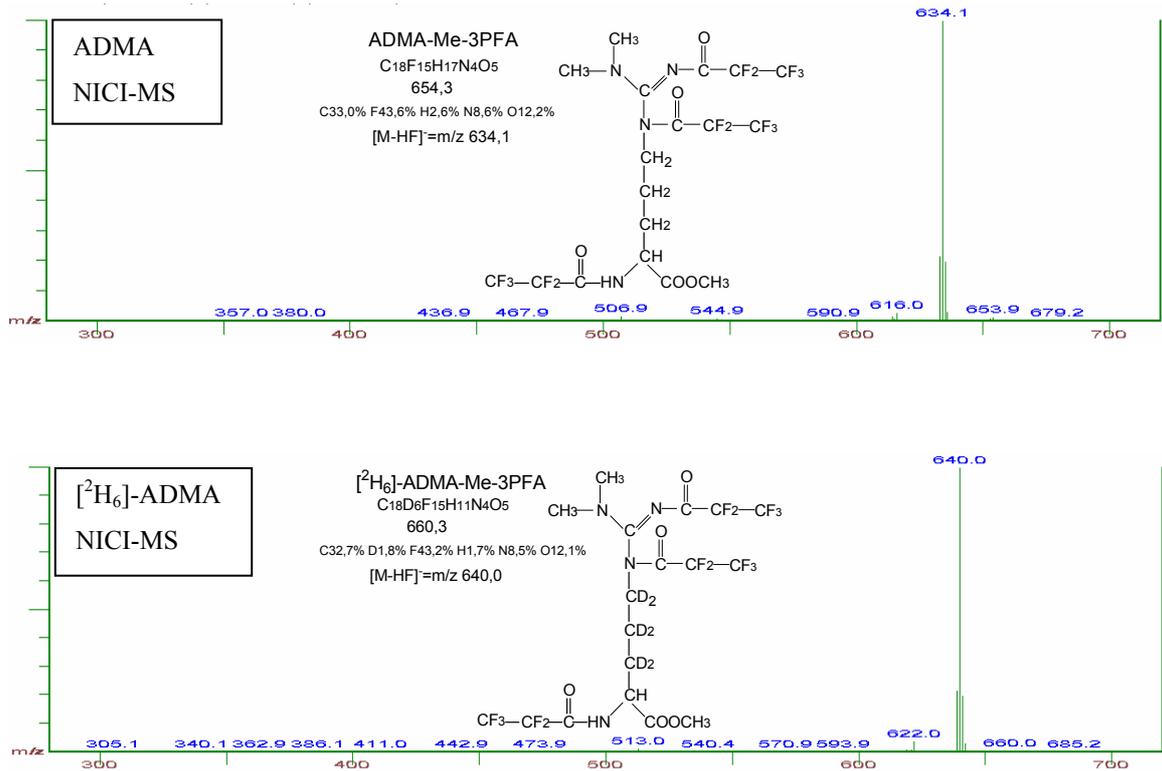
### 3.2.1. Synthese, Charakterisierung und Quantifizierung des internen Standards $N^G, N^G$ - $[^2H_6]$ -Dimethyl-L-Arginin ( $[^2H_6]$ -ADMA)

Kommerziell sind weder radioaktiv-markiertes noch Isotopen-markiertes ADMA zu erwerben, so dass das Fehlen eines adäquaten Standards für die Analytik des NOS-Inhibitors z.B. mit Hilfe der GC-MS den limitierenden Faktor darstellte und zunächst die Synthese eines solchen Standards erforderlich machte. Die Synthese des  $N^G, N^G$ - $[^2H_6]$ -Dimethyl-L-Arginins erfolgte ausgehend von L- $[^2H_6]$ -Ornithin, Bromcyan-aktivierter Agarose und Dimethylamin. Anstelle der Agarose könnten andere unlösliche Polysaccharide, wie Cellulose oder Dextran, die mit Bromcyanid unter Bildung eines Cyanesters (ROC≡N) aktiviert werden, zum Einsatz kommen. Die Cyan-Agarose wurde mit einem Kupfer-L- $[^2H_6]$ -Ornithin-Komplex versetzt, so dass durch nukleophile Addition ein substituierter Pseudoharnstoff (ROC(=NH)NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) bzw. N-substituierter Isoharnstoff entstand. Der Einsatz eines Kupferkomplexes verhinderte die Reaktion der Cyan-Agarose mit der α-Aminogruppe des L- $[^2H_6]$ -Ornithins. Das Dimethylamin reagierte schließlich im sauren Milieu in Form einer nukleophilen Substitution mit dem Isoharnstoff zur entsprechend substituierten Guanidinogruppe.



**Abbildung 30:** Synthese des  $[^2H_6]$ -ADMA unter Verwendung eines Kupfer-L- $[^2H_6]$ -Ornithin-Komplexes und Bromcyan-aktivierter Agarose

Die Massenspektren von ADMA und von [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA wurden von den Methylester-PFA(Pentafluorpropionsäure)-Derivaten nach entsprechender Derivatisierung aufgenommen (siehe 2.7.). Es erfolgte eine Injektion von 1  $\mu\text{l}$  der ADMA- bzw. [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA-Derivate in einer Konzentration von 10 nmol/500  $\mu\text{l}$  Toluol bei 1200 V. In Abbildung 31 sind die NICI(negative ion chemical ionization)-Spektren von ADMA und von [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA dargestellt. Die prominenten Fragmentationen resultierten aus der Abspaltung von HF aus dem mit Pentafluorpropionsäure dreifach acylierten Derivat von ADMA.



**Abbildung 31:** GC-MS-Spektren der Methylester-PFA-Derivate von ADMA und von [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA. Die Zielionen m/z 634,1 für ADMA und m/z 640,0 für [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA konnten detektiert werden.

In gleicher Weise wurden für die Substanzen  $\text{N}^G, \text{N}^G$ -Dimethyl-L-Arginin (SDMA), L-Arginin und L-[ $^{15}\text{N}_2$ ]-Arginin NICI-Spektren aufgenommen. Die detektierten Fragmentationen sind zusammen mit den Fragmentationen der ADMA- und [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA-Analyse in Tabelle 5 aufgeführt. Für SDMA konnte ein Fragmention mit m/z 593,9 zu einer Retentionszeit von 6,4 min identifiziert werden. Interferenzen durch SDMA konnten somit für die Messung von ADMA ausgeschlossen werden. Die Quantifizierung von SDMA hätte jedoch die Synthese eines spezifischen Standards erfordert.

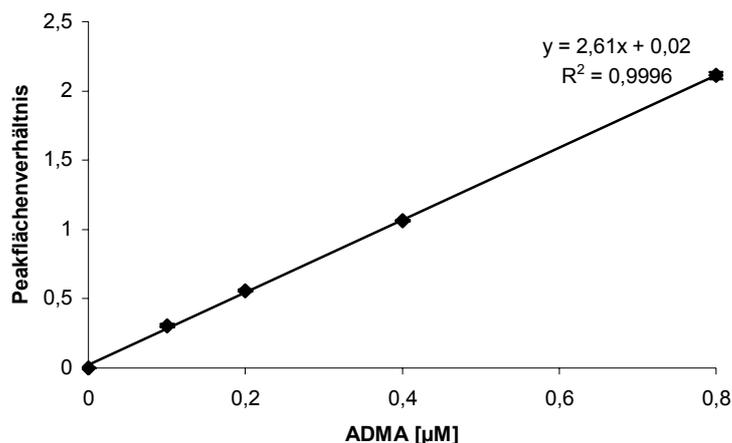
**Tabelle 5:** NICI-Spektren der Methylester-PFA-Derivate des ungelabelten und gelabelten L-Arginins, ADMA's und SDMA's

Massen-Fragment/ Verbindung	L-Arginin	L-[ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-Arginin	ADMA	[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-ADMA	SDMA
	m/z (Intensität %)				
[M-HF] <sup>-</sup>	605,9 (15)	608,0 (12)	634,1 (100)	640,0 (100)	
[M-2HF] <sup>-</sup>	586,0 (100)	588,1 (100)			613,9 (17)
[M-3HF] <sup>-</sup>	565,9 (27)	567,9 (30)			593,9 (100)
[M-3HF-PFP] <sup>-</sup>					449,9 (21)

Alle Ionen mit einem Massen-Ladungsverhältnis von  $m/z \geq 200$  und einer Intensität von  $\geq 10\%$  wurden in die Tabelle aufgenommen.

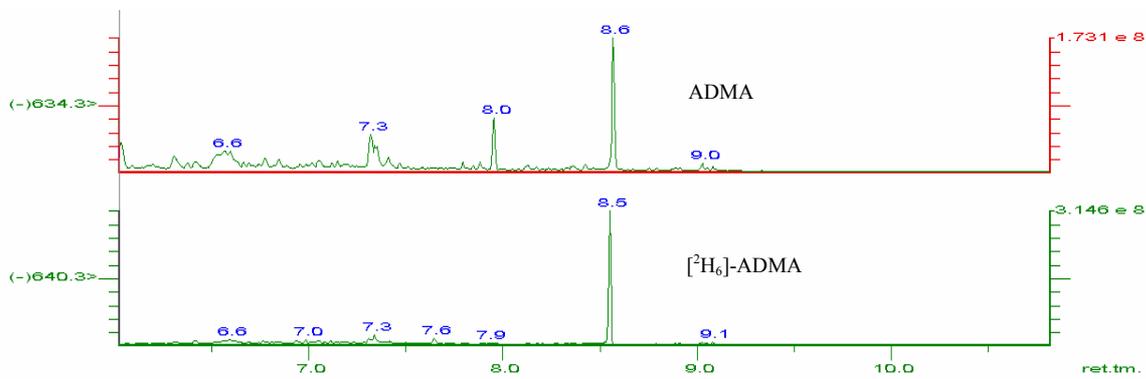
Die weitere Charakterisierung des synthetisierten [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA's erfolgte mit Hilfe der HPLC, bei der keine Spuren von SDMA, L-NMMA oder L-Arginin detektiert werden konnten (2.6.). Die Reinheit des Isotopen-markierten ADMA's konnte durch die GC-MS-Analyse mit 99,99% bestimmt werden, indem im SIM(single ion monitoring)-Modus die Ionen  $m/z$  634,1 für unmarkiertes ADMA und  $m/z$  640,0 für deuteriertes ADMA detektiert wurden. Der Anteil an nicht markiertem ADMA betrug nur 0,01%.

Die Quantifizierung von [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA erfolgte über den Zusatz von ADMA in Konzentrationen von 0-0,8  $\mu\text{M}$  zu 0,375  $\mu\text{M}$  [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA und der unter 2.7. aufgeführten Derivatisierung und Analyse mit Hilfe der GC-MS. Die Berechnung anhand der erhaltenen Standardkurve (Abb. 32) führte zu dem Ergebnis, dass bei der Synthese 736,31  $\mu\text{g}$  [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA aus 125 mg L-[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Ornithin entstanden sind und somit eine Ausbeute von ca. 0,6% erhalten wurde.

**Abbildung 32:** Lineare Regression der Peakflächenverhältnisse (SIM  $m/z$  634,1 zu  $m/z$  640,0) (y) und der eingesetzten Menge von ADMA (x) (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

### 3.2.2. Validierung der GC-MS-Methode zur Analyse des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in Zellkulturüberständen, Zelllysaten und humanen Plasmaproben

Zur Bestimmung der Intraday- und Interday-Reproduzierbarkeit der Methode wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium unter Zusatz von 10% FKS nach Addition von 188,19 pmol/500 µl [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA als interner Standard verwendet. Die 500 µl-Aliquots wurden mit unterschiedlichen Mengen an ADMA versetzt (0-0,8 µM). Nach Festphasenextraktion wurde zu den Methylester-PFA-Derivaten umgesetzt (2.7.) und mittels GC-MS-Analyse quantifiziert. Ein typisches GC-MS-Chromatogramm aus der Analyse einer Zellkulturprobe ist in Abbildung 33 zu sehen.



**Abbildung 33:** GC-MS-Analytik von ADMA im Zellkulturmedium. SIM der Ionen der Methylester-PFA-Derivate mit m/z 634,3 für zugesetztes ADMA und m/z 640,3 für den internen Standard [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA.

Die unterschiedlichen Probenansätze wurden in fünffacher Ausführung für die Bestimmung der Intraday-Reproduzierbarkeit an einem Tag aufgearbeitet und analysiert, während die Derivatisierung und Analyse für die Bestimmung der Interday-Reproduzierbarkeit für jede Konzentration von ADMA an 5 unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurde. Die mittleren gemessenen Konzentrationen von ADMA für die unterschiedlich zugesetzten Mengen an ADMA und deren Standardabweichungen dienten als Berechnungsgrundlage für die Präzision und Akkuratheit der Methode. Die in Tabelle 6 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass sich die analytische Methode zur Bestimmung von ADMA im Zellkulturmedium durch eine gute Präzision und Akkuratheit auszeichnet. Die mittlere Präzision lag bei  $2,87 \pm 1,09\%$  (RSD) und die mittlere Akkuratheit der Methode konnte mit  $104,5 \pm 7,72\%$  angegeben werden (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=5).

**Tabelle 6:**

Intraday-Reproduzierbarkeit der Methode zur Analyse von ADMA im Zellkulturmedium

ADMA ( $\mu\text{M}$ ) (Zusatz)	ADMA ( $\mu\text{M}$ ) (Messung)	RSD (%)	Akkuratheit (%)
0,0	0,34	2,91	n.b.
0,1	0,43	4,12	94,1
0,2	0,57	2,62	114,1
0,4	0,74	4,10	99,9
0,8	1,19	2,07	105,7
1,2	1,64	1,40	108,4
Mittelwert $\pm$ SD		2,87 $\pm$ 1,09	104,5 $\pm$ 7,72

Interday-Reproduzierbarkeit

ADMA ( $\mu\text{M}$ ) (Zusatz)	ADMA ( $\mu\text{M}$ ) (Messung)	RSD (%)	Akkuratheit (%)
0,0	0,33	3,52	n.b.
0,1	0,45	3,75	111,8
0,2	0,55	2,26	103,9
0,4	0,77	0,41	107,1
0,8	1,20	2,15	107,2
1,2	1,65	2,23	108,8
Mittelwert $\pm$ SD		2,39 $\pm$ 1,19	107,8 $\pm$ 2,87

n.b.: nicht berechenbar. Zur Validierung wurde die Additionsmethode verwendet. 188,19 pmol/500  $\mu\text{l}$  [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA wurden als interner Standard eingesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte (n=5).

Die Validierung der Methode zur Messung von ADMA in 50  $\mu\text{l}$  Plasma erfolgte nach dem gleichen Schema (Tabelle 7). Ein Unterschied ist allerdings in der Aufarbeitung der Proben vor der GC-MS-Analyse zu sehen. Die Plasmaproben wurden nicht über die Festphasenextraktion aufgereinigt, sondern nur durch Behandlung mit Aceton von den Proteinen befreit (2.7.). Die mittlere Präzision betrug für die Analytik von Plasmaproben 2,95  $\pm$  1,14% (RSD) und die mittlere Akkuratheit der Methode wurde mit 105,1  $\pm$  7,57% bestimmt (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=5).

**Tabelle 7:**

Intraday-Reproduzierbarkeit der Methode für die Bestimmung von ADMA in 50 µl Plasma

ADMA (µM) (Zusatz)	ADMA (µM) (Messung)	RSD (%)	Akkuratheit (%)
0,00	0,88	4,71	n.b.
0,25	1,16	2,67	111,7
0,50	1,36	3,15	95,5
1,00	1,99	1,60	110,5
2,00	2,93	2,61	102,5
Mittelwert ± SD		2,95 ± 1,14	105,1 ± 7,57

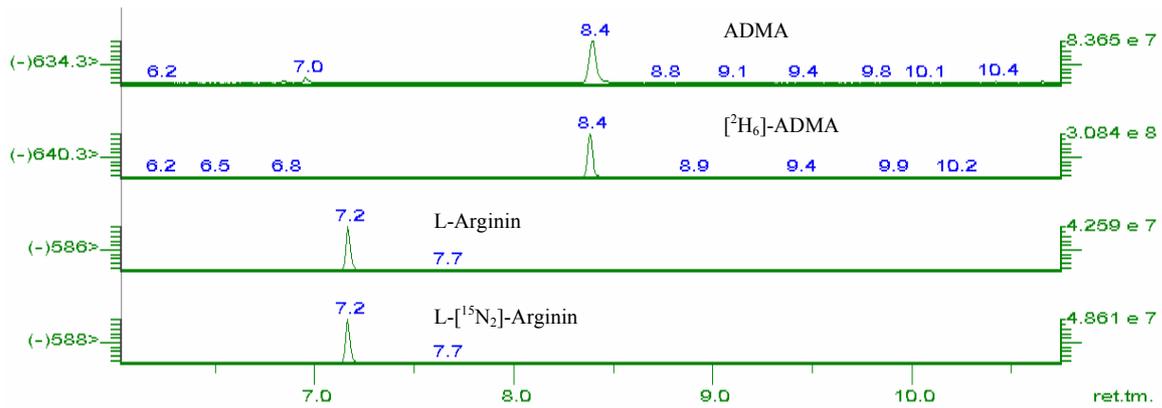
Interday-Reproduzierbarkeit

ADMA (µM) (Zusatz)	ADMA (µM) (Messung)	RSD (%)	Akkuratheit (%)
0,00	0,85	3,66	n.b.
0,25	1,16	1,08	121,7
0,50	1,34	0,92	98,0
1,00	1,98	1,56	112,6
2,00	2,97	0,88	105,7
Mittelwert ± SD		1,62 ± 1,17	109,5 ± 10,08

n.b.: nicht berechenbar. 120,4 pmol/50 µl [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA wurden als interner Standard verwendet. Die Daten stellen Mittelwerte dar (n=5).

Neben dem internen Standard [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA, der in einer Konzentration von 120,4 pmol/50 µl Plasma eingesetzt wurde, enthielten die Proben L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin (4 nmol/50 µl) zur parallelen Bestimmung des L-Arginin/ADMA-Verhältnisses. Ein typisches Chromatogramm einer Plasmaprobe ist in Abbildung 34 dargestellt. Die mittlere Präzision der Methode für die Bestimmung von L-Arginin konnte mit 1,84 ± 0,33% und die mittlere Akkuratheit mit 84,9 ± 2,8% angegeben werden (Mittelwerte ± SD, n=5).

## Ergebnisse



**Abbildung 34:** GC-MS-Analytik von ADMA und L-Arginin im Plasma. SIM der Ionen der Methylester-PFA-Derivate mit m/z 634,3 für zugesetztes ADMA und m/z 640,3 für den internen Standard [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA, mit m/z 586 für L-Arginin und m/z 588,1 für L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin. Die Retentionszeiten wurden mit 7,2 min für L-Arginin und L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin und mit 8,4 min für ADMA und [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA bestimmt.

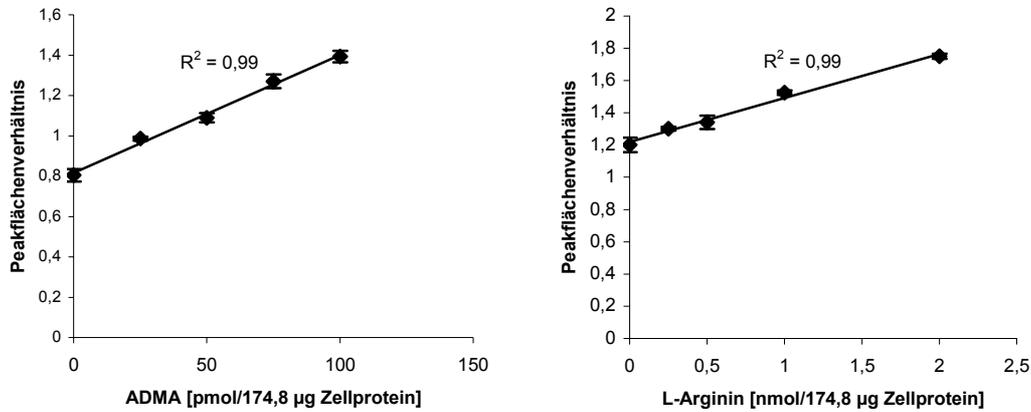
Im Plasma von 10 gesunden Probanden mit einem Durchschnittsalter von  $29,7 \pm 5,8$  Jahren wurde die ADMA-Konzentration mit Hilfe der validierten Methode analysiert. Die bestimmten ADMA-Konzentrationen lagen mit einem Mittelwert von  $0,600 \pm 0,076 \mu\text{M}$  in einem Konzentrationsbereich von  $0,483 - 0,693 \mu\text{M}$  (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Konzentration von ADMA im Plasma von 10 gesunden Probanden:

Versuchsperson/Geschlecht	Alter (Jahre)	Plasma ( $\mu\text{M}$ )
I/weiblich	25	0,563
II/weiblich	27	0,693
III/weiblich	32	0,666
IV/männlich	23	0,522
V/weiblich	29	0,671
VI/weiblich	26	0,483
VII/weiblich	26	0,678
VIII/weiblich	43	0,603
IX/männlich	33	0,609
X/männlich	33	0,516
MW $\pm$ SD	$29,7 \pm 5,8$	$0,600 \pm 0,076$

Die Validierung der Methode für die Zellysate erfolgte anhand von EA.hy 926-Zellen. [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA in einer Konzentration von  $188,19 \text{ pmol}/174,8 \mu\text{g}$  Zellprotein und L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin in einer Konzentration von  $4 \text{ nmol}/174,8 \mu\text{g}$  Zellprotein wurden als interne Standards verwendet. Nach Fällung der Proteine mit Aceton analog der Behandlung der Plasmaproben wurden die Proben derivatisiert und gemessen. Die Präzision und Akkuratheit wurden

anhand der Messung 5 unterschiedlicher Konzentrationen von ADMA und L-Arginin in dreifacher Ausführung bestimmt (Abb. 35). Die Präzision für ADMA bzw. für L-Arginin betrug  $2,35 \pm 1,02\%$  (RSD) bzw.  $1,91 \pm 1,37\%$  (RSD) und die Akkuratheit konnte mit  $118,2 \pm 13,3\%$  und  $128,7 \pm 24,1\%$  für ADMA bzw. L-Arginin angegeben werden (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=3).



**Abbildung 35:** Standardkurven der Messung von ADMA und L-Arginin in Zelllysaten nach Zugabe von 0-100 pmol ADMA bzw. 0-2 nmol L-Arginin zu 174,8 µg Zellprotein (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=3).

Die Messung von 10 EA.hy 926- und 8 HCAEC-Zelllysaten ergaben Mittelwerte für die intrazelluläre ADMA-Konzentration von  $0,295 \pm 0,085$  pmol/µg Protein und  $0,173 \pm 0,027$  pmol/µg Protein und für die intrazelluläre L-Arginin-Konzentration von  $177,87 \pm 8,60$  pmol/µg Protein und  $286,33 \pm 44,45$  pmol/µg Protein.

Das Detektionslimit (LOD, limit of detection) für ADMA wurde durch GC-MS-Analyse (1 µl) von Verdünnungen einer Stammlösung des Methylester-PFA-Derivates von ADMA in Toluol ermittelt. SIM des Ions m/z 634,3 zeigte für das Methylester-PFA-Derivat für 2 fmol ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von  $11,8 \pm 1 : 1$  (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3). Das Limit für die quantitative Analyse wurde durch den Zusatz von ADMA zu 500 µl Zellkulturmedium ohne FKS, in dem an sich kein ADMA detektiert werden konnte, mit 0,05 µM ADMA bestimmt. Die Präzision betrug 9,68% (RSD) und die Genauigkeit  $110,3 \pm 10,7\%$  (Mittelwert  $\pm$  SD, n=5). Der Vergleich von drei über die SPE aufgereinigten bzw. extrahierten Proben unterschiedlicher ADMA-Konzentration mit nicht extrahierten Standards der gleichen Konzentration führte zu der Bestimmung der Recovery mit  $92,52 \pm 2,41\%$  (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3).

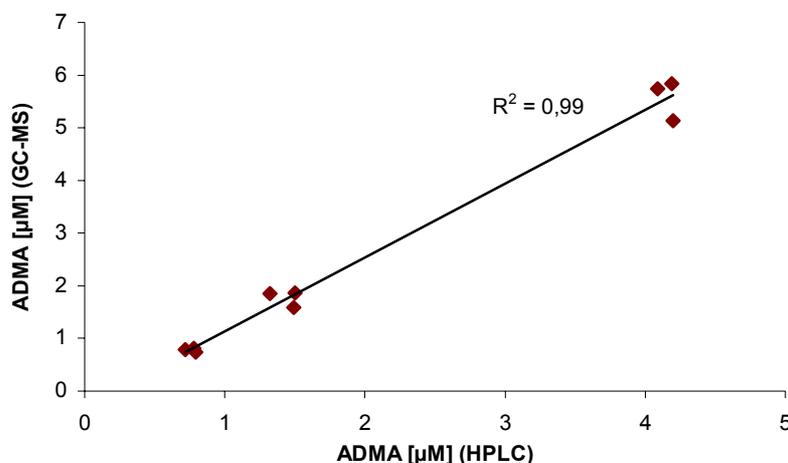
Die Autosamplerstabilität wurde für 3 verschiedene Konzentrationen von ADMA (0,1, 0,2, 0,4 µM) in Medium mit FKS in dreifacher Ausführung bestimmt, indem diese Proben wiederholt nach der Lagerung von 24 Stunden bei Raumtemperatur im Autosampler gemessen wurden. Die Intensität der ADMA-Peaks betrug bezogen auf die am Vortag gemessene Intensität

112,8 ± 6,0% (Mittelwert ± SD, n=13). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass eine Lagerung der derivatisierten Proben bei 4°C für 4 Wochen die Messung nicht beeinträchtigte. Die Validierungsdaten dieser Methode zeigen, dass die Analyse von ADMA bzw. dessen Methylester-PFA-Derivaten im Zellkulturmedium und im Plasma über die GC-MS als sehr präzise und akkurat angesehen werden kann. Die für die Analyse von ADMA und L-Arginin in Zelllysaten bestimmte Akkuratheit mit einer Standardabweichung von über 10% erfordert hingegen die Berechnung der ADMA- bzw. L-Arginin-Konzentrationen mit Hilfe einer Standardkurve.

Anhand der Validierung der Methode für Zellkulturüberstände unter dem Zusatz von FKS, dessen Verwendung z.B. für Zellversuche über eine Dauer von ≥ 48 Stunden notwendig ist, kann festgehalten werden, dass in diesen Proben im Gegensatz zu reinem Medium ADMA nachweisbar ist. Die Durchführung bzw. Auswertung der Zellversuche sollte unter Berücksichtigung dieser Blankkonzentrationen erfolgen. Grundsätzlich sollte eine Mediumprobe des Zellversuches parallel analysiert werden, um eine korrekte Auswertung zu ermöglichen. Zudem wurden in den unter 3.3. dargestellten Zellversuchen bei jeder Aufarbeitung Qualitätskontrollen mitgeführt.

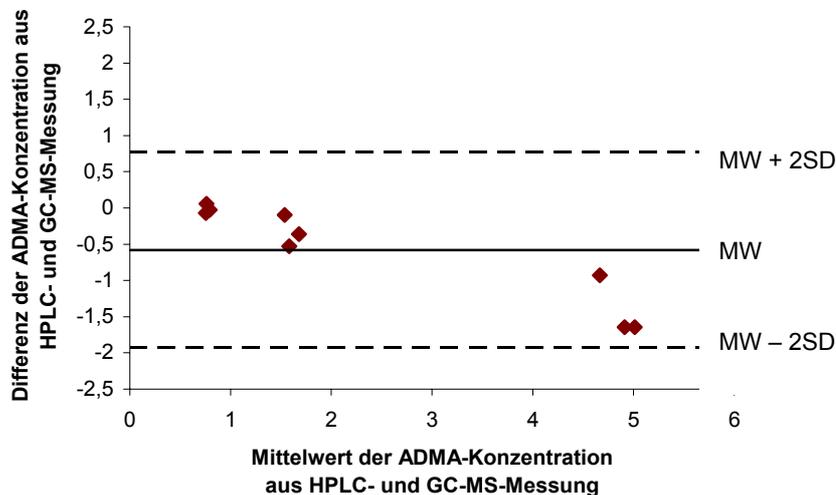
### 3.2.3. Vergleich der GC-MS- mit der HPLC-Methode hinsichtlich der Analyse des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in Plasmaproben

Plasmaproben ohne Zusatz und mit 1 µM und 5 µM ADMA wurden sowohl mit der unter 2.6. beschriebenen HPLC-Methode als auch nach den Vorschriften der validierten GC-MS-Methode analysiert (2.7.). Die erhaltenen Messergebnisse wurden, wie in Abbildung 36 zu sehen, einander gegenübergestellt.



**Abbildung 36:** Korrelation zwischen den Messdaten, erhalten aus der Analyse der Plasmaproben mit Hilfe der HPLC, und den Ergebnissen aus der GC-MS-Messung

Die Abbildung 36 zeigt, dass eine gute Korrelation zwischen den beiden Analyseverfahren bestand. Eine genauere Analyse der erhaltenen Messwerte nach einer Publikation von Bland und Altman (Bland et al. 1986), bei der die Auftragung der Differenz aus HPLC- und GC-MS-Messdaten gegen die Mittelwerte dergleichen erfolgte, ist in Abbildung 37 zu sehen.



**Abbildung 37:** Analyse der HPLC- und GC-MS-Messwerte nach einer Publikation von Bland und Altman.

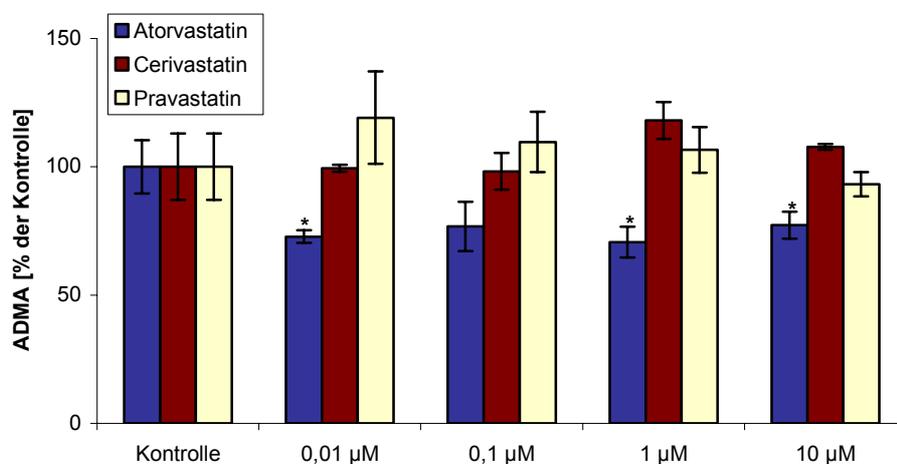
Diese Auftragung macht deutlich, dass in einem höheren Konzentrationsbereich mit Hilfe der HPLC niedrigere Konzentrationen im Vergleich zur GC-MS-Analytik bestimmt wurden.

### 3.3. Beeinflussung der Konzentration bzw. des Metabolismus des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) in Endothelzellen

Nach Validierung der Methode zur Bestimmung der Konzentration von ADMA im Zellkulturüberstand stand die Suche nach Faktoren, die auf die Konzentration des NOS-Inhibitors Einfluss nehmen, an. Dabei wurden neben HMG-CoA-Reduktasehemmern (3.3.1.), LDL, oxLDL (3.3.2.), PPAR-Agonisten (3.3.3.) und Angiotensin (3.3.4.) getestet. Untersuchungsobjekte stellten die Endothelzellen EA.hy 926 und die HCAECs dar. Die Bestimmung der ADMA-Konzentration im Zellüberstand wurde durch die Analyse der Expression und der Aktivität des ADMA abbauenden Enzyms, der DDAH, ergänzt.

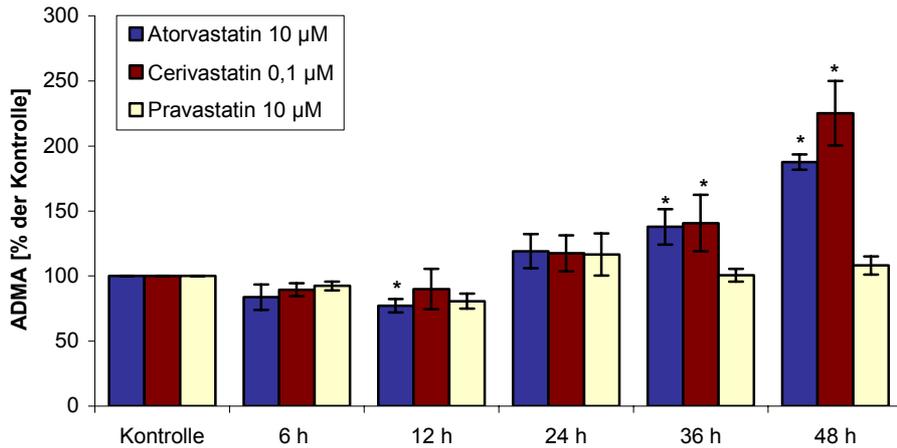
### 3.3.1. Effekte der HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine)

Die Endothelzellen EA.hy 926 wurden mit den Statinen Atorvastatin, Cerivastatin und Pravastatin in einem Konzentrationsbereich von 0,01-10  $\mu\text{M}$  für 12 Stunden inkubiert. Ausschließlich unter dem Einfluss von Atorvastatin konnte eine Reduktion der ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand bezogen auf die Zellproteine festgestellt werden. Die Konzentration von ADMA in den Kontrollproben betrug  $3,15 \pm 0,33$  pmol/ $\mu\text{g}$  Protein, während unter der Inkubation mit Atorvastatin 0,01  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Konzentrationen von  $2,29 \pm 0,07$ ,  $2,22 \pm 0,19$  und  $2,43 \pm 0,16$  pmol/ $\mu\text{g}$  Protein bestimmt wurden. Diese Konzentrationen entsprachen einer Senkung um 22-29%. Pravastatin und Cerivastatin zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen.



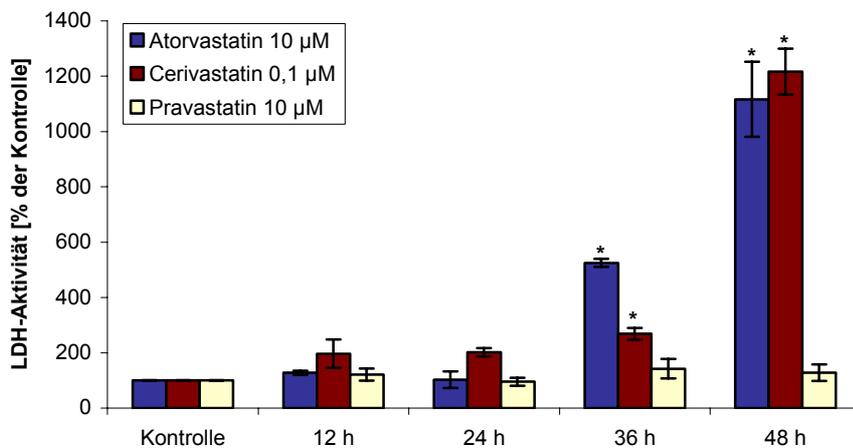
**Abbildung 38:** Veränderung der ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand unter der 12-stündigen Inkubation mit Atorvastatin, Cerivastatin und Pravastatin in EA.hy 926-Zellen (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, \*P<0,05 vs. Kontrolle).

In Abbildung 39 ist die Zeitabhängigkeit der Statineffekte auf die ADMA-Konzentration in Endothelzellen dargestellt, die deutlich zeigt, dass es in den frühen Phasen der Inkubation zu einer geringen, nicht signifikanten Abnahme der ADMA-Konzentration kam, während für die Inkubation über 36 und 48 Stunden mit Atorvastatin und Cerivastatin ein signifikanter Anstieg von ADMA zu verzeichnen war. Pravastatin schien dagegen keinen Einfluss zu besitzen.



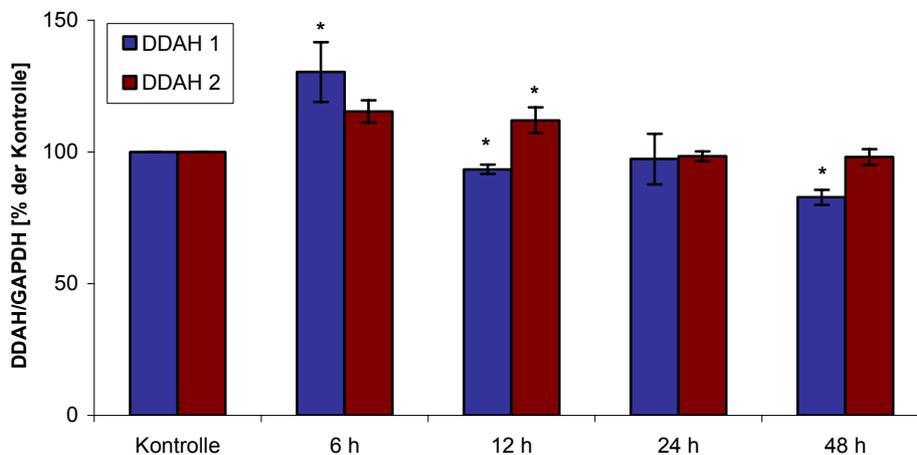
**Abbildung 39:** Einfluss von Atorvastatin 10 µM, Cerivastatin 0,1 µM und Pravastatin 10 µM auf die ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Mittelwerte ± SEM, n=4, \*P<0,05 vs. Kontrolle)

Dieser unerwartete Effekt konnte mit der Zytotoxizität der Statine unter den gewählten Inkubationsbedingungen erklärt werden (Abb. 40), über die eine Aussage mit Hilfe der Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH) in den Zellkulturüberständen möglich war. Für Atorvastatin und Cerivastatin wurde analog des Anstieges der ADMA-Konzentration unter der Inkubation über 36 und 48 Stunden ein deutlicher Anstieg der LDH-Aktivität erkannt. Das Enzym zeigte nach 48 Stunden eine um den Faktor 40,5 bzw. 47,3 erhöhte Aktivität für Atorvastatin bzw. Cerivastatin im Vergleich zu den Kontrollproben. Die Laktatdehydrogenase-Aktivität blieb dagegen unverändert unter der Inkubation mit Pravastatin.



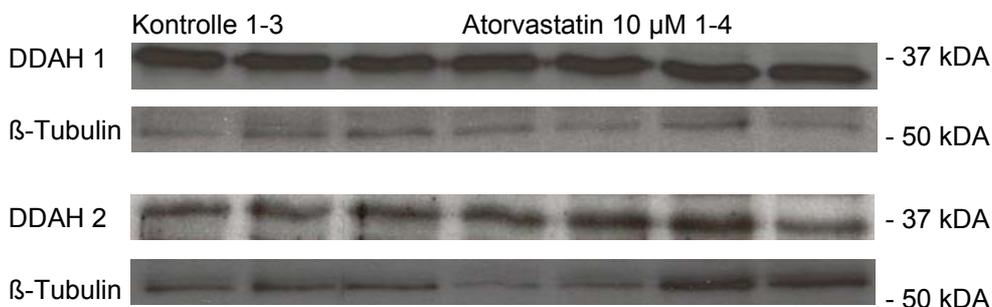
**Abbildung 40:** Ergebnis der photometrisch bestimmten Laktatdehydrogenase-Aktivität im Zellkulturüberstand (Mittelwerte ± SEM, n=4, \*P<0,05 vs. Kontrolle).

Neben der Messung der ADMA-Konzentrationen wurde ebenfalls die Expression der beiden Isoformen der DDAH (Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase) unter der Inkubation mit Atorvastatin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Die Inkubation mit Atorvastatin 10 µM über einen Zeitraum von 6 Stunden führte zu einem signifikanten Anstieg der DDAH 1-Expression um 30%, während sich die DDAH 2 unverändert zeigte. Die Abnahme der Expression der DDAH 1 und die Zunahme der Expression der DDAH 2 nach 12 Stunden lagen bei jeweils 10% und schienen sich gegenseitig aufzuheben. Die für die Inkubation von 48 Stunden zu sehende Abnahme der Expression der DDAH 1 um 17% und eine damit verbundene Reduktion des Abbaus von ADMA könnte neben den nachgewiesenen zytotoxischen Effekten der Statine zu der Erhöhung der ADMA-Konzentration beigetragen haben.

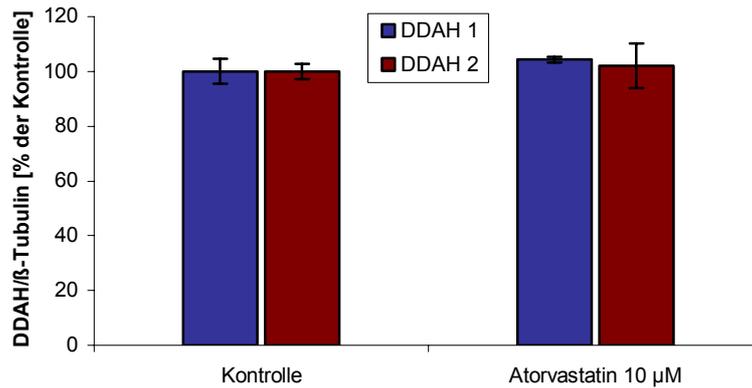


**Abbildung 41:** Semiquantitative Bestimmung der DDAH-Expression in Endothelzellen (EA.hy 926) unter dem Einfluss von Atorvastatin 10 µM für die Zeitpunkte 6, 12, 24 und 48 h (Mittelwerte ± SEM, n=4, \*P<0,05 vs. Kontrolle).

Die Untersuchung der DDAH-Expression auf Protein-Ebene fand anhand eines Western Blots statt (Abb. 42).



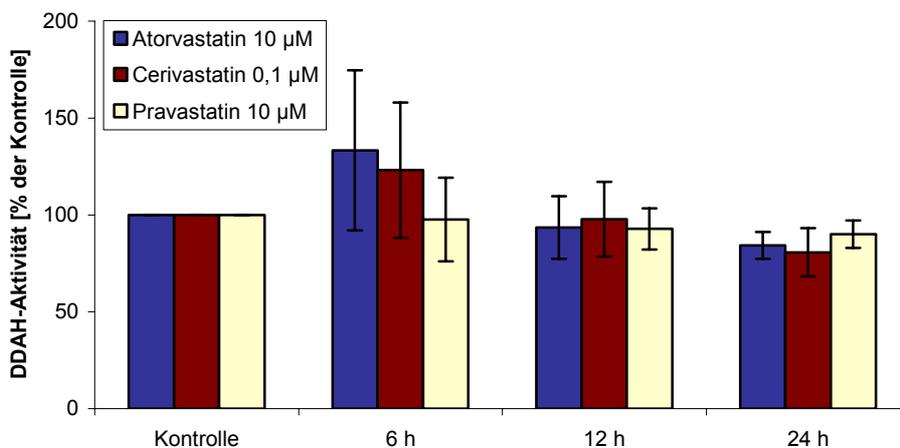
**Abbildung 42:** Western Blot der beiden DDAH-Isoformen, DDAH 1 und DDAH 2, zu einer Inkubationszeit von 12 Stunden mit Atorvastatin 10 µM in EA.hy 926-Zellen (siehe 2.10.).



**Abbildung 43:** Densitometrische Auswertung des in Abbildung 42 gezeigten Western Blots (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4).

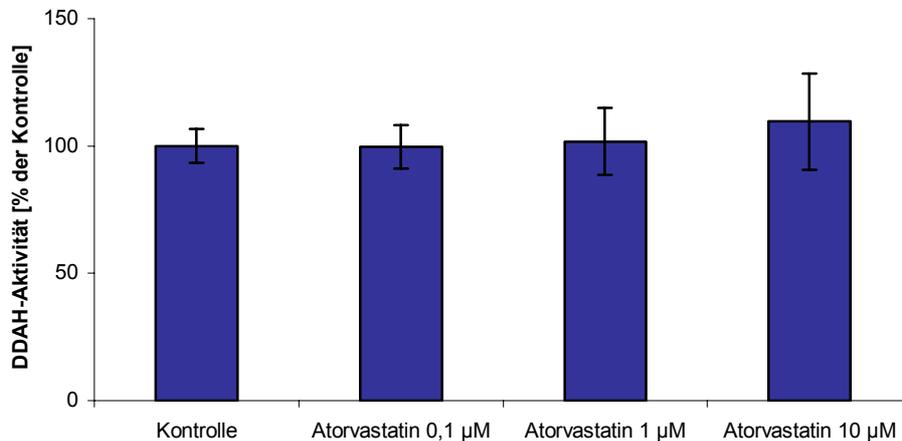
Die Analyse der Protein-Expression der DDAH-Isoformen zeigte, dass auf der Ebene der Proteine im Gegensatz zur mRNA-Ebene keine Veränderungen auftraten und die nach 6-stündiger Inkubation mit Atorvastatin (10  $\mu$ M) beobachtete Erhöhung der mRNA-Expression der DDAH 1 nicht in einer erhöhten Proteinexpression resultierte bzw. nicht in einer, die auch noch nach weiteren 6 Stunden Bestand hatte.

Die Frage, inwieweit die Aktivität des ADMA abbauenden Enzyms, der DDAH, unter dem Einfluss von Atorvastatin, Cerivastatin und Pravastatin mit den erhaltenen Ergebnissen korrelierte, wurde über die Durchführung des radioaktiven DDAH-Aktivitäts-Assays (siehe 2.8.) mit den Endothelzellen geklärt. Nach einer Inkubation der Zellen für 6 Stunden konnte eine Tendenz einer ansteigenden Aktivität des Enzyms festgestellt werden, die durchaus mit der sinkenden ADMA-Konzentration unter dem Einfluss von Atorvastatin in Zusammenhang gebracht werden könnte. Letztlich zeigten sich jedoch keine signifikanten Veränderungen.



**Abbildung 44:** Einfluss von Atorvastatin, Cerivastatin und Pravastatin auf die DDAH-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4).

Eine Wiederholung des unter Abbildung 44 gezeigten Versuches mit unterschiedlichen Konzentrationen von Atorvastatin ergab das gleiche Ergebnis. Die DDAH-Aktivität veränderte sich nicht unter der Inkubation mit 0,1, 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin für 12 Stunden, so dass die gezeigte Abnahme der ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand nicht mit einer gesteigerten Metabolisierung erklärt werden konnte.



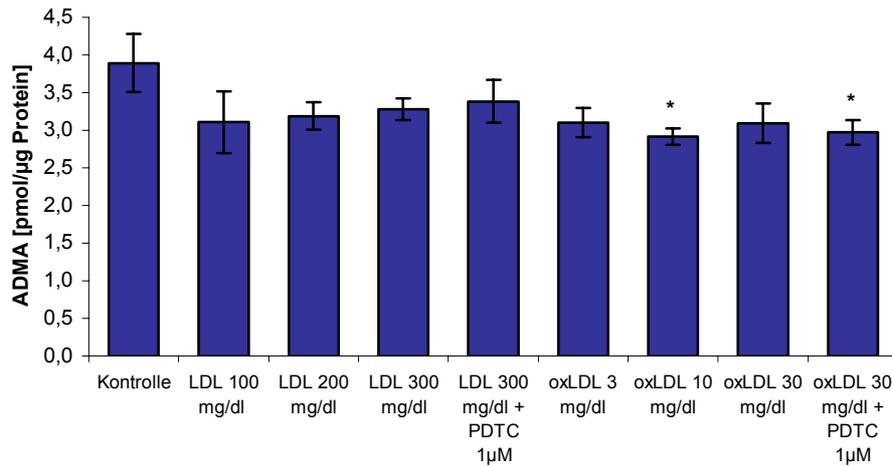
**Abbildung 45:** DDAH-Aktivität unter dem Einfluss von Atorvastatin (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) für eine Inkubationszeit von 12 Stunden (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4).

### 3.3.2. Führen LDL und oxLDL im Endothelzellversuch zu einer Erhöhung der Konzentration des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA)?

Die Endothelzellen EA.hy 926 wurden mit Konzentrationen von 100-300 mg/dl LDL bzw. 3-30 mg/dl oxLDL, welches für jeden Versuch neu aus Plasma der Blutbank isoliert wurde, für einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert.

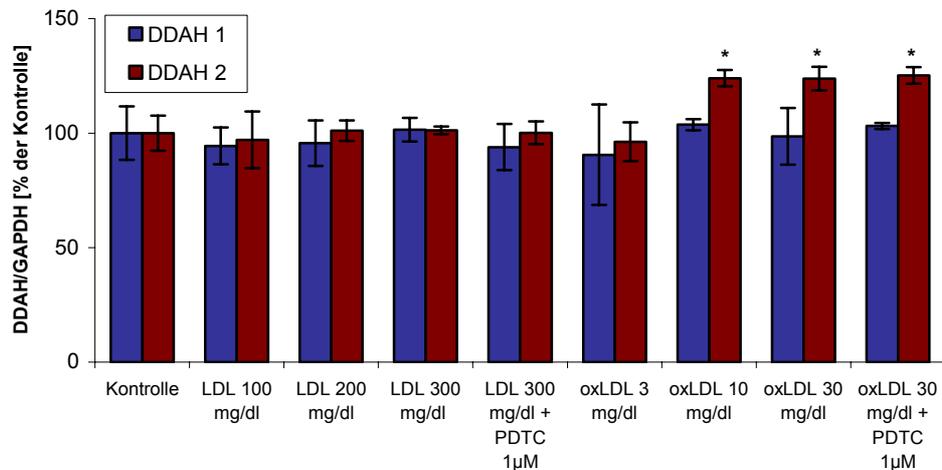
Bei der Analyse der ADMA-Konzentrationen im Zellüberstand mit Hilfe der GC-MS stellte sich heraus, dass unter dem Einfluss von oxLDL unerwartet eine Abnahme der ADMA-Konzentration zu verzeichnen war. Die Konzentration von ADMA im Zellüberstand betrug für die Kontrollen  $3,89 \pm 0,39$  pmol/ $\mu\text{g}$  Protein und für die Proben, die mit oxLDL 10 mg/dl inkubiert wurden,  $2,91 \pm 0,11$  pmol/ $\mu\text{g}$  Protein, welches einer Reduktion um 25% entsprach (Abb. 46).

Die gleichzeitige Inkubation mit PDTC (Pyrrolidindithiocarbamat) 1  $\mu\text{M}$  sollte zeigen, inwieweit oxidative Prozesse bzw. inwieweit NF- $\kappa\text{B}$  bei der Beeinflussung der ADMA-Konzentration durch LDL und oxLDL eine Rolle spielen. Da ein Effekt des LDL und oxLDL ausblieb, war eine Beurteilung der antioxidativen Eigenschaften des PDTC nicht möglich.



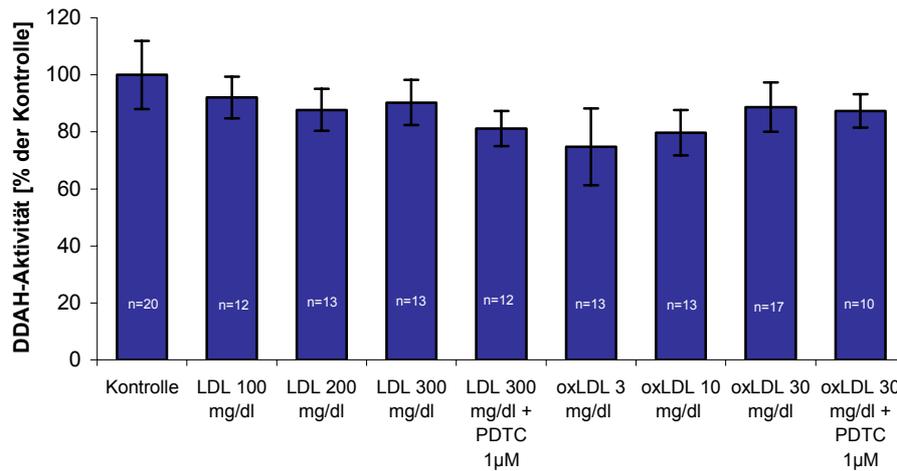
**Abbildung 46:** Inkubation der Endothelzellen EA.hy 926 mit LDL 100-300 mg/dl und oxLDL 3-30 mg/dl für einen Zeitraum von 24 Stunden (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, \*P<0,05 vs. Kontrolle).

Die Untersuchung der DDAH-Expression wurde im gleichen Versuchsansatz durchgeführt und konnte keine Veränderungen unter dem Einfluss von LDL zeigen. Die Expression der DDAH 2 stieg jedoch bei der Inkubation der Zellen mit oxLDL 10 und 30 mg/dl um 24% an.



**Abbildung 47:** Einfluss von LDL 100-300 mg/dl und oxLDL 3-30 mg/dl auf die Expression der DDAH-Isoformen in Endothelzellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, \*P<0,05 vs. Kontrolle).

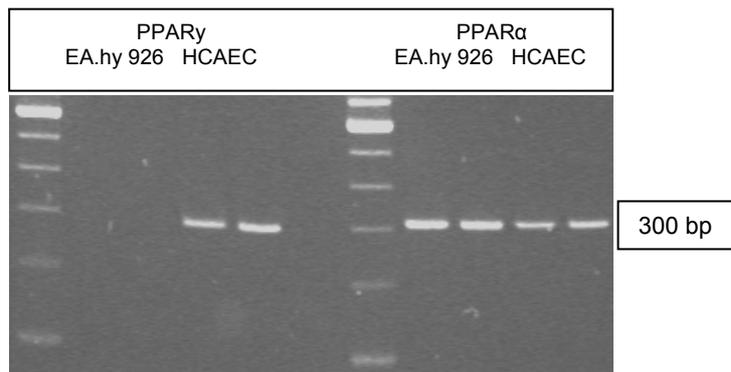
Dieser geringe Expressionsanstieg führte jedoch nicht gleichzeitig zu einem Anstieg der DDAH-Aktivität (Abb. 48). Ein gesteigerter Abbau von ADMA konnte demnach nicht als ein Grund der in Abbildung 46 gezeigten, verminderten ADMA-Konzentration im Zellüberstand angesehen werden.



**Abbildung 48:** DDAH-Aktivität nach der Inkubation von EA.hy 926-Zellen für 24 Stunden mit LDL 100-300 mg/dl bzw. oxLDL 3-30 mg/dl (Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*P<0,05 vs. Kontrolle).

### 3.3.3. Spielen die „Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ und $\gamma$ “ (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ ) als Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der DDAH-Expression eine Rolle?

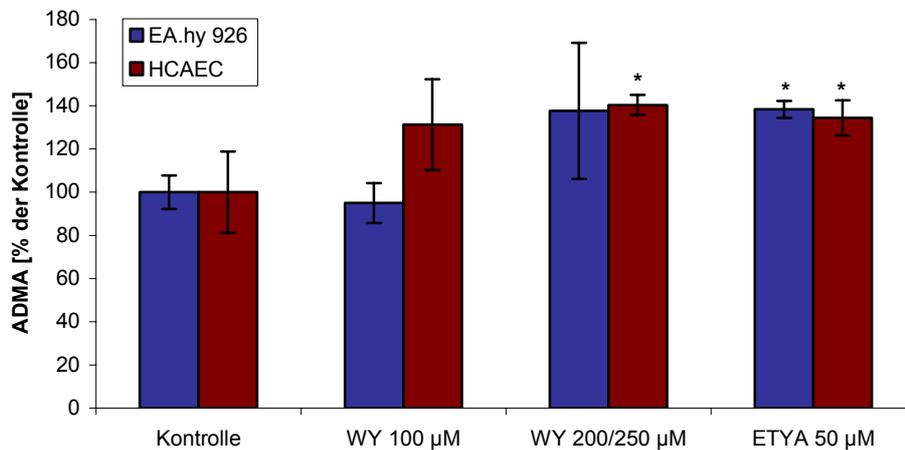
Der Nachweis der PPAR $\alpha$ - und der PPAR $\gamma$ -Isoformen auf mRNA-Ebene in den beiden Zelltypen, EA.hy 926 und HCAEC, wurde über die RT-PCR und über die Detektion im Agarosegel durchgeführt. In Abbildung 49 ist zu sehen, dass die HCAECs beide Isoformen aufwiesen, während die EA.hy 926-Zellen ausschließlich den PPAR $\alpha$  zeigten.



**Abbildung 49:** Detektion der PPAR-Isoformen auf mRNA-Ebene im Agarosegel sowohl in den EA.hy 926-Zellen als auch in den HCAECs in zweifacher Ausführung.

Nachdem der Nachweis der PPAR $\alpha$ -mRNA im Agarosegel sowohl für die EA.hy 926 und die HCAECs gelang, kamen die PPAR $\alpha$ -Aktivatoren WY 14,643 und ETYA im Zellversuch zum Einsatz. Sowohl die EA.hy 926-Zellen als auch die HCAECs wurden für 24 Stunden mit diesen Substanzen inkubiert, und neben der Bestimmung der ADMA-Konzentration im Zellüberstand wurden die DDAH-Expression auf mRNA-Ebene und die DDAH-Aktivität analysiert.

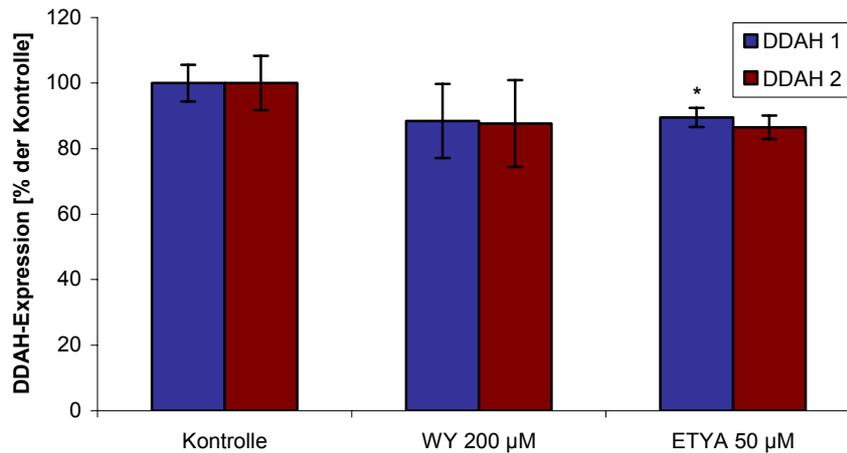
In Abbildung 50 ist zu sehen, dass es zu einem Anstieg der ADMA-Konzentration auf  $138,4 \pm 3,9\%$  in den EA.hy 926-Zellen und auf  $134,4 \pm 8,2\%$  in den HCAECs unter der Inkubation mit ETYA 50  $\mu\text{M}$  kam. Die Inkubation mit WY 14,643 in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  in HCAECs resultierte ebenfalls in einer signifikanten Steigerung der ADMA-Konzentration auf  $140,4 \pm 4,7\%$  in HCAECs.



**Abbildung 50:** Einfluss von WY 14,643 und ETYA als PPAR $\alpha$ -Aktivatoren auf die ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Zum Einsatz kamen sowohl die EA.hy 926-Zellen als auch die Primärzellen HCAECs (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, \*P<0,05 vs. Kontrolle).

Die in Abbildung 50 dargestellte Erhöhung der ADMA-Konzentration konnte nicht auf einen zytotoxischen Effekt der Substanzen zurückgeführt werden, welches durch die Messung der LDH-Aktivität im Zellüberstand analog den Statinversuchen ausgeschlossen wurde.

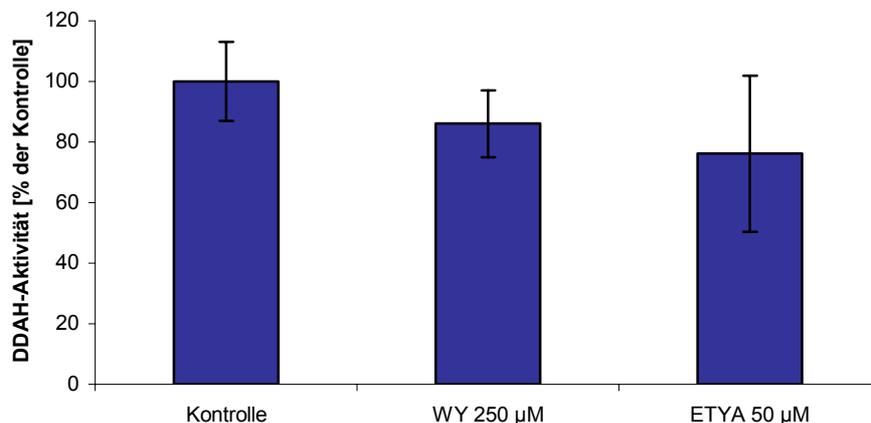
Die weitere Klärung des Mechanismus der Erhöhung der ADMA-Konzentration unter der Anwendung von PPAR $\alpha$ -Agonisten wurde ausschließlich an den EA.hy 926-Zellen durchgeführt. Eine verminderte Expression beider DDAH-Isoformen konnte unter allen gewählten Inkubationsansätzen verzeichnet werden, wobei ein signifikanter Unterschied von  $13,5 \pm 3,6\%$  in Bezug auf die DDAH 1 ausschließlich für die Substanz ETYA in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu sehen war (Abb. 51).



**Abbildung 51:** Expression der DDAH in EA.hy 926-Zellen unter der Inkubation mit WY 14,643 und ETYA für 24 Stunden (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, \*P<0,05 vs. Kontrolle).

Die Schlussfolgerung, dass ein verminderter Abbau des NOS-Inhibitors ADMA zu der erhöhten Konzentration im Zellversuch beitrug, konnte jedoch nur nach Prüfung der DDAH-Aktivität vorgenommen werden.

Die Aktivität der DDAH sank sowohl unter der Inkubation mit WY 14,643 200 µM als auch unter der Inkubation mit ETYA 50 µM um 14% bzw. 23,8%, wobei jedoch festzuhalten ist, dass diese Ergebnisse nicht signifikant waren (Abb. 52).

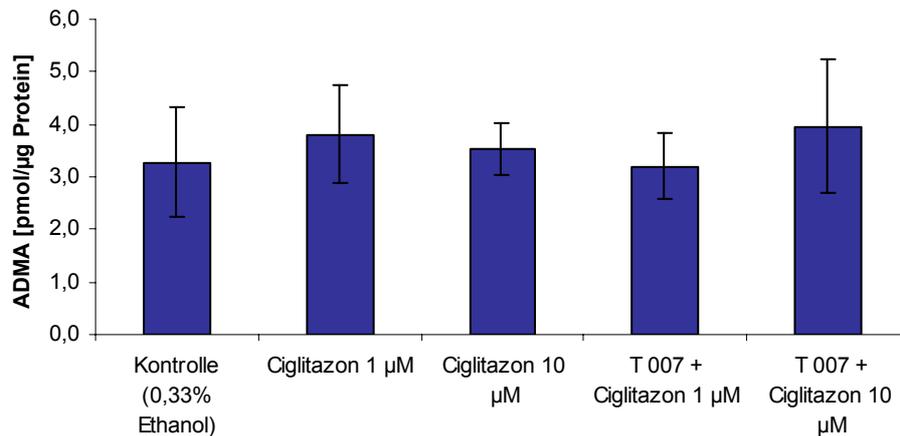


**Abbildung 52:** Bestimmung der DDAH-Aktivität in Endothelzellen (EA.hy 926) unter der Inkubation mit WY 14,643 und ETYA für einen Zeitraum von 24 Stunden (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=5, \*P<0,05 vs. Kontrolle).

Neben dem Einfluss von PPAR $\alpha$ -Agonisten sollten ebenfalls die Effekte des PPAR $\gamma$ -Agonisten Ciglitazon auf die Konzentration von ADMA untersucht werden. Aufgrund der fehlenden Existenz des PPAR $\gamma$ -Rezeptors in den EA.hy 926-Zellen wurde diese Substanz

ausschließlich in den HCAECs getestet. Weder in einer Konzentration von 1 noch von 10  $\mu\text{M}$  übte Ciglitazon innerhalb einer 24-stündigen Inkubation einen Effekt auf die ADMA-Konzentration aus, so dass der Zusatz des PPAR $\gamma$ -Antagonist T 0070907 ebenfalls keine Veränderungen hinsichtlich der ADMA-Konzentration herbeiführen konnte (Abb. 53).

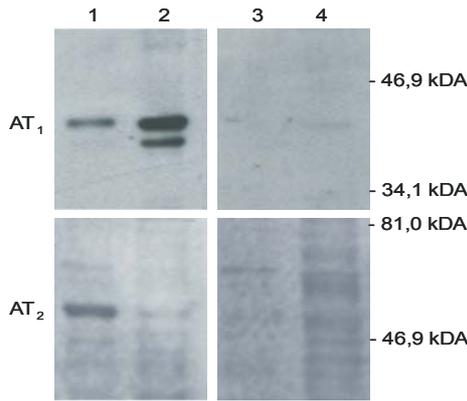
Von einer weiteren Untersuchung der DDAH-Expression und der –Aktivität wurde aus diesem Grund abgesehen.



**Abbildung 53:** Inkubation von HCAECs mit Ciglitazon-Konzentrationen von 1 und 10  $\mu\text{M}$  für 24 Stunden, u.a. in Anwesenheit des PPAR $\gamma$ -Antagonisten T 0070907 (T 007) (100 nM). (Mittelwert  $\pm$  SEM, n=5).

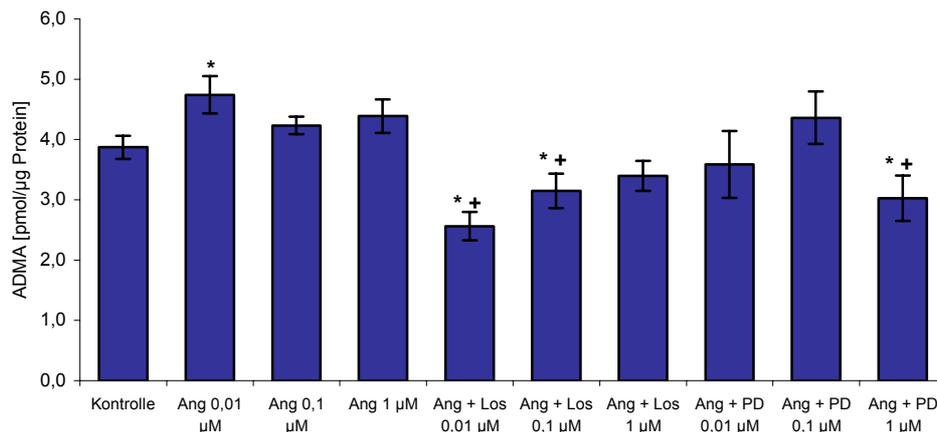
### 3.3.4. Zeigt Angiotensin II (AT II) als stark vasokonstriktorisch wirksames Peptid einen Effekt auf die ADMA-Konzentration in Endothelzellen?

Die Experimente hinsichtlich der Auswirkungen von Angiotensin II (AT II) auf die ADMA-Konzentration sollten gleichzeitig klären, über welchen Rezeptor Angiotensin die zu erwartenden Effekte ausübt, so dass zunächst der Nachweis der beiden Rezeptortypen, d.h. des AT $_1$ - und des AT $_2$ -Rezeptors, in den in dieser Arbeit verwendeten Zellen mittels Western Blot vorgenommen wurde. Sowohl die Endothelzelllinie EA.hy 926 als auch die Primärzellen HCAECs wiesen beide Rezeptoren auf (Abb. 54). Die weiteren Versuche wurden jedoch ausschließlich mit den Primärzellen durchgeführt.



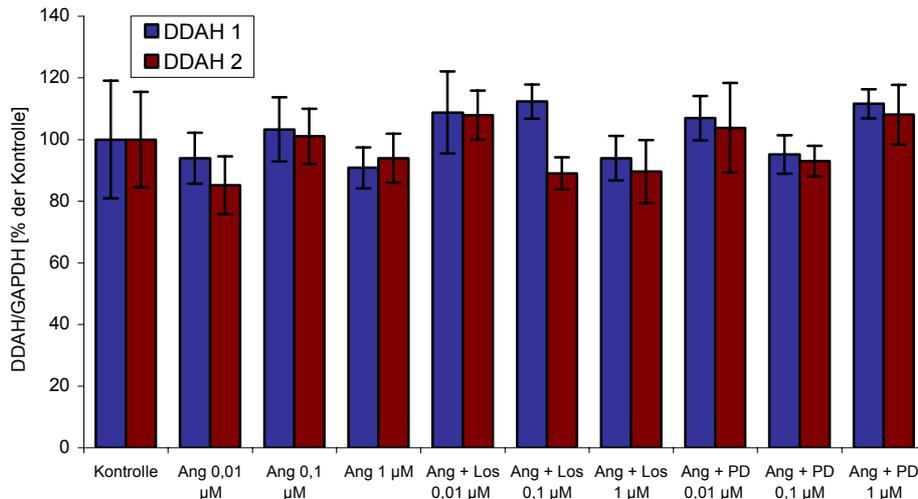
**Abbildung 54:** Nachweis der Existenz des AT<sub>1</sub>- (41 kDA) und des AT<sub>2</sub>-Rezeptors (60 kDA) in den Primärzellen HCAECs (1, 3) und in EA.hy 926-Zellen (2, 4). Zur Darlegung der Spezifität der entsprechenden Antikörper wurden für diese spezifische Blockingpeptide eingesetzt, unter deren Anwendung das durch die Bindung der Antikörper an die AT-Rezeptoren hervorgerufene Signal wieder eliminiert wurde.

Die Inkubation erfolgte entweder mit Angiotensin II in Konzentrationen von 0,01-1  $\mu\text{M}$  alleine oder in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  in Kombination mit den AT II-Rezeptor-Antagonisten Losartan (AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker) oder in Kombination mit PD 123,319 (AT<sub>2</sub>-Rezeptorblocker) für 24 Stunden. Die Abbildung 55 zeigt, dass Angiotensin in allen gewählten Konzentrationen zu einem Anstieg der ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand führte. Unter dem Einfluss von 0,01  $\mu\text{M}$  Angiotensin betrug die ADMA-Konzentration  $4,75 \pm 0,31$  pmol/ $\mu\text{g}$  Protein im Vergleich zu  $3,87 \pm 0,19$  pmol/ $\mu\text{g}$  Protein in den Kontrollproben, so dass ADMA in diesem Ansatz signifikant um 22,5% erhöht war. Eine überkompensatorische Aufhebung dieses Effektes war unter Anwendung des AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockers Losartan in einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  zu erkennen. Die ADMA-Konzentrationen wurden mit  $2,56 \pm 0,24$  bzw.  $3,14 \pm 0,29$  pmol/ $\mu\text{g}$  Protein bestimmt. Der AT<sub>2</sub>- Rezeptorantagonist PD 123,319 konnte ebenfalls den Angiotensin-Effekt kompensieren. Für die Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  PD 123,319 wurde eine ADMA-Konzentration von  $3,03 \pm 0,38$  pmol/ $\mu\text{g}$  Protein, die einer Senkung im Vergleich zur Kontrolle um 21,9% entsprach, analysiert.



**Abbildung 55:** Inkubation von HCAECs mit Angiotensin (Ang) in Konzentrationen von 0,01-1  $\mu\text{M}$  für 24 Stunden. Die Inkubation mit den Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten Losartan (Los) bzw. PD 123,319 (PD) wurde in Kombination mit Angiotensin in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  durchgeführt (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, \*P<0,05 vs. Kontrolle, +P<0,05 vs. Angiotensin 0,1  $\mu\text{M}$ ).

Die DDAH-Expression auf mRNA-Ebene wurde ebenfalls für alle Inkubationsbedingungen analysiert und ließ keine signifikanten Veränderungen erkennen (Abb. 56).



**Abbildung 56:** Expression der DDAH 1 und 2 nach der Inkubation der Primärzellen HCAECs mit Angiotensin (Ang) 0,01 µM bis 1 µM bzw. mit Angiotensin 0,1 µM in Kombination mit Losartan (Los) 0,01 µM bis 1 µM oder in Kombination mit PD 123,319 (PD) 0,01 µM bis 1 µM (Mittelwerte ± SEM, n=4).

### 3.3.5. Zusammenfassung der im Kapitel 3.3. dargestellten Ergebnisse

Die Frage, welche Faktoren den endogenen NOS-Inhibitor ADMA bzw. die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH), als ADMA metabolisierendes Enzym, beeinflussen können und vielleicht in Form neuer Therapieziele zur Senkung der Plasmakonzentration von ADMA beitragen könnten, führte zu folgenden Antworten (siehe Tabelle 9):

Unter den HMG-CoA-Reduktasehemmern (Statinen) besaß ausschließlich Atorvastatin einen ADMA-senkenden Effekt, der jedoch nur für den Inkubationszeitpunkt von 12 Stunden beobachtet werden konnte. Eine Regulation dieses Effektes durch die DDAH konnte durch die Untersuchung der Expression auf mRNA- und Protein-Ebene und der Aktivität dieses Enzyms nur bedingt belegt werden, denn eine erhöhte Expression der DDAH zeigte sich ausschließlich nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden. Die Aktivität war zu diesem Zeitpunkt ebenfalls leicht, jedoch nicht signifikant erhöht.

Während die Inkubation mit LDL keine Veränderung der ADMA-Konzentration induzierte, führte oxLDL zu einer Abnahme von ADMA im Zellüberstand, die sich zunächst mit einer Zunahme der DDAH-Expression erklären ließ. Eine Zunahme der Aktivität dieses Enzyms konnte jedoch nicht bestimmt werden, so dass die Ursache für die erniedrigten ADMA-Konzentrationen nicht in einer verstärkten Metabolisierung zu finden war.

Ein erster Hinweis auf die molekularbiologischen Prozesse, die bei der Regulation der DDAH eine Rolle spielen, ergab die Anwendung von PPAR $\alpha$ (Peroxisome proliferator-activated receptor)-Agonisten. Die Aktivierung der im Zellkern lokalisierten Transkriptionsfaktoren, der PPAR, führte zu einer Herunterregulation der DDAH sowohl auf der mRNA-Ebene als auch bezogen auf die Aktivität dieses Enzyms und resultierte damit in einem Anstieg der ADMA-Konzentration im Zellüberstand. Die Aktivitätsminderung der DDAH ist jedoch kritisch zu beurteilen, denn diese stellt kein signifikantes Ergebnis dar. Ciglitazon als Vertreter der PPAR $\gamma$ -Agonisten übte dagegen keine Effekte auf ADMA aus.

Ein Anstieg von ADMA konnte ebenfalls unter dem Einfluss von Angiotensin II beobachtet werden. Gleichzeitig war es möglich, diesen Effekt durch den Einsatz eines AT $_1$ - und eines AT $_2$ -Rezeptorantagonisten aufzuheben. Die Annahme einer Beteiligung der DDAH an diesem Effekte konnte aufgrund einer ausbleibenden Veränderung der Expression nicht bestätigt werden.

**Tabelle 9:** Zusammenstellung der unter 3.3.1.-3.3.4. dargestellten Ergebnisse

	<b>ADMA – Konzentration</b>	<b>DDAH- Expression</b>	<b>DDAH-Aktivität</b>
HMG-CoA- Reduktasehemmer (Statine)	↓ (Atorvastatin 12 h)	↑ (mRNA 6h) ↔ (Protein 12 h)	(↑) (6h)
LDL	↔	↔	↔
oxLDL	↓	↑	↔
PPAR $\alpha$ -Agonisten	↑	↓	(↓)
PPAR $\gamma$ -Agonisten	↔	n.b.	n.b.
Angiotensin II	↑	↔	n.b.
AT $_1$ - Rezeptorantagonist	↓	↔	n.b.
AT $_2$ - Rezeptorantagonist	↓	↔	n.b.

↓: Erniedrigung des Zielparameters, (↓): erkennbare, jedoch nicht signifikante Beeinflussung des Parameters, ↑: Erhöhung des Zielparameters, ↔: Parameter bleibt unbeeinflusst, n.b.: nicht bestimmt

### **3.4. Einfluss von HMG-CoA-Reduktasehemmern unterschiedlicher Halbwertszeit auf die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS)**

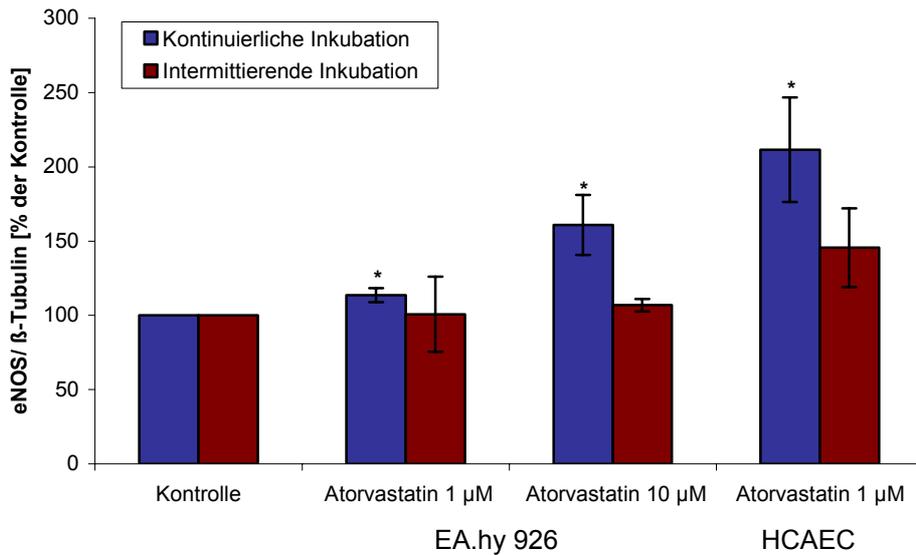
Die Endothelzellen (EA.hy 926, HCAEC) wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit Atorvastatin, Simvastatin und Pravastatin in Konzentrationen von 0,1-100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Um den Unterschied zwischen den Halbwertszeiten von Atorvastatin (HWZ ca. 14 Stunden), Simvastatin (Halbwertszeit 1-2 Stunden) und Pravastatin (Halbwertszeit 1-2 Stunden) in vitro zu simulieren, wurden die Zellen zum einen ununterbrochen mit den Statinen inkubiert, wobei alle 24 Stunden das Medium (2% FKS) mit der entsprechenden Statinkonzentration gewechselt wurde. Alternativ wurden die Zellen intermittierend alle 24 Stunden für jeweils 8 Stunden den Statinen ausgesetzt (dieser Zeitraum entspricht in etwa dem Vierfachen der Halbwertszeit von Pravastatin und damit der mittleren Verweildauer im Organismus). Nach 8 Stunden wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen und über 16 Stunden ohne Statin weiterkultiviert. Nach insgesamt 72 Stunden wurden die Proteine aus den Zellen gewonnen und die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) untersucht (2.10.).

Die Inkubation der Endothelzellen mit Pravastatin in Konzentrationen von 0,1, 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  konnte weder für das kontinuierliche noch für das intermittierende Inkubationsschema über einen Zeitraum von 72 Stunden einen Anstieg der Expression der eNOS zeigen. Die Durchführung der Versuche mit den primären humanen Koronararterienendothelzellen und einer Pravastatin-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  bestätigten dieses Ergebnis. Die Hydrophilie des Pravastatins und der damit verbundenen schwierigen Passage durch die Zellmembran diente als Erklärungsansatz für dieses Phänomen. Die weiteren Versuche wurden aus diesem Grund ausschließlich mit Atorvastatin und Simvastatin fortgeführt.

Atorvastatin war in einem Konzentrationsbereich oberhalb von 10  $\mu\text{M}$  für die Hybridomzellen und oberhalb von 1  $\mu\text{M}$  für die empfindlicheren Primärzellen über den Inkubationszeitraum von 72 Stunden toxisch. Simvastatin besaß in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  toxische Effekte auf beide Zelltypen.

Die kontinuierliche Inkubation mit Atorvastatin in einer Konzentration von 1 und 10  $\mu\text{M}$  über den gesamten Zeitraum von 72 Stunden führte in beiden Zelltypen zu einer signifikanten Erhöhung der eNOS-Expression (Abb. 57, Tabelle 10). Die Expression stieg auf  $113,5 \pm 4,8\%$  bzw.  $160 \pm 20,3\%$  für Atorvastatin 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  in EA.hy 926-Zellen und auf  $211,4 \pm 35,2\%$  für Atorvastatin 1  $\mu\text{M}$  in HCAECs an. Die intermittierende Inkubation mit Atorvastatin dagegen besaß keine Auswirkungen auf die eNOS.

Die Daten der Abbildung 57 entsprechen der densitometrischen Auswertung der in Tabelle 10 dargestellten Western Blots.



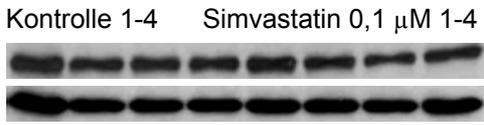
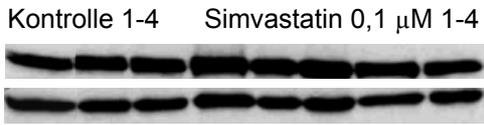
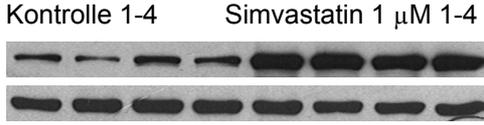
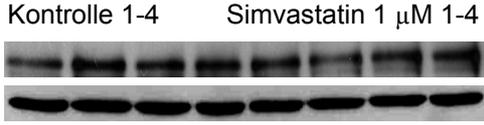
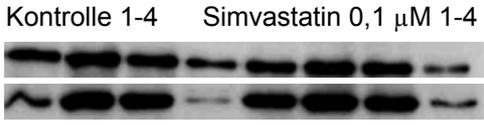
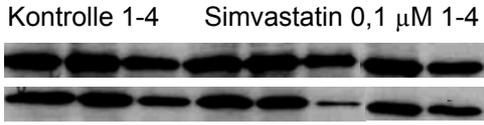
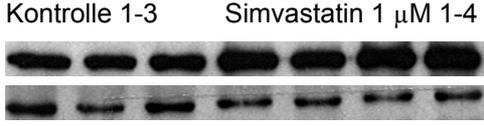
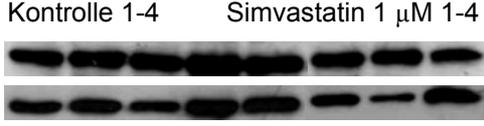
**Abbildung 57:** Einfluss von Atorvastatin auf die Expression der endothelialen NO-Synthase nach der kontinuierlichen und der intermittierenden Inkubation über einen Zeitraum von 72 Stunden in der Endothelzelllinie EA.hy 926 und in den primären humanen Koronararterienendothelzellen (HCAECs) (Mittelwert ± SEM, n=4-5, \*P<0,05).

**Tabelle 10:** Darstellung der eNOS-Expression nach Auftrennung der Zellproteine mit Hilfe der SDS-Page-Gelelektrophorese, anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran und der Detektion über einen Röntgenfilm für die Inkubation der EA.hy 926-Zellen und der HCAECs mit Atorvastatin in Konzentrationen von 1 und 10 μM. Die eNOS besitzt ein Molekulargewicht von 145 kDA und β-Tubulin von 55 kDA.

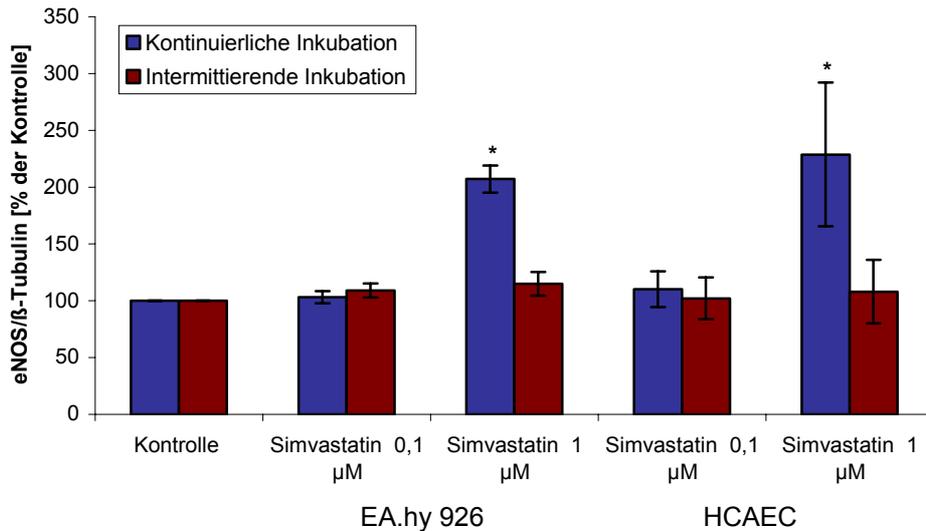
EA.hy 926	<u>Kontinuierliche Inkubation</u>		<u>Intermittierende Inkubation</u>	
	Kontrolle 1-4	Atorvastatin 1 μM 1-4	Kontrolle 1-4	Atorvastatin 1 μM 1-4
eNOS				
β-Tubulin				
EA.hy 926	<u>Kontinuierliche Inkubation</u>		<u>Intermittierende Inkubation</u>	
	Kontrolle 1-4	Atorvastatin 10 μM 1-4	Kontrolle 1-3	Atorvastatin 10 μM 1-4
eNOS				
β-Tubulin				
HCAEC	<u>Kontinuierliche Inkubation</u>		<u>Intermittierende Inkubation</u>	
	Kontrolle 1-3	Atorvastatin 1 μM 1-4	Kontrolle 1-3	Atorvastatin 1 μM 1-4
eNOS				
β-Tubulin				

Die Inkubation mit Simvastatin 1  $\mu\text{M}$  zeigte für das kontinuierliche Inkubationsmuster eine Erhöhung der Expression der eNOS auf  $207,2 \pm 12\%$  in EA.hy 926-Zellen und auf  $228,8 \pm 63,4\%$  in HCAECs (Abb. 58, Tabelle 11). Weiterhin konnte unter der intermittierenden Inkubation mit Simvastatin 1  $\mu\text{M}$  keine Veränderung in Bezug auf die Protein-Expression festgestellt werden.

**Tabelle 11:** Darstellung der eNOS-Expression in EA.hy 926-Zellen und HCAECs nach der Inkubation mit Simvastatin 0,1 und 1  $\mu\text{M}$ .

EA.hy 926	<u>Kontinuierliche Inkubation</u>	<u>Intermittierende Inkubation</u>
eNOS $\beta$ -Tubulin	Kontrolle 1-4    Simvastatin 0,1 $\mu\text{M}$ 1-4 	Kontrolle 1-4    Simvastatin 0,1 $\mu\text{M}$ 1-4 
eNOS $\beta$ -Tubulin	Kontrolle 1-4    Simvastatin 1 $\mu\text{M}$ 1-4 	Kontrolle 1-4    Simvastatin 1 $\mu\text{M}$ 1-4 
HCAEC	<u>Kontinuierliche Inkubation</u>	<u>Intermittierende Inkubation</u>
eNOS $\beta$ -Tubulin	Kontrolle 1-4    Simvastatin 0,1 $\mu\text{M}$ 1-4 	Kontrolle 1-4    Simvastatin 0,1 $\mu\text{M}$ 1-4 
eNOS $\beta$ -Tubulin	Kontrolle 1-3    Simvastatin 1 $\mu\text{M}$ 1-4 	Kontrolle 1-4    Simvastatin 1 $\mu\text{M}$ 1-4 

Die densitometrische Auswertung der in Tabelle 11 dargestellten Western Blots ist in Abbildung 58 zusammengefasst.



**Abbildung 58:** Einfluss von Simvastatin auf die Expression der endothelialen NO-Synthase nach der kontinuierlichen und der intermittierenden Inkubation über einen Zeitraum von 72 Stunden in der Endothelzelllinie EA.hy 926 und in den primären humanen Koronararterienendothelzellen (HCAECs) (Mittelwert ± SEM, n=4-5, \*P<0,05).

Abschließend ist festzuhalten, dass sowohl Atorvastatin als auch Simvastatin unter der kontinuierlichen Inkubation und damit unter der Imitation einer langen Halbwertszeit eine deutliche Steigerung der eNOS-Expression zu verantworten hatten, während die intermittierende Inkubation in einer unveränderten Expression resultierte. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Effekte nicht von dem Statin selbst abhängen und es keinen Unterschied macht, ob Atorvastatin oder Simvastatin zum Einsatz kommt, sondern dass die Dauer der Inkubation von Bedeutung zu sein scheint.

## 4. Diskussion

### 4.1. Charakterisierung des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins (ADMA) als kompetitiven Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS)

Die Versuche an der rekombinanten, endothelialen Rinder-NO-Synthase haben gezeigt, dass ADMA als ein kompetitiver Inhibitor anzusehen ist, d.h. ADMA verdrängt das Substrat L-Arginin kompetitiv von der Bindungsstelle des aktiven Zentrums, so dass die Hemmung durch einen Überschuss an L-Arginin aufgehoben werden kann. Unter diesen Voraussetzungen kann ADMA als möglicher Erklärungsansatz des L-Arginin-Paradoxon dienen (siehe 1.1.3.). Der strukturelle Vergleich von ADMA und L-Arginin legte bereits nahe, dass diese Substanzen kompetitiv konkurrieren, doch kürzlich veröffentlichte Experimente mit einer neuronalen NO-Synthase zeigten, dass ADMA an dieser Isoform als nicht-kompetitiver Inhibitor agiert (Tsikas et al. 2000b). Die bisher vielfach in Publikationen postulierte Charakterisierung von ADMA als kompetitiven Inhibitor ohne Vorliegen eines experimentellen Beweises schien plötzlich nicht mehr uneingeschränkt haltbar.

In Tabelle 12 sind die erhaltenen Parameter für die [<sup>15</sup>N]-Nitrit-Bildung durch die eNOS den veröffentlichten Werten für die nNOS gegenübergestellt.

**Tabelle 12:** Vergleich der Parameter der [<sup>15</sup>N]-Nitrit-Bildung für die nNOS (Tsikas et al. 2000b) und die eNOS basierend auf den Lineweaver-Burk-Darstellungen

	K <sub>M</sub> (μM L-[ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-Arginin)	V <sub>max</sub> (nmol [ <sup>15</sup> N]-Nitrit/ min x mg NOS)	IC <sub>50</sub> (μM ADMA)	Ki (μM ADMA)	Kii (μM ADMA)
nNOS	4,6	228	1,5	0,4	0,6
	K <sub>M</sub> (μM L-[ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-Arginin)	V <sub>max</sub> (nmol [ <sup>15</sup> N]-Nitrit/ min x mg NOS)	IC <sub>50</sub> (μM ADMA)	Ki (μM ADMA)	
eNOS	7,40	0,931	12,78	4,14	

Die Unterschiede zwischen den beiden Isoformen lagen neben dem bereits erwähnten unterschiedlichen Mechanismus der Hemmung der Synthesen durch ADMA in der Potenz der Hemmung. Die Experimente an der isolierten neuronalen NO-Synthase wiesen für ADMA einen IC<sub>50</sub>-Wert von 1,5 μM auf, während ADMA für die eNOS mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von ungefähr 12 μM einen eher schwachen Inhibitor darstellte. Hinsichtlich der [<sup>15</sup>N]-Nitrit-Produktionsrate besaß die nNOS eine 220mal höhere spezifische Aktivität als die eNOS,

wogegen die  $K_M$ -Werte für L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin kaum voneinander abwichen. Die beschriebenen Unterschiede könnten in der abweichenden Aminosäuresequenz der beiden Isoformen begründet liegen. Der Vergleich der Aminosäuresequenz der menschlichen NOS-Isoformen weist eine 52-58%ige Übereinstimmung auf. Die Proteinsequenzen der Regionen, die NADPH, Flavine und Calmodulin binden, sind jedoch in allen Isoformen der verschiedenen Spezies identisch (Alderton et al. 2001). Unterschiede der nNOS und der eNOS bestehen vor allem in den Aminosäuresequenzen am Amino- und am Carboxy-Terminus. Die nNOS besitzt im Gegensatz zu der eNOS eine N-terminale PDZ-Zone (**PSD-95 discs large/ZO-1** homology domain, PSD: post synaptic density protein), die für die Lokalisation der nNOS an den synaptischen Orten im Gehirn oder in Muskeln und für die Membranassoziation an Neuronen verantwortlich ist (Alderton et al. 2001). Diese Zone erklärt die unterschiedlichen Molekulargewichte der beiden Isoformen. Während die eNOS ein Molekulargewicht von 135 kDa aufweist, beträgt das Molekulargewicht der nNOS 160 kDa (Andrew et al. 1999). Der unterschiedliche Mechanismus der Hemmung der nNOS- und der eNOS-Aktivität sollte jedoch in Unterschieden des aktiven Zentrums der beiden Isoformen gesucht werden. Es ist wahrscheinlich, dass der Austausch von einzelnen Aminosäuren im aktiven Zentrum zu einer stärkeren Bindung von ADMA an der nNOS führt, die keiner L-Arginin-Interaktion zugänglich ist. Welche Unterschiede des aktiven Zentrums vorliegen, könnte durch Computer-Modelling einzelner Regionen der aktiven Zentren der NOS-Isoformen bestimmt werden, welches verstärkt für die Suche nach selektiven NOS-Inhibitoren verwendet wird (Ji et al. 2003).

Die eNOS stellt im Gegensatz zur nNOS ein Enzym dar, welches mit der Plasmamembran oder mit intrazellulären Organellen, wie dem Golgi-Komplex, assoziiert ist. Die Regulation der subzellulären Lokalisation der eNOS zwischen der Zelloberfläche und intrazellulären Strukturen ist im Zusammenhang mit der Interaktion der eNOS mit Caveolin zu sehen, die unter Basalbedingungen zur Hemmung der NOS-Aktivität führt (Feron et al. 1998). Erst durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zum Ersatz der inhibitorischen Bindung mit Caveolin und zum Anstieg der NOS-Aktivität (Michel et al. 1997). Eine co-translationale Myristylierung und eine post-translationale Palmylierung sind für die effiziente Lokalisation der NOS an die Plasmamembran verantwortlich (Förstermann et al. 1994), so dass die Experimente am isolierten Enzym differenziert zu beurteilen sind. Mutationen, die zu der Substitution der Aminosäure Glycin durch Alanin führten, resultierten in einem zu 92% zytosolischen Enzym (Sessa et al. 1993). Kinetische Analysen dieses mutierten Enzyms zeigten, dass dieses die gleichen  $K_M$ -Werte von 2-4  $\mu$ M für L-Arginin aufwies. Die Mutation bzw. die Bindung an die Membran scheint die Funktion des Enzyms somit nicht zu beeinflussen (Sessa et al. 1993).

Unabhängig von der Membranassoziation der eNOS ist die Untersuchung am isolierten Enzym dennoch kritisch zu bewerten. Hinweise auf die Diskrepanz zwischen den

Ergebnissen, die mit Hilfe der isolierten Enzyme erhalten wurden, und denen aus der Endothelzellkultur geben u.a. die aus der Arbeitsgruppe von Hardy veröffentlichten Daten (Hardy et al. 2002). Die  $K_M$ -Werte der eNOS aus Zellextrakten betragen ungefähr 2  $\mu\text{M}$ , während die eNOS in intakten Zellen einen  $K_M$ -Wert von 29  $\mu\text{M}$  L-Arginin aufwies.

ADMA erscheint in diesen Experimenten mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von ungefähr 12  $\mu\text{M}$  nur als schwacher Inhibitor der eNOS. Diese Daten stimmen mit den von MacAllister und seiner Arbeitsgruppe im Jahre 1994 durchgeführten Versuchen überein, bei denen verschiedene Guanidinverbindungen hinsichtlich ihres hemmenden Effektes auf die endothelabhängige Relaxation an menschlichen Venen getestet wurden. ADMA inhibierte die Relaxation um 50% in einer Konzentration von  $17,9 \pm 4,9 \mu\text{M}$  (MacAllister et al. 1994b).

Der hohe  $\text{IC}_{50}$ -Wert gibt jedoch Anlass zur Diskussion hinsichtlich der klinischen Relevanz dieser Beobachtung, denn wie in der Einleitung bereits beschrieben, liegen die ADMA-Plasmakonzentrationen in einem Bereich von 0,3-1  $\mu\text{M}$  bei gesunden Probanden. Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. mit klinisch manifester Arteriosklerose oder terminaler Niereninsuffizienz weisen 2 bzw. 3,5- oder 10,4-fach höhere Plasmakonzentrationen auf (Böger et al. 1998b, Miyazaki et al. 1999, Vallance et al. 1992a, Al Banchaabouchi et al. 2000, Zoccali et al. 2001). Nur bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz lägen somit ADMA-Konzentrationen vor, die eine 50%ige Hemmung der NOS ausüben würde. In diesem Zusammenhang ist jedoch darauf hinzuweisen, dass bisher keine genauen Untersuchungen hinsichtlich der intrazellulären Konzentrationen von L-Arginin, ADMA und  $\text{N}^G$ -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) in Endothelzellen, in Neuronen oder in Makrophagen existieren, obwohl diese im Vergleich zu Plasmakonzentrationen von größerer Bedeutung sein sollten. Daten aus Endothelzellkulturen sind diesbezüglich kritisch zu bewerten, da deren Kultivierung in L-Arginin-haltigem Medium und ADMA-haltigem FKS zu einer Beeinflussung der Konzentrationen führt.

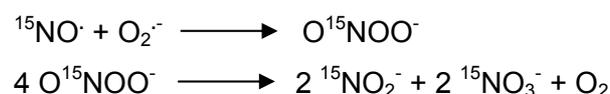
Sollte ADMA tatsächlich einen geringeren Effekt auf die NOS-Aktivität besitzen und unter diesem Aspekt eine nicht sehr ausgeprägte Rolle bezogen auf das L-Arginin-Paradoxon spielen, so könnten weitere bzw. additive Erklärungen für das L-Arginin-Paradoxon, z.B. in der Überexpression der Arginase gesehen werden, die L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff umsetzt. Unter physiologischen Bedingungen liegt der  $K_M$ -Wert von L-Arginin bei 2-20 mM für die Arginase, verglichen mit 2-20  $\mu\text{M}$  für die NOS (Grody et al. 1987). Dieses Enzym besitzt jedoch eine 1000mal höhere maximale Geschwindigkeit im Vergleich zur NOS, so dass unter Umständen eine veränderte Aktivität und Expression dieses Enzyms an der Regulation der NOS beteiligt sein könnte (Griffith et al. 1995, Wu et al. 1998). Die Arginindecarboxylase (ADC) spielt bei der L-Arginin-Metabolisierung ebenfalls eine Rolle und katalysiert die Reaktion von L-Arginin zu Agmatin und Kohlendioxid. Weiterhin besteht die

Theorie, dass eine Entkopplung der NOS unter einem Mangel an L-Arginin zu beobachten ist, der aus der kompetitiven Hemmung des  $\gamma^+$ -Transport-Systems durch ADMA hervorgehen könnte (1.1.3.). Eine Kopplung des Transports der Aminosäuren mit der Regulation der NOS wird vielfach aufgrund der benachbarten Lage der beiden Systeme auf der Zellmembran diskutiert (Hardy et al. 2002). Neben einem verminderten Transport in die Zelle könnte auch eine Verteilung bzw. Speicherung des L-Arginins in bestimmten Kompartimenten innerhalb der Zelle zu einer beeinträchtigten NO-Synthese führen. Außerdem werden L-Arginin direkte antioxidative Eigenschaften zugesprochen (Lass et al. 2002). Eine exogene L-Arginin-Zufuhr könnte all diese Mechanismen beeinflussen, indem sie die Hemmung durch ADMA sowohl an der eNOS als auch am  $\gamma^+$ -Transporter überwindet. Durch eigenes antioxidatives Wirken könnten Superoxidradikalanionen abgefangen bzw. inaktives Dihydrobiopterin ( $BH_2$ ) in aktives Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ) reduziert werden, welches wiederum eine Entkopplung der NOS und damit Produktion von Superoxidradikalanionen aufheben könnte (siehe 1.1.2.).

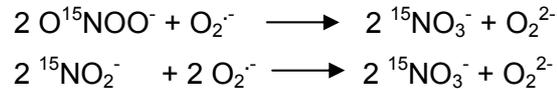
Ein weiterer interessanter Unterschied zwischen der nNOS und der eNOS betraf das molare Verhältnis der Reaktionsprodukte [ $^{15}N$ ]-Nitrit zu [ $^{15}N$ ]-Nitrat. Die nNOS-Inkubation führte zu einem molaren Verhältnis von 1:2 (Tsikas et al. 2000b), während die eNOS [ $^{15}N$ ]-Nitrit und [ $^{15}N$ ]-Nitrat unter fast identischen Inkubationsbedingungen in einem Verhältnis von 1:1 produzierte. Diese unterschiedlichen Verhältnisse könnten mit einer unterschiedlichen Synthese von  $^{15}NO\cdot$  und Superoxidradikalanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) erklärt werden.

Es ist erwiesen, dass alle Isoformen der NOS neben  $NO\cdot$  ebenfalls Superoxidradikalanionen produzieren können (Vasquez-Vivar et al. 1998, Pou et al. 1999), wobei die nNOS im Vergleich zur eNOS eine deutlich größere Menge an  $O_2^{\cdot-}$  freisetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die NADPH-Oxidation, die mit der Bildung von Superoxidradikalanionen in direktem Zusammenhang steht und zur Entkopplung der NOS beiträgt, in der nNOS viel schneller abläuft als in der eNOS und der iNOS, was auf ein höheres Reduktionspotential des Häm in der nNOS zurückzuführen ist (Andrew et al. 1999).

Unter physiologischen Bedingungen unterliegt  $NO$  der Autoxidation im Wasser und reagiert zu Nitrit und Nitrat in einem Verhältnis von 1:1. Unter der Annahme der Produktion von Superoxidradikalanionen durch die nNOS könnten diese mit dem  $^{15}NO\cdot$  zu Peroxynitrit reagieren, welches 1:1 zu [ $^{15}N$ ]-Nitrit und [ $^{15}N$ ]-Nitrat zerfällt.



Die weitere Oxidation des Peroxynitrits oder des aus dem Peroxynitrit entstandenen [<sup>15</sup>N]-Nitrits durch Superoxidradikalanionen könnte die Verschiebung des Verhältnisses von [<sup>15</sup>N]-Nitrit/[<sup>15</sup>N]-Nitrat zugunsten von [<sup>15</sup>N]-Nitrat erklären.



Diese Reaktionsmechanismen wurden der Deutung der im Kapitel 3.1.2. dargestellten Ergebnisse zugrunde gelegt. Die Beobachtung, dass ADMA in keiner der gewählten Konzentrationen von 1, 2, 5 und 10 µM das molare Verhältnis von [<sup>15</sup>N]-Nitrit zu [<sup>15</sup>N]-Nitrat verändert (siehe 3.1.2. Abb. 28, 29), lässt vermuten, dass ADMA keinen Einfluss auf die Produktion von Superoxidradikalanionen durch die eNOS besitzt.

Steigende ADMA-Plasmakonzentrationen wurden unter pathophysiologischen Bedingungen beobachtet, die sowohl mit einer verminderten NO-Produktion als auch mit vermehrtem oxidativen Stress einhergehen, so dass ADMA häufig als pro-oxidative Substanz diskutiert wird, die zu einer Entkopplung, d.h. zu einer vermehrten Produktion von Superoxidradikalanionen, durch die NOS führt. Sowohl bei Patienten mit Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Hyperhomocysteinämie als auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Niereninsuffizienz wurden neben einer Verschlechterung der Endothelfunktion, eine gesteigerte O<sub>2</sub><sup>·-</sup>-Produktion oder eine gesteigerte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Produktion, ein Marker für oxidativen Stress, und erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen bestimmt (Böger et al. 1998b, Lin et al. 2002, Sydow et al. 2003, Landmesser et al. 2002, Anuk et al. 2001).

Die hier dargestellten Daten weisen jedoch darauf hin, dass nicht ADMA oxidativen Stress ausübt und eine Entkopplung der eNOS hervorruft, sondern eher oxidativer Stress zu einer erhöhten ADMA-Konzentration führt, die wiederum eine verstärkte Hemmung der NOS nach sich zieht. Die Arbeitsgruppe von Vasquez-Vivar hat gezeigt, dass der NOS-Inhibitor N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) die Produktion von Superoxidradikalanionen durch die eNOS nicht beeinflussen kann (Vasquez-Vivar et al. 1998), was mit unseren Ergebnissen übereinstimmen würde, sofern eine Übertragung der Daten aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von L-NMMA und ADMA zulässig ist. Diese Beobachtungen stehen den an der induzierbaren und den an der neuronalen NOS erhaltenen Daten gegenüber, die eine Steigerung der Superoxidradikalanionenproduktion unter der Inkubation mit N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) zeigten, welche einer gesteigerten Oxidation des NADPH und damit einem gesteigerten Elektronentransfer auf Sauerstoff zugeschrieben werden konnte (Olken et al. 1993, Pou et al. 1999). Die verschiedenen NOS-Isoformen scheinen sich hinsichtlich einiger Charakteristika voneinander zu unterscheiden. Experimente mit ADMA an den

einzelnen isolierten Isoformen der NOS und die Bestimmung der Superoxidradikalanionbildung stehen noch aus, um den genauen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Endotheldysfunktion, gesteigertem oxidativem Stress und erhöhten ADMA-Konzentrationen aufzuklären.

## 4.2. Analytik des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginins mittels GC-MS

### 4.2.1. Bedeutung des N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Dimethyl-L-Arginins ([<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA) als interner Standard

Die Analyse von ADMA mit Hilfe der GC-MS scheiterte bisher an dem Mangel eines adäquaten, internen Standards. Kommerziell sind weder radioaktiv-markiertes noch Isotopen-markiertes ADMA zu erwerben. Bei der Synthese von Isotopen-markiertem ADMA, ausgehend von Isotopen-markiertem L-Arginin, kann nicht mit einer spezifischen Bildung von N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) gerechnet werden. Es würde ein Gemisch unterschiedlicher L-Argininderivate entstehen, wie z.B. N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (SDMA), N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und ADMA, aus dem ADMA durch aufwendige Aufreinigungen isoliert werden müsste. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Veresterung der Carboxylgruppe von ADMA mit deuteriertem Methanol ([<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Methanol), bei der dreifach deuteriertes ADMA entsteht (Tsikas et al. 2003). Da die Umsetzung zum Ester nicht vollständig erfolgt, besteht das Problem der verbleibenden Ausgangssubstanz, dem unmarkiertem ADMA, in dem Reaktionsgemisch, so dass eine Quantifizierung schwer möglich ist. Die Synthese, ausgehend von L-Ornithin und Bromcyan-aktivierter Agarose, stellt eine günstige Alternative dar, die ausschließlich ohne weitere Aufreinigungsschritte zu ADMA führt. Dieses Syntheschema bietet die Möglichkeit, sowohl [<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-ADMA aus L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Ornithin, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA aus L-[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Ornithin oder auch aus unmarkiertem Ornithin und [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Dimethylamin Isotopen-markiertes ADMA herzustellen.

Die Synthese von [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA aus L-[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Ornithin wurde gewählt, da in diesem Fall eine höhere Isotopenreinheit zu erwarten war als bei der Synthese von [<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-ADMA. Die Deuterierung der Dimethylgruppe an der Guanidinogruppe bot dagegen das Risiko, dass bei der Fragmentierung im MS Zielionen entstehen, die diese Gruppe gar nicht oder nur noch zum Teil tragen. Die Synthese führte zu [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA mit einer Isotopenreinheit von 99,9%. Die Ausbeute von unter 1%, die bei der Synthese erreicht werden konnte, ist als eher unbefriedigend zu bezeichnen, doch kann dieser Nachteil unter Berücksichtigung der unkomplizierten und ohne Aufreinigungsschritte durchzuführenden Synthese akzeptiert werden. Ausgehend von 125 mg L-[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Ornithin entspricht die Ausbeute einer

synthetisierten Menge von ungefähr 1,25 mg [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA, welche für die Aufarbeitung bzw. Analyse von z.B. 30000 Zellkulturüberständen ausreicht.

Neben der Funktion als interner Standard könnte das synthetisierte [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA ebenfalls für Metabolisierungsversuche in der Zellkultur oder in Tierversuchen eingesetzt werden. Weitere Verwendungsmöglichkeiten für das Isotopen-markierte ADMA sind in einem DDAH-Aktivitätsassay zu sehen. Die in dieser Arbeit dargestellte Methode zur Bestimmung der DDAH-Aktivität erfolgte unter Verwendung von radioaktiv-markiertem L-NMMA, welches die Messung der Aktivität nur in wenigen Versuchsansätzen zuließ (siehe 2.8.). Die Analyse von aus [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA über die DDAH entstandenem L-[ $^2\text{H}_6$ ]-Citruillin wäre denkbar und würde ein einfacheres Arbeiten erlauben.

#### **4.2.2. Beurteilung der GC-MS-Methode zur Analyse von $\text{N}^G, \text{N}^G$ -Dimethyl-L-Arginin (ADMA)**

Die Kombination von Gaschromatographie bzw. Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS, LC-MS) erweist sich als sehr empfindlich und ermöglicht daher die Detektion äußerst geringer Substanzmengen. In jüngster Zeit wurden Methoden zur Analyse von  $\text{N}^G, \text{N}^G$ -Dimethyl-L-Arginin veröffentlicht, die auf der Gaschromatographie (GC) bzw. Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie beruhen (Tsikas et al. 2003, Martens-Lobenhoffer et al. 2003). Die beiden Arbeitsgruppen verwendeten die GC-MS bzw. die LC-MS zur quantitativen Bestimmung von ADMA im Plasma und im Urin. Die LC-MS-Methode verlangte ein Plasmavolumen von 250  $\mu\text{l}$  und eine Trennung der Aminosäuren nach einer Proteinpräzipitation und Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd über eine HPLC. Die Verwendung der HPLC ersetzte die aufwendige Reinigung der Proben mit Kationen-Austauschersäulen und die Derivatisierung, die für die Analyse mit Hilfe der GC notwendig ist. Der Einsatz des L-[ $^{13}\text{C}_6$ ]-Arginins als internen Standard sowohl für L-Arginin als auch für ADMA und SDMA ist kritisch zu beurteilen. Zudem erschien ADMA in den Chromatogrammen als zweifacher Peak, und das Detektionslimit wurde für die Bestimmung von ADMA mit 0,2  $\mu\text{M}$  angegeben, welches für die Analyse von Plasmaproben, jedoch nicht von Zellüberständen ausreicht. Unter diesen Gesichtspunkten ist die von Tsikas veröffentlichte Methode mittels GC-MS positiver zu bewerten. Ein Plasmavolumen von 100  $\mu\text{l}$  wurde nach Ultrafiltration mit Pentafluoropropionsäure derivatisiert und analysiert. Diese Methode verwendete das bereits im oberen Abschnitt erwähnte [ $^2\text{H}_3$ ]-Methylester-ADMA als internen Standard, dessen Synthese nicht quantitativ verläuft und somit unmarkiertes ADMA beinhaltet. Das Detektionslimit wurde mit 0,1  $\mu\text{M}$  für ADMA bestimmt. Diesen kritischen Punkten der bisher existierenden Publikationen konnte mit der in dieser Arbeit validierten

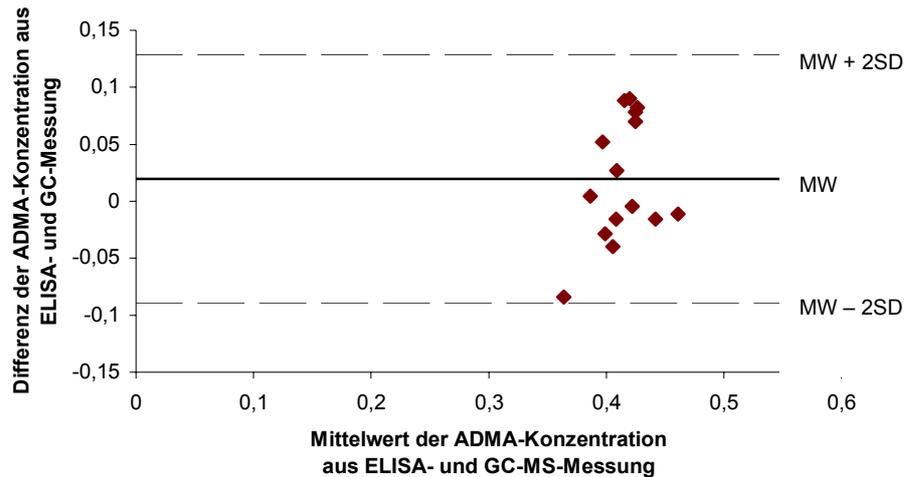
Methode begegnet werden. Die GC-MS-Methode wurde unter Einsatz des internen Standards [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA, auf den bereits im oberen Abschnitt eingegangen worden ist, zunächst für Zellüberstände validiert und erlaubte eine selektive und sensitive Bestimmung von ADMA bei einem LOD (limit of detection) von 2 fmol bzw. einem LOQ (limit of quantification) von 0,05  $\mu\text{M}$ . Bei der Beurteilung des Detektionslimits ist zu berücksichtigen, dass in diesem Fall Medium ohne FKS, in dem sich kein ADMA befand, der Bestimmung dieses Parameters diene und nicht Plasmaproben mit eigener ADMA-Konzentration von 0,3-1  $\mu\text{M}$  verwendet wurden. Die Akkuratheit mit einem Wert von unter 105% und die Präzision mit einem Wert von unter 2,9% sind als sehr hoch einzustufen. Die gleichzeitige Bestimmung von L-Arginin im Zellüberstand ist aufgrund des hohen L-Arginingehaltes des Mediums nicht sinnvoll. Die Analyse von SDMA unter den gegebenen Bedingungen erfordert leider einen weiteren für SDMA spezifischen Standard. Da in zahlreichen Studien jedoch bereits gezeigt wurde, dass SDMA keinen hemmenden Einfluss auf die eNOS besitzt bzw. keine Veränderungen der SDMA-Konzentrationen bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren zu verzeichnen ist, wurde auf die Entwicklung eines entsprechenden Standards verzichtet. Diese entwickelte GC-MS-Methode wurde bei der Durchführung von in vitro-Experimenten, deren Ergebnisse im Kapitel 3.3. dargestellt wurden, erfolgreich eingesetzt. Die gemessenen Konzentrationen von ADMA, bezogen auf die Proteinkonzentration für eine Inkubationszeit von 24 Stunden, lag im Bereich von  $3,88 \pm 0,29$  pmol/ $\mu\text{g}$  Protein (n=8 aus 2 unabhängigen Versuchen). Ein direkter Vergleich mit Konzentrationsangaben aus anderen veröffentlichten Zellversuchen ist schwer durchzuführen, da die Angaben oftmals auf die Zellzahl anstelle der Zellproteine bezogen werden und die Verwendung von Medium unter dem Zusatz von FKS die Ergebnisse verfälscht.

Die Übertragung dieser Methode auf die Analyse von Plasmaproben und Zelllysaten führte zu ebenso guten Ergebnissen und zeigte die Vorteile einer großen Akkuratheit und Präzision, hohen Empfindlichkeit und Interferenzfreiheit. Für diese beiden Matrices konnte durch Zusatz von L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin als interner Standard die gleichzeitige Messung von L-Arginin vorgenommen werden. Diese Methode verlangt nur ein Plasmavolumen von 50  $\mu\text{l}$ , so dass eine Analyse von Ratten- bzw. Mäuseplasmaproben uneingeschränkt möglich ist. Die in der Gruppe von 10 gesunden Probanden gemessenen Plasmakonzentrationen von  $0,60 \pm 0,08$   $\mu\text{M}$  ADMA stimmen mit bisherigen Veröffentlichungen überein, die ADMA-Plasmakonzentrationen von  $0,34 \pm 0,16$  bis  $1,3 \pm 0,2$   $\mu\text{M}$  analysiert haben (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Zusammenstellung der bisher analysierten Plasmakonzentrationen von ADMA unter Berücksichtigung der verwendeten Analysemethoden und beobachteten Patientengruppen:

ADMA-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Messmethode	Größe der Patientengruppe	Alter der Patientengruppe	Weitere Charakteristika	Literaturangabe
$0,40 \pm 0,17$	HPLC, OPA-Derivatisierung	51 Männer	25-40 Jahre		Janatuinen et al. 2003
$1,03 \pm 0,09$	HPLC, OPA-Derivatisierung	31		Normotensiv, Nicht-Raucher	Böger et al. 1998b
$1,3 \pm 0,2$	HPLC, OPA-Derivatisierung	18 (5 Männer, 13 Frauen)		Keine Hypercholesterinämie, Nicht-Raucher	Chan et al. 2000
$0,34 \pm 0,16$	HPLC, OPA-Derivatisierung	65		Nicht-Diabetiker	Paiva et al. 2003
$1,1 \pm 0,7$	HPLC, OPA-Derivatisierung	11		Normotensiv	Surdacki et al. 1999
$1,15 \pm 0,13$	HPLC, Kapillarelektrophorese	6 (5 Männer, 1 Frau)	22-48 Jahre		Vallance et al. 1992a
$0,45 \pm 0,13$	LC-MS	15			Martens-Lobenhoffer et al. 2003
$0,39 \pm 0,06$	GC-MS	12	23-64	Nicht-Raucher	Tsikas et al. 2003

Der direkte Vergleich der HPLC mit der GC-MS-Methode für Plasmaproben ließ eine gute Korrelation zwischen den beiden Verfahren erkennen, die sich allerdings auf einen niedrigen Konzentrationsbereich von 1-2  $\mu\text{M}$  ADMA beschränkte (siehe 3.2.3.). Unter dem Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  ADMA zeigten sich anhand der Darstellung nach Bland und Altman (1986) insofern deutliche Abweichungen, als dass die Messergebnisse der HPLC unter den Ergebnissen der GC-MS lagen. Die gleichzeitige Messung von 15 Zellüberständen mit der GC-MS und einem kürzlich entwickelten ELISA der Firma DLD Diagnostika GmbH führte, wie in Abbildung 59 zu sehen, ebenfalls zu einheitlichen Messergebnissen.



**Abbildung 59:** Korrelation von ADMA-Konzentrationen bestimmt in 15 Zellkulturüberständen mittels GC-MS und ELISA, analysiert nach Bland-Altman (Bland et al. 1986).

Die in dieser Arbeit validierte GC-MS-Methode kann jedoch im Gegensatz zum ELISA auf die Analytik anderer Aminosäuren übertragen werden, deren quantitative Bestimmung z.B. im Zuge der Untersuchung bisher unentdeckter Metabolisierungswege von ADMA oder der Untersuchung des Einflusses von ADMA auf verschiedene Enzymsysteme, die L-Arginin metabolisieren, von Interesse sein könnte. In diesem Zusammenhang sind die Analyse von Agmatin, welches durch Decarboxylierung von L-Arginin entsteht, und die Messung von L-Ornithin, das aus L-Arginin unter dem Einfluss der Arginase freigesetzt wird, zu erwähnen.

#### 4.3. Diskussion über die Einflussnahme verschiedener Faktoren auf die Konzentration des $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-Arginins (ADMA)

Inzwischen sind einige klinische Studien veröffentlicht worden, die eine Senkung der ADMA-Konzentration im Plasma unter verschiedenen Therapien beobachten konnten. So wurde von einer niederländischen Forschergruppe im Zuge der Hormonersatztherapie mit konjugierten Estrogenen (Teerlink et al. 2003) bzw. von der Arbeitsgruppe von Asagami unter der Therapie von Patienten mit Typ 2 Diabetes mit Metformin eine Abnahme der ADMA-Konzentration bestimmt (Asagami et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit, die Einblick in weitere therapeutische Ansatzpunkte geben sollten, werden im Folgenden diskutiert.

#### **4.3.1. Effekte der HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine)**

Neben der Cholesterin-senkenden Aktivität besitzen Statine, wie in der Einleitung bereits erwähnt, zahlreiche pleiotrope Effekte, die u.a. die Wiederherstellung der endothelabhängigen Vasodilatation beinhalten. Erklärt wird diese Beobachtung mit der in vitro untersuchten Erhöhung der eNOS-Expression nach Inkubation mit Statinen (siehe Abschnitt 3.4.). Die Einflussnahme dieser Substanzklasse auf erhöhte ADMA-Konzentrationen könnte ebenfalls an diesem pleiotropen Effekt teilhaben. Aufgrund der erhöhten ADMA-Konzentrationen sowohl in Tieren als auch in Menschen mit Hypercholesterinämie (Böger et al. 1997a, Böger et al. 1998b) und des therapeutischen Einsatzes der Statine bei dieser Erkrankung, schien diese Substanzklasse ein ideales Therapiekonzept gegen den NOS-Inhibitor darzustellen. Ein Effekt der Statine auf die Expression der DDAH hätte zudem erste Hinweise auf die Regulation dieses Enzyms durch posttranslationale Modifikationen mit Isopentanyl-, Geranyl- oder Farnesylpyrophosphat geliefert (Abb. 9, 1.2.5.1.).

Diese Hypothese konnte durch die in dieser Arbeit dargestellten Daten jedoch nicht bestätigt werden, da der Effekt von Statinen auf die Freisetzung von ADMA aus humanen Endothelzellen als äußerst gering zu beurteilen ist. Atorvastatin reduzierte die ADMA-Konzentration nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden um circa 30%, während Cerivastatin und Pravastatin keinen Effekt besaßen. Diese Reduktion der ADMA-Konzentration war nicht von Dauer, denn über die Inkubationszeit von 12 Stunden hinaus führten sowohl Atorvastatin und Cerivastatin zu einer signifikanten Erhöhung von ADMA im Zellüberstand. Diese Beobachtung konnte mit der Zytotoxizität dieser Substanzen in Zusammenhang gebracht werden, die anhand der Laktatdehydrogenaseaktivität (LDH-Aktivität) im Medium bestimmt wurde. Pravastatin, welches keinen Einfluss auf die LDH-Aktivität nahm, zeigte ebenso keine Effekte hinsichtlich der ADMA-Konzentration, der DDAH-Expression oder -Aktivität zu keiner der gewählten Inkubationszeiten bzw. eingesetzten Konzentrationen. Der Unterschied von Pravastatin zu allen anderen bekannten Substanzen der Wirkstoffgruppe der Statine liegt in seiner chemischen Struktur und der sich daraus ergebenden Hydrophilie, aus der eine deutlich geringere Fähigkeit zur Passage durch die Zellmembran resultiert (Quion et al. 1994).

Die Reduktion der ADMA-Freisetzung nach der 12-stündigen Inkubation mit Atorvastatin konnte nicht mit einer erhöhten DDAH-Expression und DDAH-Aktivität, d.h. mit einem erhöhten Abbau von ADMA begründet werden. Die mRNA-Expression der DDAH 1 nach einer Inkubation von 6 Stunden stieg zwar um ca. 30% an, doch resultierte diese nach weiteren 6 Stunden nicht wie erwartet in einer erhöhten Protein-Expression des DDAH-Enzyms. In gleicher Weise konnte nach 6 Stunden zwar eine tendenzielle, aber nicht

signifikante Erhöhung der Aktivität der DDAH beobachtet werden, die sich ebenfalls nach insgesamt 12 Stunden normalisiert zu haben schien. Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass es sich bei dem für Atorvastatin spezifischen Effekt hinsichtlich der ADMA-Konzentration nur um eine transiente und nicht sehr ausgeprägte Beobachtung handelt, dessen klinische Relevanz äußerst fraglich erscheint.

Der Effekt von Statinen auf die Plasmakonzentration von ADMA in Patienten mit Hypercholesterinämie wurde inzwischen auch in verschiedenen klinischen Studien mit unterschiedlichen Statinen untersucht. Eid und seine Arbeitsgruppe berichteten von der Behandlung mit 40 mg Pravastatin pro Tag für einen Zeitraum von 8 Wochen. Sie konnten bei 32 hypercholesterinämischen Patienten keine Änderung weder der ADMA-Konzentration noch des L-Arginin/ADMA-Verhältnisses beobachten (Eid et al. 2003). Während diese Daten mit unserer Erkenntnis, dass Pravastatin nicht in die Endothelzellen eindringen kann, übereinstimmen, wurden ähnliche Befunde auch mit anderen, lipophilen Statinen erhalten. Paiva und seine Kollegen fanden unveränderte Konzentrationen von ADMA im Plasma unter der 8-wöchigen Anwendung von Simvastatin (80mg/Tag) oder Atorvastatin (40 mg/Tag) in einer doppelblinden, randomisierten Studie mit 48 Patienten mit milder Hypercholesterinämie (Paiva et al. 2003). Die Arbeitsgruppe von Böger untersuchte kürzlich den Effekt von Simvastatin 40 mg/Tag innerhalb von 3 Wochen an 15 Probanden mit erhöhten ADMA-Plasmakonzentrationen und konnte ebenfalls keine Effekte des Statins auf ADMA beobachten (Böger et al. 2004). Selbst in der bisher größten, randomisierten, kontrollierten Studie, der ENCORE I Studie, in der bei 343 Patienten die ADMA-Konzentrationen im Plasma während einer 6-monatigen Behandlung mit 0,4 mg/Tag Cerivastatin bestimmt wurden, konnte kein ADMA vermindender Effekt von Cerivastatin erkannt werden (ENCORE Investigators 2003, unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe Böger).

Dennoch spielt ADMA eine bedeutende Rolle hinsichtlich der therapeutischen Effekte der Statine. Janatuinen analysierte neben der Konzentration von ADMA vor und nach Behandlung mit Pravastatin für 6 Monate den myokardialen Blutfluss mittels Positronen-emissionstomographie (PET) (Janatuinen et al. 2003). Während Pravastatin keinen signifikanten Effekt hinsichtlich der ADMA-Konzentration besaß, konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass Pravastatin zu einer Verbesserung des myokardialen Blutflusses nur bei Patienten mit ADMA-Konzentrationen unterhalb des Medians führte. Diese Beobachtungen können einfach mit dem inhibitorischen Effekt hoher ADMA-Konzentrationen auf die NO-Produktion erklärt werden, so dass der Schluss zulässig erscheint, dass Statine ausschließlich bei Patienten mit niedriger ADMA-Konzentration eine Verbesserung des endothelabhängigen Blutflusses erreichen können. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Böger, die eine Verbesserung der Endothelfunktion nach Simvastatin-Behandlung bei Patienten mit erhöhten ADMA-Konzentrationen nur unter der

gleichzeitigen Anwendung von L-Arginin, welches den inhibitorischen Effekt von ADMA auf die NO-Synthese kompetitiv aufheben kann, darlegten (Böger et al. 2004).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass unsere in vitro Daten die inzwischen existierenden klinischen Ergebnisse unterstützen und den Statinen einen klinisch relevanten Effekt hinsichtlich der ADMA-Konzentration bzw. der DDAH-Expression und -Aktivität im Plasma absprechen.

#### **4.3.2. Einfluss von LDL und oxLDL**

Im Jahr 2000 ist von der Arbeitsgruppe Böger gezeigt worden, dass in primären Koronararterienendothelzellen (HCAECs) die konzentrationsabhängige Zunahme von ADMA unter dem Einfluss von LDL und oxLDL auf eine gesteigerte Bildung dieses NO-Synthase-Inhibitors durch die PRMTs zurückgeführt werden kann (Böger et al. 2000b). Hintergrund der in dieser Arbeit durchgeführten weitergehenden Untersuchungen hinsichtlich des Metabolismus von ADMA waren Daten, die die gleichzeitige Inkubation von Endothelzellen mit LDL und dem DDAH-Inhibitor S-2-amino-4(3-methylguanidino)butansäure (4124W) ergeben haben. Unter der Ausschaltung beider DDAH-Isoformen durch 4124W wurde kein zusätzlicher Anstieg der ADMA-Konzentration im Vergleich zu der alleinigen Inkubation mit LDL festgestellt, was den Schluss zuließ, dass die Beteiligung der PRMTs an dem beschriebenen LDL-Effekt schwindend gering sein muss.

Die in dem Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellten Effekte sowohl von LDL als auch von oxLDL konnten die von Böger et al. beschriebenen Anstiege der ADMA-Konzentration unter dem Einfluss derselben Faktoren nicht reproduzieren (Böger et al. 2000b). Im Gegensatz dazu wurde anstelle eines Konzentrationsanstiegs eine 25%ige Abnahme von ADMA durch oxLDL im Zellkulturüberstand der Endothelzelllinie EA.hy 926 beobachtet. Die zunächst geltende Erklärung eines verstärkten Abbaus von ADMA durch die veränderte DDAH 2-Expression war nach Bestimmung der DDAH-Aktivität nicht mehr haltbar. Dagegen spiegelten sich die ausbleibenden Effekte von LDL sowohl in einer unveränderten DDAH-Expression als auch in einer gleichbleibenden DDAH-Aktivität wider.

Ein Teil der Ergebnisse stimmt mit den von der Arbeitsgruppe von Ito veröffentlichten Daten überein (Ito et al. 1999). In der Endothelzelllinie ECV 304 konnte für oxLDL 3 und 10 mg/dl keine veränderte Expression der DDAH 1 weder nach 24 noch nach 48 Stunden detektiert werden. Zum Zeitpunkt dieser Publikation wurde die zweite Isoform der DDAH erst bekannt, so dass deren Nachweis in diesem Zusammenhang nie erfolgte. In Bezug auf die DDAH-Aktivität wurde von Ito et al. dagegen eine Abnahme durch oxLDL 10 mg/dl unter Anwendung des gleichen Assays, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde, dargestellt.

Allerdings betrug die Senkung nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden nur 30% im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise wird der Einfluss von LDL auf die DDAH-Aktivität in keiner Weise erwähnt, welches eine unveränderte Aktivität vermuten lässt.

Die Arbeit von Ito stellte für die DDAH die Hypothese auf, dass über oxidative Prozesse eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem an der Regulation zahlreicher Gene beteiligten Transkriptionsfaktor, erfolgt, und untermauerte diese durch die analoge Erniedrigung der DDAH-Aktivität unter der Inkubation mit TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  kann von nahezu allen Zelltypen produziert werden und übt zahlreiche biologische Effekte aus, die z.T. über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erklärt werden können. Unterstützt wurde diese Vermutung weiterhin durch die gleichzeitige Inkubation von LDL und oxLDL mit PDTC (Pyrrolidindithiocarbamat) in der Publikation von Böger et al. (2000b), bei der PDTC den Anstieg der ADMA-Konzentration unter dem Einfluss von LDL und oxLDL wieder aufhob. PDTC kann nicht nur als Antioxidanz angesehen werden, sondern gilt ebenso als Inhibitor von NF- $\kappa$ B, dessen Einsatz in dieser Arbeit erste Daten zu der Regulation der DDAH auf der Transkriptionsebene liefern und die Hypothese von Ito bestätigen sollte. Darüber hinaus wurden Versuche mit den antioxidativ wirksamen Vitaminen E und C in Kombination mit LDL und oxLDL durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob die LDL- und oxLDL-Effekte mit diesen Vitaminen ohne Hemmung von NF- $\kappa$ B aufgehoben werden können (Daten sind nicht mit in den Ergebnisteil aufgenommen worden). Bezogen auf die ADMA-Konzentration besaßen aufgrund der ausbleibenden Stimulierung durch LDL und oxLDL weder PDTC noch die Vitamine Effekte.

Wie kann eine solche Abweichung der Ergebnisse erklärt werden? Zum einen sind die verwendeten Zelltypen zu berücksichtigen. Sowohl in der Veröffentlichung von Böger et al. (2000b) als auch von Ito et al. (1999) und in dieser Arbeit wurden Endothelzellen für die Untersuchungen herangezogen. Die Arbeitsgruppe um Böger verwendete humane Koronararterienendothelzellen (HCAECs), die Gruppe um Ito arbeitete mit der Endothelzelllinie ECV 304, während die Ergebnisse dieser Arbeit mit der Endothelzelllinie EA.hy 926 erzielt wurden. Denkbar wäre der Mangel bzw. die Abwandlung bestimmter Transkriptionsfaktoren in der Hybridomzelllinie EA.hy 926. So wurde festgestellt, dass diese Zelllinie im Gegensatz zu den Primärzellen, den HCAECs, nicht alle 4 Isoformen der PRMTs aufweist (2.2.). Mit Hilfe der RT-PCR wurde die PRMT 1-Isoform, die den am stärksten exprimierten Vertreter der 4 Isoformen in Säugern darstellt (Tang et al. 2000), als fehlend identifiziert. Die Endothelzellen EA.hy 926 könnten somit als PRMT 1-knockout-Zellen angesehen werden, und die ausbleibende Erhöhung der ADMA-Konzentration könnte mit dem Fehlen dieser Isoform erklärt werden. Diese Beobachtungen sprechen wiederum für den dominanten Einfluss der PRMT 1-Isoform bei den von Böger und seiner Arbeitsgruppe in HCAECs

dargestellten LDL- und oxLDL-Effekten und weniger für eine Beteiligung der DDAH (Böger et al. 2000b).

Die Beurteilung der LDL- und oxLDL-Effekte sollte weiterhin unter der Berücksichtigung der unterschiedlichen Zusammensetzung des LDL und oxLDL erfolgen, welches für jeden Versuchsansatz frisch herzustellen war, und für das aufgrund der großen benötigten Ausgangsmenge an Plasma für jeden Versuch verschiedene Spender zur Verfügung standen. Die Konzentration an Cholesterin wurde zwar bestimmt, doch sieht die Einbettung in Form der Lipoproteine von Versuch zu Versuch anders aus (Abb. 10). So konnte z.B. nachgewiesen werden, dass ein LDL-Partikel mit einem um 5% kleineren Durchmesser schon eine um 50% erhöhte Aufnahme in die Arterienwand zeigt. Gravierender ist sicherlich der Unterschied zwischen den verwendeten oxidierten Lipoproteinen zu beurteilen, deren Herstellung in jeder Publikation anders vorgenommen wird. Die Angaben zu der Oxidation des LDL variieren von Publikation zu Publikation und erlauben diesen Prozess über Zeiträume von 8-36 Stunden und bei Temperaturen von 4-37°C. Der Grad der Oxidation bzw. die Anwesenheit von Hydroperoxiden wird zumeist über die Bestimmung der TBA(Thiobarbiturat)-aktiven Substanzen mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse angegeben (Asakawa et al. 1979). Diese Überprüfung des Ausmaßes der Oxidation des LDL war innerhalb dieser Arbeit leider nicht möglich.

Interessanterweise ist außer den bereits beschriebenen Publikationen von Böger et al. (2000b) und Ito et al. (1999) bis zum heutigen Zeitpunkt nur eine weitere Veröffentlichung von Jiang bekannt, in der ausschließlich oxLDL, nicht aber LDL nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden analog der Arbeit von Ito zu einer Erhöhung der ADMA-Konzentration in Endothelzellen führte (Jiang et al. 2003). Demgegenüber stehen zahlreiche Veröffentlichungen, die in Tieren und in Menschen mit Hypercholesterinämie einen deutlichen Anstieg von ADMA reproduzieren können (siehe 1.2.3.). Durch die Infusion von LDL in Ratten konnte sogar direkt gezeigt werden, dass ADMA im Plasma zunimmt und mit einer verminderten endothelabhängigen Vasorelaxation korreliert (Jiang et al. 2002). Der beobachtete Anstieg wurde auf das Auftreten von Lipidperoxiden zurückgeführt, da die Vorbehandlung mit den Antioxidantien Procubol und Vitamin E diesen verhindern konnte.

Vielleicht spielt im Hinblick auf die Hypercholesterinämie weniger der Stoffwechsel von ADMA in Endothelzellen, sondern eine durch LDL bzw. oxLDL veränderte Metabolisierung in der Leber, die für die erhöhten Plasmakonzentrationen verantwortlich gemacht werden kann, eine Rolle (Nijveldt et al. 2003). ADMA könnte auf diese Weise sowohl über eine verstärkte Aufnahme in die Endothelzellen und Beeinträchtigung der NO-Synthase-Aktivität als auch über eine Erhöhung der Monozytenadhäsion an dem Prozess der Arteriosklerose beteiligt sein. Denkbar wäre weiterhin das Auftreten eines Circulus vitiosus, der auf der Induktion des

oxLDL-Rezeptors LOX-1 unter einer Zunahme der ADMA-Konzentration beruht. In humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) wurde gezeigt, dass die Inkubation mit ADMA zu einer gesteigerten Expression dieses Rezeptors führt und in einer vermehrten Aufnahme von oxLDL resultiert (Smirnova et al. 2004). Im Menschen könnte eine erhöhte Aufnahme von LDL bzw. oxLDL und eine damit verbundene veränderte Metabolisierung in der Leber in erhöhten Plasmakonzentrationen von ADMA resultieren, die eine erhöhte Expression des oxLDL-Rezeptors LOX-1 und eine erhöhte Aufnahme des oxLDLs nach sich ziehen. OxLDL könnte schließlich über die Aktivierung der PRMTs, in erster Linie der PRMT 1, intrazellulär einen Anstieg der ADMA-Konzentration bewirken und die Beeinträchtigung der NOS-Aktivität begründen.

Eine Senkung der oxLDL-Konzentrationen sollte vor dem Hintergrund der Beeinflussung der Synthese von ADMA weiterhin als Therapieziel gelten. Die Einflussnahme auf die Low density Lipoproteine (LDL) scheint dagegen nur unter dem Aspekt der Generierung von oxLDL von Bedeutung zu sein, könnte selbst jedoch keine Veränderung der ADMA-Konzentration hervorrufen.

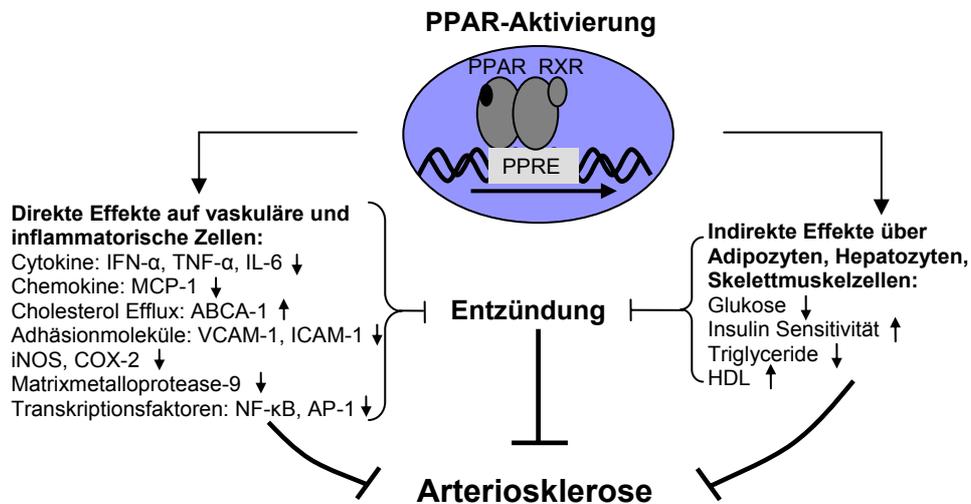
#### **4.3.3. PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) $\alpha$ - und $\gamma$ -Agonisten und N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-Arginin (ADMA)**

Die zunehmende Diskussion um die Involvierung der PPAR als Transkriptionsfaktoren in den Prozess der Arteriosklerose (1.2.5.3. und Abb. 60) sowie die mangelnden Kenntnisse über die Regulation der DDAH-Expression führten zu der Hypothese, dass eine Aktivierung der PPAR bzw. eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren über die PPAR die DDAH-Expression und damit die Metabolisierung von ADMA beeinflussen könnten. Die über eine veränderte ADMA-Konzentration beeinflusste NO-Bioverfügbarkeit könnte einen weiteren Mechanismus der PPAR-Effekte hinsichtlich der Arteriosklerose darstellen. Unterstützt wurde die Annahme einer Interaktion bzw. Regulation der DDAH über die PPAR durch die Tatsache, dass sich in der Promotor-Region der 2. Isoform der DDAH, der DDAH 2, eine Bindungsstelle für den PPAR/Retinoid-Rezeptor befindet (Achan et al. 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die beiden Rezeptoren PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$ , wie schon in der Einleitung erwähnt (siehe 1.2.5.3.), differenziert betrachtet werden müssen. Während die PPAR $\alpha$ -Agonisten WY 14,643 und ETYA zu einer Erhöhung der ADMA-Konzentration sowohl in der Endothellinie EA.hy 926 als auch in den Primärzellen HCAECs führten, besaß der PPAR $\gamma$ -Agonist Ciglitazon keinen Effekt. Begleitet wurden diese Ergebnisse von einer tendenziellen, nicht ausschließlich signifikanten Verminderung der

DDAH 1- und DDAH 2-Expression und –Aktivität für die Inkubation mit den PPAR $\alpha$ -Agonisten (siehe 3.3.3.).

WY 14,643, eine [4-Chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]essigsäure (Synonym: Pirinixsäure), gilt als einer der potentesten PPAR $\alpha$ -Liganden und wird in Konzentrationsbereichen von 50-500  $\mu$ M eingesetzt, das ETYA (5, 8, 11, 14-Eicosatetraynoide Säure), ein Eicosanoidderivat, besitzt neben der PPAR $\alpha$ -Aktivierung in Konzentrationen von 20-100  $\mu$ M ebenfalls inhibitorische Wirkung auf die Cyclooxygenase ( $ID_{50}$  = 8  $\mu$ M) und auf alle Lipoxygenasen ( $ID_{50}$  = 10, 0,3 und 0,2  $\mu$ M für die 5-, 12- und 15-Lipoxygenase). Die eingesetzten Konzentrationen der Liganden entsprachen demnach den Literaturangaben. In letzter Zeit wird zunehmend diskutiert, dass in höheren Konzentrationen Effekte beobachtet werden können, die nicht über eine PPAR-Aktivierung erfolgen. Ein adäquater PPAR $\alpha$ -Antagonist, der die Frage nach einer spezifischen PPAR-Aktivierung hätte klären können, existiert nur bedingt. In der Literatur wird bisher nur ein spezifischer PPAR $\alpha$ -Antagonist beschrieben, der allerdings nicht kommerziell zu erwerben ist (Xu et al. 2002). In höheren Konzentrationsbereichen ist auch die Möglichkeit der zytotoxischen Wirkung der Substanzen zu berücksichtigen, die in dieser Arbeit jedoch durch die Messung der Laktatdehydrogenaseaktivität ausgeschlossen werden konnte.



**Abbildung 60:** Direkte und indirekte Effekte der PPA-Rezeptoren (Plutzky 2003) (RXR: Retinoid-X-Rezeptor, PPRE: PPAR response element, IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , IL-2: Interleukin-2, MCP-1: Monozyten-chemoattractant Protein 1, ABCA-1: Adenosintriphosphat-bindende Kasette Protein A-1, VCAM-1: Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül, ICAM-1: Intrazelluläres Adhäsionsmolekül, iNOS: induzierbare NO-Synthase, COX-2: Cyclooxygenase-2, NF- $\kappa$ B: Nuklearfaktor- $\kappa$ B, AP-1: Aktivatorprotein-1)

Die eingesetzten PPAR $\alpha$ -Agonisten WY 14,643 und ETYA könnten im Fall der ADMA-Beeinflussung auf zwei Arten agiert haben. Zum einen könnte die PPAR-Aktivierung zu einer

direkten Beeinflussung der DDAH geführt haben, zum anderen wäre die PPAR-vermittelte Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren, die wiederum Einfluss auf die DDAH nahmen, denkbar. Der Mangel einer PPAR/RXR Rezeptorbindungsstelle in der Promotorregion der DDAH 1 lässt einen solchen Mechanismus vor allem für diese Isoform vermuten. Von den in Abbildung 60 dargestellten Transkriptionsfaktoren könnte analog der Diskussion der oxLDL-Effekte NF- $\kappa$ B und dessen Aktivierung eine Rolle spielen (siehe 4.3.2.). Diese Hypothese wird jedoch durch zahlreiche Veröffentlichungen widerlegt, die uneingeschränkt von einem Antagonismus der PPAR $\alpha$ -Liganden hinsichtlich deren Wirkung auf NF- $\kappa$ B berichten, und diesem die Beteiligung an antiarteriosklerotischen Prozessen zuschreiben (Plutzky et al. 2003). Die Frage, welche Transkriptionsfaktoren an der DDAH-Regulation über PPAR $\alpha$  beteiligt sind, muss leider unbeantwortet bleiben. Die Hypothese der Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren wird ebenfalls durch eine Veröffentlichung untermauert, in der der Einsatz von all-trans-Retinoidsäure zu einer Aktivierung der PPAR/RXR-Rezeptorbindungsstelle der DDAH 2 führte und einen Anstieg der DDAH 2-Expression erkennen ließ (Achan et al. 2002). In diesem Fall erfolgte keine direkte Aktivierung der PPARs, sondern ausschließlich über den RXR eine Aktivierung des PPAR/RXR-Komplexes, so dass weitere Transkriptionsfaktoren keinen Einfluss nehmen konnten (siehe 1.2.5.3., Abb. 11). PPAR-Agonisten scheinen demnach, über einen direkten Angriff an dem DDAH-Enzym einen Anstieg der Expression zu induzieren, die jedoch über die Aktivierung oder Beeinträchtigung anderer Transkriptionsfaktoren durch PPAR aufgehoben werden kann bzw. in einer Verminderung der DDAH-Expression resultiert.

Die in dieser Arbeit beschriebene Erhöhung der ADMA-Konzentration unter dem Einfluss der PPAR $\alpha$ -Agonisten könnte in vivo über die Einschränkung der NO-Bioverfügbarkeit zur Beeinträchtigung des Endothels beitragen. Neben der in der Einleitung beschriebenen, eingeschränkten Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen in PPAR $\alpha$ -defizienten Mäusen wäre dieser Effekt ein weiteres Beispiel für eine arteriosklerotische Wirkungsweise der PPAR $\alpha$  und gäbe verstärkt Anlass zur differenzierten Beurteilung der PPAR-Aktivierung (siehe 1.2.5.3.).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie betrachtete das L-Arginin/ADMA-Verhältnis im Plasma von 25 Männern mit Hypertriglyceridämie unter der 6-wöchigen Therapie mit Fenofibrat (200 mg/d), einem in der Therapie der Hypertriglyceridämie eingesetzten PPAR $\alpha$ -Agonisten (Dierkes et al. 2004). Es wurde eine Erhöhung des L-Arginin/ADMA-Verhältnisses bestimmt, für die jedoch ausschließlich ein Anstieg der L-Arginin-Konzentration ohne Veränderung der ADMA-Konzentration verantwortlich gemacht werden konnte. Der Effekt auf die L-Arginin-Konzentration ist in diesem Fall nicht unbedingt auf einen direkten Effekt über die Aktivierung von PPAR $\alpha$  zurückzuführen, sondern könnte ebenso mit der Senkung der Triglyceridkonzentration begründet werden. Die beobachtete, unveränderte ADMA-Konzentration im

Plasma schließt eine Veränderung der intrazellulären Konzentration analog den Ergebnissen dieser Arbeit und eine damit verbundene Beeinträchtigung der NOS-Aktivität jedoch nicht aus. Die hier dargestellten Daten sollten zu einer kritischen Beurteilung zukünftiger klinischer Studien führen, die die Klärung der Fibrateneffekte unabhängig einer Triglyceridsenkung und unter Berücksichtigung der Endothelfunktion beinhalten sollten.

Die Datenlage für die PPAR $\gamma$  ist im Vergleich zu den PPAR $\alpha$  eindeutiger und scheint ausschließlich die Beteiligung dieser Isoform an antiarteriosklerotischen Prozessen zu erlauben. So wurden neben der Antagonisierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie der Signaltransduktions-induzierte Transkriptionsfaktor (STAT), NF- $\kappa$ B und Aktivatorprotein-1 (AP-1) (Abb. 60) und damit verbundenen antiinflammatorischen Effekten, direkte antioxidative Wirkungen von PPAR $\gamma$  beschrieben (Schiffrin et al. 2003). Diese äußerten sich in der Induktion der Synthese der Superoxiddismutase (SOD) und der Katalase sowie in der Hemmung der NADH/NADPH Oxidase nach Aktivierung von PPAR $\gamma$  (Inoue et al. 2001, Poynter et al. 1998, Inoue et al. 2000). PPAR $\gamma$ -Agonisten konnten außerdem in Kaninchen mit Hypercholesterinämie, ohne eine Veränderung der Lipidwerte erkennen zu lassen, zu einer Verbesserung der Endothelfunktion bzw. Acetylcholin-induzierten Vasorelaxation führen (Tao et al. 2003). Gleichzeitig wurde eine verstärkte Expression des Proteins P-VASP, ein neuer Marker des NO/cGMP/cGK-Signalweges, detektiert, während die endotheliale NO-Synthase in ihrer Expression unbeeinflusst blieb. Eine Beteiligung von ADMA an diesen Effekten schien möglich.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden mit Ciglitazon (5-[4-(1-Methylcylohexylmethoxy)benzyl]thiazolidine-2,4-dion), bekannt als selektiver PPAR $\gamma$  Agonist mit einer EC<sub>50</sub> von 3  $\mu$ M, und mit dem PPAR $\gamma$ -Antagonisten T0070907 (2-Chloro-5-nitro-N-(4-pyridyl)benzamid), der mit einem Ki von 1 nM selektiv den PPAR $\gamma$  inaktiviert und mit einem Ki von 0,85  $\mu$ M und 1,8  $\mu$ M ebenfalls PPAR $\alpha$  und PPAR $\delta$  antagonisiert (Lee et al. 2002), durchgeführt. Es konnte keine Veränderung der ADMA-Konzentration in den humanen Koronararterienendothelzellen analysiert werden, so dass eine weitere Untersuchung der DDAH-Veränderung als nicht sinnvoll erachtet wurde. Die dennoch von Calnek und seiner Arbeitsgruppe beobachtete Erhöhung der NO-Produktion durch die PPAR $\gamma$ -Liganden 15d-PGJ2 (15-deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2) und Ciglitazon in Endothelzellen scheint somit ausschließlich auf einen direkten Effekt der Glitazone auf die eNOS zurückzuführen zu sein (Calnek et al. 2003). So wurde für die Inkubation von Rinderarterienendothelzellen mit Troglitazon eine NO-Produktionssteigerung beschrieben, die über zwei unabhängige Wege erfolgte und sowohl eine PPAR $\gamma$ -abhängige, Akt-vermittelte eNOS-Ser<sup>1179</sup>-Phosphorylierung und eine PPAR $\gamma$ -unabhängige eNOS-Ser<sup>116</sup>-Dephosphorylierung beinhaltete (Cho et al. 2004).

Die hier dargestellten Daten können Ergebnisse einer Studie von Stühlinger, die unter der Therapie von Patienten mit Typ 2 Diabetes mit Rosiglitazon eine Senkung der ADMA-Konzentration im Plasma bestimmen konnten, nicht ergänzen (Stühlinger et al. 2002). Zu berücksichtigen bleibt, dass Patienten mit Typ 2 Diabetes, wie vielfach gezeigt, unter erhöhten ADMA-Konzentrationen leiden (siehe 1.2.3.) und das Glitazon in der oben erwähnten Arbeit eine Normalisierung der Plasmaspiegel erreichte. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die PPAR $\gamma$ -Agonisten die Aktivierung von PRMTs bzw. die Beeinträchtigung der DDAH, die für die erhöhten ADMA-Konzentrationen verantwortlich gemacht werden könnten, rückgängig machen. Ein ausbleibender Effekt in den Endothelzellen könnte somit mit der mangelnden Veränderung der DDAH-Aktivität begründet werden und würde den PPAR $\gamma$ -Agonisten einen prophylaktischen Effekt hinsichtlich einer Verminderung der ADMA-Konzentration absprechen. Weitere Versuche an Endothelzellen zur Untersuchung des in der Stühlinger-Arbeit vorgestellten Effektes auf die ADMA-Konzentration durch Glitazone sollten unter dem gleichzeitigen Einsatz von z.B. Glukose, die der Imitation des Diabetes und Beeinträchtigung der DDAH dienen sollte, erfolgen (Lin et al. 2002). Unter diesen Bedingungen ist eine Normalisierung der ADMA-Konzentration durch Glitazone zu erwarten und eine nähere Untersuchung der Mechanismen möglich.

Eine weitere Erklärung für die ausbleibenden Effekte von Ciglitazon ist in dem Aufschluss über die genauen Regulationsmechanismen der PPARs zu sehen. Neben den Interaktionen mit RXR und PPRE scheinen weitere Komplexbildungen mit anderen Proteinen in Abhängigkeit von der Bindung eines Liganden von Bedeutung zu sein (Torra et al. 2001). So wurde ein Nuklearrezeptor-Corepressor (N-CoR) und „Silencing mediator of retinoid and thyroid receptors“(SMRT)-Proteine, die die Expression nicht Liganden-aktivierter PPARs unterbinden, identifiziert. Ebenso existieren Coaktivatorproteine, wie das „PPAR binding protein“ (PBP), die in das Transkriptionssystem eingreifen. Die gewebespezifische Expression dieser Kofaktoren bzw. Coaktivatoren scheinen die Transkription wesentlich zu beeinflussen und an den unterschiedlichen Effekten der PPAR in verschiedenen Geweben beteiligt zu sein. Eine Erniedrigung der ADMA-Plasmakonzentration durch die Glitazone wäre demzufolge auch über gewebespezifische Mechanismen ohne Beteiligung der Endothelzellen denkbar.

Effekte der PPAR $\gamma$ -Agonisten hinsichtlich der ADMA-Konzentration und DDAH-Expression bzw. -Aktivität sollten aufgrund der hier dargestellten Versuchsergebnisse nicht ausgeschlossen werden, scheinen jedoch nur unter bestimmten Bedingungen und in spezifischen Geweben in Kraft zu treten.

#### 4.3.4. Deutung der Angiotensin II-Effekte

Angiotensin wird zunehmend diskutiert in den Prozess der Arteriosklerose, der auf veränderte Funktionen des Endothels zurückzuführen ist und für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse verantwortlich gemacht werden kann, involviert zu sein. So konnte nachgewiesen werden, dass Angiotensin II vermehrt in arteriosklerotischen Läsionen, insbesondere zusammen mit den Makrophagen in der Intima media arteriosklerotischer Gefäße auftritt, und dass dessen Konzentration im Zuge der Regression der Arteriosklerose wieder abnimmt (Dean Potter et al. 1998). Zudem wird Angiotensin II zusammen mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor und dem Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in arteriosklerotischen Koronararterien exprimiert und die Tatsache, dass Angiotensin II IL-6 induziert, führt zu der Hypothese, dass das Renin-Angiotensin-System zu den entzündlichen Prozessen der Gefäßwand und zu der Entwicklung des akuten Koronarsyndroms beiträgt (Schieffer et al. 2000). Ein direkter kausaler Zusammenhang konnte durch die Angiotensin II-Infusion in Mäusen hergestellt werden, die zu einer verstärkten Entwicklung der Arteriosklerose in diesen Tieren führte (Weiss et al. 2001, Daugherty et al. 2000).

Des Weiteren wird Angiotensin II mit einer Verschlechterung der Endothelfunktion in Verbindung gebracht, die u.a. mit einer eingeschränkten NO-Produktion begründet werden kann (Unger 2002). Angiotensin II wirkt über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vasokonstriktiv und verursacht somit erhöhten Blutdruck. Diese drei bzw. vier Faktoren, von der Arteriosklerose über die Endotheldysfunktion und die eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit bis zum Bluthochdruck, stehen in engem Zusammenhang mit erhöhten ADMA-Konzentrationen.

Die Inkubation der primären humanen Koronararterienendothelzellen (HCAECs) mit Angiotensin II in Konzentrationen von 0,01 bis 1 µM konnte diese Verbindung bestätigen und zeigte für 0,01 µM eine gut 20%ige Erhöhung der ADMA-Konzentration im Zellüberstand. Wie kann diese Interaktion erklärt werden? Angiotensin II führt zu der bereits beschriebenen verminderten NO-Bioverfügbarkeit über verschiedene Mechanismen, u.a. über eine verstärkte Generierung von Superoxidradikalen, die auf einer Aktivierung von NADPH-Oxidasen und auf der veränderten Expression der Superoxiddismutase der Gefäßwand beruhen (Griendling et al. 1994, Fukai et al. 1999). Weiterhin wurde beobachtet, dass Angiotensin II über die Erhöhung des oxidativen Stresses den Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert (Pueyo et al. 2000, Ruiz-Ortega et al. 2000). Diese Faktoren bzw. deren Beteiligung an der Regulation der DDAH wurden bereits unter dem Kapitel LDL, oxLDL angesprochen (siehe 4.3.2.). Die DDAH enthält Sulfhydrylgruppen (Kimoto et al. 1998), deren Existenz die Empfänglichkeit dieses Enzyms für oxidativen Stress und eine verminderte Aktivität unter oxidativen Bedingungen begründen kann, so dass Angiotensin über die Beeinflussung der DDAH und damit einer verminderten Metabolisierung von ADMA einen direkten Einfluss auf

den NO-Synthase-Inhibitor nehmen könnte. Die Expression wurde unter der Inkubation mit Angiotensin in den hier dargestellten Zellversuchen nicht beeinträchtigt, was eine verminderte Aktivität dieses Enzyms jedoch noch nicht ausschließt. Ein Nachweis dieses Mechanismus konnte leider aufgrund des Mangels an L-[<sup>14</sup>C]-NMMA, der Grundsubstanz für den DDAH-Aktivitätsassay, nicht erbracht werden.

Die Experimente führten jedoch weiterhin zu der Beantwortung der Frage, ob Angiotensin hinsichtlich der ADMA-Beeinflussung über die AT-Rezeptoren agiert. Der Einsatz von Losartan, ein AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker, konnte die Erhöhung der ADMA-Konzentration nicht nur aufheben, sondern ließ im Vergleich zur Kontrolle eine zusätzliche Senkung erkennen. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Daten, die für die Inkubation mit dem AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten PD 123,319 erhalten wurden, wobei PD 123,319 erst in der höchsten Konzentration von 1 µM eine Wirkung besaß. Es scheinen demnach beide Rezeptortypen an dem Angiotensin-Effekt beteiligt zu sein, was nicht unbedingt den Vorstellungen zu den beiden Subtypen entspricht. Die oben beschriebene Vermittlung von oxidativem Stress durch Angiotensin und die Aktivierung von NF-κB kann nachweislich auf die Aktivierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors zurückgeführt werden, während der AT<sub>2</sub>-Rezeptor zunehmend als Antagonist des AT<sub>1</sub>-Rezeptors eingestuft wird (Pueyo et al. 2000, AbdAlla et al. 2001). Einige präklinische und klinische Studien haben gezeigt, dass der AT<sub>1</sub>-Rezeptor mit in die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion involviert ist, während Untersuchungen zum AT<sub>2</sub>-Rezeptor darauf hinweisen, dass dieser Rezeptor über die Stimulation von Bradykinin und der NO-Synthase ein Gegengewicht darstellt (de Gasparo et al. 2002). So übte in hypertensiven Ratten ein AT<sub>1</sub>-Blocker in Verbindung mit einem 5-fachen cGMP-Anstieg Schutz vor der Entwicklung von Bluthochdruck und Linksherzhypertrophie aus (Gohlke et al. 1996). Diese Beobachtung ist vor dem Hintergrund zu sehen, dass vermehrt Angiotensin II an dem AT<sub>2</sub>-Rezeptor angreift und so zu einer Erhöhung von NO und schließlich cGMP führt. In Bezug auf den Effekt von Angiotensin auf ADMA scheinen die beiden Rezeptoren die gleichen Wirkungen zu besitzen. Wird der Mechanismus für die Stimulation der NO-Produktion unter der AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade zugrunde gelegt, d.h. nimmt man die verstärkte Wirkung von Angiotensin über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor unter dem Einsatz von Losartan an, so dürfte keine Erniedrigung der ADMA-Konzentration durch Losartan erreicht werden. Ebenso dürfte keine ADMA-Abnahme durch den AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten PD 123,319 erfolgen. Spekulationen über weitere Angiotensin-Rezeptoren in den Endothelzellen sind durch diese Beobachtungen gerechtfertigt und wurden bereits in der Abbildung 12 unter 1.2.5.4. als AT<sub>n</sub> erwähnt. Diese bisher wenig untersuchten Isoformen der AT-Rezeptoren könnten im Fall von ADMA ein Gegengewicht sowohl für den AT<sub>1</sub>- als auch für den AT<sub>2</sub>-Rezeptor darstellen, indem deren Aktivierung durch Angiotensin eine Erniedrigung der ADMA-Konzentration induziert. Dieser Mechanismus scheint jedoch im Vergleich zu der Aktivierung des AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptors

eine geringere Rolle zu spielen, könnte aber zum einen die eher geringe ADMA-Zunahme (22,5%) unter der Inkubation mit Angiotensin und zum anderen die überkompensatorische Abnahme von ADMA unter das Niveau der Kontrollproben unter dem Einfluss der AT-Antagonisten erklären. Diese in vitro-Daten sind sowohl mit Studien, die die klinische Anwendung von ACE-Inhibitoren als auch die Applikation von AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockern betreffen, in Einklang zu bringen. Studien mit Perindopril und Enalapril (ACE-Hemmer) konnten sowohl in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, mit Syndrom X als auch mit Bluthochdruck zu einer Reduktion der ADMA-Plasmakonzentration führen (Chen et al. 2002, Ito et al. 2002, Delles et al. 2002). Die Studie der Gruppe von Ito konnte die Abnahme der ADMA-Konzentration im Plasma von Patienten mit Typ 2 Diabetes nach einer 4-wöchigen Anwendung von Perindopril analysieren und gleichzeitig eine Verminderung des von Willebrandt Faktors (vWF), ein Marker für Endothelverletzungen, nachweisen (Ito et al. 2002). Diese Veränderungen schienen sich unabhängig von einer Beeinflussung des Glukosemetabolismus bzw. Veränderung des Blutdrucks zu ergeben. Die Anwendung von AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockern, wie Losartan und Eprosartan, bei Hypertonikern zeigte die gleichen ADMA vermindernenden Effekte (Ito et al. 2001, Delles et al. 2002). Die Mechanismen, die hinter diesen Auswirkungen stehen, sind weiterhin unklar. Die hier dargestellten Daten geben darüber Aufschluss, dass Angiotensin die ADMA-Konzentration im Endothel über den AT<sub>1</sub>- und den AT<sub>2</sub>-Rezeptor ohne Veränderung der DDAH-Expression erhöht. Weiterhin scheint eine gegenregulatorisch wirksame Reduktion der ADMA-Konzentration durch Angiotensin möglich, so dass eine Hemmung der AT<sub>1</sub>- und/oder AT<sub>2</sub>-Rezeptoren im Vergleich zur ACE-Hemmung eine deutlichere Verminderung der ADMA-Konzentration erwarten lässt, die die bevorzugte Anwendung von AT-Rezeptorblockern rechtfertigen würde.

#### **4.3.5. Schlussfolgerung für die pharmakologische Therapie**

Abschließend ist festzuhalten, dass im Hinblick auf die Senkung der ADMA-Konzentration weder der Einsatz von HMG-CoA-Reduktasehemmern noch von PPAR-Agonisten eine therapeutische Interventionsmöglichkeit darzustellen scheint. Während der HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin nur eine vorübergehende Senkung von ADMA hervorrufen konnte, führten PPAR $\alpha$ -Agonisten sogar zu einem Anstieg des NOS-Inhibitors. Die Applikation von ACE-Hemmern bzw. AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockern dagegen könnte eine vielversprechende Alternative sein, um die in Abschnitt 3.3.4. gezeigten, unter dem Einfluss von Angiotensin II erhöhten ADMA-Konzentrationen zu senken.

Mit Ausnahme der Effekte der PPAR-Agonisten konnte keine der beobachteten Veränderungen hinsichtlich der ADMA-Konzentration direkt mit einer Veränderung des ADMA abbauenden Enzyms, der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH), in Verbindung gebracht werden. Die Effekte von Atorvastatin und oxLDL spiegelten sich zwar in einer erhöhten Expression der DDAH wider, resultierten jedoch nicht in einer entsprechenden Erhöhung der DDAH-Aktivität. Spekulationen über die Bedeutung dieses Enzyms und die Frage nach der gezielten Aktivierung desgleichen als therapeutisches Ziel scheinen in diesem Zusammenhang erlaubt. Eine dritte bisher nicht identifizierte Isoform der DDAH, die ausschließlich ADMA, nicht aber L-NMMA, metabolisiert, könnte zur Diskussion gestellt werden. Diese wäre dem verwendeten DDAH-Aktivitäts-Assay, basierend auf der Umsetzung von L-[<sup>14</sup>C]-NMMA, nicht zugänglich. Die Existenz eines bisher unentdeckten Enzyms, welches für die Metabolisierung von ADMA verantwortlich gemacht werden könnte, scheint durch die Experimente der Arbeitsgruppe von Ogawa aus dem Jahre 1987 ausgeschlossen (Ogawa et al. 1987). Die Infusion von N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethyl-L-[1,2,3,4,5-<sup>14</sup>C]-Arginin führte im Rattengewebe zu hohen Konzentrationen an radioaktiv markiertem L-Citrullin. Weitere Metabolite, wie L-Ornithin, L-Arginin und Glutaminsäure spielten eine eher untergeordnete Rolle bzw. schienen aus dem L-Citrullin zu entstehen. Das Argument, die Situation im Menschen sei nicht hinreichend untersucht, wurde jüngst durch die Infusion von ADMA entkräftet, die zu einer erhöhten Elimination von Dimethylamin im Urin führte und damit eine entscheidende Beteiligung der DDAH am Abbau von ADMA bewies (Achan et al. 2003).

Alternativ ist die Bedeutung der Proteinmethyltransferasen (PRMTs), als ADMA synthetisierende Enzymsysteme, zu diskutieren. Sollten diese stärkeren Regulationsmechanismen unterliegen als die DDAH, so wären die therapeutischen Möglichkeiten auf die Hemmung der PRMTs beschränkt, deren pharmakologische Auswirkung aufgrund der Beteiligung dieser Enzymsysteme an zahlreichen intrazellulären Prozessen nicht abschätzbar ist.

#### **4.4. Interpretation des Expressionsmusters der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in Endothelzellen induziert durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine)**

Zu den zahlreichen pleiotropen Effekten der Statine zählt die Verbesserung der Endothelfunktion, die von verschiedenen Arbeitsgruppen für unterschiedliche Statine gezeigt wurde und in einer Reduktion der Angina pectoris-Häufigkeit und Verbesserung der Myokardperfusion resultiert (Anderson et al. 1995). So beobachteten Egashira nach einer 6-

monatigen Therapie mit Pravastatin eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation im Bereich der koronaren Leitungs- und Widerstandsgefäße bei Patienten mit Hypercholesterinämie (Egashira et al. 1994). O'Discoli zeigte bereits nach einer 4-wöchigen Applikation von Simvastatin eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation im Bereich der Unterarmzirkulation bei Patienten mit mäßig erhöhten LDL-Cholesterin-Spiegeln (O'Discoli et al. 1997). Die erhöhte NO-Bioverfügbarkeit, die nach einer Lipid-senkenden Therapie in hypercholesterinämischen Patienten beobachtet wurde (John et al. 1998), kann inzwischen auf verschiedene Effekte der Statine zurückgeführt werden. Sowohl eine Erhöhung der eNOS-Expression als auch eine Reduktion an Superoxidradikalanionen und eine Reduktion an Caveolin-Konzentrationen in der Plasmamembran, die in einer Aktivitätssteigerung der eNOS resultiert, werden diskutiert (Laufs et al. 1998a; Wagner et al. 2000, Wassmann et al. 2002, Feron et al. 2001). Der Mechanismus, der hinter der Beeinflussung der eNOS-Expression steht, ist in einer durch die Statine induzierten Aktivitätsminderung der Rho GTPase und veränderten Isoprenylierung dieses Enzyms zu suchen (Laufs et al. 1998b, Kalinowski et al. 2002).

Bei den vorhandenen Untersuchungen wurde allerdings nie berücksichtigt, welches Statin zum Einsatz kam, d.h. die Beurteilung der Effekte erfolgte ohne Betrachtung der pharmakokinetischen Eigenschaften der einzelnen Substanzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Erhöhung der eNOS-Expression durch Atorvastatin und Simvastatin in gleichem Ausmaß erfolgt, allerdings nur unter der Bedingung einer kontinuierlichen Inkubation, d.h. Simulation einer langen Halbwertszeit. Diese Beobachtung gibt Hinweise darauf, dass zumindest in Bezug auf die eNOS-Expression Atorvastatin im Vergleich zu anderen Statinen mit kurzer Halbwertszeit ausgeprägtere Effekte zeigen dürfte. Ein direkter Vergleich der Statine mit unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften in einer klinischen Studie, in der die Untersuchung der endothelialen Dysfunktion bzw. die NO-Bioverfügbarkeit erfolgte, und der die hier dargestellten Daten untermauern könnte, existiert nicht. Diese Ergebnisse könnten eine solche Studie dahingehend ergänzen, als dass die voraussichtlich in vivo auftretenden Unterschiede mit den pharmakokinetischen Eigenschaften der einzelnen Statine erklärt werden könnten.

Weiterhin sind diese Daten im Zusammenhang mit den Ergebnissen einer Medizindoktorarbeit zu sehen, bei der die gleichen Untersuchungen mit Atorvastatin, Simvastatin und Pravastatin an einer Hepatozytenzelllinie unter dem Aspekt der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors durchgeführt wurden. Die Arbeit zeigte eine Veränderung der beiden Systeme für alle drei Statine nur unter einer kontinuierlichen Inkubation, untermauert damit die von Cromwell und unter 1.3. beschriebenen Tachyphylaxie-Effekte unter Anwendung von Atorvastatin und kann diese mit der langen Halbwertszeit dieses Statins begründen. Während die Erhöhung der Expression der HMG-CoA-Reduktase durch

die permanente Hemmung von Atorvastatin, die einen negativen Rückkopplungsmechanismus darstellt und in einer verminderten LDL-Cholesterin-Senkung resultiert, negativ zu beurteilen ist, muss bzw. kann der gleiche Effekt hinsichtlich einer Erhöhung der Expression des LDL-Rezeptors und der eNOS deutlich positive klinische Effekte nach sich ziehen. Diese Versuche veranlassen zu der Spekulation, dass die Anwendung von Atorvastatin mit einer Halbwertszeit von 14 Stunden einen deutlicheren Effekt auf die eNOS-Expression und damit auf die Verbesserung der Endothelfunktion besitzen dürfte als alle anderen Statine. Eine bevorzugte Anwendung von Atorvastatin im Hinblick auf einen kardiovaskulären Benefit wäre in diesem Fall zu befürworten.

In Bezug auf die hier dargestellten Versuche bleibt kritisch zu erwähnen, dass eine Erhöhung der eNOS-Expression erst für Konzentrationen von 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin und Simvastatin gemacht werden konnten. Die im menschlichen Blut gemessenen maximalen Plasmakonzentrationen liegen für Atorvastatin bei 46,7–114,1 nM und für Simvastatin bei 23,9–81,2 nM (Corsini et al. 1999), so dass die hier als wirksam eingestuften Konzentrationen um den Faktor 10-100 höher lagen. Diese Datenlage wird begleitet von der Tatsache, dass nur wenige in vivo-Studien zu der Erhöhung der eNOS-Expression unter der Anwendung von Statinen existieren. So konnte eine Arbeitsgruppe ex vivo an Rattenherzen eine Zunahme der eNOS-Expression für Simvastatin (25  $\mu\text{M}$ ), die mit der Prävention vor myokardialen Schaden in Verbindung gebracht wurde, beobachten (Di Napoli et al. 2001). Für Rosuvastatin wurde in Mausearten neben einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der eNOS-Expression ebenfalls eine erhöhte Aktivität nachgewiesen (Laufs et al. 2002).

Klinische Studien zur Bestimmung der eNOS-Expression unter der Applikation von Statinen ebenso wie Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Statineffekte bzw. zum direkten Vergleich verschiedener Statine sollten in Zukunft durchgeführt werden.

## 5. Zusammenfassung

Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin (ADMA) ist als ein endogener NO-Synthase-Inhibitor anzusehen. Erhöhte ADMA-Konzentrationen wurden u.a. bei Patienten mit Hypercholesterinämie, Hypertonie, Arteriosklerose, chronischer Niereninsuffizienz und chronischer Herzinsuffizienz nachgewiesen und mit einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasodilatation in Zusammenhang gebracht. Neuere prospektive und Fall-Kontroll-Studien lassen ADMA als neuen kardiovaskulären Risikomarker bzw. -faktor zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Der Frage des Mechanismus der NOS-Hemmung durch ADMA wurde anhand von in vitro-Experimenten mit einer rekombinanten NOS nachgegangen. Der erkannte kompetitive Mechanismus liefert einen Erklärungsansatz für das L-Arginin-Paradoxon und kann die Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation nach Applikation von L-Arginin in Patienten mit erhöhten ADMA-Konzentrationen begründen.

Zur sensitiven und spezifischen Quantifizierung von ADMA wurde eine auf der Gaschromatographie-Massenspektrometrie basierende analytische Methode entwickelt. Die Methode setzte die Synthese eines geeigneten internen Standards voraus und wurde für Zellkulturüberstände, für geringe Volumina von Plasma und für Zelllysate validiert. In vitro-Experimente an Endothelzellen, die der Aufklärung der Beeinflussung von ADMA und der Regulation der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH), dem ADMA abbauenden Enzym, dienten, wurden mit Hilfe dieser Methode durchgeführt. Der Einsatz von HMG-CoA-Reduktasehemmern, von LDL und oxLDL, von PPAR-Agonisten und Angiotensin führte zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Beeinflussung der ADMA-Konzentration. Eine Beteiligung der DDAH konnte ausschließlich für die unter der Anwendung von PPAR $\alpha$ -Agonisten beobachteten Effekte belegt werden. Eine therapeutische Interventionsmöglichkeit zur Senkung der ADMA-Konzentrationen, ohne Angaben zum Wirkmechanismus machen zu können, ist in dem Einsatz von Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten zu sehen.

HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine) besitzen neben ihrer Cholesterin-senkenden Eigenschaften zahlreiche pleiotrope Effekte, die deren Bezeichnung als antiarteriosklerotisch wirksame Substanzen begründen. Statine führen nachweislich in vitro zu einer Erhöhung der Expression der NOS. Weitergehende Untersuchungen an Endothelzellen unter dem Einsatz von Atorvastatin und Simvastatin und der Simulation unterschiedlicher Halbwertszeiten lassen den Schluss zu, dass die pharmakokinetischen Unterschiede der Statine bei der Beurteilung ihrer Effekte zu berücksichtigen sind. Für Atorvastatin ist im Hinblick auf die NOS eine im Vergleich zu Statinen kürzerer Halbwertszeit deutlichere Expressionserhöhung in vivo zu erwarten.

## Summary

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is characterized as an endogenous inhibitor of the nitric oxide synthase (NOS). Its plasma concentration is increased in humans with hypercholesterolemia, hypertension, atherosclerosis, chronic renal failure, and chronic heart failure. Increased ADMA levels are associated with reduced NO synthesis as assessed by impaired endothelium-dependent vasodilatation. In several prospective and cross-sectional studies, ADMA evolved as a marker of cardiovascular risk and becoming a goal for pharmacotherapeutic intervention.

The mechanism by which ADMA inhibits the enzyme NOS was investigated in vitro with a purified, recombinant bovine endothelial NO synthase. The result of a competitive inhibition of the NOS explains in part the L-arginine paradox and provides a possible mechanism for the improvement of endothelium-dependent vascular function in subjects with high ADMA levels after administration of L-arginine.

For analyzing ADMA with high sensitivity and specificity a method based on gas chromatography-mass spectrometry was developed. The method required the synthesis of an adequate internal standard and was validated for cell culture supernatants, small volumes of plasma and cell lysates. In vitro experiments with endothelial cells for investigation the effect of different substances on ADMA and on the dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH), the ADMA metabolising enzyme, were realized using this validated method. HMG-CoA-reductase inhibitors, LDL and oxLDL, PPAR-agonists and angiotensin II influenced the concentration of ADMA in different ways, but only the change under the use of PPAR $\alpha$ -agonists could be explained with an alteration of the expression and activity of the DDAH. The experiments gave evidence for angiotensin II-receptor antagonists as a new therapeutic possibility to lower ADMA concentrations without the ability of declaring the mechanism of action.

HMG-CoA-reductase inhibitors (statins) lower effectively the cholesterol concentration in patients with hypercholesterolemia and exert different pleiotropic effects including the increase of the expression of the NOS in vitro. Further experiments with endothelial cells and the simulation of the different half-lives of atorvastatin and simvastatin showed the importance of recognizing the different pharmacokinetic properties of the statins judging about their effects. Atorvastatin seems to influence the NOS expression more effectively compared to other statins with shorter half-lives.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin-converting-enzyme</i>
ADMA	Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AVK	Arterienverschlusskrankheit
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
<sup>14</sup> C	radioaktives Isotop des Kohlenstoffs
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-5'-monophosphat
μCi	Mikro-Curie
d	Tag
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat, Gemisch zu gleichen Anteilen aus Adenosin-5'-triphosphat, Cytidin-5'-triphosphat, Guanosin-5'-triphosphat, Thymidin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	Konzentration, die zum halbmaximalen Effekt führt
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
FKS	fetales Kälberserum
FMN	Flavinadeninmononukleotid
g, mg, μg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-tandem MS	Gaschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HCAECs	<i>human coronary arterial endothelial cells</i> (Humane Koronararterienendothelzellen)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Inhibitorkonzentration
IS	Interner Standard
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
l, ml, μl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LOD	<i>limit of detection</i>
LOQ	<i>limit of quantification</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

min	Minute
mol, mmol, $\mu$ mol	Mol, Millimol, Mikromol
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MW	arithmetischer Mittelwert
m/z	Masse/Ladung
n	Anzahl der Proben
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidtriphosphat
NF- $\kappa$ B	Nuklearfaktor- $\kappa$ B
NICI	<i>negative-ion chemical ionization</i>
L-NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin
L-NNA	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OD	Optische Dichte
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
oxLDL	<i>oxidized low density lipoprotein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
PFAA	<i>Pentafluoropropionic acid anhydride</i>
PFB-Bromid	Pentafluorobenzylbromid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRMT	<u>P</u> rotein- <u>A</u> rginin- <u>N</u> - <u>M</u> ethyl- <u>T</u> ransferase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RSD	Relative Standardabweichung
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Realtime-Polymerasekettenreaktion
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDMA	Symmetrisches Dimethyl-L-Arginin
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SIM	<i>selected-ion monitoring</i>
SOD	Superoxiddismutase
SPE	<i>solid-phase extraction</i>
SRM	<i>selected-reaction monitoring</i>
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
TBE	Tris-Borat-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
vs.	versus

## 7. Literaturverzeichnis

Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Stühlinger M, Tsao PS (2001) Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 88: 1201-1203

AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U (2001) The angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor is an AT<sub>1</sub>-R antagonist. *J Biol Chem* 276: 39721-39726

Achan V, Tran CT, Arrigoni F, Whitley GS, Leiper JM, Vallance P (2002) All-trans-retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 90: 764-769

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

Al Banchaabouchi M, Marescau B, Possemiers I, D'Hooge R, Levillain O, De Deyn PP (2000) N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine and N<sup>G</sup>,N<sup>G'</sup>-dimethylarginine in renal insufficiency. *Pflugers Arch* 439: 524-531

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615

Altschuler L, Wook JO, Gurari D, Chebath J, Revel M (1999) Involvement of receptor-bound protein methyltransferase PRMT 1 in antiviral and antiproliferative effects of type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* 19: 189-195

Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P (1995) The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 332: 488-493

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

Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B (2001) Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12: 2747-2752

Asagami T, Abbasi F, Stühlinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reave GM, Tsao PS (2002). Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 51: 843-846

Asakawa T, Matsushita S (1979) Colouring conditions of thiobarbituric acid test for detection lipid hydroperoxides. *Lipids* 15: 137-140

Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4: 585-595

Baydoun AR, Emery PW, Pearson JD, Mann GE (1990) Substrate-dependent regulation of intracellular amino acid concentrations in cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 940-948

Baylis C, Mitruka B, Deng A (1992) Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90: 278-281

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

Bisgaier CL, Essenburg AD, Auerbach BJ, Pape ME, Sekerke CS, Gee A, Wolle S, Newton RS (1997) Attenuation of plasma low density lipoprotein cholesterol by select 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in mice devoid of low density lipoprotein receptors. *J Lipid Res* 38: 2502-2515

Bishop-Bailey D (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 129: 823-834

Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 8: 307-310

Blumenthal RS (2000) Statines: effective antiatherosclerotic therapy. *Am Heart J* 139: 577-583

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

Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Bohme M, Nafe R, Mügge A, Frölich JC (1997a) Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 96: 1282-1290

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC (1997b) Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 95: 2068-2074

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC (1998a) Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol* 32: 1336-1344

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP (1998b) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98: 1842-1847

Böger RH, Bode-Böger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R, Frölich JC (1998c) Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 136: 67-77

Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR (2000a) Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1557-1567

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

Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP (2000c) An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol* 36: 2287-2295

Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG (2001) Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci* 100: 161-167

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

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

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Brostoff S, Eylar EH (1971) Localization of methylated arginine in the A1 protein from myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 765-769

Brown MS, Faust JR, Goldstein JL (1978) Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J Biol Chem* 253: 1121-1128

Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 52-57

Ceremuzynski L, Chamiec T, Herbaczynska-Cedro K (1997) Effect of supplemental oral L-arginine on exercise capacity in patients with stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 80: 331-333

Chan JR, Böger RH, Bode-Böger SM, Tangphao O, Tsao PS, Blaschke TF, Cooke JP (2000) Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1040-1046

Chawla A, Lee CH, Barak Y, He W, Rosenfeld J, Liao D, Han J, Kang H, Evans RM (2003) PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1268-1273

Chen BM, Xia LW, Zhao RQ (1997) Determination of N(G), N(G)-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 692: 467-471

Chen JW, Hsu NW, Wu TC, Lin SJ, Chang MS (2002) Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition reduces plasma asymmetric dimethylarginine and improves endothelial nitric oxide bioavailability and coronary microvascular function in patients with syndrom X. *Am J Cardiol* 90: 974-982

Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga Ji, Gotoda T, Kitamine T, Tamura Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Shimano H, Nagai R, Yamada N (2001) Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 372-377

Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, Mc Cann PP (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 10: 471-480

Cho DH, Choi YJ, Jo SA, Jo I (2004) Nitric oxide production and regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by prolonged treatment with troglitazone: evidence for involvement of peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) gamma-dependent and PPARgamma-independent signalling pathways. *J Biol Chem* 279: 2499-2506

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159

Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB (1992) Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 90: 1116-1121

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

Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, Jackson S, Wakino S, Noh G, Palinski W, Hsueh WA, Law RE (2001) Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 365-371

Conde K, Roy S, Freake HC, Newton RS, Fernandez ML (1999) Atorvastatin and simvastatin have distinct effects on hydroxy methylglutaryl-CoA reductase activity and mRNA abundance in the guinea pig. *Lipids* 34: 1327-1332

Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA (1991) Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 83: 1057-1062

Corsini A, Mazzotti M, Raiteri M, Soma MR, Gabbiani G, Fumagalli R, Paoletti R (1993) Relationship between mevalonate pathway and arterial myocyte proliferation: in vitro studies with inhibitors of HMG-CoA reductase. *Atherosclerosis* 101: 117-125

Corsini A, Bellocosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F (1999) New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther* 84: 413-428

Cromwell WC, Ziajka PE (2000) Development of tachyphylaxis among patients taking HMG CoA reductase inhibitors. *Am J Cardiol* 86: 1123-1127

Das I, Khan NS, Puri BK, Hirsch SR (1996) Elevated endogenous nitric oxide synthase inhibitor in schizophrenic plasma may reflect abnormalities in brain nitric oxide production. *Neurosci Lett* 215: 209-211

Daugherty A, Manning MW, Cassis LA (2000) Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 105: 1605-1612

Dean Potter D, Sobey CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD (1998) Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation* 98: 800-807

De Gasparo M (2002) Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev* 7: 347-358

Deibler GE, Martenson RE (1973) Determination of methylated basic amino acids with the amino acid analyzer. Application to total acid hydrolyzates of myelin basic proteins. *J Biol Chem* 248: 2387-2391

Delerive P, Furman C, Teissier E, Fruchart J, Duriez P, Staels B (2000) Oxidized phospholipids activate PPARalpha in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS Lett* 471: 34-38

Delles C, Schneider MP, John S, Gekle M, Schmieder RE (2002) Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens* 15: 590-593

Desrosiers R, Tanguay RM (1998) Methylation of Drosophila histones at proline, lysine and arginine residues during heat shock. *J Biol Chem* 263: 4686-4692

Devés R, Boyd CA (1998). Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 78: 487-545

Dierkes J, Westphal S, Martens-Lobenhoffer J, Luley C, Bode-Böger SM (2004) Fenofibrate increases the L-arginine:ADMA ratio by increase of L-arginine concentration but has no effect on ADMA concentration. *Atherosclerosis* 173: 239-244

Di Napoli P, Antonio Taccardi A, Grilli A, Spina R, Felaco M, Barsotti A, De Caterina R (2001) Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 51: 283-293

Di-Poi N, Tan NS, Michalik L, Wahli W, Desvergne B (2002) Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signalling pathway. *Mol Cell* 10: 721-733

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H (1991) Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 338: 1546-1550

Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W (2003) Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell* 77: 67-76

Dreyfuss G, Swanson MS, Pinol-Roma S (1988) Heterogenous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem* 13: 86-91

Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB (1983) Permanent cell line expression human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3734-3737

Edgell CJ, Haizlip JE, Bagnell CR, Packerham JP, Harrison P, Wilbourn B, Madden VJ (1990) Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In vitro Cell Dev Biol* 26: 1167-1172

Egashira K, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Inou T, Takeshita A (1994) Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation* 89: 2519-2524

Eid HM, Eritsland J, Larsen J, Arnesen H, Seljeflot I (2003) Increased levels of asymmetric dimethylarginine in populations at risk for atherosclerotic disease. Effects of pravastatin. *Atherosclerosis* 166: 279-284

Elkeles RS, Diamond JR, Poulter C, Dhanjil S, Nicolaidis AN, Mahmood S, Richmond W, Mather H, Sharp P, Feher MD (1998) Cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. A double-blind placebo-controlled study of bezafibrate: the St. Mary's, Ealing, Northwick Park Diabetes Cardiovascular Disease Prevention (SENDCAP) Study. *Diabetes Care* 21:641-648

ENCORE Investigators (2003) Effect of nifedipine and cerivastatin on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease: the ENCORE I Study (Evaluation of Nifedipine and Cerivastatin On Recovery of coronary Endothelial function). *Circulation* 107: 422-428

Endres ME, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8880-8885

Ericsson CG, Nilsson J, Grip L, Svane B, Hamsten A (1997) Effect of bezafibrate treatment over five years on coronary plaques causing 20% to 50% diameter narrowing (The Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial [BECAIT]). *Am J Cardiol* 80: 1125-1129

Feng Q, Lu X, Fortin AJ, Petterson A, Hedner T, Kline RL, Arnold JM (1998) Elevation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in experimental congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 37: 667-675

- Feron O, Michel JB, Sase K, Michel T (1998) Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: Complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. *Biochemistry* 37: 193-200
- Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL (2001) Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 103: 113-118
- Fickling SA, Leone AM, Nussey SS, Vallance P, Whitley GS (1993) Synthesis of N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-Dimethylarginine by human endothelial cells. *Endothelium* 1: 137-140
- Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ; Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP (2002) The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 109: 121-130
- Finck BN, Han X, Courtois M, Amond F, Nerbonne JM, Kovacs A, Gross RW, Kelly DP (2003) A critical role for PPARα-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1226-1231
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and function. *Hypertension* 23: 1121-1131
- Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Kato T, Takahashi K, Okumura K (2000) Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation* 101: 856-861
- Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griending KK, Harrison DG (1999) Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res* 85: 23-28
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
- Garg UC, Hassid A (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1774-1777

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

Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti M, Stühr DJ (1998) Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem* 273: 22267-22271

Giroux LM, Davignon J, Naruszewicz M (1993) Simvastatin inhibits the oxidation of low-density lipoproteins by activated human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1165: 335-338

Gohlke P, Linz W, Scholkens BA, Wiemer G, Unger T (1996) Cardiac and vascular effects of long-term losartan treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 28: 397-402

Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, Frend A, Shah V, Dillon MJ (1997) Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens* 15: 901-909

Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE (2001) Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 37: 489-492

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 1141-1148

Griffith OW, Stühr DJ (1995) Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57: 707-736

Grody WW, Dizikes GJ, Cederbaum SD (1987) Human arginase isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 13: 181-214

Hardy TA, May JM (2002) Coordinate regulation of L-arginine uptake and nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 32: 122-131

Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE, Vane JR (1990) The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8612-8616

Herlitz H, Peterson A, Sigstrom L, Wennmalm A, Westberg G (1997) The arginine-nitric oxide pathway in thrombotic microangiopathy. *Scand J Urol Nephrol* 31: 477-479

Hermenegildo C, Medina P, Peiro M, Segarra G, Vila JM, Ortega J, Lluch S (2002) Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5636-5640

Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S (1998) Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101: 2711-2719

Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nusey SS (1998) Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 178: 551-556

Hornig B, Arakawa N, Haussmann D, Drexler H (1998) Differential effects of quinaprilat und enalaprilat on endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 98: 2842-2848

Hsueh WA, Jackson S, Law RE (2001a) Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-gamma: a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care* 24: 392-397

Hsueh WA, Law RE (2001b) PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1891-1895

Hsueh WA, Law R (2003) The central role of fat effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 92: 3J-9J

Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS (1982) Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* 718: 49-59

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9269

Inoue I, Goto S, Mizotani k, Awata T, Matsunaga T, Kawai S, Nakajima T, Hokari S, Komoda T, Katayama S (2000) Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. *Life Sci* 67: 863-876

Inoue I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komoda T, Katayama S (2001) The ligands/activators for peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 50: 3-11

Inoue R, Miyake M, Kanazawa A, Sato M, Kakimoto Y (1979) Decrease of 3-methylhistidine and increase of N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine in the urine of patients with muscular dystrophy. *Metabolism* 28: 801-804

Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP (1999) Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 99: 3092-3095

Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A (2001) Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. *Jpn Circ J* 65: 775-778

Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A (2002) 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: 811-815

Janatuinen T, Laakso J, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimäki T, Raitakari OT, Knuuti J (2003) Plasma asymmetric dimethylarginine modifies the effect of pravastatin on myocardial blood flow in young adults. *Vasc Med* 8: 185-189

Jang JJ, Ho HK, Kwan HH, Fajardo LF, Cooke JP (2000) Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 102: 1414-1419

Ji H, Li H, Flinspach M, Poulos TL, Silverman RB (2003) Computer modeling of selective regions in the active site of nitric oxide synthases: implication for the design of isoform-selective inhibitors. *J Med Chem* 46: 5700-5711

Jiang DJ, Hu GY, Jiang JL, Xiang HL, Deng HW, Li YJ (2003) Relationship between protective effect of xanthone on endothelial cells and endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 11: 5171-5177

Jiang JL, Li NS, Li YJ, Deng HW (2002) Procubol preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Br J Pharmacol* 135, 1175-1182

John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, Weidinger G, Schmieder RE (1998) Increased bioavailability of nitric oxide after lipid lowering therapy in hypercholesterolemic patients - a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation* 98: 211-216

Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW (1999) Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol* 33: 234-241

Kakimoto Y, Matsuoka Y, Miyake M, Konishi H (1975) Methylated amino acid residues of proteins of brain and other organs. *J Neurochem* 24: 893-902

Kalinowski L, Dobrucki IT, Malinski T (2002) Cerivastatin potentiates nitric oxide release and eNOS expression through inhibition of isoprenoids synthesis. *J Physiol Pharmacol* 53: 585-595

Karlson P, Doenecke D, Koolmann J (1994) *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, 14. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, p. 187

Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A, Frei B, Curran-Celentano J, Shwaery GT, Loscalzo J, Vita JA (1993) Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11880-11884

Keaney JF Jr, Xu A, Cunningham D, Jackson T, Frei B, Vita JA (1995) Dietary procubol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J Clin Invest* 95: 2520-2529

Keaney JF Jr, Guo Y, Cunningham D, Shwaery GT, Xu A, Vita JA (1996) Vascular incorporation of alpha-tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation. *J Clin Invest* 98: 386-394

Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Schäffer J, Barbey M, Koch KM, Frölich JC (1999) Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 10: 594-600

Kielstein JT, Bode-Böger SM, Frölich JC, Haller H, Böger RH (2001) Relationship of asymmetric dimethylarginine to dialysis treatment and atherosclerotic disease. *Kidney Int Suppl* 78: S9-S13

Kielstein JT, Bode-Böger SM, Frölich C, Ritz E, Haller H, Fliser D (2003) Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation* 107: 1891-1895

Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Frölich JC, Hoepfer MM, Haller H, Fliser D (2004) Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 109: 172-177

Kim S (1973) Purification and properties of protein methylase II. Arch Biochem Biophys 157: 476-484

Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K (1993) Detection of N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. Arch Biochem Biophys 300: 657-662

Kimoto M, Sasakawa T, Tsuji H, Miyatake S, Oka T, Nio N, Ogawa T (1997) Cloning and sequencing of cDNA encoding N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine dimethylaminohydrolase from rat kidney. Biochim Biophys Acta 1337:6-10

Kimoto M, Miyatake S, Sasagawa T, Yamashita H, Okita M, Oka T, Ogawa T, Tsuji H (1998) Purification, cDNA cloning and expression of human N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Eur J Biochem 258: 863-868

Kintscher U, Goetze S, Wakino S, Kim S, Nagpal S, Chandraratna RA, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration in monocytes. Eur J Pharmacol 401: 259- 270

Kominz DR (1962) A method for the improved resolution of basic amino acids on the automatic amino acid analyzer. J Chromatogr 9: 253-254

Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 4651-4655

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. (1999) PPARgamma mediates high fat diet induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Mol Cell 4: 597-609

Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN (1995) Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. Am J Physiol 268: H2224-H2231

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H (2002) Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 106: 3073-3078

Lass A, Süssenbacher A, Wolkart G, Mayer B, Brunner F (2002) Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Mol Pharmacol* 61: 1081-1088

Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998a) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97: 1129-1135

Laufs U, Liao JK (1998b) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273: 24266-24271

Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M (2002) Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 942: 23-30

Law RE, Meehan WP, Xi XP, Graf K, Wuthrich DA, Coats W, Faxon D, Hsueh WA (1996) Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 98: 1897-1905

Lee G, Elwood F, McNally J, Weiszmann J, Lindstrom M, Amaral K, Nakamura M, Miao S, Cao P, Learned RM, Chen JL, Li Y (2002) T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferators-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem* 277: 19649-19657

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

Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P (2002) S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13527-13532

Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Class CK (2000a) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106: 523-531

Li H, Förstermann U (2000b) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190: 244-254

Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP (2002) Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 106: 987-992

LIPID Study Group (1998) Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med* 339: 1349-1357

Lu TM, Ding YA, Charng MJ, Lin SJ (2003) Asymmetrical dimethylarginine: a novel risk factor for coronary artery disease. *Clin Cardiol* 26: 458-464

Lundman P, Eriksson MJ, Stühlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P (2001) Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 38: 111-116

MacAllister RJ, Fickling SA, Whitley GS, Vallance P (1994a) Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol* 112: 43-48

MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P (1994b) Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int* 45: 737-742

MacAllister RJ, Rambašek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E (1996) Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 11: 2449-2452

Mahmoodi H, Hadley M, Chang YX, Draper HH (1995) Increased formation and degradation of malondialdehyde-modified proteins under conditions of peroxidative stress. *Lipids* 30: 963-966

Marra M, Bonfigli AR, Testa R, Testa I, Gambini A, Coppa G (2003) High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Anal Biochem* 318: 13-17

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM (2003) Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *J Chromatogr B* 798: 231-239

Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J (1998) Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* 153: 17-23

Masaaki K, Kurose I, Russell I, Granger DN (1997) Effect of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1521-1526

Masuda H, Goto M, Tamaoki S, Azuma H (1999) Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. *Br J Pharmacol* 126: 211-218

Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, Kohno K, Tamai O, Wada Y, Yasukawa H, Iwami G, Okuda S, Imaizumi T (1997) Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. *Hypertension* 29: 242-247

Michalik L, Wahli W (1999) Peroxisome proliferators-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol* 10: 564-570

Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J, Peters JM, Kaya G, Gonzalez FJ, Zakany J, Metzger D, Chambon P, Duboule D, Wahli W (2001) Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol* 154: 799-814

Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by  $Ca^{2+}$ -calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272: 15583-15586

Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T (1999) Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99: 1141-1146

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1988) The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12: 365-372

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142

Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG (1991) Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 69: 1293-1300

Mügge A, Brandes RP, Böger RH, Dwenger A, Bode-Böger S, Kienke S, Frölich JC, Lichtlen PR (1994) Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 24: 994-998

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

Nakagomi S, Kiryu-Seo S, Kimoto M, Emson PC, Kiyama H (1999) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) as a nerve-injury-associated molecule: mRNA localization in the rat brain and its coincident up-regulation with neuronal NO synthase (nNOS) in axotomized motoneurons. *Eur J Neurosci* 11: 2160-2166

Nakajima T, Matsuoka Y, Kakimoto Y (1971) Isolation and identification of N<sup>G</sup>-monomethyl-, N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl- and N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 230: 212-222

Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T (1994) Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH<sub>2</sub> does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arterioscler Thromb* 14: 746-752

Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MP, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PA (2003) The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clin Nutr* 22: 17-22

O'Discoll G, Green D, Taylor RR (1997) Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 95: 1126-1131

O'Discoll G, Green D, Maiorana A, Stanton K, Colreavy F, Taylor RR (1999) Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 33: 1506-1511

Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K (1987) Metabolism of N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>- and N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys* 252: 526-537

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K (1989) Purification and properties of a new enzyme, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 264: 10205-10209

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91: 2546-2551

Olken NM, Marletta MA (1993) N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry* 32: 9677-9685

Paik WK, Kim S (1968) Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem* 243: 2108-2114

Paik WK, Kim S (1970) Solubilization and partial purification of protein methylase 3 from calf thymus nuclei. *J Biol Chem* 245: 6010-015

Paiva H, Laakso J, Lehtimäki T, Isomustajarvi M, Ruokonen I, Laaksonen R (2003) Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 41: 219-222

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666

Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC (1999) Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 43: 509-520

Park KS, Lee HW, Hong SY, Shin S, Kim S, Paik WK (1988) Determination of methylated amino acids in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 440: 225-230

Pearson TA (2002) New tools for coronary risk assessment: what are the advantages and the limitations? *Circulation* 105: 886-892

Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J (1997) Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem* 272: 27307-27312

Pettersson A, Ugglä L, Backmann V (1997) Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 692: 257-262

Pi J, Kumagai Y, Sun G, Shimojo N (2000) Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 742: 199-203

Piatti P, Fragasso G, Monti LD, Setola E, Lucotti P, Fermo I, Paroni R, Galluccio E, Pozza G, Chierchia S, Margonato A (2003) Acute intravenous L-arginine infusion decreases endothelin-1 levels and improves endothelial function in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms: correlation with asymmetric dimethylarginine levels. *Circulation* 107: 429-436

Plutzky J (2003) Medicine. PPARs as therapeutic targets: reverse cardiology? *Science* 302: 406-407

Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10480-10484

Pollock JS, Narkane M, BATTERY LD, Martinez A, Springall D, Polak JM, Förstermann U, Murad F (1993) Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol* 265: C1379-1387

Pou S, Keaton L, Surichamorn W, Rosen GM (1999) Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 274: 9573-9580

Poynter ME, Daynes RA (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* 273: 32833-32841

Pritchard KA, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB (1995) Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 77: 510-518

Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB (2000) Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 645-651

Pundak S, Wilchek M (1981) Synthesis of guanidino-N-alkylarginines by the use of polymeric pseudoureas. *J Org Chem* 46: 808-809

Quion JA, Jones PH (1994) Clinical pharmacokinetics of pravastatin. *Clin Pharmacokinet* 27: 94-103

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987) The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92: 639-646

Rawal N, Lee YJ, Whitaker JN, Park JO, Paik WK, Kim S (1995) Urinary excretion of N<sup>G</sup>-dimethylarginines in multiple sclerosis patients: preliminary observations. *J Neurol Sci* 129: 186-191

Rector TS, Bank AJ, Mullen KA, Tschumperlin LK, Sih R, Pillai K, Kubo SH (1996) Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. *Circulation* 93: 2135-2141

Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwrex J, Palinski W, Glass CK (1998) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7614-7619

Rizzoni D, Muiesan ML, Porteri E, Castellano M, Zulli R, Bettoni G, Salvetti M, Monteduro C, Agabiti-Rosei E (1997) Effects of long-term antihypertensive treatment with lisinopril on resistance arteries of hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* 15: 197-204

Robins SJ, Collins D, Wittes JT, Papademetriou V, Deedwania PC, Schaefer EJ, McNamara JR, Kashyap ML, Hershman JM, Wexler LF, Rubins HB; VA-HIT Study Group. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial (2001) Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA* 285: 1585-1591

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelmann BM, Mortensen RM (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4: 611-617

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J (2000) Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res* 86: 1266-1272

Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 335: 1001-1009

Saltiel AR, Olefsky JM (1996) Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 45: 1661-1669

Santa Maria J, Vallance P, Charles IG, Leiper JM (1999) Identification of microbial dimethylarginine dimethylhydrolase enzymes. *Mol Microbiol* 33: 1278-1279

Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344: 1383-1389

Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H (2000) Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 101: 1372-1378

Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 42: 664-668

Scott HS, Antonarakis SE, Lalioti MD, Rossier C, Silver PA, Henry MF (1998) Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT 1L1 and HRMT 1L2). *Genomics* 48: 330-340

Sessa WC, Barber CM, Lynch KR (1993) Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from membrane to a cytosolic protein. *Circ Res* 72: 921-924

Shaul PW (2003) Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol* 547: 21-33

Smirnova IV, Sawamura T, Goligorsky MS (2004) Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by nitric oxide deficiency. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F25-32

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC (1998) Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98: 2088-2093

Stamler J, Wentworth D, Neaton JD (1986) Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 256: 2823-2828

Stampfer MJ, Hu FB, Manson JE, Rimm EB, Willett WC (2000) Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle. *N Engl J Med* 343: 16-22

Stepp DW, Ou J, Ackermann AW, Welak S, Klick D, Pritchard KA Jr (2002) Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H750-H759

Stichtenoth DO (1997) Nitrogen monoxide. Mediator or marker of chronic inflammation? *Internist* 38: 420-426

Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP (2001) Homocysteine impairs nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 104: 2569-2575

Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM; Tsao PS (2002) Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 287: 1420-1426

Suggs JE, Madden MC, Friedeman M, Edgell CJ (1986) Prostacyclin expression by a continuous human cell line derived from vascular endothelium. *Blood* 68: 825-829

Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Böger RH, Bode-Böger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Frölich JC (1999) Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 652-658

Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Böger SM, Hornig B, Frölich JC, Böger RH (2003) ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 57: 244-252

Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR (1996) DNA damage by nitric oxide. *Chem Res Toxicol* 9: 821-827

Tan NS, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M, Fluhmann B, Desvergne B; Wahli W (2001) Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev* 15: 3263-3277

Tang J, Gary JD, Clarke S, Herschman HR (1998) PRMT 3, a type I protein arginine methyltransferase that differs from PRMT 1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J Biol Chem* 273: 16935-16945

Tang J, Frankel A, Cook RJ, Kim S, Paik WK, Williams KR, Clarke S, Herschman HR (2000) PRMT 1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem* 275: 7723-7730

Tao L, Liu HR, Gao E, Teng ZP, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL, Batinic-Haberle I, Willette RN, Ohlstein EH, Yue TL (2003) Antioxidative, antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist in hypercholesterinemia. *Circulation* 108: 2805-2811

Teerlink T, Nijveldt RJ, Jong S, van Leeuwen PA (2002) Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 303: 131-137

Teerlink T, Neele SJ, de Jong S, Netelenbos JC, Stehouwer CD (2003) Oestrogen replacement therapy lowers plasma levels of asymmetrical dimethylarginine in healthy postmenopausal women. *Clin Sci (Lond)* 105: 67-71

Tenkanen L, Manttari M, Manninen V (1995) Some coronary risk factors related to the insulin resistance syndrome and treatment with gemfibrozil. Experience from the Helsinki Heart Study. *Circulation* 92:1779-1785

Tordjmann K, Bernal-Mizrachi C, Zemany L, Weng S, Feng C, Zhang F, Leone TC, Coleman T, Kelly DP, Semenkovich CF (2001) PPARalpha deficiency reduces insulin resistance and atherosclerosis in apoE-null mice. *J Clin Invest* 107: 1025-1034

Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart JC, Staels B (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol* 12: 245-254

Tran Cam TL, Fox MF, Vallance P, Leiper J (2000) Chromosomal localization, gene structure and expression pattern of DDAH 1: comparison with DDAH 2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 68: 101-105

Tsikakos D, Junker W, Frölich JC (1998) Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 705: 174-176

Tsikakos D (2000a) Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 72: 4064-4072

Tsikakos D, Böger RH, Sandmann J, Bode-Böger SM, Frölich JC (2000b) Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 478: 1-3

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

Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S (1992) The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 11: 433-439

Ueno S, Sano A, Kotani K, Kondoh K, Kakimoto Y (1992) Distribution of free methylarginines in rat tissues and in the bovine brain. *J Neurochem* 59: 2012-2016

Unger T (2002) The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 89: 3A-10A

Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T (1998) Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 62: 2425-2430

Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R (2001) Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 358: 2127-2128

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

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992b) Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 20: S60-62

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

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9220-9225

Wagner AH, Köhler T, Rückschloss U, Just I, Hecker M (2000) Improvement of nitric oxide-dependent vasodilation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 61-69

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T (1999) Increased NADPH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99: 2027-2033

Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G (2002) Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 300-305

Weiss D, Kools JJ, Taylor WR (2001) Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* 103: 448-454

White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, Parks DA, Tarpey MM, Freeman BA (1996) Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8745-8749

Wu G, Morris Jr SM (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336: 1-17

Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 274: 9116-9121

Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD; Galardi CM, Plunkert KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliwer SA, Willson TM, Stimmel JB (2002) Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* 415: 813-817

Yoo JH, Lee SC (2001) Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 158: 425-430

Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich JC, Böger RH (2001) Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 358: 2113-2117

Zoccali C, Benedetto FA, Maas, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino LS, Böger RH, CREED Investigators (2002a) Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 490-96

Zoccali C, Mallamaci F, Maas R; Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Böger RH, CREED Investigators (2002b) Left ventricular hypertrophy, cardiac remodelling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int* 62: 339-345

## 8. Anhang

### Material

#### Chemikalien

4124W

(S-2-amino-4(3-methylguanidino)butansäure	Prof. Vallance Lab. (London, UK)
Accutase	PAA-Laboratories (Linz, Österreich)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid/Bisacrylamid; 37,5:1	Biogene (North America, USA)
Agarose	Gibco (Karlsruhe)
Ameisensäure	Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad (München)
Angiotensin	Sigma (Deisenhofen)
Anti-AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology (California, USA)
Anti-AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology (California, USA)
Anti-DDAH 1-Antikörper (Maus, monoklonal)	M. Kimoto, Okayama Prefectural University (Okayama, Japan)
Anti-DDAH 2-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	M. Kimoto, Okayama Prefectural University (Okayama, Japan)
Anti-eNOS-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology (California, USA)
Anti-Goat IgG (HRP-konjugiert)	Sigma (Deisenhofen)
Anti-Mouse IgG (HRP-konjugiert)	Sigma (Deisenhofen)
Anti-Rabbit IgG (HRP-konjugiert)	Sigma (Deisenhofen)
Anti-β-Tubulin-Antikörper	Sigma (Deisenhofen)
Aqua ad iniectabilia	Baxter (Unterschleißheim)
L-Arginin	Sigma (Deisenhofen)
L-[ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-Arginin (98% für beide <sup>15</sup> N-Guanidino-Atome)	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)
Atorvastatin	Gödecke (Freiburg)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bradfordreagenz	Bio-Rad (München)
Bromcyan-aktivierte Agarose	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)

Butylhydroxytoluol (BHT)	Sigma (Deisenhofen)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Calmodulin (CaM)	Biomol (Hamburg)
Cerivastatin	Bayer (Leverkusen)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Cholesterol-KIT (Cholesterol 20)	Sigma (Deisenhofen)
Citronensäure (wasserfrei)	Merck (Darmstadt)
Cytotoxicity-Detection-Kit	Roche (Mannheim)
Dimethylamin	Sigma (Deisenhofen)
dNTPs (Nucleotidtriphosphat, 10 µM)	Promega (Madison, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco (Karlsruhe)
EGM-2-MV Bullet Kit	Cambrex (Verviers, Belgien)
Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	Alexis (Grünberg)
Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Kit	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Entwickler G150	Agfa-Gevaert (Leverkusen)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma (Deisenhofen)
Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether) (EGTA)	Sigma (Deisenhofen)
ETYA	Biomol (Hamburg)
Flavinadenindinukleotid (FAD)	Sigma (Deisenhofen)
Flavinadeninmononukleotid (FMN)	Sigma (Deisenhofen)
Fixierer G 350	Agfa-Gevaert (Leverkusen)
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert) (FKS)	Gibco (Karlsruhe)
Formaldehyd	Merck (Hohenbrunn)
Glucose	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
HAT-Supplement	Gibco (Karlsruhe)
Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])	Sigma (Deisenhofen)
L-Homoarginin	Sigma (Deisenhofen)
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen (Hilden)
Ionenaustauscherharz Dowex AG50W-X8	Bio-Rad (München)
Isotonische Kochsalzlösung	Baxter (Unterschleißheim)
Kaliumbromid	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)

Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Kupfersulfat	Merck (Darmstadt)
Losartan	MSD Sharp & Dome (Haar)
Magensiumchlorid	Merck (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Milchpulver	Nestle (Frankfurt)
3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Sigma (Deisenhofen)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumnitrat	Riedel de Haen (Seelze)
Natrium[ <sup>15</sup> N]nitrat, (98,5% <sup>15</sup> N)	MSD Isotopes MFC (Montreal, Canada)
Natriumnitrit	Riedel de Haen (Seelze)
Natrium[ <sup>15</sup> N]nitrit, (98,5% <sup>15</sup> N)	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)
Natriumphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumtetraborat	Merck (Darmstadt)
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)	Boehringer (Mannheim)
N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA)	Sigma (Deisenhofen)
N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-[ <sup>14</sup> C]-Arginin	Prof. Vallance Lab. (London, UK)
N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -Dimethyl-L-Arginin (Asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin, ADMA)	Sigma (Deisenhofen)
N <sup>G</sup> ,N <sup>G'</sup> -Dimethyl-L-Arginin (Symmetrisches Dimethyl-L-Arginin, SDMA)	Sigma (Deisenhofen)
N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin (L-NNA)	Sigma (Deisenhofen)
L-Ornithinhydrochlorid-3,3,4,4,5,5,-d <sub>6</sub> (98% für alle Deuterium-Atome)	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)
ortho-Phthaldialdehyd (OPA)	Sigma (Deisenhofen)
PD 123,319	Sigma (Deisenhofen)
Pentafluorobenzylbromid (PFB)	Sigma (Deisenhofen)
Pentafluoropropionsäureanhydrid (PFAA)	Pierce (Rockford, USA)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen)

Pravastatin	Bristol-Myers-Squibb (Regensburg)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma (Deisenhofen)
Proteinstandard (Broad Range)	Bio-Rad (München)
Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC)	Sigma (Deisenhofen)
QuantiTect™ SYBR®Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Random Primer	Promega (Madison, USA)
RNAsin	Promega (Madison, USA)
RNAzol	WAK-Chemie (Steinbach)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Simvastatin	Merck (Rahway, USA)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
SuperScript™ II	Gibco (Karlsruhe)
Szintillationsflüssigkeit, Ultima Gold®	Packard Bioscience (Groningen, Niederlande)
Tetrahydrobiopterin (H <sub>4</sub> B)	Sigma (Deisenhofen)
Tetramethylethylenamin (TEMED)	Merck (Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris/HCl bzw. Tris/Base)	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen)
Trypsin (10x)	Gibco (Karlsruhe)
Tween® 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Sigma (Deisenhofen)
WY 14,643	Alexis (Grünberg)

**Substanzen mit R- und S- Sätzen**

Aceton	R: 11-36-66-67	S: 9-16-26
Acrylamid/ Bisacrylamid 37,5:1	R: 45-46-23/24/25-48	S: 36/37/39-43-45-60
Ameisensäure	R: 35	S: 23-26-45
Ammoniumpersulfat	R: 8-22-36/37/38-42/43	S: 22-24-26-37
Atorvastatin	R: 36-48/22	S: 25-53
Bradfordreagenz	R: 34-20/21/22	S: 24-25-45-36/37/39
Bromcyan-aktivierte Agarose	R: 26/27/28-32-50/53	S: 7-28-29-45-60-61
Calciumchlorid	R: 36	S: 22-44
Cerivastatin	R: 25-41-51/53	S: 22-26-38-45
Chloroform	R: 22-38-40/20/22	S: 36/37

## Anhang

---

Citronensäure (wasserfrei)	R: 36	S: 26
Dimethylamin	R: 22-36/37/38	S: 26-36
Essigsäure	R: 10-35	S: 23-26-45
Ethanol	R: 11	S: 7-16
Ethidiumbromid	R: 22-26-36/37/38-40	S: 26-28-36/37/39-45-51
Ethylendiamintetraessigsäure	R: 22-36/37/38	S: 26-36
Formaldehyd	R: 23/24/25-34-40-43	S: 26-36/37/39-45-51
Kaliumhydroxid	R: 22-35	S: 26-36/37/39-45
Kupfersulfat	R: 22-36/38-50/53	S: 22-60-61
β-Mercaptoethanol	R: 24-20/22-36/37-41	S: 26-36/37/39-45
Methanol	R: 11-23/24/25-39/23/24/25	S: 7-16-36/37-45
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	R: 36/37/38	S: 26-36
Natriumchlorid	R: 36/37/38	S: 26-36
Natriumhydroxid	R: 35	S: 26-37/39-45
Natriumphosphat	R: 36/38	S: /
Natriumtetraborat	R: /	S: 24/25
ortho-Phthaldialdehyd	R: 20/21/22-36/37/38	S: 26-36
Ponceau S	R: 36/37/38	S: 26-36
2-Propanol	R: 11	S: 7-16
Salzsäure	R: 34-37	S: 26-36/37/39-45
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	R: 22-36/38	S: /
Tetramethylethylenamin (TEMED)	R: 11-20/22-34	S: 16-26-36/37/39-45
Toluol	R: 11-20	S: 16-25-29-33
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	R: 36/38	S: /
Triton X-100	R: 22-41	S: 24-26-39
Trypsin	R: 36/37/38-42	S: 22-24-26-36/37

### Für die GC-MS verwendete Gase

Argon (5,0), Helium (5,0), Methan (5,5)

Linde (Hannover)

### Zellen

EA.hy 926

Dr. Edgell Lab. (North Carolina,  
USA)

Humane Koronararterienendothelzellen (HCAEC)

Cambrex (Verviers, Belgien)

**Lösungen und Puffer**

Aktivitätspuffer:	300 mM 150 mM 1 mM	NaCl Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> EDTA
AssayMix (DDAH-Aktivität)	200 µM 0,05 ‰ (v/v) in Aktivitätspuffer	L-NMMA L-[ <sup>14</sup> C]-NMMA
Boratpuffer, pH 8,5:	0,2 M	Borsäure
Krebs-Puffer:	131 mM 25 mM 20 mM 5,5 mM 5,5 mM 2,5 mM 1 mM 1 mM	NaCl NaHCO <sub>3</sub> Hepes Glucose KCl CaCl <sub>2</sub> MgCl <sub>2</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
3x Lämmli-Puffer:	18,75 % (v/v) 30 % (v/v) 15 % (v/v) 30 % (v/v) 0,002 % (v/v)	Tris/HCL, 0,5 M, pH 6,8 Glycerin β-Mercaptoethanol SDS, 20 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer, pH 8,3:	192 mM 25 mM 2,5 % (v/v)	Glycin Tris/HCl SDS, 20 % (w/v)
Medium für zellbiologische Arbeiten:	10 % (v/v) 2 % (v/v) in DMEM (Gibco)	FKS HAT
MOPS-EDTA:	0,2 M 0,05 M 2 % (v/v)	MOPS Natriumacetat 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Murakami-Puffer:	50 mM 5 mM 5 mM 5 mM	Tris/HCl, pH 7,4 MgCl <sub>2</sub> EDTA EGTA
PBS:	137 mM 61,1 mM 6,5 mM 2,7 mM 1,5 mM 0,68 mM 0,5 mM	NaCl Glucose Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> CaCl <sub>2</sub> MgCl <sub>2</sub>
Phosphatpuffer, pH 7,0:	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## Anhang

---

10 x TBE:	0,9 M 0,89 M 4 % (v/v)	Tris/Base Borsäure 0,5 M EDTA (pH 8,0)
TBS, pH 7,6:	150 mM 10 mM	NaCl Tris/HCl
TBST, pH 7,6:	150 mM 10 mM 0,1 %	NaCl Tris/HCl Tween® 20
Transferpuffer:	192 mM 25 mM 10 % (v/v) 1 % (v/v)	Glycin Tris/HCl Methanol SDS, 20 % (w/v)

### Für die HPLC verwendete Laufpuffer:

Eluent A, pH 6,8:	33,3 mM 33,3 % (v/v)	Citronensäure (wasserfrei) Methanol
Eluent B:	90 % (v/v)	Methanol

### Gele

Agarose-Gel:	1,8 % (w/v) 0,01 ‰ (v/v) in TBE (1x)	Agarose Ethidiumbromid
Denaturierendes RNA-Gel:	1 % (w/v) 5 % (v/v) 0,01 ‰ (v/v) in MOPS-EDTA (1x)	Agarose Formaldehyd Ethidiumbromid
Sammelgel:	4 % (v/v) 2,5 % (v/v) 0,5 % (v/v) 0,5 % (v/v) 0,1 % (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid; 37,5:1 Tris/HCl, 0,5 M, pH 6,8 SDS, 20 % (w/v) APS, 10 % (w/v) TEMED
Trenngel:	10 % (v/v) 18,8 % (v/v) 0,5 % (v/v) 0,5 % (v/v) 0,05 % (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid; 37,5:1 Tris/HCl, 2 M, pH 8,8 SDS, 20 % (w/v) APS, 10 % (w/v) TEMED

**Verbrauchsmaterial**

Autosamplergefäße mit Bördelverschluss (GC-MS)	GC-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)
Autosamplergefäße mit Rundboden, Chromacol (HPLC)	Abimed (Langenfeld)
Autosamplergefäße mit Schnappdeckelverschluss (GC-MS)	GC-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)
Bördelkappen mit geschlitztem Deckel (HPLC)	Macherey-Nagel (Düren)
Eppendorfggefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Röhrchen (15, 50 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Filmmaterial (X-OMAT)	Kodak (Stuttgart)
Filterpapier 3 MM	Whatmann (Maidstone, UK)
Glaskapillaren für Light Cycler	Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz)
HPLC-Säule: CC 250/4 Nucleosil 100-5 C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	Macherey-Nagel (Düren)
HPLC-Vorsäule: CC 8/4 Nucleosil 100-5-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	Macherey-Nagel (Düren)
Kapillarsäule DB-5 MS (30m x 0,25mm I.D., 0,25 µm Filmdicke) (Nitrat, Nitrit)	J. & W. Scientific (Ran. Cordova, USA)
Kapillarsäule Optima-17 (30m x 0.25mm I.D., 0,25 µm Filmdicke) (ADMA)	Macherey-Nagel (Düren)
Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Limited volume inserts (0,3ml)	Brown (Wertheim)
Nitrocellulose (Protran <sup>®</sup> , 0,45 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Pasteurpipetten	Brand GmbH (Wertheim)
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Hybaid (Heidelberg)
PP-Röhrchen (5 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Rührspatel 120mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten (1, 2, 10, 25 ml)	Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, USA)
Slide-A-Lyzer <sup>®</sup> Dialysekassette (MWCO 10,000, 0,5-3 ml, 3-15 ml)	Pierce (Rockford, USA)
SPE-Kartusche Bond Elut CBA	Varian (Darmstadt)
Spritzen	B. Braun (Melsungen)
Sterican <sup>®</sup> -Kanülen	B. Braun (Melsungen)

Sterilfilter (0,22, 0,45 µm)	Merck (Bruchsal)
Szintillationsgefäße	Rudolf Franke Labortechnik (Hamburg)
Ultrazentrifugenröhrchen (30 ml)	Sorvall (Newton, USA)
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen 80 cm <sup>2</sup>	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturschalen (35 x 10mm, 60 x 10 mm)	Greiner (Frickenhausen)
Zellschaber	Greiner (Frickenhausen)

### **Laborgeräte**

Agarosegelkammer	Bio-Rad (München)
Analysenwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Blotkammer	Bio-Rad (München)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Chromabond Vakuumkammer	Macherey-Nagel (Düren)
Digitalwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad (München)
GC-MS (CP-3800; 1200 Quadrupole MS)	Varian (Walnut Creek, USA)
HPLC (P580 Pumpe, ASI 100 Autosampler, RF 2000 Fluoreszenz-Detektor)	Dionex Softron GmbH (Germering)
Kühltruhe (-20°C, -80°C)	Kryotec (Hamburg)
Light Cycler	Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz)
Magnetrührer	Heidolph (Kelheim)
Mikroskop, Axiovert HBO 50	Zeiss (Jena)
PCR-Heizblock Express	Hybaid (Heidelberg)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Photometer	Perkin Elmer (Palo Alto, USA)
Pipettus Accu-jet	Eppendorf (Hamburg)
Power Supply	Bio-Rad (München)
Reinraumwerkbank LaminAir HB 2448	Heraeus (Hanau)
Speed-Vac RVC 2-25	Christ (Osterode)
Szintillationszähler	Beckmann (Palo Alto, USA)
Thermoblock Telex Bioblock 890436 F	Bioblock Scientific (Illkirch Cedex, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge Centricon (T-2170) (Rotor 50.2 TI)	Contron Instruments (Mailand, Italien)

Vakuumpumpe Mini-Vac E 1	PeqLab (Erlangen)
Vakuumpumpe RZ 5 (4 x 10 <sup>-4</sup> mbar)	Vaccubrand (Wertheim)
Vortexer	Heidolph (Kelheim)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Eschborn)
Zentrifuge Rotina 35 R	Hettich (Tuttlingen)

## R- und S-Sätze

### R-Sätze weisen auf besondere Gefahren hin

- R 1 In trockenem Zustand explosionsgefährlich
- R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich
- R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich
- R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen
- R 5 Beim Erwärmen explosionsfähig
- R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig
- R 7 Kann Brand verursachen
- R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
- R 9 Explosionsgefahr bei Mischen mit brennbaren Stoffen
- R 10 Entzündlich
- R 11 Leichtentzündlich
- R 12 Hochentzündlich
- R 14 Reagiert heftig mit Wasser
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
- R 16 Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen
- R 17 Selbstentzündlich an der Luft
- R 18 Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger/leichtentzündlicher Dampf-Luftgemische möglich
- R 19 Kann explosionsfähige Peroxide bilden
- R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen
- R 21 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
- R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
- R 23 Giftig beim Einatmen
- R 24 Giftig bei Berührung mit der Haut
- R 25 Giftig beim Verschlucken
- R 26 Sehr giftig beim Einatmen
- R 27 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut
- R 28 Sehr giftig beim Verschlucken
- R 29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase
- R 30 Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden
- R 31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase
- R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
- R 33 Gefahr kumulativer Wirkungen
- R 34 Verursacht Verätzungen
- R 35 Verursacht schwere Verätzungen
- R 36 Reizt die Augen

R 37	Reizt die Atmungsorgane
R 38	Reizt die Haut
R 39	Ernste Gefahr irreversiblen Schadens
R 40	Irreversibler Schaden möglich
R 41	Gefahr ernster Augenschäden
R 42	Sensibilisierung durch Einatmen möglich
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 44	Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss
R 45	Kann Krebs erzeugen
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen
R 48	Gefahr ernster Gesundheitsschäden
R 49	Kann Krebs erzeugen
R 50	Sehr giftig für Wasserorganismen
R 51	Giftig für Wasserorganismen
R 52	Schädlich für Wasserorganismen
R 53	Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
R 54	Giftig für Pflanzen
R 55	Giftig für Tiere
R 56	Giftig für Bodenorganismen
R 57	Giftig für Bienen
R 58	Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben
R 59	Gefährlich für die Ozonschicht
R 60	Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 63	Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen
R 64	Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen
R 65	Gesundheitsschädlich: kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen
R 66	Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit hervorrufen

**S-Sätze dienen als Sicherheitsratschläge**

S 1	Unter Verschluss aufbewahren
S 2	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen
S 3	Kühl aufbewahren
S 4	Von Wohnplätzen fernhalten
S 5	Unter...aufbewahren (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben)
S 6	Unter...aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben)
S 7	Behälter dicht geschlossen halten
S 8	Behälter trocken halten
S 9	Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
S 12	Behälter nicht gasdicht verschließen
S 13	Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
S 14	Von...fernhalten (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben)
S 15	Vor Hitze schützen
S 16	Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen
S 17	Von brennbaren Stoffen fernhalten
S 18	Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben
S 20	Bei der Arbeit nicht essen und trinken

- S 21 Bei der Arbeit nicht rauchen
- S 22 Staub nicht einatmen
- S 23 Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen (geeignete Bezeichnung(en) vom Hersteller anzugeben)
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden
- S 25 Berührung mit den Augen vermeiden
- S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
- S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen
- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel... (vom Hersteller anzugeben)
- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
- S 30 Niemals Wasser hinzugießen
- S 33 Maßnahmen gegen elektronische Aufladung treffen
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen
- S 39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit...reinigen (Material vom Hersteller anzugeben)
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen
- S 42 Bei Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen (geeignete Bezeichnung(en) vom Hersteller anzugeben)
- S 43 Zum Löschen... (vom Hersteller anzugeben) verwenden (wenn Wasser die Gefahr erhöht, anfügen: „Kein Wasser verwenden“)
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen
- S 47 Nicht bei Temperaturen über...°C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben)
- S 48 Feucht halten mit...(geeignetes Mittel vom Hersteller anzugeben)
- S 49 Nur die Originalbehälter aufbewahren
- S 50 Nicht mischen mit...(vom Hersteller anzugeben)
- S 51 Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden
- S 52 Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume zu verwenden
- S 53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
- S 56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen
- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeignete Behälter verwenden
- S 59 Information zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
- S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen
- S 63 Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhig stellen
- S 64 Bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen (nur wenn Verunfallter bei Bewusstsein ist)

## Ergebnistabellen

**Zu Abbildung 22 A:** Berechnung der Konzentration von [<sup>15</sup>N]-Nitrit in pmol/ml und Angabe der Mittelwerte ± SEM:

<u>Zeit (min)</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>ADMA</u>	<u>L-NMMA</u>	<u>L-NNA</u>
1	17,99 ± 1,35	19,29 ± 3,22	17,74 ± 0,90	14,68 ± 0,59
3	53,52 ± 0,96	49,33 ± 5,14	43,45 ± 2,25	29,88 ± 2,95
5	85,23 ± 5,94	77,33 ± 2,16	78,74 ± 2,59	46,61 ± 3,38
10	206,15 ± 20,71	157,72 ± 10,44	148,49 ± 1,46	77,40 ± 3,41
20	368,73 ± 3,81	290,93 ± 23,93	233,02 ± 40,57	123,03 ± 2,32
30	480,07 ± 6,00	381,78 ± 16,09	369,32 ± 56,63	179,81 ± 0,34

**Zu Abbildung 22 B:** Berechnung der prozentualen Veränderung der [<sup>15</sup>N]-Nitrit-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle und Angabe der Mittelwerte ± SEM:

	<u>ADMA</u>	<u>L-NMMA</u>	<u>L-NNA</u>
[ <sup>15</sup> N]-Nitrit	23,49 ± 5,06	27,97 ± 0,71	62,4 ± 1,66

**Zu Abbildung 22 C:** Berechnung der Konzentration von [<sup>15</sup>N]-Nitrat in pmol/ml und Angabe der Mittelwerte ± SEM:

<u>Zeit (min)</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>ADMA</u>	<u>L-NMMA</u>	<u>L-NNA</u>
1	14,50 ± 3,58	21,68 ± 6,67	19,86 ± 23,40	11,23 ± 0,67
3	37,25 ± 22,94	45,83 ± 7,40	50,50 ± 13,48	18,35 ± 9,67
5	81,30 ± 2,79	82,57 ± 20,37	76,22 ± 20,91	21,78 ± 10,89
10	152,72 ± 5,50	129,14 ± 4,54	126,55 ± 7,91	89,94 ± 21,48
20	268,75 ± 7,73	229,71 ± 28,16	238,39 ± 51,73	123,30 ± 7,13
30	380,80 ± 2,44	309,84 ± 58,79	420,81 ± 111,36	177,47 ± 1,46

**Zu Abbildung 22 D:** Berechnung der prozentualen Veränderung der [<sup>15</sup>N]-Nitrat-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle und Angabe der Mittelwerte ± SEM:

	<u>ADMA</u>	<u>L-NMMA</u>	<u>L-NNA</u>
[ <sup>15</sup> N]-Nitrat	15,44 ± 2,97	17,14 ± 5,18	41,11 ± 14,06

**Zu Abbildung 23:** Berechnung der [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit-Bildungsgeschwindigkeit in nmol/min x mg und Angabe der Mittelwerte  $\pm$  SEM:

<u>L-[<math>^{15}\text{N}_2</math>]-Arginin [<math>\mu\text{M}</math>]</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>ADMA 1 <math>\mu\text{M}</math></u>	<u>ADMA 2 <math>\mu\text{M}</math></u>	<u>ADMA 5 <math>\mu\text{M}</math></u>	<u>ADMA 10 <math>\mu\text{M}</math></u>
0	0	0	0	0	0
2,5	0,243 $\pm$ 0,017	0,188 $\pm$ 0,021	0,160 $\pm$ 0,018	0,127 $\pm$ 0,020	0,076 $\pm$ 0,002
5	0,337 $\pm$ 0,031	0,308 $\pm$ 0,023	0,251 $\pm$ 0,019	0,212 $\pm$ 0,038	0,138 $\pm$ 0,007
7,5	0,505 $\pm$ 0,025	0,408 $\pm$ 0,030	0,361 $\pm$ 0,045	0,274 $\pm$ 0,010	0,171 $\pm$ 0,028
10	0,563 $\pm$ 0,040	0,566 $\pm$ 0,027	0,441 $\pm$ 0,023	0,374 $\pm$ 0,034	0,262 $\pm$ 0,020
12,5	0,536	0,463	0,438	0,350	0,267
15	0,615 $\pm$ 0,033	0,576 $\pm$ 0,090	0,486 $\pm$ 0,009	0,471 $\pm$ 0,020	0,281 $\pm$ 0,023
20	0,702 $\pm$ 0,029	0,617 $\pm$ 0,048	0,582 $\pm$ 0,047	0,528 $\pm$ 0,016	0,411 $\pm$ 0,034
30	0,796 $\pm$ 0,092	0,749 $\pm$ 0,074	0,634 $\pm$ 0,046	0,593 $\pm$ 0,004	0,474 $\pm$ 0,047
40	0,776 $\pm$ 0,042	0,816 $\pm$ 0,093	0,720 $\pm$ 0,044	0,611 $\pm$ 0,020	0,570 $\pm$ 0,050

**Zu Abbildung 24 A:** Originaldaten für die Lineweaver-Burk-Auftragung

<u>1/ L- [<math>^{15}\text{N}_2</math>]- Arginin [1/<math>\mu\text{M}</math>]</u>	<u>1/[<math>^{15}\text{N}</math>]-Nitrit [nmol/min x mg]</u>											
	<u>Kontrolle</u>			<u>ADMA 1 <math>\mu\text{M}</math></u>				<u>ADMA 2 <math>\mu\text{M}</math></u>				
0,400	4,604	3,774	4,065	4,779	5,289	4,880	6,712	5,737	7,030	5,480	7,116	
0,200	3,135	2,607	3,252	2,891	3,148	3,244	3,829	4,041	3,562	4,059	4,366	
0,133	1,890	2,142	1,931	2,355	2,253	2,463	2,803	3,188	2,250	2,952	2,869	
0,100	1,661	1,710	1,989	1,727	1,662	1,807	1,885	2,149	2,136	2,326	2,486	
0,080			1,866				2,161				2,282	
0,067	1,505	1,638	1,752	1,603	1,605	1,586	2,351	1,679	2,290	2,174	2,209	
0,050	1,342	1,446	1,495	1,480	1,623	1,534	1,903	1,543	1,632	1,735	2,044	
0,033	1,072	1,326	1,430	1,277	1,209	1,318	1,595	1,594	1,419	1,580	1,754	
0,025	1,285	1,196	1,402		1,117	1,139	1,479	1,417	1,289	1,518	1,355	

<u>1/ L- [<math>^{15}\text{N}_2</math>]- Arginin [1/<math>\mu\text{M}</math>]</u>	<u>1/[<math>^{15}\text{N}</math>]-Nitrit [nmol/min x mg]</u>							
	<u>ADMA 5 <math>\mu\text{M}</math></u>				<u>ADMA 10 <math>\mu\text{M}</math></u>			
0,400	6,375	11,179	8,667	6,810	12,769	12,742	13,641	13,422
0,200	4,394	3,788	5,439	5,814	6,990	7,560	6,816	7,641
0,133	3,176	4,057	3,855	3,635	5,612	5,696	4,948	7,890
0,100	2,654	2,960	2,458		2,993	4,816	3,860	4,043
0,080								3,738
0,067	1,786	2,235	2,461		3,356	3,230	3,734	4,031
0,050	1,969	1,801	1,915		2,262	2,211	2,642	2,690
0,033	1,668	1,684	1,706		1,696	1,975	2,661	2,362
0,025	2,018	1,450	1,542		1,732	1,609	1,695	2,028

**Zu Abbildung 24 B:** Originaldaten für die Hanes-Auftragung

L-[ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-Arginin [μM]	L-[ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-Arginin [μM]/[ <sup>15</sup> N]-Nitrit [nmol/min x mg]											
	Kontrolle			ADMA 1 μM				ADMA 2 μM				
2,5	11,51	9,43	10,16	11,95	13,22	12,20	16,78	14,34	17,57	13,70	17,79	
5	15,68	13,04	16,26	14,46	15,74	16,22	19,14	20,21	17,81	20,29	21,83	
7,5	14,17	16,06	14,48	17,66	16,90	18,47	21,02	23,91	16,87	22,14	21,52	
10	16,61	17,10	19,89	17,27	16,62	18,07	18,85	21,49	21,36	23,26	24,86	
12,5			23,32				27,02				28,53	
15	22,57	24,58	26,28	24,04	24,08	23,79	35,26	25,18	34,35	32,61	33,14	
20	26,83	28,92	29,91	29,60	32,46	30,68	38,06	30,86	32,63	34,70	40,88	
30	32,16	39,77	42,90	38,31	36,28	39,53	47,84	47,82	42,57	47,40	52,62	
40	51,40	47,86	56,07		44,70	45,54	59,14	56,68	51,55	60,72	54,20	

L-[ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-Arginin [μM]	L-[ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]-Arginin [μM]/[ <sup>15</sup> N]-Nitrit [nmol/min x mg]								
	ADMA 5 μM					ADMA 10 μM			
2,5	15,94	27,95	21,67	17,02	31,92	31,85	34,10	33,56	
5	21,97	18,94	27,20	29,07	34,95	37,80	34,08	38,20	
7,5	23,82	30,43	28,91	27,26	42,09	42,72	37,10	59,17	
10	26,54	29,60	24,58		29,94	48,16	38,60	40,43	
12,5								46,73	
15	26,78	33,53	36,92		50,33	48,44	56,02	60,46	
20	39,38	36,03	38,30		45,25	44,22	52,85	53,81	
30	50,03	50,52	51,18		50,88	59,25	79,84	70,85	
40	80,74	58,00	61,66		69,27	64,36	67,81	81,11	

**Zu Abbildung 25:** Sekundärauftragung nach Lineweaver-Burk

ADMA [μM]	$\frac{K_M/V}{(1 + ADMA [\mu M]/K_i)}$
1	11,09
2	13,25
5	18,09
10	30,16

**Zu Abbildung 26:** Gegenüberstellung der analysierten [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten in nmol/min x mg Enzym mit den berechneten [ $^{15}\text{N}$ ]-Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten nach Lineweaver-Burk unter Annahme einer kompetitiven (komp.) und unter Annahme einer nicht kompetitiven (nicht-komp.) Hemmung. Die in der Abbildung als Punkte dargestellten, analysierten Einzelwerte sind in dieser Tabelle als Mittelwerte  $\pm$  SEM analog Abbildung 23 angegeben:

L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin [ $\mu\text{M}$ ]	$^{15}\text{N}$ -Nitrit [nmol/min x mg]					
	ADMA 1 $\mu\text{M}$ (Analyse)	ADMA 1 $\mu\text{M}$ (komp.)	ADMA 1 $\mu\text{M}$ (nicht-komp.)	ADMA 2 $\mu\text{M}$ (Analyse)	ADMA 2 $\mu\text{M}$ (komp.)	ADMA 2 $\mu\text{M}$ (nicht-komp.)
0	0	0	0	0	0	0
2,5	0,188 $\pm$ 0,021	0,191	0,190	0,160 $\pm$ 0,018	0,161	0,160
5	0,308 $\pm$ 0,023	0,317	0,315	0,251 $\pm$ 0,019	0,275	0,271
7,5	0,408 $\pm$ 0,030	0,407	0,402	0,361 $\pm$ 0,045	0,359	0,353
10	0,566 $\pm$ 0,027	0,473	0,468	0,441 $\pm$ 0,023	0,424	0,415
12,5	0,463	0,525	0,518	0,438	0,476	0,465
15	0,576 $\pm$ 0,090	0,566	0,558	0,486 $\pm$ 0,009	0,518	0,505
20	0,617 $\pm$ 0,048	0,628	0,618	0,582 $\pm$ 0,047	0,583	0,566
30	0,749 $\pm$ 0,074	0,704	0,692	0,634 $\pm$ 0,046	0,666	0,644
40	0,816 $\pm$ 0,093	0,750	0,736	0,720 $\pm$ 0,044	0,717	0,692

L- $^{15}\text{N}_2$ -Arginin [ $\mu\text{M}$ ]	$^{15}\text{N}$ -Nitrit [nmol/min x mg]					
	ADMA 5 $\mu\text{M}$ (Analyse)	ADMA 5 $\mu\text{M}$ (komp.)	ADMA 5 $\mu\text{M}$ (nicht-komp.)	ADMA 10 $\mu\text{M}$ (Analyse)	ADMA 10 $\mu\text{M}$ (komp.)	ADMA 10 $\mu\text{M}$ (nicht-komp.)
0	0	0	0	0	0	0
2,5	0,127 $\pm$ 0,020	0,109	0,108	0,076 $\pm$ 0,002	0,071	0,070
5	0,212 $\pm$ 0,038	0,196	0,191	0,138 $\pm$ 0,007	0,133	0,128
7,5	0,274 $\pm$ 0,010	0,266	0,257	0,171 $\pm$ 0,028	0,186	0,177
10	0,374 $\pm$ 0,034	0,324	0,311	0,262 $\pm$ 0,020	0,232	0,219
12,5	0,350	0,372	0,355	0,267	0,273	0,255
15	0,471 $\pm$ 0,020	0,414	0,393	0,281 $\pm$ 0,023	0,309	0,287
20	0,528 $\pm$ 0,016	0,480	0,452	0,411 $\pm$ 0,034	0,371	0,339
30	0,593 $\pm$ 0,004	0,573	0,534	0,474 $\pm$ 0,047	0,465	0,415
40	0,611 $\pm$ 0,020	0,634	0,586	0,570 $\pm$ 0,050	0,531	0,467

**Zu Abbildung 27:** Bestimmung der IC<sub>50</sub> von ADMA und Angabe der Mittelwerte ± SEM:

<u>ADMA <math>\mu\text{M}</math></u>	<u>Inhibition (%)</u>
1	12,05 ± 6,62
2	17,13 ± 6,96
5	24,71 ± 2,54
10	41,43 ± 5,13
12,78	50

**Zu Abbildung 28:** Vergleich der Michaelis-Menten-Konstanten für die [<sup>15</sup>N]-Nitrit- und für die [<sup>15</sup>N]-Nitratbildung

<u>K<sub>M</sub> L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin [<math>\mu\text{M}</math>]</u> <u>([<sup>15</sup>N]-Nitrit)</u>	<u>K<sub>M</sub> L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin [<math>\mu\text{M}</math>]</u> <u>([<sup>15</sup>N]-Nitrat)</u>
7,95	5,51
11,09	6,26
13,25	7,45
18,09	11,51
30,16	16,40

**Zu Abbildung 29:** Angabe der Verhältnisse der [<sup>15</sup>N]-Nitrit-Bildungsgeschwindigkeit zur [<sup>15</sup>N]-Nitrat-Bildungsgeschwindigkeit als Mittelwerte ± SEM:

<u>ADMA [<math>\mu\text{M}</math>]</u>	<u>L-Arginin [2,5 <math>\mu\text{M}</math>]</u>	<u>L-Arginin [20 <math>\mu\text{M}</math>]</u>
0	0,779 ± 0,178	0,808 ± 0,077
1	0,639 ± 0,061	0,795 ± 0,113
2	0,640 ± 0,083	0,785 ± 0,128
5	0,728 ± 0,313	0,965 ± 0,124
10	0,603 ± 0,148	0,908 ± 0,139

**Zu Abbildung 32:** Die Peakflächenverhältnisse für die Zielionen m/z 634 für ADMA und m/z 640 für [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA werden angegeben als Mittelwerte ± SD:

<u>ADMA [<math>\mu\text{M}</math>]</u>	<u>m/z 634/m/z 640</u>
0	0
0,1	0,31 ± 0,01
0,2	0,56 ± 0,01
0,4	1,06 ± 0,01
0,8	2,11 ± 0,02

**Zu Abbildung 35:** Die Peakflächenverhältnisse des Zielions mit m/z 634 für ADMA zu dem Zielion mit m/z 640 für [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ADMA und die Peakflächenverhältnisse für L-Arginin bzw. L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin mit m/z 586 und m/z 588 werden als Mittelwerte ± SD angegeben:

<u>ADMA [pmol/174,8 µg Zellprotein]</u>	<u>m/z 634/m/z 640</u>	<u>L-Arginin [nmol/174,8 µg Zellprotein]</u>	<u>m/z 586/m/z588</u>
0	0,80 ± 0,03	0	1,20 ± 0,04
25	0,99 ± 0,01	0,25	1,30 ± 0,01
50	1,09 ± 0,02	0,50	1,34 ± 0,04
75	1,27 ± 0,03	1,0	1,53 ± 0,01
100	1,39 ± 0,03	2,0	1,75 ± 0,02

**Zu Abbildung 36 und 37:** Analyse der ADMA-Konzentration gleicher Proben mit HPLC und mit GC-MS und Berechnung der Mittelwerte der mit HPLC und GC-MS bestimmten ADMA-Konzentrationen einer Probe und der Differenz dieser Konzentrationen für die Analyse der Daten nach Bland-Altman (Konzentrationsangabe in µM):

	<u>HPLC</u>	<u>GC-MS</u>	<u>MW der HPLC-Messergebnisse und der GC-MS-Messdaten</u>	<u>HPLC-Messergebnisse - GC-MS-Messdaten</u>
Serum basal	0,79	0,73	0,76	0,06
	0,78	0,81	0,79	-0,03
	0,72	0,79	0,76	-0,07
Serum + 1 µM ADMA	1,50	1,86	1,68	-0,36
	1,49	1,59	1,54	-0,10
	1,32	1,85	1,58	-0,53
Serum + 5 µM ADMA	4,20	5,13	4,67	-0,93
	4,19	5,84	5,01	-1,65
	4,09	5,74	4,91	-1,65
			<u>MW der Differenzen</u>	-0,58
			<u>2SD der Differenzen</u>	1,35

**Zu Abbildung 38:** Berechnung der ADMA-Konzentrationen in pmol/µg Protein und Angabe der prozentualen Veränderung im Vergleich zur Kontrolle als Mittelwerte ± SEM:

<u>Statinkonzentration</u>	<u>Atorvastatin</u>	<u>Cerivastatin</u>	<u>Pravastatin</u>
0,01 µM	72,81 ± 2,38	99,40 ± 1,39	119,14 ± 17,97
0,1 µM	76,75 ± 9,61	98,21 ± 7,15	109,66 ± 11,77
1 µM	70,62 ± 6,02	118,06 ± 7,14	106,61 ± 8,87
10 µM	77,26 ± 5,22	107,76 ± 1,30	93,17 ± 4,72

**Zu Abbildung 39:** Bestimmung der ADMA-Konzentration in pmol/ $\mu$ g Protein und Angabe der prozentualen Veränderung im Vergleich zur Kontrolle als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

<u>Inkubationszeit (h)</u>	<u>Atorvastatin 10 <math>\mu</math>M</u>	<u>Cerivastatin 0,1 <math>\mu</math>M</u>	<u>Pravastatin 10 <math>\mu</math>M</u>
6	83,73 $\pm$ 9,63	89,54 $\pm$ 4,94	92,35 $\pm$ 3,36
12	77,26 $\pm$ 5,22	89,97 $\pm$ 15,53	80,72 $\pm$ 5,78
24	119,09 $\pm$ 13,18	117,46 $\pm$ 13,95	116,62 $\pm$ 16,21
36	137,84 $\pm$ 13,64	140,71 $\pm$ 21,77	100,57 $\pm$ 4,87
48	187,55 $\pm$ 5,86	225,22 $\pm$ 24,88	108,09 $\pm$ 6,93

**Zu Abbildung 40:** Berechnung der prozentualen Veränderung der LDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle und Angabe derselben als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

<u>Inkubationszeit (h)</u>	<u>Atorvastatin 10 <math>\mu</math>M</u>	<u>Cerivastatin 0,1 <math>\mu</math>M</u>	<u>Pravastatin 10 <math>\mu</math>M</u>
12	127,78 $\pm$ 7,41	196,30 $\pm$ 51,54	121,30 $\pm$ 21,60
24	102,38 $\pm$ 30,16	201,90 $\pm$ 14,60	95,24 $\pm$ 14,60
36	525,00 $\pm$ 14,29	268,21 $\pm$ 21,74	142,39 $\pm$ 35,51
48	1116,67 $\pm$ 135,56	1216,33 $\pm$ 82,99	128,06 $\pm$ 30,44

**Zu Abbildung 41:** Angabe der prozentualen Veränderung der DDAH 1- und der DDAH 2-Expression im Vergleich zu GAPDH und zur Kontrolle als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

<u>Inkubationszeit (h)</u>	<u>DDAH 1-Expression (mRNA)</u>	<u>DDAH 2-Expression (mRNA)</u>
6	130,37 $\pm$ 11,31	115,38 $\pm$ 4,23
12	93,35 $\pm$ 1,76	112,02 $\pm$ 4,90
24	97,28 $\pm$ 9,59	98,40 $\pm$ 1,88
48	82,76 $\pm$ 2,85	98,08 $\pm$ 3,00

**Zu Abbildung 43:** Angabe der prozentualen Veränderung der DDAH 1- und der DDAH 2-Expression auf Proteinebene im Vergleich zu  $\beta$ -Tubulin und zur Kontrolle als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<u>DDAH 1-Expression (Protein)</u>	<u>DDAH 2-Expression (Protein)</u>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 4,58	100,00 $\pm$ 2,81
Atorvastatin 10 $\mu$ M	104,36 $\pm$ 1,06	102,07 $\pm$ 8,09

**Zu Abbildung 44:** Angabe der prozentualen Veränderung der DDAH-Aktivität als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

<b><u>Inkubationszeit</u></b> <b><u>(h)</u></b>	<b><u>Atorvastatin</u></b> <b><u>10 <math>\mu</math>M</u></b>	<b><u>Cerivastatin</u></b> <b><u>0,1 <math>\mu</math>M</u></b>	<b><u>Pravastatin</u></b> <b><u>10 <math>\mu</math>M</u></b>
6	133,28 $\pm$ 41,34	123,14 $\pm$ 34,88	97,66 $\pm$ 21,58
12	93,54 $\pm$ 16,10	97,81 $\pm$ 19,22	92,76 $\pm$ 10,63
24	84,28 $\pm$ 6,99	80,74 $\pm$ 12,39	90,09 $\pm$ 7,11

**Zu Abbildung 45:** Angabe der prozentualen Veränderung der DDAH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<b><u>DDAH-Aktivität</u></b>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 6,59
Atorvastatin 0,1 $\mu$ M	99,78 $\pm$ 8,51
Atorvastatin 1 $\mu$ M	101,79 $\pm$ 13,04
Atorvastatin 10 $\mu$ M	109,64 $\pm$ 18,87

**Zu Abbildung 46:** Analyse der ADMA-Konzentrationen im Zellüberstand als pmol/ $\mu$ g Protein und Angabe der Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<b><u>ADMA [pmol/<math>\mu</math>g Protein]</u></b>
Kontrolle	3,89 $\pm$ 0,39
LDL 100 mg/dl	3,11 $\pm$ 0,41
LDL 200 mg/dl	3,19 $\pm$ 0,19
LDL 300 mg/dl	3,28 $\pm$ 0,15
LDL 300 mg/dl + PDTC 1 $\mu$ M	3,39 $\pm$ 0,29
oxLDL 3 mg/dl	3,10 $\pm$ 0,19
oxLDL 10 mg/dl	2,91 $\pm$ 0,11
oxLDL 30 mg/dl	3,09 $\pm$ 0,27
oxLDL 30 mg/dl + PDTC 1 $\mu$ M	2,97 $\pm$ 0,17

**Zu Abbildung 47:** Angabe der prozentualen Veränderung der DDAH 1- und der DDAH 2-Expression im Vergleich zur Kontrolle als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<b><u>DDAH 1-Expression</u></b>	<b><u>DDAH 2-Expression</u></b>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 11,75	100,00 $\pm$ 7,59
LDL 100 mg/dl	94,47 $\pm$ 8,10	97,10 $\pm$ 12,40
LDL 200 mg/dl	95,68 $\pm$ 9,96	101,12 $\pm$ 4,49
LDL 300 mg/dl	101,54 $\pm$ 5,11	101,28 $\pm$ 1,64
LDL 300 mg/dl + PDTC 1 $\mu$ M	93,88 $\pm$ 10,09	100,21 $\pm$ 4,99
oxLDL 3 mg/dl	90,59 $\pm$ 21,90	96,29 $\pm$ 8,48
oxLDL 10 mg/dl	103,71 $\pm$ 2,44	124,00 $\pm$ 3,56
oxLDL 30 mg/dl	98,59 $\pm$ 12,38	123,79 $\pm$ 5,17
oxLDL 30 mg/dl + PDTC 1 $\mu$ M	103,14 $\pm$ 1,33	125,15 $\pm$ 3,62

**Zu Abbildung 48:** Angabe der prozentualen Änderung der DDAH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<b><u>DDAH-Aktivität</u></b>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 11,95
LDL 100 mg/dl	92,08 $\pm$ 7,29
LDL 200 mg/dl	87,72 $\pm$ 7,37
LDL 300 mg/dl	90,28 $\pm$ 7,94
LDL 300 mg/dl + PDTC 1 $\mu$ M	81,14 $\pm$ 6,18
oxLDL 3 mg/dl	74,78 $\pm$ 13,43
oxLDL 10 mg/dl	79,70 $\pm$ 7,94
oxLDL 30 mg/dl	88,67 $\pm$ 8,65
oxLDL 30 mg/dl + PDTC 1 $\mu$ M	87,36 $\pm$ 5,86

**Zu Abbildung 50:** Prozentuale Veränderung der ADMA-Konzentration, die in pmol/ $\mu$ g Protein berechnet wurde, als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt:

	<b><u>ADMA-Konzentration in EA.hy 926- Zellüberständen</u></b>	<b><u>ADMA-Konzentration in HCAEC- Zellüberständen</u></b>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 18,86
WY 100 $\mu$ M	95,00 $\pm$ 9,28	131,29 $\pm$ 21,01
WY 200/250 $\mu$ M	137,73 $\pm$ 31,53	140,40 $\pm$ 4,70
ETYA 50 $\mu$ M	138,39 $\pm$ 3,94	134,40 $\pm$ 8,20

**Zu Abbildung 51:** Angabe der prozentualen Veränderung der DDAH 1- und der DDAH 2-Expression als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<u>DDAH 1-Expression</u>	<u>DDAH 2-Expression</u>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 5,57	100,00 $\pm$ 8,28
WY 200 $\mu$ M	88,46 $\pm$ 11,28	87,65 $\pm$ 13,22
ETYA 50 $\mu$ M	89,48 $\pm$ 2,91	86,47 $\pm$ 3,61

**Zu Abbildung 52:** Prozentuale Änderung der DDAH-Aktivität als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt:

	<u>DDAH-Aktivität</u>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 13,00
WY 250 $\mu$ M	86,05 $\pm$ 11,01
ETYA 50 $\mu$ M	76,20 $\pm$ 25,79

**Zu Abbildung 53:** Bestimmung der ADMA-Konzentration im Zellkulturüberstand in pmol/ $\mu$ g Protein und Zusammenfassung der Daten in Form der Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<u>ADMA [pmol/<math>\mu</math>g Protein]</u>
Kontrolle (0,33 % Ethanol)	3,27 $\pm$ 1,05
Ciglitazon 1 $\mu$ M	3,81 $\pm$ 0,92
Ciglitazon 10 $\mu$ M	3,54 $\pm$ 0,50
T 0070907 + Ciglitazon 1 $\mu$ M	3,21 $\pm$ 0,61
T 0070907 + Ciglitazon 10 $\mu$ M	3,96 $\pm$ 1,28

**Zu Abbildung 55:** Bestimmung der ADMA-Konzentration als pmol/ $\mu$ g Protein und Berechnung der Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<u>ADMA [pmol/<math>\mu</math>g Protein]</u>
Kontrolle	3,87 $\pm$ 0,19
Angiotensin 0,01 $\mu$ M	4,74 $\pm$ 0,31
Angiotensin 0,1 $\mu$ M	4,23 $\pm$ 0,14
Angiotensin 1 $\mu$ M	4,39 $\pm$ 0,28
Ang + Los 0,01 $\mu$ M	2,56 $\pm$ 0,24
Ang + Los 0,1 $\mu$ M	3,15 $\pm$ 0,29
Ang + Los 1 $\mu$ M	3,40 $\pm$ 0,25
Ang + PD 0,01 $\mu$ M	3,59 $\pm$ 0,56
Ang + PD 0,1 $\mu$ M	4,36 $\pm$ 0,44
Ang + PD 1 $\mu$ M	3,02 $\pm$ 0,38

**Zu Abbildung 56:** Prozentuale Veränderung der DDAH 1- und der DDAH 2-Expression im Vergleich zur Kontrolle als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben:

	<b><u>DDAH 1-Expression</u></b>	<b><u>DDAH 2-Expression</u></b>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 19,07	100,00 $\pm$ 15,45
Angiotensin 0,01 $\mu$ M	93,99 $\pm$ 8,28	85,16 $\pm$ 9,38
Angiotensin 0,1 $\mu$ M	103,31 $\pm$ 10,40	101,09 $\pm$ 8,95
Angiotensin 1 $\mu$ M	90,81 $\pm$ 6,69	93,95 $\pm$ 7,96
Ang + Los 0,01 $\mu$ M	108,80 $\pm$ 13,25	107,92 $\pm$ 7,94
Ang + Los 0,1 $\mu$ M	112,35 $\pm$ 5,52	89,04 $\pm$ 5,18
Ang + Los 1 $\mu$ M	93,95 $\pm$ 7,23	89,59 $\pm$ 10,22
Ang + PD 0,01 $\mu$ M	106,94 $\pm$ 7,19	103,81 $\pm$ 14,53
Ang + PD 0,1 $\mu$ M	95,17 $\pm$ 6,28	93,05 $\pm$ 4,97
Ang + PD 1 $\mu$ M	111,61 $\pm$ 4,73	108,08 $\pm$ 9,71

**Zu Abbildung 57:** Berechnung des Verhältnisses der eNOS- und der  $\beta$ -Tubulin-Expression und Angabe der prozentualen Veränderung im Vergleich zur Kontrolle als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<b><u>eNOS-Expression</u></b> <b><u>(kontinuierliche Inkubation)</u></b>	<b><u>eNOS-Expression</u></b> <b><u>(intermittierende Inkubation)</u></b>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
Atorvastatin 1 $\mu$ M (EA.hy 926)	154,43 $\pm$ 28,72	100,72 $\pm$ 25,33
Atorvastatin 10 $\mu$ M (EA.hy 926)	160,84 $\pm$ 20,28	106,89 $\pm$ 4,19
Atorvastatin 1 $\mu$ M (HCAEC)	211,42 $\pm$ 35,22	145,55 $\pm$ 26,54

**Zu Abbildung 58:** Berechnung der prozentualen Änderung der eNOS-Expression als Mittelwerte  $\pm$  SEM:

	<b><u>eNOS-Expression</u></b> <b><u>(kontinuierliche Inkubation)</u></b>	<b><u>eNOS-Expression</u></b> <b><u>(intermittierende Inkubation)</u></b>
Kontrolle	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
Simvastatin 0,1 $\mu$ M (EA.hy 926)	103,10 $\pm$ 5,32	108,88 $\pm$ 6,15
Simvastatin 1 $\mu$ M (EA.hy 926)	207,17 $\pm$ 12,00	114,91 $\pm$ 10,51
Simvastatin 0,1 $\mu$ M (HCAEC)	110,11 $\pm$ 15,66	101,99 $\pm$ 18,42
Simvastatin 1 $\mu$ M (HCAEC)	228,75 $\pm$ 63,39	107,99 $\pm$ 28,03

## Lebenslauf

Name: Jennifer Albsmeier

Geburtsdatum: 21. September 1974

Geburtsort: Herford

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Ledig

Schulbildung: 1981 – 1985 Grundschule Obernbeck, Löhne  
 1985 – 1994 Städtisches Gymnasium Löhne

Studium: 1994 – 1998 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Fachrichtung Pharmazie  
 09/1996 1. Staatsexamen  
 09/1998 2. Staatsexamen

Praktische Ausbildung: 11/1998 – 04/1999 Lukas Krankenhaus, Bünde  
 05/1999 – 10/1999 Altstädter Apotheke, Herford  
 11/1999 3. Staatsexamen

Berufstätigkeit: 11/1999 – 01/2000 Altstädter Apotheke, Herford  
 02/2000 – 04/2000 Apotheke an der Post, Bad Oeynhausen  
 10/2002 – 06/2004 Krauses Apotheke, Hamburg

Promotion: 05/2000 – 08/2000 Institut für Klinische Pharmakologie,  
 Medizinische Hochschule Hannover  
 09/2000 – 07/2004 Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie,  
 Institut für Experimentelle und Klinische  
 Pharmakologie, Universitätsklinikum  
 Hamburg-Eppendorf

02/2001 Gastaufenthalt am *University College  
 London, Centre for Clinical Pharmacology*

01/2003 - 01/2004 Forschungsförderung des Fachbereiches  
 Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-  
 Eppendorf (F-120-1)

## Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

### 1. Originalarbeiten

Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Böger RH (2004) Determination of N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 809: 59-65

Maas R, Schwedhelm E, Albsmeier J, Böger RH (2002) The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc Med* 7: 213-225

### 2. Vorträge und Poster mit publiziertem Abstrakt

Albsmeier J, Tsikas D, Frölich JC, Böger RH (2002) Asymmetric dimethylarginine (ADMA), an explanation for the L-arginine-paradox. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl): R14

Albsmeier J, Böger RH (2002) Rolle der DDAH-Expression für die Steigerung der Konzentration des endogenen NOS-Inhibitors ADMA durch LDL-Cholesterin in humanen Endothelzellen – gegenläufiger Effekt der Statine. *Z Kardiol* 91 (Suppl 1): I/296

Albsmeier J, Böger RH (2004) Influence of statins on the expression of the NO synthase in endothelial cells dependent on the manner of incubation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 (Suppl 1): R15

## **Erklärung**

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

Bedeutung endogener Inhibitoren der NO-Synthase für kardiovaskuläre Erkrankungen  
und ihre pharmakologische Therapie

in der Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R.-H. Böger ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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

Hamburg, 31. August 2004

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. H. Scholz und Herrn Prof. Dr. T. Eschenhagen möchte ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie durchzuführen, danken.

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R.-H. Böger. Ihm bin ich besonders dankbar für seine freundschaftliche Betreuung, für das fortwährende Vertrauen in meine Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung bei der Vorbereitung und Teilnahme an Kongressen und letztendlich bei der kritischen und unverzüglichen Korrektur dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein möchte ich mich für die Betreuung meiner Arbeit im Fachbereich Chemie und die Einblicke in andere Forschungsgebiete im Zuge regelmäßig stattfindender Kolloquien bedanken.

Besonders den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe Mariola Kastner, Renke Maas, Friedrich Schulze, Edzard Schwedhelm und Anna Steenpaß, aber auch allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Institutes danke ich für das hervorragende Arbeitsklima und die permanente Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. Edzard Schwedhelm danke ich insbesondere für die Einführung in die GC-MS-Analytik.

Die Untersuchungen wurden mit der Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Bo 1431/3-1) und der Forschungsförderung des Fachbereiches Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (F-120-1) durchgeführt.

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