

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

Direktor: Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

**Entwicklung und Validierung immunologischer Nachweisverfahren für  
asymmetrisches Dimethyl-L-arginin (ADMA)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
im Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Friedrich Schulze

Hamburg 2004

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. H.-J. Duchstein

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. R. H. Böger

Tag der Disputation: 01.12.2004

für Dörthe und Friederike

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Das Endothel.....	1
1.2.	ADMA .....	4
1.3.	Woher kommt ADMA? .....	5
1.4.	Was macht ADMA?.....	8
1.5.	Wie misst man ADMA? .....	10
1.6.	Was sind Antikörper? .....	12
1.7.	Wie macht man polyklonale Antikörper?.....	13
1.8.	Wie macht man monoklonale Antikörper?.....	14
1.9.	Immunoassays.....	20
2.	Ziel der Arbeit.....	23
3.	Methoden .....	25
3.1.	Hapten-Kopplung.....	25
3.2.	Proteinbestimmung .....	26
3.3.	Bestimmung des gebundenen ADMA .....	26
3.4.	Messung von ADMA-Konzentrationen mit HPLC .....	27
3.5.	Immunisierung .....	28
3.6.	Bestimmung des Immunisierungserfolges und Titers .....	28
3.6.1.	Bestimmung des Immunisierungserfolges .....	28
3.6.2.	Bestimmung des Antikörpertiters.....	29
3.7.	Präparation der Lymphozyten aus der Milz.....	30
3.8.	Überprüfung der HAT-Sensitivität der Myelomzellen.....	30
3.9.	Fusion von Myelomzellen und Lymphozyten .....	31
3.10.	Kopplung von ADMA und SDMA an BSA .....	31
3.11.	Test der Zellkulturüberstände auf Antikörper gegen ADMA.....	33
3.12.	Weiterführung positiv getesteter Wells einer Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen .....	34
3.13.	Test zur Abschätzung der Kreuzreaktivität .....	35
3.14.	Isolierung der anti-ADMA Antikörper aus Zellkulturüberstand .....	35
3.15.	Bestimmung des Antikörpersubtyps .....	37
3.16.	Standardvorschrift für einen kompetitiven ADMA-ELISA .....	38
3.17.	Bestimmung einer geeigneten Verdünnung des Antikörpers 142D6-4E8.....	39

3.18. Erstellung einer Standardkurve.....	39
3.19. Bestimmung der Kreuzreaktivität.....	39
3.20. Synthese von N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]Dimethylarginin ([ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]ADMA).....	40
3.21. Quantifizierung des deuterierten ADMA mittels Gaschromatographie- Massenspektrometrie (GC-MS).....	41
3.22. Entwicklung eines polyklonalen ADMA-Antiserum und eines Immunoassay daraus... .....	43
3.22.1. Bestimmung der Kreuzreaktivität .....	43
3.22.2. Bestimmung der Sensitivität .....	44
3.22.3. Bestimmung der Präzision .....	44
3.22.4. Bestimmung der Richtigkeit.....	45
3.22.5. Vergleich verschiedener Methoden.....	45
3.23. Verwendung des polyklonalen ELISA zur Messung von ADMA-Konzentrationen bei Patienten im Rahmen einer klinischen Studie .....	46
4. Ergebnisse.....	47
4.1. Herstellung des Immunogens.....	47
4.2. Immunisierung.....	49
4.3. Fusion.....	50
4.4. Test der fusionierten Zellen auf Antikörperproduktion gegen ADMA .....	52
4.5. Test zur Abschätzung der Kreuzreaktivität .....	52
4.6. Bestimmung des Antikörpersubtyps.....	55
4.7. Kompetitiver ELISA zu Bestimmung von ADMA .....	55
4.7.1. Bestimmung einer geeigneten Verdünnung des Antikörpers 142D6-4E8 .....	55
4.7.2. Erstellung einer Standardkurve .....	57
4.7.3. Bestimmung der Kreuzreaktivität .....	58
4.8. Synthese von N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]Dimethylarginin ([ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]ADMA).....	60
4.9. Entwicklung eines polyklonalen Antiserums .....	61
4.9.1. Bestimmung der Kreuzreaktivität .....	61
4.9.2. Bestimmung von Standardkurve und Sensitivität .....	61
4.9.3. Bestimmung der Präzision .....	62
4.9.4. Bestimmung der Richtigkeit.....	63
4.9.5. Vergleich verschiedener Methoden.....	67
4.10. Verwendung des polyklonalen ELISA zur Messung von ADMA-Konzentrationen bei Patienten im Rahmen einer klinischen Studie .....	68

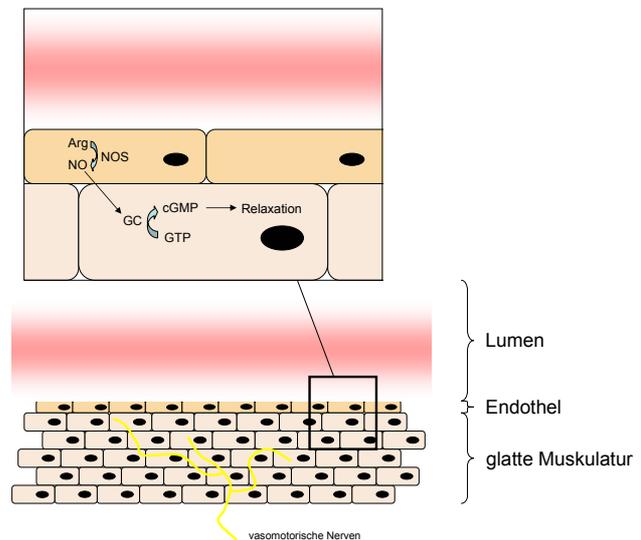
5.	Diskussion.....	71
5.1.	Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers.....	72
5.1.1.	Immunogenentwicklung und Immunisierung .....	72
5.2.	Entwicklung eines polyklonalen Antikörpers und eines ELISA daraus.....	79
5.3.	Messung einer klinischen Studie mit dem ELISA aus dem polyklonalen Antiserum	81
6.	Zusammenfassung .....	85
7.	Summary .....	87
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	89
9.	Literatur .....	91
10.	Material.....	102
10.1.	Substanzen .....	102
10.2.	Zellkulturmedien.....	106
10.3.	Puffer und Lösungen.....	107
10.3.1.	HPLC.....	107
10.3.2.	andere Puffer .....	108
10.4.	Tiere .....	109
10.5.	Zellen .....	109
10.6.	Serum- und Plasmaproben .....	110
10.7.	Verbrauchsmaterial .....	110
10.8.	Geräte.....	112
11.	Lebenslauf.....	114
12.	Publikationen .....	115
13.	Erklärung .....	116
14.	Danksagung .....	117

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Endothel

Das Endothel der Gefäße stellt die Verbindung zwischen der Gefäßmuskulatur und dem Strombett dar (siehe Abbildung 1). Es besteht aus einer einlagigen Zellschicht, den Endothelzellen, und kleidet alle Gefäße im menschlichen Körper aus. Furchgott und Zawadski machten 1980 eine Entdeckung, die wesentlich zum Verständnis der Funktion des Endothels beitrug und wichtige Anstöße für die Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie des Herz-Kreislauf-Systems gab (Furchgott RF. et al., 1980) Sie zeigten an isolierten Gefäßen, dass für die Acetylcholin-vermittelte Dilatation ein intaktes Endothel vorhanden sein muss. Ohne Endothel führte Acetylcholin zu einer Vasokonstriktion, durch direkte Wirkung auf die glatte Muskulatur. Sie schlossen aus ihren Experimenten auf eine Substanz, welche durch Acetylcholin aus dem Endothel freigesetzt wird und in der glatten Muskulatur zu einer Relaxation führt. Die Substanz nannten sie „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF). EDRF wurde später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Palmer RM. et al., 1987 und Ignarro LJ. et al., 1987). NO kann seine Wirkung auf verschiedenen Wegen vermitteln. Zum einen aktiviert NO die lösliche Guanylylcyclase und führt so über die Bildung von cGMP zu einer Vasorelaxation durch Abnahme der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. NO verfügt aber auch über  $Ca^{2+}$ -unabhängige Signaltransduktionswege. So führt die S-Nitrosylierung von Enzymen zu einer Modulation der Enzymaktivität. Die konnte zum Beispiel für Transkriptionsfaktoren und Caspasen (Stamler JS. et al., 1994), aber auch für Enzyme, die direkt an der  $Ca^{2+}$ -Homöostase der Zelle beteiligt sind, gezeigt werden (Xu L. et al., 1998).

Sie schlossen aus ihren Experimenten auf eine Substanz, welche durch Acetylcholin aus dem Endothel freigesetzt wird und in der glatten Muskulatur zu einer Relaxation führt. Die Substanz nannten sie „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF). EDRF wurde später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Palmer RM. et al., 1987 und Ignarro LJ. et al., 1987). NO kann seine Wirkung auf verschiedenen Wegen vermitteln. Zum einen aktiviert NO die lösliche Guanylylcyclase und führt so über die Bildung von cGMP zu einer Vasorelaxation durch Abnahme der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. NO verfügt aber auch über  $Ca^{2+}$ -unabhängige Signaltransduktionswege. So führt die S-Nitrosylierung von Enzymen zu einer Modulation der Enzymaktivität. Die konnte zum Beispiel für Transkriptionsfaktoren und Caspasen (Stamler JS. et al., 1994), aber auch für Enzyme, die direkt an der  $Ca^{2+}$ -Homöostase der Zelle beteiligt sind, gezeigt werden (Xu L. et al., 1998).



**Abbildung 1** Schematische Darstellung des Endothels und der Lokalisation von eNOS und Guanylylcyclase.

Das Endothel hat vielfältige Funktionen. Mit die wichtigste Funktion des Endothels ist die Regulation des Gefäßtonus. Es hat aber auch noch andere wichtige Funktionen. So ist es wichtig für die Steuerung der Adhäsion von Zellen an die Gefäßwand und für den Übergang

von Zellen aus dem Blut in das umliegende Gewebe. Ebenfalls durch das Endothel wird die Gefäßpermeabilität gesteuert, also der Übertritt von im Blut gelösten Substanzen. Für die Blutgerinnung ist das Endothel ebenfalls von essentieller Bedeutung, so hemmt NO zum Beispiel die Thrombozytenaggregation.

Von einer Endotheldysfunktion spricht man, wenn eine verminderte NO-Aktivität oder NO-Verfügbarkeit vorliegt. Die Endotheldysfunktion geht also mit einer Reihe pathophysiologischer Effekte wie verminderter endothelabhängiger Vasodilatation, erhöhter Monozytenadhäsion, erhöhter Gefäßpermeabilität und erhöhter Thrombozytenaggregation einher. Klinisch kann man eine Endotheldysfunktion bei einer Reihe von Erkrankungen feststellen. Dazu zählen Arteriosklerose, Hypercholesterinämie, Hypertonie, Diabetes und chronische Herzinsuffizienz.

NO wirkt im zentralen Nervensystem als Neurotransmitter und beeinflusst dort zahlreiche Funktionen, wie zum Beispiel Gedächtnisfunktionen. Aber auch peripher hat NO als Neurotransmitter Einfluss auf gastrointestinale, urogenitale und respiratorische Funktionen (Moncada S. et al., 1993).

Durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird NO in großen Mengen zur Erregerabwehr in aktivierten Makrophagen gebildet. Die iNOS ist an pathologischen Prozessen wie dem septischen Schock, dem hyperdynamischen Status der Zirrhose und an entzündlichen Prozessen beteiligt (Moncada S. et al., 1993). Aber auch bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen scheint die iNOS eine gewisse Rolle zu spielen (Riede UN. et al., 1998).

NO wird enzymatisch aus L-Arginin durch die NO-Synthasen (NOS) gebildet. Aus der Reaktion resultieren L-Citrullin und NO (Palmer RM. et al., 1988). Es sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt: NOS I, NOS II und NOS III (siehe Abbildung 2). Die NOS I wird in Nervengewebe exprimiert und auch neuronale NOS (nNOS) genannt. Die NOS II wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und ist durch Substanzen wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Zytokine induzierbar. Sie wird auch als induzierbare NOS (iNOS) bezeichnet. Die dritte Isoform der NOS wird insbesondere im Endothel, in Kardiomyozyten oder Erythrozyten gebildet. Die NOS III wird auch als endotheliale NOS (eNOS) bezeichnet. Alle drei Isoformen haben Bindungsstellen für NADPH, FAD, FMN und Calmodulin, sowie eine Phosphatbindungsstelle. Tetrahydrobiopterin ist als Co-Faktor bei allen drei Isoformen für die Aktivität essentiell. Die konstitutiven Isoformen NOS I und NOS III werden durch  $\text{Ca}^{2+}$  und

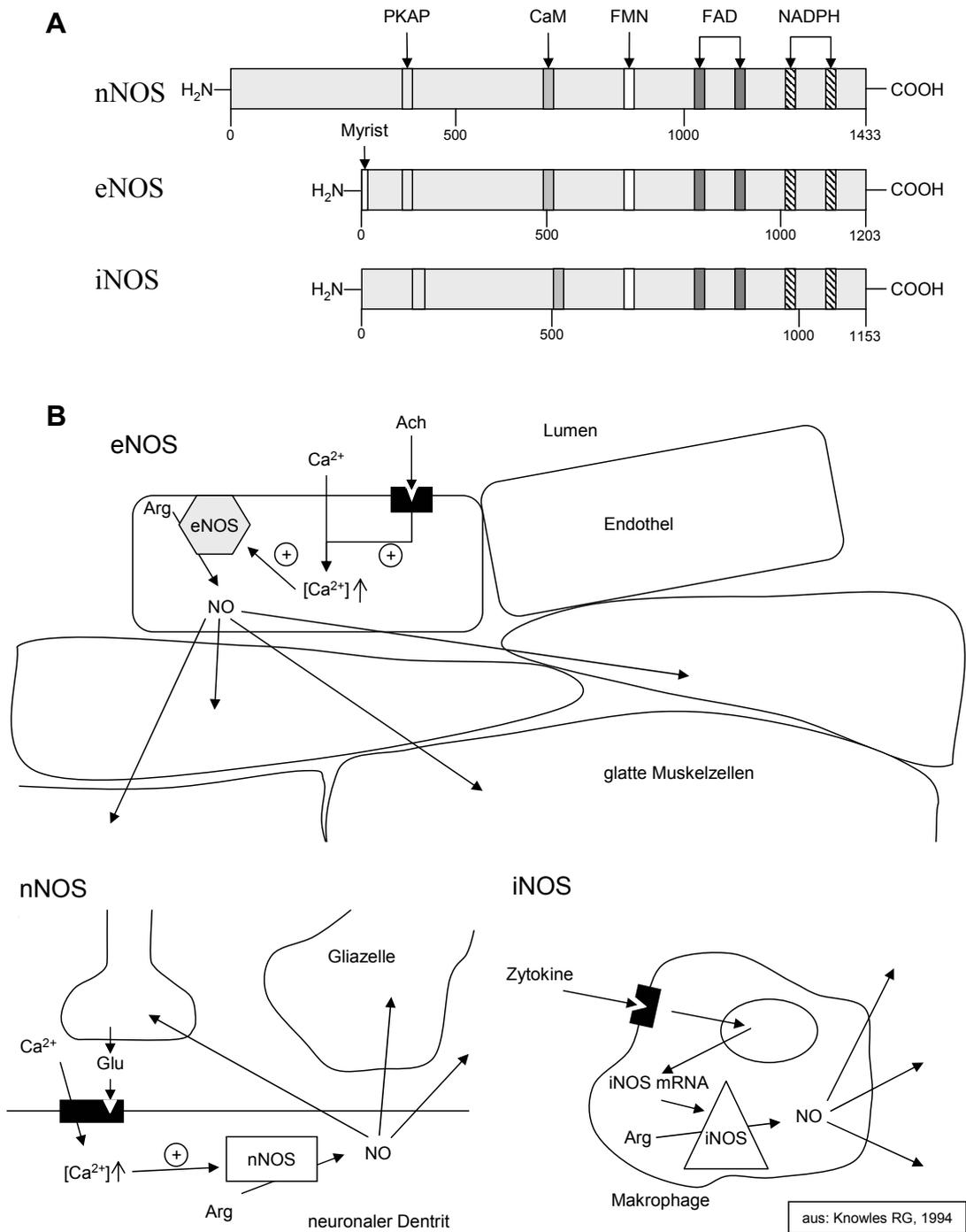


Abbildung 2

- A Struktur und Bindungsstellen der drei verschiedenen NOS
- B Lokalisation und Regulation von eNOS, nNOS und iNOS

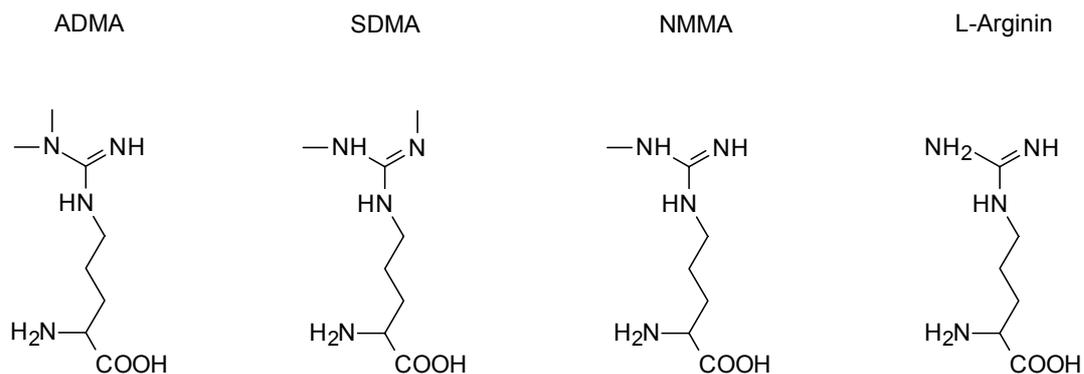
(nach Knowles RG. et al., 1994)

Calmodulin aktiviert. Die induzierbare NOS II ist  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig, da sie Calmodulin fest gebunden enthält. Die NOS III ist über einen Myristinrest in der Zellmembran verankert.

Expression und Aktivität der endothelialen NOS unterliegen zahlreichen Regulationsmechanismen. So führt zum Beispiel eine Erhöhung der Scherkräfte, die am Endothel angreifen, zu einer erhöhten eNOS Expression, und eine Proteinkinase A vermittelte Phosphorylierung erhöht die Aktivität (Fleming I. et al., 1999 und Papapetropoulos A. et al., 1999). Gegenspieler sind endogene Inhibitoren der NOS. Das sind  $\text{N}^{\text{G}}$ -Monomethyl-L-arginin (NMMA) und  $\text{N}^{\text{G}},\text{N}^{\text{G}}$ -Dimethyl-L-arginin (ADMA). Beide Substanzen sind als kompetitive Antagonisten in der Lage, das Substrat der NOS, L-Arginin, konzentrationsabhängig von seiner Bindungsstelle zu verdrängen (Vallance P. et al., 1992). ADMA spielt eine Rolle bei pathologischen Veränderungen der Endothelfunktion (s.u.).

## 1.2. ADMA

N,N-Dimethyl-L-arginin ist eine natürlich vorkommende Aminosäure. In der Literatur wird sie in der Regel mit ADMA für asymmetrisches Dimethylarginin abgekürzt (auch wenn durch die Methylierung der Guanidinogruppe kein Asymmetriezentrum entsteht). Zwei ebenfalls natürlich vorkommende Derivate des L-Arginin sind das N-Monomethyl-L-arginin (NMMA) und das N,N'-Dimethyl-L-arginin (symmetrisches Dimethylarginin, SDMA) (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3** Strukturformeln von ADMA, SDMA, NMMA und L-Arginin

### 1.3. Woher kommt ADMA?

ADMA, NMMA und SDMA entstehen bei der posttranslationalen Modifikation von argininhaltigen Proteinen (siehe Abbildung 4). Eine Gruppe von Proteinen, die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT), methyliert die endständigen Stickstoffe der Guanidinogruppe von L-Arginin, welches bereits in Proteine eingebaut ist (Paik W. et al., 1968). Die Gruppe der PRMT wird in zwei Klassen eingeteilt. Die Typ I PRMT (PRMT 1, 3, 4, 6) methylieren einen Stickstoff zweimal und führen so zu der Bildung von ADMA. Die Typ II PRMT (PRMT 5) führen zu der Bildung von SDMA durch die einfache Methylierung der beiden endständigen Stickstoffe. Beide Klassen der PRMT führen auch zu der Bildung von NMMA. Dieses ist wahrscheinlich als Zwischenstufe auf dem Weg zur Bildung von ADMA und SDMA anzusehen. Die natürlichen Substrate der PRMT I sind Histone und RNA-bindende Proteine wie „heterogeneous nuclear ribonuclear protein“ (hnRNP) A1, Fibrillarin und Nucleolin. Die Methylierung von RNA bindenden Proteinen geschieht in praktisch allen Zellen. Sie reguliert die Aktivität der Proteine, die an Prozessen wie Reifung, Transport und Stabilisierung von RNA beteiligt sind. Ungefähr 65% des intrazellulären ADMA befindet sich in den hnRNPs gebunden (Boffa LC. et al., 1977). Natives Substrat der PRMT II ist myelinbasisches Protein. Myelinbasisches Protein ist ein wichtiger Bestandteil der Myelinscheide nervaler Axone. Es wird vermutet, dass die Methylierung von Argininresten für die Integrität und Stabilität der Myelinscheide von Bedeutung ist (Baldwin GS. et al., 1971). Für Endothelzellen konnte nachgewiesen werden, dass mit zunehmenden Scherkräften die Expression von PRMT I steigt und dieser Effekt durch Unterdrückung der I $\kappa$ B-Kinase und mit dem „peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ “ (PPAR $\gamma$ ) -Agonisten Troglitazon wieder aufgehoben werden kann (Osnaï T. et al., 2003). Die Unterschiede in der PRMT I Expression korrelierten mit den gemessenen ADMA-Konzentrationen. Diese Beobachtung legt den Verdacht nahe, dass die Menge freien ADMAs zumindest zu einem Teil über die Aktivität der PRMT I reguliert ist und wäre eine mögliche Erklärung für erhöhte ADMA-Konzentrationen im Serum von Hypertonikern (s.u.).

Die größte Quelle für intrazelluläres und freies Arginin und methylierte Derivate ist der Proteinabbau. In der Leber einer erwachsenen Ratte werden täglich ca. 40% der konstitutiven Proteine abgebaut und neu synthetisiert (Garlick PJ. et al., 1976).

ADMA und SDMA wurden beim Menschen in nennenswerten Mengen erstmals aus Urin gewonnen (Kakimoto Y. et al., 1970). Es wurde vermutet, dass die Substanzen ausschließlich renal eliminiert werden; vorausgesetzt, dass sie nicht wieder eingebaut oder abgebaut werden.

McDermott untersuchte 1976 die Elimination von ADMA, SDMA und NMMA und fand, dass die renale Elimination von SDMA ca. dreißigfach höher ist als die von ADMA und NMMA. T Ogawa et al. führten 1987 Versuche mit <sup>14</sup>C-markiertem ADMA und SDMA durch. Sie fanden unterschiedliche Metabolite bei Ratten,

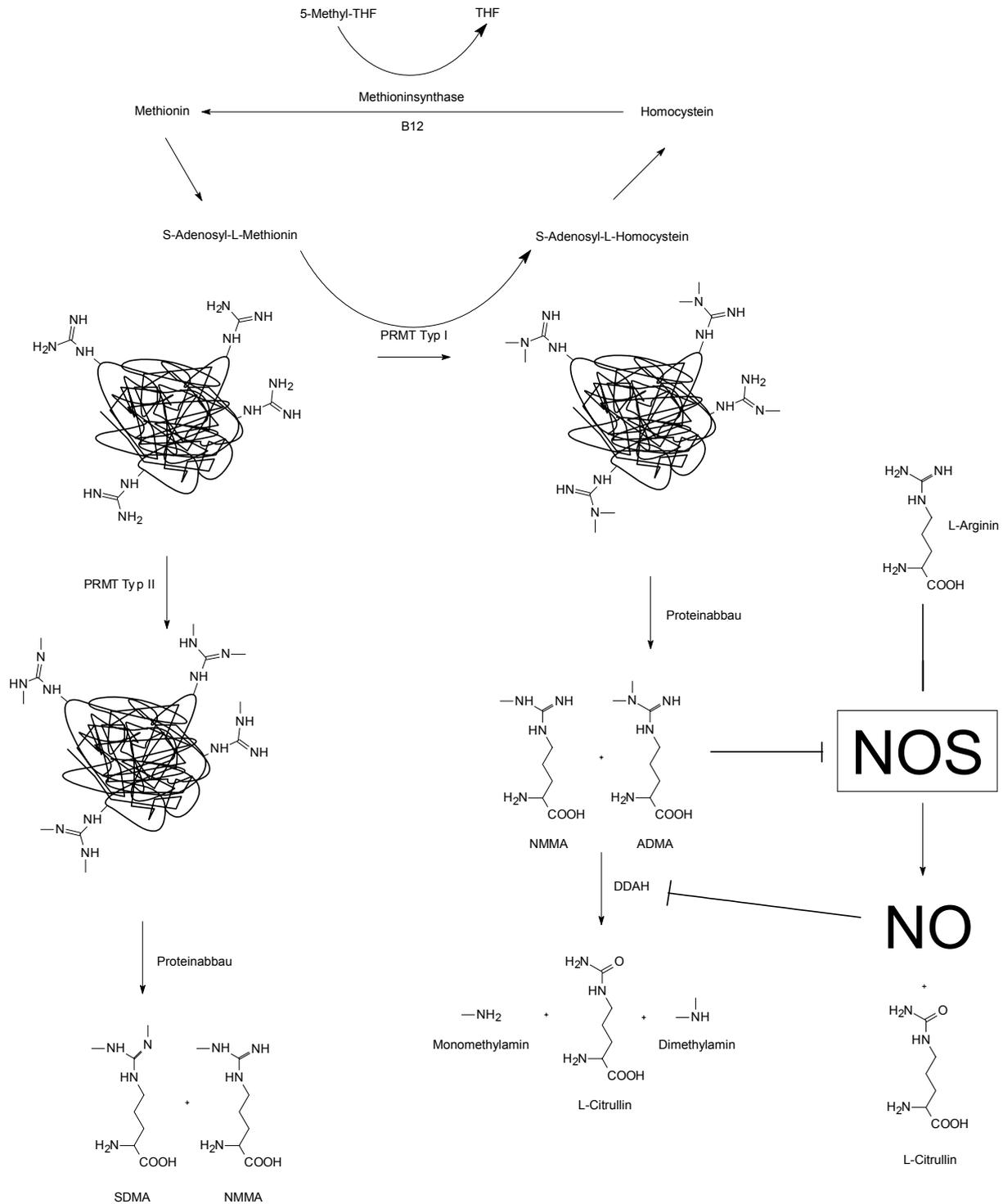


Abbildung 4 Der „ADMA-Kreislauf“ – Entstehung, Wirkung und Metabolismus.

denen sie entweder das markierte ADMA oder das markierte SDMA verabreicht hatten. Für ADMA fanden sie L-Citrullin als Metaboliten, während sie für SDMA keine Metabolite finden konnten. 1989 fand die gleiche Arbeitsgruppe das verantwortliche Enzym und isolierte es aus der Rattenniere (Ogawa T. et al., 1989). Das Enzym wurde N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-**D**imethylarginin **D**imethyl**a**mino**h**ydrolase (DDAH) benannt. Es konnte gezeigt werden, dass mehr als 90% des ADMA über die DDAH metabolisiert werden. Die  $K_m$ -Werte für die DDAH wurden mit 0,18 mM für ADMA und mit 0,36 mM für SDMA bestimmt. DDAH-Aktivität konnte in verschiedenen Geweben wie Niere, Pankreas, Leber und Gehirn der Ratte nachgewiesen werden. Das Protein selbst wurde mittels Immunoplotting detektiert (Kimoto M. et al., 1993). Zusätzlich konnten hohe Konzentrationen an DDAH in der Aorta, neutrophilen Granulozyten und in Makrophagen gefunden werden. A Tojo und Kollegen (Tojo A et al., 1997) untersuchten 1997 die Verteilung von NOS und DDAH in der Niere von Ratten und fanden, dass in allen Nierengeweben, in denen eine Form der NOS exprimiert wird, auch die DDAH zu finden ist. Sie schlossen aus ihren Untersuchungen, dass die DDAH in die Regulation des L-Arginin : ADMA Verhältnisses in den Zellen der Niere und damit in die Regulation der NO-Produktion eingebunden sein müsste.

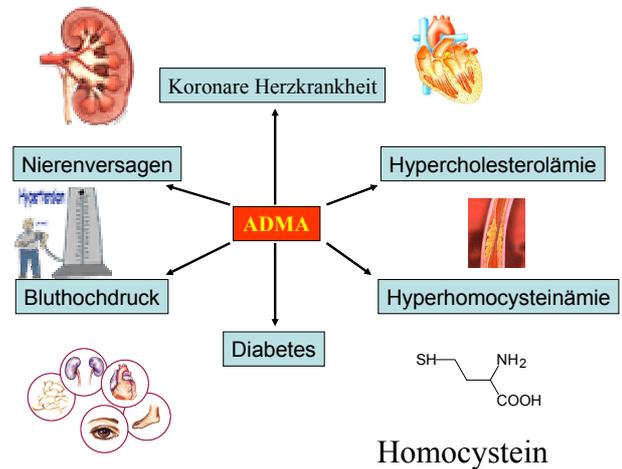
Diese Vermutungen konnten in anderen Versuchen bestätigt werden. S-2-Amino-4(3-methylguanidino)buttersäure (4124W) hemmte die Umsetzung von [<sup>14</sup>C]-N<sup>ω</sup>-Monomethyl-L-arginin zu [<sup>14</sup>C]-L-Citrullin in Rattenleberhomogenaten, kultivierten humanen Endothelzellen und isolierter gereinigter DDAH. Ein Zusatz von W4124 zum Zellkulturmedium von humanen Endothelzellen erhöhte die Anreicherung von ADMA im Zellkulturüberstand der Zellen von  $3,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$  auf  $5,0 \pm 0,7 \mu\text{M}$ . Im Organbad führte 4124W an isolierten Aortenringen der Ratte zu einer Kontraktion, die mit L-Arginin wieder aufhebbar war (MacAllister. et al., 1996). Die Daten zeigten, dass eine Hemmung der DDAH die ADMA Konzentrationen ausreichend hoch steigen lassen kann, um zu physiologischen Effekten zu führen. Die Autoren schlossen daraus, dass eine Änderung in der Aktivität der DDAH an pathophysiologischen Veränderungen der NO-Produktion beteiligt sein könnte.

Die cDNA-Klonierung der humanen DDAH ergab, dass zwei Isoenzyme mit unterschiedlicher Verteilung in Geweben existieren (Kimoto M. et al., 1998 und Leiper JM. et al., 1999). Die DDAH I dominiert in Geweben, welche die neuronale NO-Synthase exprimieren und die DDAH II dominiert in Geweben, welche die endotheliale Form der NO-Synthase exprimieren. Trotz dem werden beide Isoformen der DDAH in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert, was nicht zwangsläufig an die Expression einer NOS gebunden ist. Die Erkenntnisse stärkten die Hypothese, dass die DDAH in die Regulation der

NO-Produktion involviert ist, da mit den zwei verschiedenen Isoformen der DDAH eine gewebesunterschiedliche Regulation der ADMA-Konzentrationen möglich schien.

### 1.4. Was macht ADMA?

Wenn man ADMA Probanden infundiert, kann man alle Symptome beobachten, die sich theoretisch aus einer verminderten NO-Produktion ergeben (Achan V. et al., 2003 und Kielstein JT. et al., 2004). Der Blutdruck steigt, es kommt zu einer Vaso-  
konstriktion, der arterielle Unterarm-  
Blutfluss nimmt ab (Calver A. et al., 1993), die Herzfrequenz sinkt und die kardiale Auswurfleistung sinkt. Auch auf die Niere hat eine Hemmung der NO-Synthese großen Einfluss (Bech JN. et al., 1996). Der renale Blutfluss sinkt, die glomeruläre Filtrationsrate sinkt und die



**Abbildung 5** ADMA und Erkrankungen, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen.

Natriumausscheidung sinkt ebenfalls. Die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen wird durch ADMA erhöht (Böger RH. et al., 2000). Im Tiermodell konnten noch einige andere Effekte von ADMA (bzw. L-NMMA) gezeigt werden. So ließen sich Symptome einer Präeklampsie hervorrufen und die Angiogenese hemmen (Yallampalli C. et al., 1993 und Jang JJ. et al., 2000).

Bei niereninsuffizienten Patienten steigen die ADMA-Konzentrationen im Blut an (Vallance P. et al., 1992). Dieses Phänomen konnte in mehreren klinischen Studien reproduziert werden, wobei jedoch unterschiedliche starke Anstiege der ADMA-Konzentrationen gefunden wurden (Übersicht: Böger RH. et al., 2003). Interessanterweise war die Variabilität der gemessenen SDMA-Konzentrationen deutlich geringer als die der ADMA-Konzentrationen. Dieser Unterschied zwischen ADMA und SDMA könnte an der Beteiligung der DDAH an der Elimination von ADMA liegen und eine unterschiedlich starke Beeinträchtigung der DDAH-Aktivität bei niereninsuffizienten Patienten widerspiegeln. Zwei Studien mit Hämodialysepatienten beschäftigten sich mit der Fragestellung, wie sich die ADMA-Konzentrationen unter Hämodialyse verhalten (MacAllister RJ. et al., 1996b und Kielstein JT. et al., 1999). Beide Studien kamen zu dem Ergebnis, dass ADMA nur in einem geringen Maß durch Hämodialyse aus dem Blut niereninsuffizienter Patienten entfernbar ist. Dieses Ergebnis

spricht für eine relativ hohe Bindung an Plasmaproteine. Ebenfalls spricht die Tatsache, dass man niedrigere ADMA-Konzentrationen findet, wenn man aus Plasmaproben die Proteine durch Fällung mit Trichlooessigsäure entfernt, für eine hohe Plasmaproteinbindung. Hämodialysepatienten haben ein stark erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und eine erhöhte Mortalität. Für diese Patienten konnte gezeigt werden, dass ADMA ein prognostischer Faktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse und Gesamtmortalität ist (Zoccali C. et al., 2001).

Neben einer eingeschränkten Nierenfunktion wurden erhöhte ADMA-Konzentrationen aber auch im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen, die mit einer Endotheldysfunktion einhergehen, gefunden. Das sind Hypercholesterinämie (Böger RH. et al., 2000b), Bluthochdruck (Goonasekera CD. et al., 1997), Diabetes (Ito A. et al., 2002 und Xiong Y. et al., 2003), Hyperhomocysteinämie (Böger RH. et al., 2001) und Atherosklerose (Miyazaki H. et al., 1999). Die Anstiege der ADMA-Konzentrationen fielen allerdings nicht so hoch wie bei niereninsuffizienten Patienten aus und die Studien waren teilweise auch relativ klein.

Mögliche Mechanismen für erhöhte ADMA-Konzentrationen konnten in Zellkulturversuchen für LDL gefunden werden. Es konnte dort gezeigt werden, dass steigende LDL-Konzentrationen die DDAH-Aktivität senken (Ito A. et al., 1999) und die PRMP I Expression erhöhen (Böger RH. et al., 2000c). Für Homocystein gibt es einige Berührungspunkte zu ADMA, die eine Erklärung für erhöhte ADMA-Werte bei erhöhten Homocysteinwerten bieten könnten. Zum einen kann Homocystein die DDAH inhibieren (Stühlinger MC. et al., 2001), zum anderen ist Homocystein in den Methioninkreislauf eingebunden und damit Teil der Proteinmethylierung.

In Zusammenhang mit Diabetes melitus wurden erhöhte ADMA-Konzentrationen sowohl in Tiermodellen zu Typ I- und Typ II-Diabetes als auch bei Patienten mit Typ II Diabetes gefunden (Xiong Y. et al., 2003 und Paiva H. et al., 2003). Interessanter Weise konnte für erhöhte ADMA-Konzentrationen bei Typ II-Diabetikern gezeigt werden, dass sowohl unter einer Therapie mit Metformin (Asagami T. et al., 2002) als auch mit Rosiglitazon (Stühlinger MC. et al., 2002) die ADMA-Konzentrationen sinken. Die Mechanismen, über die der pharmakologische Effekt dieser Substanzen vermittelt sein könnte, sind allerdings bisher ungeklärt.

## 1.5. Wie misst man ADMA?

Die am häufigsten verwendete Methode, um ADMA, SDMA und L-Arginin-Konzentrationen zu messen, ist die „high performance-liquid chromatography“ (HPLC). Die Methode beinhaltet als ersten Schritt eine Festphasenextraktion mit Kationenaustauschersäulen. Das dient der Anreicherung der basischen Aminosäuren und der Abtrennung der restlichen Serumbestandteile. Die Aminosäuren werden im nächsten Schritt mit o-Phtaldialdehyd derivatisiert, um die Detektion mittels Fluoreszenzdetektor zu ermöglichen. Das steigert zum einen die Selektivität, da nur derivatisierte Substanzen aus der Probe gemessen werden und zum anderen die Sensitivität, da die Fluoreszenzmessung sehr empfindlich ist. Die Trennung wird mit einer Phenyl-Säule und einem Methanol-Citratpuffer-Gemisch (30 + 60) als Eluenten durchgeführt (Bode-Böger SM. et al., 1996). Diese Methode wurde von einigen Arbeitsgruppen modifiziert. Einige Arbeitsgruppen versuchten, diese Methode noch zu verbessern, indem sie die Extraktionsmethode, die Derivatisierung oder die Trennsäule veränderten. Chen veränderte 1997 die Extraktion (Chen BM et al., 1997). Er verzichtete auf eine chromatographische Reinigung und beschränkte sich auf eine Proteinfällung mit 5-Sulfosalicylsäure. Chen konnte zwar, im Vergleich zu anderen, vergleichbare Ergebnisse erzielen und die Aufarbeitung ein wenig vereinfachen, aber keine grundlegende Verbesserung der Methode erreichen. Die Derivatisierung wurde von M Marra 2003 verändert, um ein stabileres Derivat zu erhalten, das länger zu lagern ist (Marra M et al., 2003). Marra verwendete an Stelle des o-Phtaldialdehyd (OPA) 2,3-Naphthalendicarboxaldehyd (NDA) als Fluorophor. NDA-Derivate sind zwar stabiler als die entsprechenden OPA-Derivate, was sich aber bei der Verwendung von automatischen Probenaufgebern relativiert. Da die automatischen Probenaufgeber heute in Labors, die größere Mengen an Proben messen, zur Standardausrüstung gehören, ergab die Verwendung von NDA auch keine nennenswerte Verbesserung der Standardmethode. Die Verwendung einer C-18 HPLC-Säule (Ultracarb 3 ODS (20), Phenomenex) erbrachte zwar eine leicht verbesserte Trennung von SDMA und ADMA. Dies gelang aber nur zu Lasten der Zeit für eine Messung. Diese betrug immerhin 80 Minuten, was für die ADMA-Messung im Rahmen einer größeren klinischen Studie deutlich zu lang ist (Pettersson A. et al., 1997). Ich selbst habe versucht, eine HPLC-Methode ohne Derivatisierung mit UV-Detektion (205 nm) zu entwickeln. Es hat sich aber gezeigt, dass die UV-Detektion nicht sensitiv genug ist, um ADMA-Konzentrationen in biologischen Proben zu messen (0,3 µM – 3 µM) (Daten nicht gezeigt).

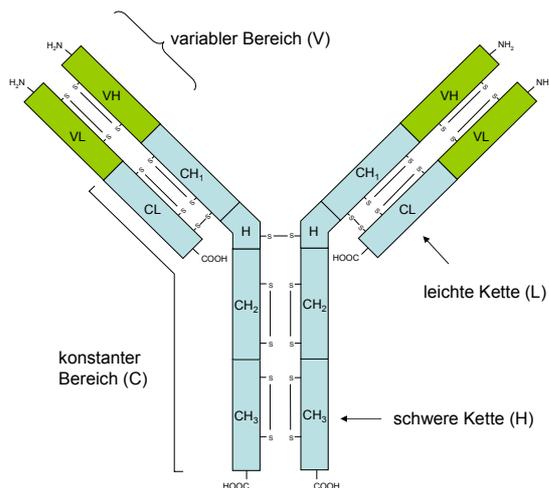
Außer der HPLC wurden auch andere analytische Methoden genutzt, um ADMA in biologischen Proben zu messen. Zu erwähnen sind da die Kapillarelektrophorese (Causse E. et al., 2000), die Flüssigkeitschromatographie - Tandemmassenspektrometrie (LC-tandem MS) (Vishwanathan K. et al., 2000 und Martens-Lobenhoffer J. et al., 2003) und die Gaschromatographie - Tandemmassenspektrometrie (GC-tandem MS) (Tsikas D. et al., 2003). Für die Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC - MS) konnte J Albsmeier 2004 in unserer Arbeitsgruppe eine Methode entwickeln (Albsmeier J et al., 2004). Die Kapillarelektrophorese konnte sich aus zwei Gründen nicht durchsetzen. Zum einen brachte die Methode als solche keinen nennenswerten Fortschritt in der Bestimmung von ADMA und zum anderen ist sie in klinisch orientierten Labors nicht sehr weit verbreitet. Die LC-tandem MS hatte zwar eine höhere Empfindlichkeit und Genauigkeit gegenüber der HPLC, da aber auch sie mit einer OPA-Derivatisierung arbeitet und die Trennung von ADMA und SDMA über die Flüssigkeitschromatographie erfolgt, brachte sie ebenfalls in Hinblick auf einen erhöhten Probendurchsatz keine Verbesserung. Eine echte Verbesserung für die Routinemessung von ADMA in klinischen Studien brachten erst die GC-tandem MS und die GC-MS. Zwar ist auch hier eine gewisse Probenaufarbeitung notwendig (Proteinfällung und Derivatisierung), aber die Analytik ist in zweifacher Hinsicht deutlich verbessert worden. Erstens ist auf Grund der unterschiedlichen Fragmente der ADMA- und SDMA-Derivate eine vollständige Trennung der beiden Substanzen möglich, und zweitens ist die Analysezeit mit weniger als zehn Minuten je Probe deutlich kürzer als mit allen anderen Methoden. Durch die Herstellung von stabil isotopenmarkiertem ADMA und der Verwendung als internem Standard in der GC-MS ist es unserer Arbeitsgruppe sogar gelungen, über einen Standard zu verfügen, der sich von dem ADMA aus den Proben chemisch und physikalisch praktisch nicht unterscheidet. Trotz allem hat die GC-MS auch zwei kleine Nachteile. Das sind die Kosten und die Verfügbarkeit.

Für die Bestimmung von ADMA in klinischen Studien mit einem Umfang von mehr als hundert Proben wird ein System benötigt, mit dem sich viele Proben in kurzer Zeit messen lassen. Zudem sollte die Methode in möglichst vielen Laboratorien verfügbar sein, um vergleichbare Werte zu erhalten, und die Kosten je gemessener Probe dürfen nicht allzu hoch sein. Ein solches System stellen die Antikörper basierten Methoden wie der ELISA und der kompetitive EIA dar. Mit diesen Systemen lassen sich eine große Anzahl an Proben in kurzer Zeit messen und die benötigte Ausstattung besteht im Prinzip lediglich in einem Plattenphotometer. Durch die Verwendung von Antikörpern sind diese Systeme hoch selektiv und sensitiv.

## 1.6. Was sind Antikörper?

Emil von Behring stellte als erster die Hypothese von der Existenz der Antikörper auf. Er impfte Kaninchen mit geringen Mengen Tetanustoxin. Dann stellte er fest, dass eigentlich letale Dosen Tetanustoxin, wenn sie mit dem Serum geimpfter Tiere gemischt wurden, für naive Kaninchen nicht mehr letal wirkten (Behring EK., 1890). Das Serum der geimpften Tiere musste also eine Substanz enthalten, die das Tetanustoxin neutralisierte: Antikörper. Paul Ehrlich ging davon aus, dass der Organismus als Immunantwort vermehrt „Bindungsstellen“ in das Serum abgibt und diese die Fremdschubstanz abfangen. Die tatsächliche Struktur der Antikörper wurde dann von Porter und Edelman aufgeklärt, wofür sie 1972 den Nobelpreis erhielten (Porter RR, 1967 und Edelman GM. et al., 1968). 1975 gelang es erstmals Köhler und Milstein mittels der Hybridomtechnik, monoklonale Antikörper zu gewinnen (Köhler G. et al., 1975).

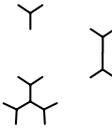
Antikörper sind aus vier unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt (siehe Abbildung 6). Sie bestehen aus zwei identischen schweren (ca. 55 kDa) und zwei identischen leichten Ketten (ca. 25 kDa). Die beiden schweren Ketten sind über eine Disulfidbrücke verbunden. Jede leichte Kette ist wiederum mit einer der schweren Ketten über eine Disulfidbrücke verbunden. Die Antikörper werden in vier Klassen eingeteilt, die sich in ihren schweren Ketten unterscheiden.



**Abbildung 6** Struktur eines Immunglobulins

Man unterscheidet die Typen Immunglobulin (Ig) M (verantwortlich für die primäre Immunantwort), IgG (verantwortlich für die sekundäre Immunantwort), IgA (welches primär

in den Schleimhäuten vorkommt), IgE (welches vermutlich dem Schutz vor Parasiten dient und für allergische Reaktionen verantwortlich ist) und IgG (dessen Bedeutung nicht ganz geklärt ist). IgM bildet Pentamere, bei IgA können sich zwei, vier oder sechs Antikörper zu einem Komplex zusammenlagern. Die drei anderen Typen liegen als Monomere vor.

	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
schwere Kette	$\gamma$	$\mu$	$\alpha$	$\epsilon$	$\delta$
leichte Kette	$\kappa$ oder $\lambda$	$\kappa$ oder $\lambda$	$\kappa$ oder $\lambda$	$\kappa$ oder $\lambda$	$\kappa$ oder $\lambda$
Y-Struktur					
Valenzen	2	10	2, 4 oder 6	2	2
Konzentration im Serum	8 – 16 mg/ml	0,5 – 2 mg/ml	1 – 4 mg/ml	10 – 400 ng/ml	0 – 0,4 mg/ml
Funktion	sekundäre Immunant- wort	primäre Immunant- wort	Schutz von Schleim- häuten	Schutz vor Parasiten (?)	?

**Tabelle 1** Einteilung und Eigenschaften der Immunglobuline nach Harlow E, Lane D. Antibodies, a laboratory manual. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory.

## 1.7. Wie macht man polyklonale Antikörper?

Ein polyklonaler Antikörper (Antiserum) besteht aus der Gesamtheit der von einem Organismus gebildeten Antikörper. Er spiegelt also alle Antigene wieder, mit denen der Organismus im Laufe seines Lebens in Kontakt gekommen ist.

Ein Antiserum wird in der Regel im Kaninchen entwickelt. Dazu wird das Kaninchen wiederholt mit dem Antigen immunisiert, bis es einen ausreichend hohen Antikörpertiter aufweist (zur Immunisierung siehe 1.8). Das Serum wird gewonnen, in dem man das Kaninchen unter Narkose ausbluten lässt und aus dem Blut das Serum gewinnt. Die Spezifität und der Titer lassen sich nur über die wiederholte Immunisierung steuern. Gute Antiseren gewinnt man nach bis zu zehn Immunisierungen mit einem Titer von 1:50.000 bis 1:150.000. Antiserum und monoklonaler Antikörper unterscheiden sich in einigen Punkten voneinander (siehe Tabelle 2).

Charakteristik	Antiserum	monoklonaler Antikörper
Spezifität	unterschiedlich	hoch
Kosten und Aufwand	gering	hoch
Homogenität	variiert zwischen Chargen	hoch
Verfügbarkeit	beschränkt	prinzipiell unbegrenzt
Anwendungsmöglichkeiten	unterschiedlich	prinzipiell für alle immunologischen Methoden

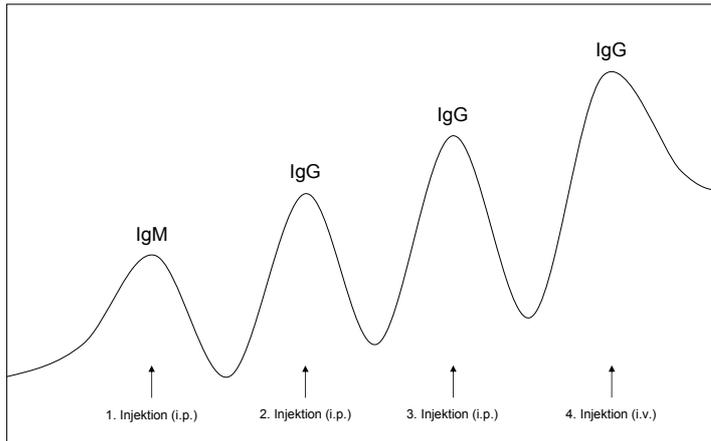
**Tabelle 2** Unterschiede zwischen Serum und monoklonalen Antikörpern

## 1.8. Wie macht man monoklonale Antikörper?

Monoklonale Antikörper sind Antikörper, deren Ursprung auf einen B-Lymphozyten zurückgeht, die also von einem Zellklon gebildet wurden.

Was ist die Schwierigkeit bei der Herstellung monoklonaler Antikörper? Ein einzelner B-Lymphozyt produziert genau einen für ein Antigen spezifischen Antikörper. Kommt nun das Tier mit einem Antigen in Kontakt, so wird sich der passende B-Lymphozyt vermehren und den Antikörper produzieren. Bei der Immunisierung einer Maus wird nun dieser Prozess in Gang gesetzt. Möchte man nun den Antikörper (und nur den) gewinnen, so müsste man der Maus die entsprechenden B-Lymphozyten entnehmen und versuchen, sie ex vivo zu vermehren. Die Schwierigkeit besteht nun darin, dass B-Lymphozyten sich ex vivo nicht vermehren und nach kurzer Zeit eingehen. Des Weiteren ist es praktisch nicht möglich, nur die gewünschten B-Lymphozyten zu isolieren. Man braucht also eine Technik, mit der es möglich ist, die gewünschten B-Lymphozyten von anderen abzutrennen und zu immortalisieren. Die Lösung für dieses Problem fanden Köhler und Milstein.

Der erste Schritt in der Gewinnung monoklonaler Antikörper ist die Immunisierung eines Versuchstieres. In der Regel werden dafür Mäuse vom Stamm BALB/c verwendet, es ist aber prinzipiell auch möglich, andere Tiere zu verwenden. Die Immunisierung besteht darin, dem Tier wiederholt das Antigen zu verabreichen, um möglichst viele spezifische B-Lymphozyten präparieren zu können. Für die Immunisierung wird das Antigen mit einem Adjuvans, welches die Immunantwort des Tieres verstärkt, gemischt und der Maus intraperitoneal injiziert. Nach der ersten Injektion steigt der Antikörpertiter an und fällt nach einer kurzen Zeit wieder ab (siehe Abbildung 7).

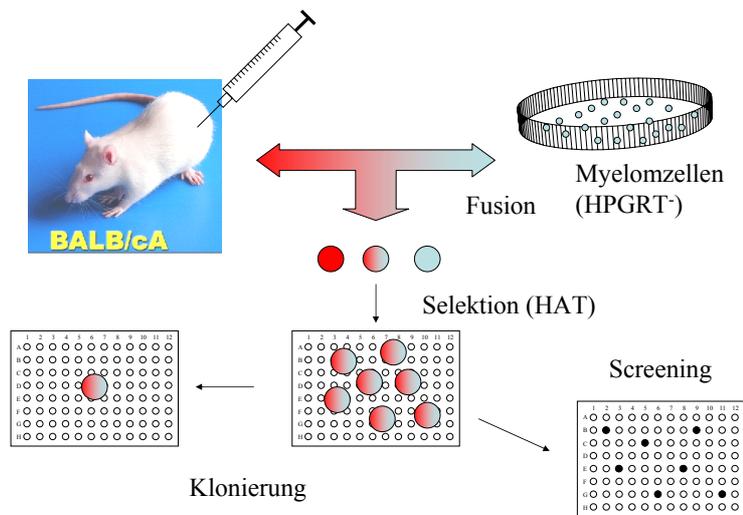


**Abbildung 7** Verlauf des Antikörpertiter und -typ im Verlauf der Immunisierung.

Nach einer weiteren Injektion steigt der Antikörpertiter über den Ausgangswert an und fällt nicht mehr so stark wie nach der ersten Injektion. Die Injektionen werden wiederholt, bis ein möglichst hoher Titer erreicht ist. In der Praxis werden drei intraperitoneale und eine intravenöse Injektion verabreicht. Wenn das gewünschte Antigen ein Molekülmasse von weniger als 2000 Da hat, muss es an ein größeres Trägerprotein gekoppelt werden, da es zu klein für die Erkennung durch das Immunsystem ist. Dafür verwendet man meistens Albumine, Globuline oder Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH). KLH wird aus der Hämolymphe des Molusken *Megathura crenulata* isoliert und gehört zu der Familie der respiratorischen Proteine (Hämocyanine), welche in Molusken und Arthropoden vorkommen. Durch sein großes Molekulargewicht (400 – 3000 kDa) ist KLH ein starkes Immunogen und durch die große Anzahl von Lysinresten im Molekül gut für die Kopplung von Haptenen geeignet. KLH kann verschieden zusammengesetzte Aggregate bilden, deren Zusammensetzung vom pH-Wert und der Konzentration zweiwertiger Kationen abhängt (Markl J. et al., 1991 und Herskovits TT. et al., 1988). Bei einem pH-Wert größer als 9,5 liegt das Protein vollständig in Monomere dissoziiert vor, während es bei einem pH-Wert von 7,4 und in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  stabile Oligomere bildet. Der aktive, Sauerstoff bindende Teil des Proteins enthält zwei Kupferionen. Für die Kopplung von Haptenen an KLH kommen verschiedene bifunktionelle „cross-linker“ in Frage, die in der Regel eine aktivierte Carboxylgruppe für die Bindung an einen Lysinrest und eine weitere funktionelle Gruppe für die Bindung des Haptens enthalten. Für die Immunisierung mit einem Hapten werden zwei verschiedene Haptenkonjugate benötigt. Eines wird zur Immunisierung eingesetzt und das andere wird für einen Assay zum Screening auf Antikörper benötigt. Für die Herstellung der

beiden Konjugate müssen unterschiedliche Trägerproteine und „cross-linker“ verwendet werden, um zu verhindern, dass man Antikörper detektiert, die gegen das Trägerprotein oder den „cross-linker“ gerichtet sind. Um den Erfolg der Immunisierung zu verfolgen, wird aus dem Blut der Mäuse der Antikörpertiter bestimmt.

Der zweite Schritt nach einer erfolgreichen Immunisierung ist die Präparation der B-Lymphozyten aus einer Maus und deren Fusion mit Zellen einer Myelom-Zelllinie. Zur Präparation der B-Lymphozyten wird die Maus in Narkose getötet und die Milz wird entnommen. Die B-Lymphozyten aus der Milz werden mit einer Spritze mit einer dünnen Kanüle mit Zellkulturmedium aus der Milz „ausgewaschen“ und gezählt. Als Fusionspartner wählt man eine Myelomzelllinie, die ihren Ursprung ebenfalls bei BALB/c-Mäusen hat (also syngenen ist). Die Myelomzelllinie sollte selbst keinen Antikörper mehr exprimieren. Für die Fusion wird in der Regel die Zelllinie X63-Ag8.653 verwendet. Diese Linie wurde gewonnen, indem



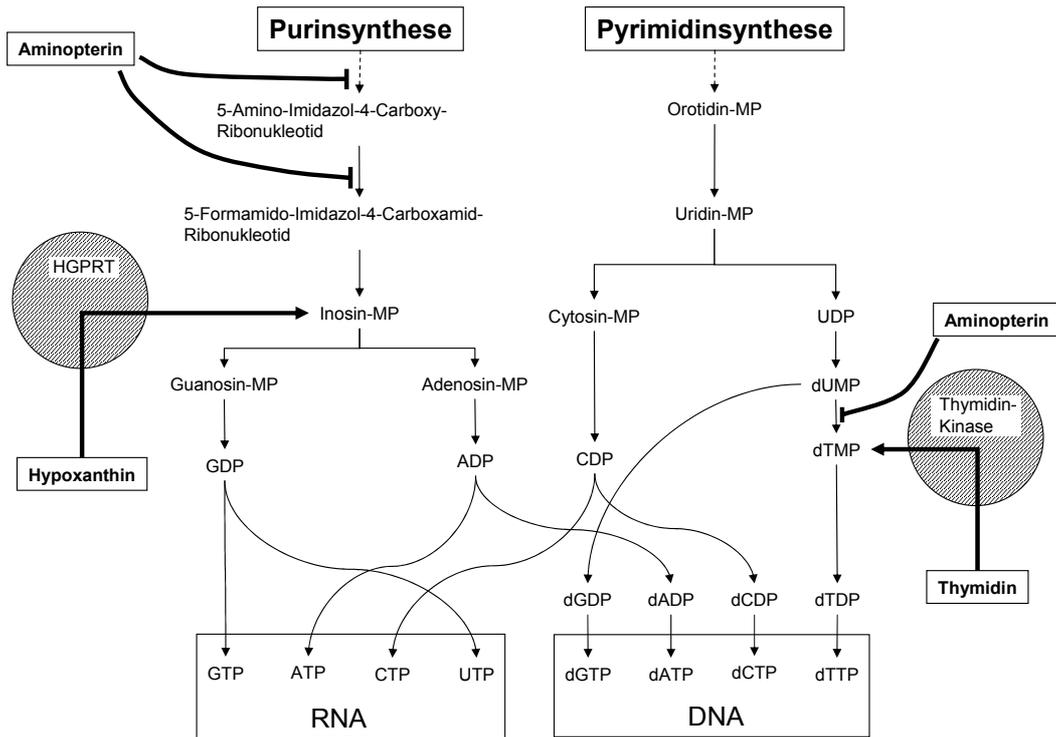
**Abbildung 8** Schematische Darstellung der Entwicklung monoklonaler Antikörper.

einer BALB/c-Maus ein multiples Myelom (B-Zell-Lymphom) induziert wurde und daraus eine stabile Tumor-Zelllinie (P3K) etabliert wurde. Aus dieser Zelllinie wurden Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase defiziente ( $HGPRT^-$ ) Zellen selektioniert (P3-X63Ag8). Aus diese Zellen wurde nun die Linie X63-Ag8.653 entwickelt, welche selbst keine Antikörper mehr exprimierten. Zur Fusion werden die B-Lymphozyten mit den Myelomzellen im Verhältnis 1:1 bis 1:10 gemischt und die Fusion durch Zentrifugation unter Vermittlung der oberflächenaktiven Substanz Polyethylenglykol (PEG) durchgeführt. Die Fusion kann auch mit zuvor tiefgefrorenen B-Lymphozyten durchgeführt werden. Bei dieser Fusion entstehen nun Hybrid-Zellen (Hybridome) aus einer Myelomzelle und einem B-Lymphozyten, aus zwei B-Lymphozyten oder aus zwei Myelomzellen (es können auch mehr als zwei Zellen fusionieren). Außerdem verbleiben in dem Gemisch viele nicht fusionierte Zellen. Wie trennt man nun die verschiedenen Hybridome und Zellen?

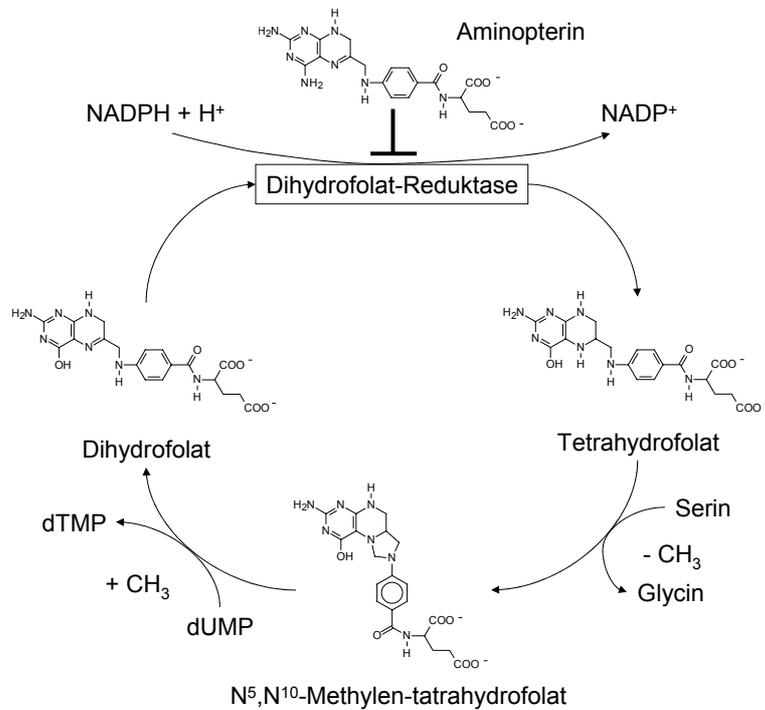
Wie schon erwähnt sind B-Lymphozyten selbst unter optimalen Kulturbedingungen nicht länger als 14 Tage ex vivo lebensfähig. Sie sterben also mit der Zeit von selber ab. Die

Myelomzellen aber würden sich schnell vermehren und wachsen. An dieser Stelle macht man sich die so genannte HAT-Selektion zu Nutze. HAT steht für die Substanzen Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin. Wie oben schon erwähnt sind die für die Fusion verwendeten Myelomzellen HGPRT<sup>-</sup>. Wenn man in das Zellkulturmedium dieser Zellen nun das HAT-Gemisch gibt, so wird bei ihnen zunächst die Purin- und Pyrimidinsynthese durch das Aminopterin unterbunden (siehe Abbildung 9). Dies geschieht natürlich auch bei den Hybridomen. Den Myelomzellen fehlt aber das für den Reservestoffwechselweg notwendige Enzym HGPRT (siehe Abbildung 10), über das die Hybridome durch die B-Lymphozyten verfügen. Durch den Zusatz von Hypoxanthin und Thymidin zum Zellkulturmedium können die Hybridome über die HGPRT die Purin- und Pyrimidinsynthese aufrecht erhalten. Das führt dazu, dass in der Zellkultur nur die Hybridome überleben und alle anderen Zellen innerhalb von 14 Tagen absterben. Nach dieser Zeit wird das Selektionsmedium (HAT-Medium) auf HT-Medium umgestellt, bis auch noch eventuell intrazellulär vorhandenes Aminopterin entfernt ist. Danach können die so erhaltenen Zellen wieder auf dem normalen Weg Purine und Pyrimidine synthetisieren.

Nach der Fusion werden die Zellen in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät (40 Platten für die Fusion einer Milz) oder zur späteren Aussaat eingefroren. Der größte Teil der ausgesäten Zellen wird absterben. Aber in ungefähr der Hälfte der Kavitäten werden ein oder mehrere Klone heranwachsen (siehe Abbildung 11). Als Klon bezeichnet man Zellen, die von einer Zelle abstammen (also monoklonal sind). Sie haben genau die gleichen Eigenschaften; produzieren also in unserem Fall den gleichen Antikörper. Es werden aber nicht alle Klone, die nach der Fusion heranwachsen, Antikörper produzieren und von denen, die Antikörper produzieren, wird nur ein kleiner Teil Antikörper gegen das Immunogen bilden. Man muss nun also die Klone finden, die den gewünschten Antikörper produzieren. Dieses Screening führt man ebenfalls in Mikrotiterplatten durch. Man beschichtet die Kavitäten mit dem Immunogen und inkubiert mit Zellkulturüberstand. Mit einem anti-Maus-Ig-Antikörper weist man nun gebundenen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand nach. Wenn die Immunisierung mit einem Hapten stattgefunden hat, wird zum Beschichten ein Konjugat mit einem zweiten Trägerprotein und einem anderen „cross-linker“ verwendet. Die als positiv getesteten Klone werden im letzten Schritt noch einmal kloniert. Dazu werden die Zellen so verdünnt, dass sich 0,5 Zellen in 100 µl Zellkulturmedium befinden und die



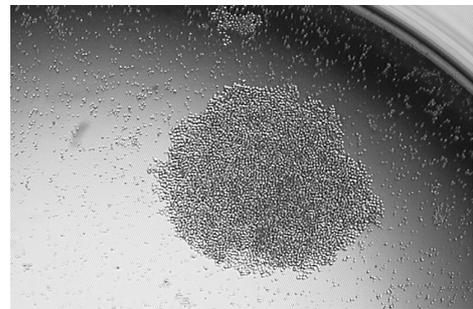
**Abbildung 9** Aminopterin wirkt durch die Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase und verhindert dadurch die Übertragung von Methylgruppen bei der Purin- und Pyrimidinsynthese.



**Abbildung 10** Hemmung der Purin- und Pyrimidinsynthese durch Aminopterin und Reserveweg über HGPRT und Thymidin-Kinase.

Zellen á 100 µl je Kavität in Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zellen werden erneut auf Antikörperproduktion gescreent und positiv getestete Klone als Kulturen etabliert.

Zur Produktion größerer Mengen an Antikörper stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Die effektivste, aber heute nicht mehr praktizierte Methode ist ein Aszites der Maus. Dabei werden einer BALB/c-Maus einige Antikörper produzierende Zellen als Tumor in die Bauchhöhle injiziert. Darauf bildet sich bei der Maus ein Tumor aus, was mit einer massiven Aszites-Bildung einhergeht. Nach einer gewissen Zeit kann man die Flüssigkeit der Maus abnehmen und erhält eine relativ hoch konzentrierte Antikörperlösung (0,9 – 9 mg/ml). Diese Methode wird aber mit Rücksicht auf den Tierschutz nicht mehr angewendet. Wenn man geringere Mengen an Antikörper benötigt (1 – 5 mg), werden die Zellen in normalen Zellkulturschalen gehalten. Im Überstand solcher Kulturen findet man Konzentrationen zwischen 10 µg Ig und 50 µg Ig je ml. Ein Vorteil dieser Produktionsmethode ist, dass man unter proteinfreien Kulturbedingungen eine praktisch reine Antikörperlösung erhält. Der Nachteil dieser Methode sind Aufwand und Kosten. Möchte man höhere Antikörperkonzentrationen als die des Zellkulturüberstandes oder den Antikörper



**Abbildung 11** Klon 14 Tage nach Aussaat (100 x).

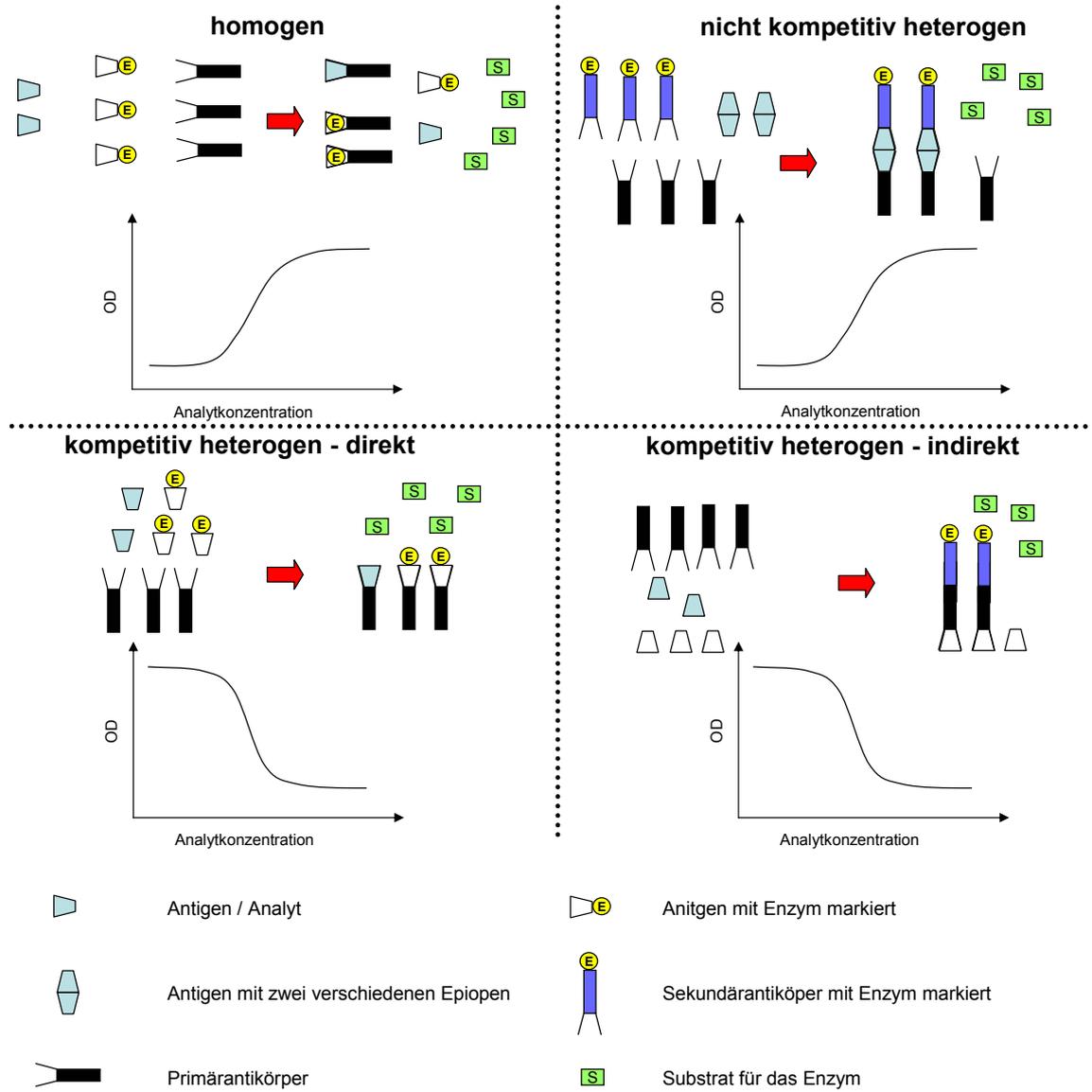
aufreinigen, so kann man prinzipiell alle Methoden der Proteinreinigung anwenden. In der Regel macht man sich aber einer Besonderheit der Immunglobuline zu Nutze. Ein Oberflächenprotein von *Staphylococcus aureus* (Protein A) ist in der Lage, selektiv Immunglobuline zu binden. Man gibt den Zellkulturüberstand über eine Protein-A-Säule und kann dann die Immunglobuline entweder mittels erhöhter Salzkonzentrationen oder erniedrigtem pH von der Säule eluieren. Anschließend erfolgt eine Umpufferung durch Dialyse oder Ionenaustauschchromatographie. Die Produktion größerer Mengen Antikörper wird in Fermentern oder speziellen Produktionssystemen durchgeführt, die höhere Zelldichten als normale Zellkulturschalen zulassen. Diese Systeme sind aber auf Grund ihres Preises für den Laboralltag nicht geeignet.

## 1.9. Immunoassays

Die Zahl der verschiedenen immunologischen Testformate ist gewaltig und soll auch nicht erschöpfend an dieser Stelle besprochen werden. Zur quantitativen Bestimmung eines Analyten, haben sich drei prinzipielle Testformate durchgesetzt. Der älteste Assay ist der „Radio-Immuno-Assay“ (RIA) (Yalow. et al., 1959). Bei diesem Assay wird ein radioaktiv markierter Tracer eingesetzt, der mit dem Analyten (Antigen) um die Antikörperbindung konkurriert. Gemessen wird die Radioaktivität, nach dem der überschüssige Analyt und Tracer vom Antigen-Antikörper-Komplex getrennt wurde. Die Analytenkonzentration ist umgekehrt proportional dem gemessenen Signal. Der Assay hat den Vorteil, dass er sehr empfindlich und robust ist. Er wird aber auf Grund der Verwendung radioaktiv markierter Substanzen immer weniger verwendet.

Das heute weit mehr genutzte Testprinzip ist der enzymatische Assay. Er beruht darauf, dass die Analytenkonzentration mit einer Enzymaktivität im Assay korreliert. Die in der Regel verwendeten Enzyme sind die Meerrettichperoxidase und die alkalische Phosphatase. Bei den Enzym-Immuno-Assays (EIA) werden prinzipiell zwei verschiedene Testprinzipien unterschieden. Zum einen der homogene Assay, bei dem keine Abtrennung des Antigen-Antikörper-Komplexes aus dem Versuchsansatz erfolgt. Die Enzymaktivität wird direkt durch die Komplexbildung beeinflusst. Zum anderen der heterogene Assay, bei dem eine Trennung von Antigen-Antikörperkomplex erfolgt. Der heterogene EIA wird noch einmal in nichtkompetitive und kompetitive Assays unterteilt. Die kompetitiven Assays unterteilen sich in die direkten und indirekten Assays (siehe Abbildung 12).

Für die Entwicklung eines EIA zur quantitativen Bestimmung eines Haptens bieten sich die heterogen kompetitiven Testformate an. Bei einem homogenen Assay besteht die Schwierigkeit, das Hapten so an ein Enzym (oder Substrat) zu koppeln, dass zum einen das Hapten noch von dem Antikörper erkannt wird und zum anderen aber das Enzym durch die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung inaktiviert wird. Für die Entwicklung eines heterogenen nicht kompetitiven Assay muss das Hapten die notwendige Voraussetzung erfüllen, zwei Epitope, also Bindungsstellen für zwei unterschiedliche Antikörper, zu besitzen. Es reicht also nicht, nur einen Antikörper gegen das Hapten zu entwickeln.

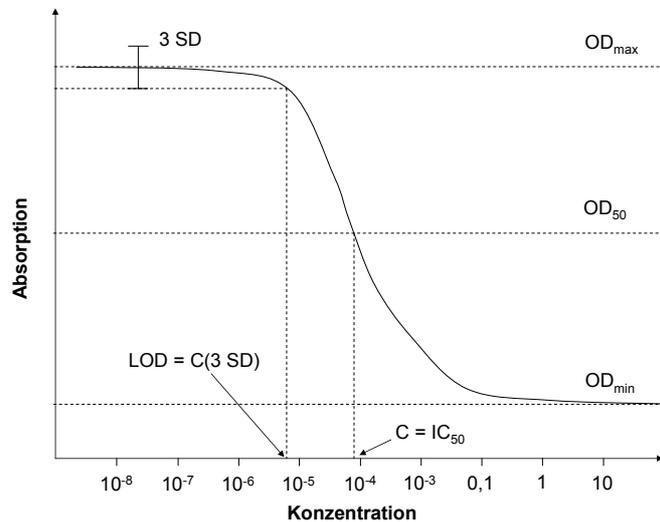


**Abbildung 12** Die verschiedenen Assaykonfigurationen enzymatischer Immunoassays.

Die kompetitiven heterogenen Assays sind für Haptene am besten geeignet. Man benötigt nur einen Antikörper und bei dem indirekten Assay entfällt zudem die Kopplung des Haptens an ein Enzym. Enzymmarkierte Sekundärantikörper, die gegen Immunglobuline der Maus gerichtet sind, kann man käuflich erwerben.

Aus den genannten Gründen habe ich mich für den heterogenen, kompetitiven, indirekten Immunoassay entschieden. Hierbei wird das an ein Trägerprotein gekoppelte Hapten an eine Festphase (Mikrotiterplatte) gebunden. Der Antikörper kann nun entweder an das fest gebundene Hapten binden oder an den gelösten Analyten. Nach der Entfernung des gelösten Hapten-Antikörper-Komplexes aus dem System wird der gebundene Antikörper mit Hilfe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Die Menge an umgesetztem

Substrat ist also umgekehrt proportional zum Analyten. Die Abbildung 13 zeigt eine typische Standardkurve eines solchen Assays. Sie wird durch drei Absorptionen und zwei Konzentrationen gekennzeichnet. Die maximale Absorption  $OD_{max}$  und die minimale Absorption  $OD_{min}$  kennzeichnen den Absorptionbereich des Assays. Der Bereich sollte sich über ein bis zwei OD erstrecken. Der Testmittelpunkt wird durch die  $OD_{50}$  und die dazugehörige Konzentration  $IC_{50}$  (auch  $C_{50\%}$ ) angegeben. Die untere Nachweisgrenze wird als LOD (limit of detection) bezeichnet und ist als die Konzentration definiert, die drei Standardabweichungen von der  $OD_{max}$  entfernt liegt. Auch die Kreuzreaktivität ist ein ganz wichtiger Parameter für einen Immunoassay. Sie gibt die Spezifität des Assays an und ist von ihm abhängig. Sie wird



**Abbildung 13** Typische Standardkurve eines heterogenen kompetitiven indirekten EIA.

ermittelt, indem statt mit dem Analyten mit der zu untersuchenden Substanz eine Standardkurve erstellt wird und die Testmittelpunkte in ein Verhältnis gesetzt werden. Die

Formel für die Kreuzreaktivität lautet: 
$$\text{Kreuzreaktivität [\%]} = \frac{IC_{50}(\text{Analyt})}{IC_{50}(\text{Substanz})} * 100.$$

## 2. Ziel der Arbeit

N,N-Dimethyl-L-arginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Es entsteht durch posttranslationelle enzymatische Methylierung von RNA-bindenden Proteinen. Die Enzyme die die Methylierung katalysieren werden als Arginin-Protein-Methyltransferasen (PRMT) bezeichnet. Die PRMT unterteilen sich in zwei verschiedenen Subgruppen. Die Typ-I-PRMT katalysieren die Bildung von ADMA und seinem monomethylierten Derivat N-Monomethyl-L-arginin (NMMA). Die Typ-II-PRMT katalysieren die Bildung von N,N'-Dimethyl-L-arginin (SDMA) und ebenfalls NMMA. Im Laufe des physiologischen Protein-Turn-over werden ADMA, SDMA und in geringer Menge NMMA aus den methylierten Proteinen im Rahmen ihrer Degradation freigesetzt. ADMA und NMMA sind beides Inhibitoren der eNOS und bewirken damit eine verminderte NO-Freisetzung aus dem Endothel der Gefäße. Erhöhte ADMA-Konzentrationen sind bei einer Reihe von Erkrankungen, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen, beobachtet worden (terminale Niereninsuffizienz, Hyperlipidämie, Hypertonus u.a.). Die Infusion von ADMA in gesunde Probanden ruft bei diesen die Symptome einer endothelialen Dysfunktion hervor. SDMA ist im Gegensatz zu ADMA biologisch inaktiv. ADMA wird auf zwei Wegen aus dem Körper eliminiert. Zum einen erfolgt die Elimination renal und zum anderen wird ADMA enzymatisch abgebaut. Das Enzym das für den Abbau von ADMA verantwortlich ist, ist die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH). Von der DDAH kommen zwei Isoformen vor (DDAH I und DDAH II). Die beiden Isoformen sind im menschlichen Körper unterschiedlich lokalisiert, sie sind jedoch in der Regel mit einer der NOS-Isoformen colokalisiert. Der enzymatisch abgebaute Anteil überwiegt den renal eliminierten. SDMA wird ausschließlich renal eliminiert. NMMA verhält sich im Körper wie ADMA, seine Konzentration beträgt aber nur ca. ein Zehntel.

Die Messung von ADMA-Konzentrationen wurde bisher mit Hilfe der HPLC durchgeführt. Die Herausforderung besteht hier in der Trennung von ADMA und SDMA. Die Proben werden mit einer Kationenaustauscher-Säule (CBA-Kartusche) aufkonzentriert und von Matrixbestandteilen gereinigt. Die Trennung erfolgt auf einer Phenyl-Phase mit kleiner Vorsäule. Um eine Detektion mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors durchführen zu können wird eine online-Derivatisierung mit o-Phtaldialdehyd durchgeführt. Die Laufzeit für eine Messung beträgt inklusive eines zwischenzeitlichen Eluentenwechsels zur Säulenspülung ca. 45 Minuten. Einige Arbeitsgruppen haben versucht diese Methode durch verschiedene Modifikationen zu verbessern. Sie sind aber alle im wesentlichen nicht erfolgreich gewesen.

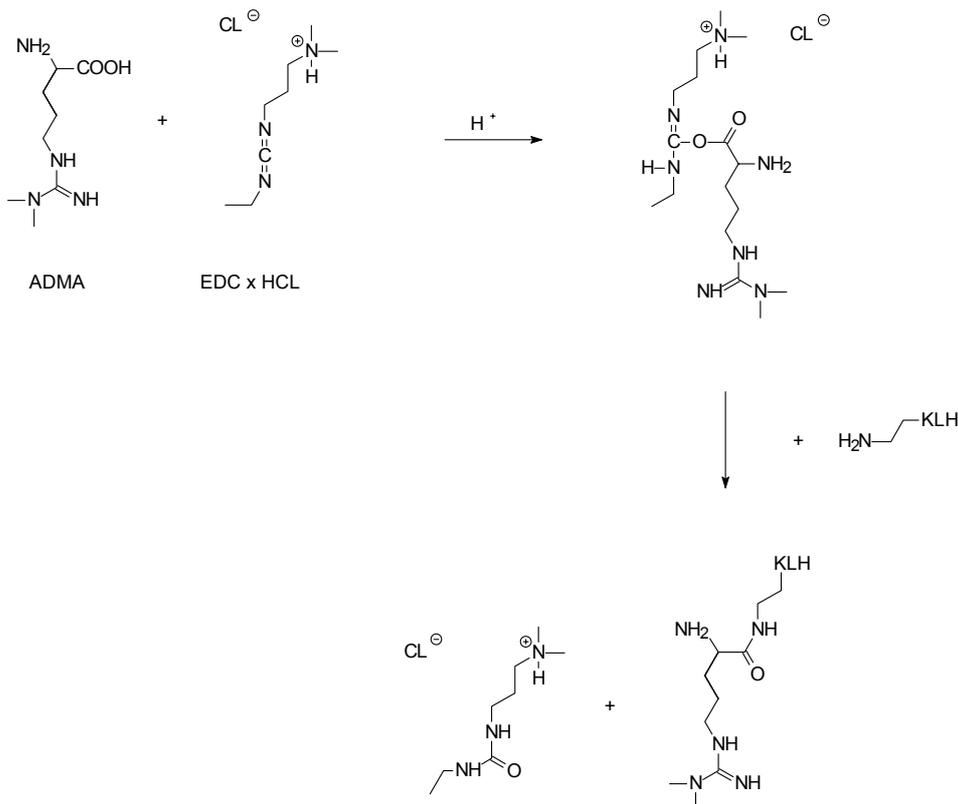
Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden ganz andere analytische Ansätze gewählt. So wurden in letzter Zeit LC-tandem MS-, GC-MS- und GC-tandem MS-Methoden entwickelt. Die Methoden zeichnen sich durch eine verbesserte Genauigkeit gegenüber der HPLC aus. Vor allem die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte GC-MS-Methode hat den zusätzlichen Vorteil, dass die Zeit für die Messung einer Probe nur noch rund zehn Minuten beträgt. Dennoch haben die Massenspektrometrie-basierten Methoden den nach Nachteil, dass sie in der Anschaffung teuer und daher nicht sehr weit verbreitet sind.

Für die Messung von biologischen Parametern im Rahmen einer klinischen Studien ist es nötig, dass die Messmethode robust, kostengünstig um zum Zwecke der Vergleichbarkeit weit verbreitet ist. Diese Anforderungen werden durch die antikörperbasierten Testformate erfüllt. Es war daher Ziel der Arbeit zum einen, einen monoklonalen Antikörper und zum anderen ein polyklonales Antiserum zu entwickeln. Darauf basierend sollte ein ELISA konstruiert werden. Der ELISA sollte validiert und im Rahmen einer klinischen Studie eingesetzt werden. Die Entwicklung des polyklonalen Antiserum und des ELISA erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma DLD Diagnostika, Adlerhorst 15, Hamburg.

### 3. Methoden

#### 3.1. Hapten-Kopplung

Für die Herstellung des Immunogens wurden 100 µl einer KLH (keyhole limpet hemocyanin)-Lösung (10 mg/ml) mit 760 µl MES-Puffer verdünnt. Zu der Mischung wurden 40 µl einer ADMA-Lösung (25 mg/ml) gegeben und gut gemischt. Von dem Kopplungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid x Hydrochlorid (EDC) wurden 10,0 mg in 1 ml Aqua bidest. gelöst und gut gevortext. Die Lösung muss immer frisch angesetzt werden. Von der EDC-Lösung wurden 100 µl zu der KLH-ADMA-Mischung gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für zwei Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Abbildung 14). Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz über Nacht zweimal gegen vier Liter PBS-Puffer dialysiert. Nach der Dialyse wurde die erhaltene Lösung á 100 µl aliquotiert und zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.



**Abbildung 14** Schematische Darstellung der Kopplung von ADMA an ein Protein mit EDC x HCl. EDC reagierte mit der Carboxylgruppe des ADMA unter Bildung eines nicht stabilen reaktiven Zwischenproduktes. Dieses reagierte mit Aminogruppen (Lysin) des KLH unter Abspaltung von N-substituiertem Harnstoff. Nicht reagiertes Zwischenprodukt hydrolysierte rasch wieder.

### **3.2. Proteinbestimmung**

Zur Bestimmung von Proteinmengen in Lösungen wurden diese mit Hilfe der Methode nach Bradford (Bradford 1976) photometrisch quantifiziert.

Die Proteinbestimmung erfolgte in Doppelbestimmung. Dazu wurde zunächst eine Standardreihe angelegt, indem in je zwei Photometerküvetten 10, 20, 30 bzw. 40  $\mu\text{l}$  (3,58  $\mu\text{g}$ , 7,15  $\mu\text{g}$ , 10,73  $\mu\text{g}$  und 14,30  $\mu\text{g}$ ) der Proteinstandarlösung hineinpipettiert und mit Aqua bidest. auf je 800  $\mu\text{l}$  aufgefüllt wurden. Von der zu untersuchenden Lösung wurden in ebenfalls je zwei Photometerküvetten einmal 10  $\mu\text{l}$  und einmal 30  $\mu\text{l}$  Lösung (ca. 5 - 15  $\mu\text{g}$  Protein) gegeben und auf 800  $\mu\text{l}$  mit Aqua bidest. aufgefüllt. Anschließend wurden in jede Küvette 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz gegeben und gut mit einem Einwegspatel gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde von der Standardreihe und den Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Photometer die Absorption gemessen. Aus den Werten der Standards wurde mittels linearer Regression eine Eichgerade berechnet. Mittels der Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt.

### **3.3. Bestimmung des gebundenen ADMA**

Um die Menge an gebundenem ADMA in dem ADMA-KLH-Konjugat zu bestimmen, wurde eine Hydrolyse mit Salzsäure durchgeführt. Dazu wurden 70  $\mu\text{l}$  der ADMA-KLH-Lösung ( $\sim$  50  $\mu\text{g}$  Protein) mit 2  $\mu\text{l}$  einer 2,0% Phenollösung in Ethanol und 10  $\mu\text{l}$  konzentrierter Salzsäure versetzt und mit Aqua bidest. auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde in ein Autosamplervial für die HPLC gegeben, mit Argon überschichtet und zugekriegt. Die Hydrolyse wurde für drei Stunden bei 130°C durchgeführt. Nachdem der Reaktionsansatz wieder auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Lösung in der SpeedVac zur Trockne eingengt und in 300  $\mu\text{l}$  Aqua bidest. aufgenommen. In der Lösung wurde die ADMA-Konzentration mittels HPLC bestimmt und die Menge des an das KLH gebundenen ADMA's berechnet.

### 3.4. Messung von ADMA-Konzentrationen mit HPLC

Die Messung von ADMA-Konzentrationen in Lösungen erfolgte mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Die Proben wurden mit einer Festphasenextraktion (SPE) vorgereinigt und vor der chromatographischen Auftrennung mittels Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor. Als interner Standard wurde 12,5  $\mu\text{M}$  L-Homoarginin verwendet. Für die Festphasenextraktion wurden zu 400  $\mu\text{l}$  der zu messenden Probe 50  $\mu\text{l}$  einer 0,1 mM L-Homoargininlösung gegeben und die Probe mit Aqua bidest. auf 1,0 ml gebracht. Parallel dazu wurden 1,0 ml eines Standard hergestellt, der 50  $\mu\text{M}$  L-Arginin, 12,5  $\mu\text{M}$  L-Homoarginin, 1  $\mu\text{M}$  SDMA und 1  $\mu\text{M}$  ADMA enthielt. Die Festphasenextraktion wurde mit CBA (carboxylic acid)-Kartuschen durchgeführt, um unpolare Proteine und Aminosäuren abzutrennen. Die CBA-Kartuschen wurden mit einem Säulenvolumen Methanol und einem Säulenvolumen Aqua bidest. vorkonditioniert. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben und ein Standard (SPE-Standard) auf die Kartuschen aufgegeben. Anschließend wurden die Kartuschen mit zwei Säulenvolumen Aqua bidest. gespült. Die Elution von den Kartuschen erfolgte mit 1 ml 1M Ameisensäure in Eppendorfgläser. Die so vorbereiteten Proben wurden in der SpeedVac zur Trockne eingengt, der Rückstand in 400  $\mu\text{l}$  Aqua bidest. aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelagert. 100  $\mu\text{l}$  der aufgearbeiteten Proben wurden in Autosamplervials für die HPLC gefüllt und in den Autosampler der HPLC gestellt. Vor der eigentlichen Chromatographie erfolgte in der HPLC eine 30-sekündige Inkubation der Proben mit 100  $\mu\text{l}$  OPA-Reagenz als Vorsäulenderivatisierung. Nach der Derivatisierung wurden 5  $\mu\text{l}$  in die HPLC eingespritzt. Die Trennung erfolgte auf einer Phenyl-Säule isokratisch mit Eluent A und einem Fluss von 1 ml/min. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei  $\lambda^{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$  und  $\lambda^{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ . Nach einer Laufzeit von 30 Minuten wurde die Säule für zehn Minuten mit Eluent B gespült. Die Peaks von L-Arginin, L-Homoarginin, SDMA und ADMA wurden mittels des Standards identifiziert und die Konzentration anhand des Peakflächenverhältnisses von Substanz zu internem Standard (L-Homoarginin) errechnet.

### **3.5. Immunisierung**

Zur Immunisierung wurden vier Mäuse (Balb/c) verwendet. Vor der ersten Immunisierung wurde den Mäusen durch Punktion des retrobulbären Plexus unter Ethernarkose ein Tropfen Blut (0,02 ml – 0,04 ml) entnommen. Das Blut wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde stehengelassen und das Serum durch Zentrifugation gewonnen. Das Serum wurde bei -20 °C gelagert und später als Negativkontrolle in Immunoassays verwendet. Für die erste Injektion wurden 70 µl der ADMA-KLH-Lösung (50 µg Protein) mit 180 µl Aqua bidest. gemischt und durch einen 0,2 µM Membranfilter sterilfiltriert. Diese 250 µl wurden mit 250 µl komplettem Freundschens Adjuvans durch Vortexen in einem 1500 µl Eppendorfgefäß zu einer stabilen Emulsion gemischt. Jeder Maus wurden 500 µl der so hergestellten Emulsion intraperitoneal gespritzt. Die erste Boostinjektion erfolgte 14 Tage später mit einer Injektionslösung, die analog der ersten Lösung hergestellt wurde, mit dem Unterschied, dass statt komplettem Freundschens Adjuvans inkomplettes verwendet wurde. Eine weitere Boostinjektion mit inkomplettem Freundschens Adjuvans erfolgte drei Wochen nach der vorhergehenden Boostinjektion. Weitere drei Wochen später erfolgte die letzte Boostinjektion. Bei dieser letzten Injektion wurde den Mäusen eine sterile Lösung von 50 µg ADMA x HCL in isotoner Kochsalzlösung über die Schwanzvene iv. verabreicht. Blutentnahmen (ein Tropfen) erfolgten immer vor den Boostinjektionen durch retrobulbäre Punktion mit anschließender Serumgewinnung wie oben beschrieben. Drei Tage nach der letzten Boostinjektion wurden die Tiere getötet und die Milz präpariert.

### **3.6. Bestimmung des Immunisierungserfolges und Titers**

#### **3.6.1. Bestimmung des Immunisierungserfolges**

Um den Verlauf der Immunisierung zu zeigen, wurden die vier Blutproben, die den Mäusen im Laufe der Immunisierung abgenommen wurden, unter identischen Bedingungen in einem einfachen Test eingesetzt, der eine rein qualitative Aussage über den Verlauf der Immunisierung zulässt.

Eine Mikrotiterplatte wurde beschichtet, in dem ein Aliquot ADMA-BSA Konjugat (siehe 3.10) in 40 ml Beschichtungspuffer gelöst wurde und á 100 µl in die Wells der Platte pipettiert wurde. Die Beschichtung verlief über Nacht. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte drei mal mit je 200 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Nach der Beschichtung der Platte wurden noch freie Bindungsstellen in den Wells durch Inkubation mit

200 µl Blockpuffer je Well für 30 Minuten bei Raumtemperatur besetzt. Im Anschluss an das Blocken wurde die Mikrotiterplatte wie oben beschrieben gewaschen und das Serum der vier Mäuse mit Verdünnungspuffer 1/1000 verdünnt und á 100 µl in je zwei Wells der Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wurde im Anschluss für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte wie oben beschrieben gewaschen und mit 100 µl Sekundärantikörper (1/5000 in Verdünnungspuffer) je Well für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gewaschen. Die Detektion von gebundenem Antikörper wurde mit 100 µl TMB-Reagenz je Well für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 100 µl Schwefelsäure 1 M je Well gestoppt und die Absorption bei 450 nm im Plattenphotometer bestimmt. Die Absorptionwerte für die einzelnen Seren wurden in einem Balkendiagramm dargestellt (siehe 4.2)

### **3.6.2. Bestimmung des Antikörpertiters**

Der Titer eines Antikörpers ist die Verdünnung, bei der gerade noch ein Nachweis erfolgen kann. Es wurde also eine Verdünnungsreihe der zuletzt von den vier Mäusen gewonnen Seren erstellt und versucht den enthaltenen Antikörper gegen ADMA in einem Test nachzuweisen. Dazu wurde zuerst eine Mikrotiterplatte wie unter 3.6.1 beschrieben mit ADMA-BSA Konjugat beschichtet, gewaschen und geblockt. In die Wells der so vorbereiteten Platte wurden nun die Verdünnungen (1/1000, 1/2000, 1/5000, 1/8000, 1/10.000, 1/20.000, 1/50.000, 1/80.000, 1/100.000) des Serum in Verdünnungspuffer á 100 µl je Well pipettiert. Nach der Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Platte wie bereits beschrieben gewaschen und je Well 100 µl Sekundärantikörper (1/5000 in Verdünnungspuffer) zugegeben. Es wurde erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Mikrotiterplatte im Anschluss gewaschen. Der Antikörpernachweis erfolgte mit 100 µl TMB-Reagenz je Well für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit 100 µl Schwefelsäure 1 M je Well gestoppt und die Absorption bei 450 nm mit einem Plattenphotometer gemessen. Die Ergebnisse wurden grafisch aufgetragen und der Titer bestimmt (siehe 4.2).

### **3.7. Präparation der Lymphozyten aus der Milz**

Im ersten Schritt wurde den Mäusen durch retrobulbäre Punktion ca. 0,2 ml Blut entnommen. Um die Zellen der Milz zu gewinnen, wurden die vier Mäuse durch cervikale Dislokation getötet. Die toten Mäuse wurden auf dem Rücken liegend mit Präpariernadeln auf einer Styroporplatte fixiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Das Fell wurde mit einer Präparationsschere aufgeschnitten und die Haut stumpf von der darunter liegenden Bauchdecke getrennt. Die Bauchdecke wurde mit einem senkrechten Schnitt entlang der Mittellinie eröffnet. Die im linken Oberbauch liegende Milz wurde vorsichtig mit einer Schere von ihren bindegewebigen Verbindungen abgeschnitten und in eine Zellkulturschale (Ø 10 cm) mit 10 ml DMEM gelegt. Mit einer Spritze wurden vorsichtig 10 ml DMEM durch eine dünne Kanüle (Sterican 0,45 x 12 mM) in die Milz gespritzt und so eine Einzelzellsuspension erhalten. Die Milz wurde „ausgespritzt“. Der zurückbleibende bindegewebige Sack wurde verworfen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 300 g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Zellpellet wurde erneut in 10 ml DMEM aufgenommen und bei 300 g erneut abzentrifugiert. Die vier Zellpellets der vier Mäuse wurden in je 10 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### **3.8. Überprüfung der HAT-Sensitivität der Myelomzellen**

Bevor Myelomzellen für die Fusion mit Lymphozyten verwendet werden, sollte sichergestellt werden, dass ihr Wachstum durch Aminopterin gehemmt werden kann. Dafür wurden  $10^7$  Myelomzellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur abgenommen, abzentrifugiert und in 40 ml Selektionsmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf vier 96-Well-Zellkulturplatten á 100 µl je Well verteilt und im Brutschrank für sieben Tage inkubiert. Nach den sieben Tagen wurden die Zellen mit 100 µl Selektionsmedium je Well gefüttert. Nach 14 Tagen erfolgte die Auswertung unter dem Mikroskop. Die Zellen galten als HAT-sensitiv, wenn in keinem Well nach 14 Tagen ein Zellwachstum zu erkennen war.

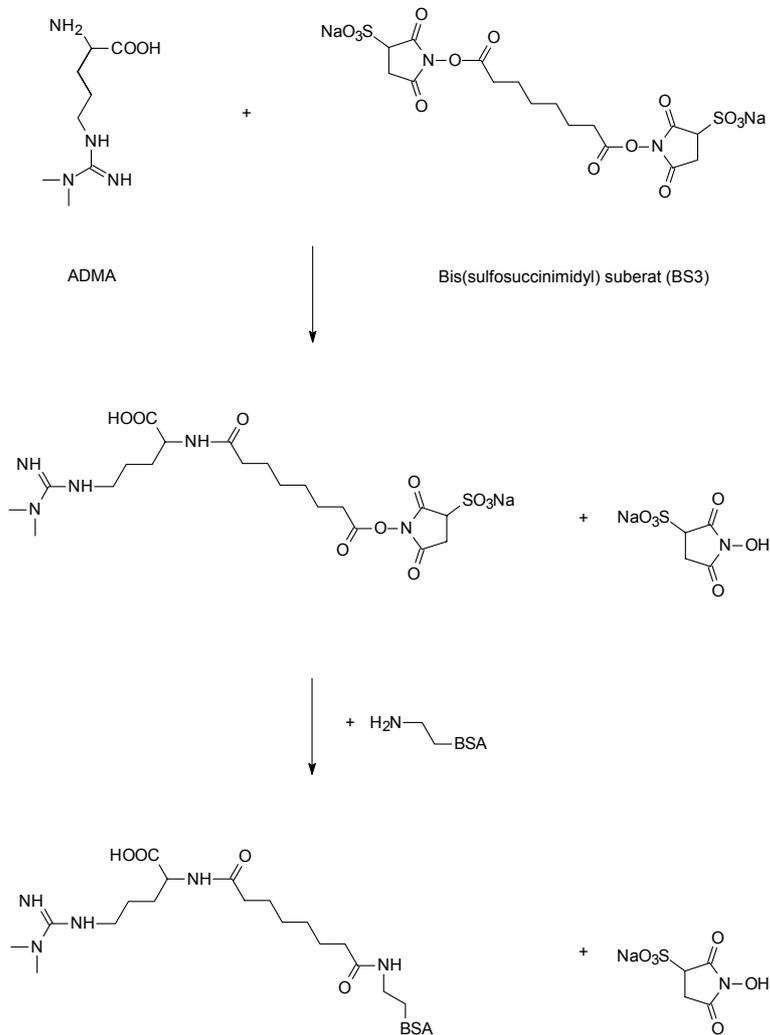
### **3.9. Fusion von Myelomzellen und Lymphozyten**

Im ersten Schritt wurden die zu fusionierenden Lymphozyten aus dem flüssigen Stickstoff genommen und noch kalt in 10 ml Zellkulturmedium suspendiert. Bei 400 g für fünf Minuten in der Zentrifuge wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde erneut in 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und die Lymphozyten mit Trypanblau in der Neubauerkammer gezählt. Zu der Suspension aus Lymphozyten wurde die doppelte Menge an Myelomzellen zugegeben und die Zellen bei 400 g für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt und verworfen. Das gemischte Zellpellet wurde in 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen und es wurden 100 µl PEG-Lösung zugegeben. Die Zellsuspension wurde für 90 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 800 g für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zu dem Zellpellet wurden über einen Zeitraum von einer Minute 1,5 ml PEG-Lösung gegeben und mit der Pipettenspitze das Zellpellet vorsichtig gelockert. Die Zellen wurden für eine Minute bei 37°C inkubiert. Unter leichtem Schütteln wurden dann über 30 Sekunden 1 ml, über weitere 30 Sekunden 3 ml und über weitere 60 Sekunden 16 ml steriler PBS-Lösung zugegeben. Die Zellsuspension wurde im Anschluss für fünf Minuten bei 500 g zentrifugiert und das Zellpellet mit dem Überstand für fünf Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach diesen fünf Minuten erst wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen vorsichtig in 40 ml Selektionsmedium aufgenommen und á 100 µl je Well auf vier 96-Well Zellkulturplatten verteilt. Nach sieben Tagen wurden Zellen mit 100 µl Selektionsmedium je Well gefüttert und nach 14 Tagen wurden die Zellkulturüberstände auf Anwesenheit von Antikörpern gegen ADMA getestet.

### **3.10. Kopplung von ADMA und SDMA an BSA**

Zuerst wurden 10 mg BSA in 2 ml Kopplungspuffer gelöst. Zu der BSA-Lösung wurden dann 84 µl ADMA x HCL Lösung (25 mg/ml) und 6 mg Bis(sulfosuccinimidyl) suberat (BS<sup>3</sup>) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert (siehe Abbildung 15) und die Reaktion dann mit 100 µl Tris-Lösung 1 M gestoppt. Nach dem Stoppen wurde die Lösung für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Gemisch über Nacht gegen PBS dialysiert. Das Dialysat wurde mit PBS auf 12,5 ml aufgefüllt, á 100 µl aliquotiert (~ 80 µg

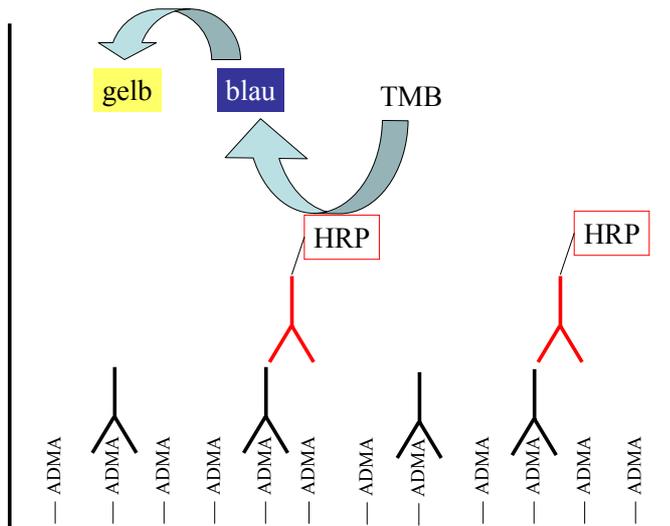
BSA je Aliquot) und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das SDMA-BSA-Konjugat wurde analog hergestellt.



**Abbildung 15** Schematische Darstellung der Kopplung von ADMA an ein Protein mit BS3. ADMA wurde über seine  $\alpha$ -Aminogruppe an die eine Carboxylgruppe des 1,8-Heptan-dicarbonsäure Grundgerüsts als Amid gebunden. Auf die gleiche Weise reagierte die zweite Carboxylgruppe des Grundgerüsts mit einer freien primären Aminogruppe (Lysin) des Trägerproteins.

### **3.11. Test der Zellkulturüberstände auf Antikörper gegen ADMA**

Der Ablauf des Testes lässt sich in mehrere Einzelschritte unterteilen. Zuerst wurden vier ELISA-Platten mit ADMA-BSA-Konjugat beschichtet. Dafür wurde ein Aliquot des ADMA-BSA-Konjugates in 40 ml Beschichtungspuffer gelöst (~ 2 µg Konjugat pro ml) und á 100 µl in die Wells der ELISA-Platten pipettiert. Die Bindung des Konjugates an die Oberfläche der Platten erfolgte über Nacht bei 4 °C. Der nächste Schritt bestand im Waschen der Platten, um nicht gebundenes Konjugat zu entfernen. Dazu wurden die Platten geleert und die Wells mit 200 µl Waschpuffer gefüllt, der ca. 15 Sekunden einwirken konnte. Danach wurden die Platten wieder geleert und auf Zellstoff gründlich ausgeklopft. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Um freie Bindungsstellen auf den ELISA-Platten abzudecken und so eine unspezifische Bindung bei den weiteren Schritten zu verhindern, wurden im dritten Schritt in jedes Well der ELISA-Platte 200 µl Blockpuffer pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich als vierter Schritt wieder ein Waschen der Platten wie oben beschrieben an. Im fünften Schritt wurde in jedes Well einer ELISA-Platte der Zellkulturüberstand der korrespondierenden 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als sechster Schritt wurde erneut wie oben beschrieben gewaschen. Die Detektion von eventuell gebundenem Antikörper aus dem Zellkulturüberstand geschah im siebten Schritt mittels eines HRP-markierten Ziegenantiserums, welches spezifisch an IgG und IgM der Maus bindet (ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L), Peroxidase Conjugated). Das Antiserum wurde in 40 ml Verdünnungspuffer 1:5000 verdünnt und á 100 µl in jedes Well der ELISA-Platten gegeben. Die ELISA-Platten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssiges Antiserum zu entfernen, wurden die ELISA-Platten im achten Schritt nach der Inkubation wie oben beschrieben gewaschen. Um ein auswertbares Signal zu erhalten, wurden in jedes Well im neunten Schritt 100 µl TMB-Lösung pipettiert. Das Tetramethylbenzidin wurde durch die Reaktion der Peroxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem grün-blauen Farbstoff umgesetzt. Die Enzymreaktion wurde nach 20 Minuten durch die Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M gestoppt, wobei die Farbe von grün-blau nach gelb umschlägt. Der gelbe Farbstoff war für eine Stunde stabil. Die Auswertung erfolgte mit einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.



**Abbildung 16** Ablauf des Immunoassays zum Test auf Antikörperproduktion gegen ADMA. Die Wells einer Mikrotiterplatte wurden mit ADMA beschichtet. Der Antikörper aus dem Zellkulturüberstand (schwarz) band an ADMA (oder auch nicht) und wurde mit einem Antikörper, der gegen IgG der Maus gerichtet und HRP gekoppelt war (rot) über eine Farbreaktion nachgewiesen. Dabei wurde Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, der nach Zugabe von  $H_2SO_4$  zu einem stabilen gelben Farbstoff umgewandelt wurde.

### 3.12. Weiterführung positiv getesteter Wells einer Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen

Die Myelomzellen der Maus (X63AG8) wurden in Zellkulturschalen ( $\varnothing$  10 cm) mit 10 ml Zellkulturmedium kultiviert. Gefüttert wurden sie alle zwei Tage, geteilt wurden sie, wenn ca. 75% der Fläche der Schale bewachsen waren.

Wurden bei der Testung von Zellkulturüberständen nach einer Fusion Wells identifiziert, die Antikörper gegen ADMA enthielten, so wurden die Zellen in 500  $\mu$ l Selektionsmedium in eine 24-Well-Zellkulturplatte überführt und nach drei Tagen mit weiteren 500  $\mu$ l Selektionsmedium gefüttert. Wenn die Zellen 75% der Fläche bewachsen hatten, wurden sie in 5 ml Propagiermedium überführt und in 6-Well Platten kultiviert. Aus den 6-Well Platten wurden sie mit Propagiermedium in Zellkulturschalen ( $\varnothing$  10 cm) überführt, wenn sie wieder 75% der Fläche bewachsen hatten. In den Zellkulturschalen ( $\varnothing$  10 cm) wurden die Zellen dann schrittweise in normales Zellkulturmedium überführt, indem portionsweise Propagiermedium durch Zellkulturmedium ersetzt wurde. In diesem Stadium wurden die Zellen in Einfriermedium eingefroren.

### 3.13. Test zur Abschätzung der Kreuzreaktivität

Der Test zur Abschätzung der Kreuzreaktivität wurde durchgeführt, wenn die Zellen 75% der Fläche in den 6-Well-Zellkulturplatten bewachsen hatten. Für den Test wurde aus jeder zu testenden Kultur 1 ml Medium entnommen und im Test eingesetzt. Zunächst wurde die nötige Anzahl an ELISA-Platten mit ADMA-BSA und SDMA-BSA nach folgendem Schema beschichtet:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	ADMA
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	SDMA
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	BSA
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

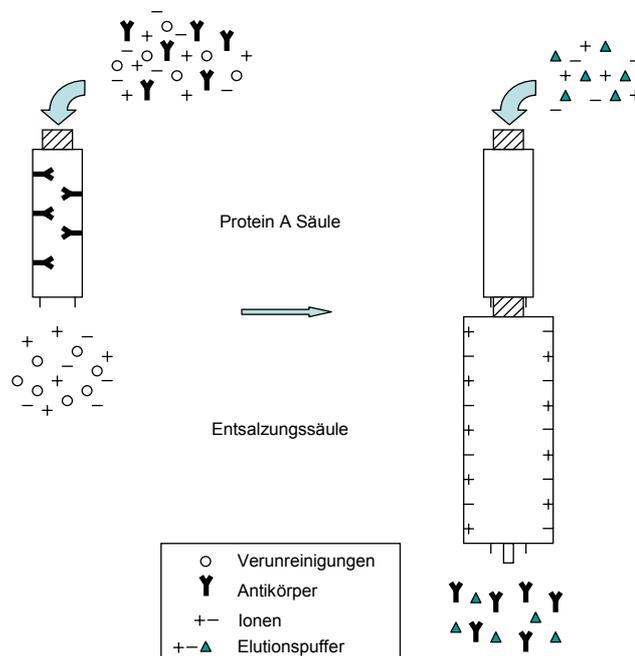
**Abbildung 17** Darstellung der Beschichtung einer Mikrotiterplatte zur Abschätzung der Kreuzreaktivität eines Antikörpers gegen ADMA. Die Zeilen A bis C wurden mit ADMA-BSA, die Zeilen D bis F mit SDMA-BSA und die Zeilen G und H mit BSA beschichtet.

Die ADMA-BSA- und SDMA-BSA-Konjugate wurden wie schon bei dem Test auf Antikörperproduktion beschrieben verdünnt. Das ADMA-BSA-Konjugat wurde á 100 µl in die Wells A1 bis C12 und das SDMA-BSA-Konjugat wurde in die Wells D1 bis F12 pipettiert. Die Beschichtung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Waschschrte erfolgten analog dem Test auf Antikörperproduktion. Der Zellkulturüberstand der zu testenden Kulturen wurde in Spalten á 100 µl je Well in die beschichtete und geblockte ELISA-Platte pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit Sekundäantikörper und die Auswertung erfolgte analog dem Test auf Antikörperproduktion.

### 3.14. Isolierung der anti-ADMA Antikörper aus Zellkulturüberstand

Die Isolierung von anti-ADMA-Antikörpern erfolgte aus Zellkulturüberstand. Dafür wurde der Zellklon, dessen Antikörper isoliert werden sollte, aufgetaut und in Zellkulturmedium in einer Kulturschale (Ø 10 cm) in Kultur gebracht. Wenn die Kulturschale zu 75% dicht gewachsen war, wurden die Zellen 1/10 geteilt. Ein Zehntel wurde in 100 ml serumfreies Medium in eine Zellkulturflasche 175 cm<sup>2</sup> ausgesät und neun Zehntel wurden in normalem

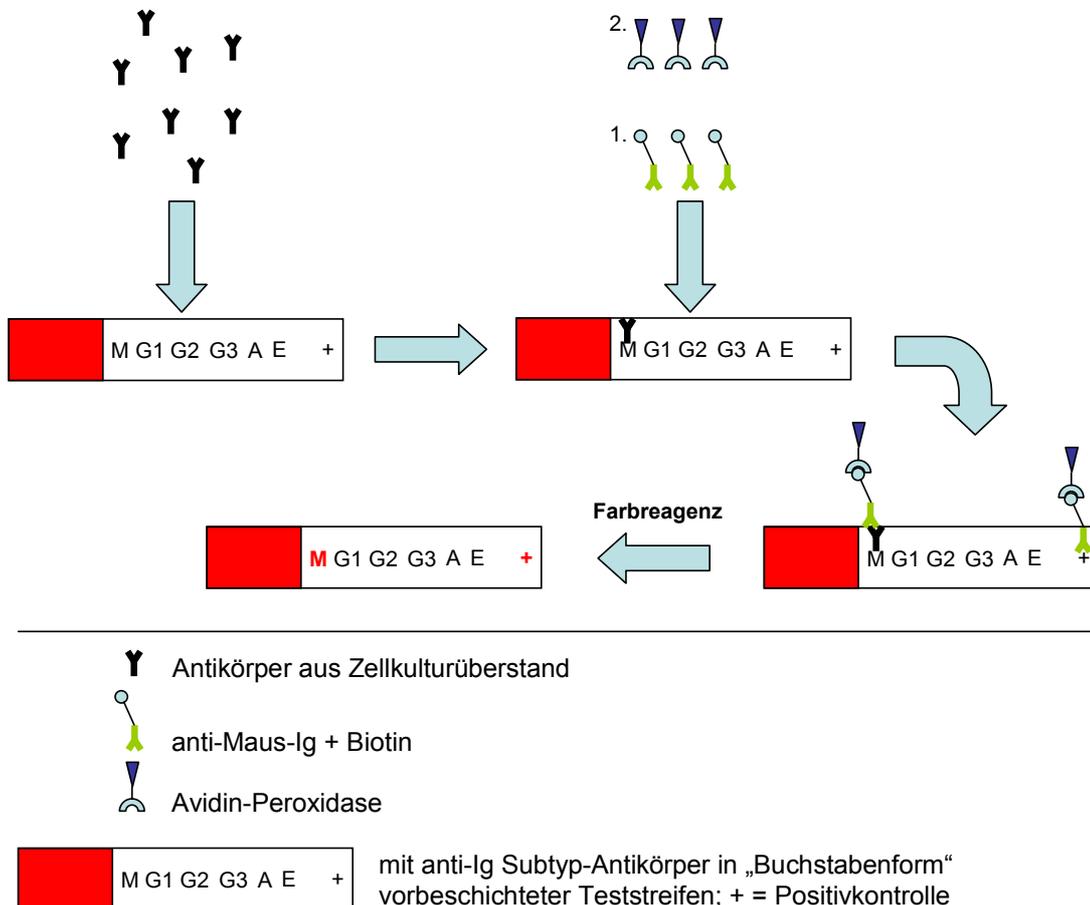
Zellkulturmedium weiter kultiviert und dann eingefroren. Die Zellen in dem serumfreien Medium wurden kultiviert, bis 90% aller Zellen abgestorben waren. Der Überstand wurde durch Zentrifugieren bei 1000 g gewonnen. Der Antikörper wurde aus dem Überstand mittels Protein-A-Agarose durch Säulenchromatographie isoliert. Es wurde ein Komplett-Kit der Firma Sigma verwendet. Zuerst wurde die Entsalzungssäule mit 10 ml HEPES-Puffer bei einem Fluss von 1 ml/min regeneriert. Das Gleiche geschah mit der Protein A Säule und 5 ml Regenerationspuffer. Danach wurde die Protein A-Säule mit 4 ml Bindungspuffer bei einem Fluss von 1 ml/min equilibriert. Die 100 ml Zellkulturüberstand wurden mit 10 ml Bindungspuffer gut gemischt und dann bei einem Fluss von 0,5 ml/min mit Hilfe einer Infusionspumpe über die Protein A-Säule gegeben. Ungebundene Proteine und andere Verunreinigungen wurden im Anschluss mit 6 ml Bindungspuffer bei einem Fluss von 1 ml/min von der Säule gewaschen. Die Elution der auf der Säule gebundenen Antikörper erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer bei einem Fluss von 0,5 ml/min direkt auf die dahinter geschaltete und bereits regenerierte Entsalzungssäule. Der Antikörper wurde also direkt in einem physiologischen Puffer aufgefangen. Mit dem so gewonnenen Antikörper wurde im Anschluss versucht, einen ELISA nach 3.18 durchzuführen.



**Abbildung 18** Isolierung eines Antikörpers, der in Zellkulturmedium vorliegt. Der durch Bestandteile des Zellkulturmediums verunreinigte Antikörper wurde in der ersten Säule an Protein A gebunden. Die Verunreinigungen liefen durch und nach dem Spülen der Säule wurde der Antikörper mit erhöhten Salzkonzentrationen eluiert. Nach der Elution wurde die erhöhte Salzkonzentration durch eine nachgeschaltete Entsalzungssäule wieder entfernt und der Antikörper lag anschließend im Aufbewahrungspuffer vor.

### 3.15. Bestimmung des Antikörpersubtyps

Die Bestimmung des Antikörpersubtyps wurde mit einem Komplet-Kit der Firma Sigma durchgeführt. Basis des Kit ist eine Nitrocellulosemembran (Teststreifen), an die Antikörper gegen die verschiedenen Subtypen der Immunglobuline der Maus streifenförmig gebunden sind (siehe Abbildung 19). Der Zellkulturüberstand der zu testenden Zellen wurde auf den Teststreifen gegeben und die anti-Ig-Antikörper auf dem Teststreifen fingen den Antikörper aus dem Zellkulturüberstand je nach Subtyp ab. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte über einen anti-Maus-Ig-Antikörper, an den Biotin gekoppelt war. Das Biotin wurde über einen Avidin-Peroxidase-Komplex und 3-Amino-9-ethylcarbazol als Farbstoff nachgewiesen.



**Abbildung 19** Schematische Darstellung des Ablaufs der Subtypenbestimmung eines Antikörpers. Ein mit anti-Subtyp-mAb beschichteter Teststreifen wurde mit dem zu untersuchenden Antikörper beschichtet und band diesen. Der gebundene Antikörper wurde mit einem Sekundärantikörper über eine Farbreaktion detektiert. Der Subtyp des zu untersuchenden Antikörpers konnte dann von den Teststreifen abgelesen werden.

### 3.16. Standardvorschrift für einen kompetitiven ADMA-ELISA

Falls nicht anders beschrieben, wurden 96-Well-Mikrotiterplatten verwendet und die Inkubationen wurden bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bei einer Frequenz von  $400 \text{ min}^{-1}$  durchgeführt.

- Beschichtung:** Eine Mikrotiterplatte wurde zuerst mit ADMA-BSA-Konjugat beschichtet (siehe 3.10). Dazu wurde das Konjugat zu einer Endkonzentration von  $40 \mu\text{g/ml}$  mit Beschichtungspuffer verdünnt. Diese Verdünnung wurde á  $100 \mu\text{l}$  in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und diese für eine Stunde inkubiert.
- Waschen:** Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden ausgeleert und dreimal mit  $200 \mu\text{l}$  Waschpuffer je Vertiefung gewaschen.
- Blocken:** In jede Vertiefung wurden  $200 \mu\text{l}$  Blockpuffer gegeben und für 15 Minuten inkubiert.
- Waschen:** s.o.
- Acylierung:**  $400 \mu\text{l}$  des in Aqua bidest. gelösten ADMA wurden mit  $50 \mu\text{l}$  einer  $10 \text{ mM}$  L-Lysin-Lösung und  $50 \mu\text{l}$  einer frisch hergestellten  $10 \text{ mM}$  EDC-Lösung versetzt und für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Danach wurden  $25 \mu\text{l}$  einer  $1 \text{ M}$  Tris-Lösung zugegeben und für weitere 30 Minuten geschüttelt.
- Inkubation:**  $50 \mu\text{l}$  der acylierten Probe (Standard) und  $50 \mu\text{l}$  Antikörper (verdünnt mit Verdünnungspuffer) wurden in eine Vertiefungen pipettiert und für eine Stunde inkubiert.
- Waschen:** s.o.
- Konjugat:** Nach dem Waschen wurde in jede Vertiefung  $100 \mu\text{l}$  einer  $1/2000$  Verdünnung des anti-Maus IgG-Antiserum in Verdünnungspuffer gegeben und für eine Stunde inkubiert.
- Waschen:** s.o.
- Reagenz:** Zur Entwicklung wurden in jede Vertiefung  $100 \mu\text{l}$  TMB-Reagenz gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit  $100 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ M}$  gestoppt.
- Lesen:** Nach dem Stoppen der Reaktion wurde die optische Dichte (OD) der einzelnen Vertiefungen im Mikrotiterplattenleser bei  $450 \text{ nm}$  und einer Referenz-Wellenlänge von  $620 \text{ nm}$  bestimmt.

### 3.17. Bestimmung einer geeigneten Verdünnung des Antikörpers 142D6-4E8

Um eine geeignete Verdünnung für eine Verwendung des Antikörpers 142D6-4E8 zu ermitteln, wurden zunächst von dem Zellkulturüberstand Verdünnungen mit Verdünnungspuffer für Antikörper hergestellt. Die Verdünnungen 1/20, 1/30, 1/40, 1/80, 1/100 und 1/1000 wurden dann in einem ELISA nach 3.16 eingesetzt. Die gemessene Absorption wurde graphisch gegen die ADMA-Konzentration aufgetragen.

### 3.18. Erstellung einer Standardkurve

Unter Verwendung der Antikörperverdünnung, die nach 3.17 mit dem Nullwert am nächsten an eine OD von 2,0 herankam, wurde eine Standardkurve für den Antikörper 142D6-4E8 erstellt. Dazu wurde ein ELISA nach 3.16 mit den ADMA-Konzentrationen 0; 0,1; 1,0; 10; 100; 1000; 10000  $\mu\text{mol/l}$  in Aqua bidest. durchgeführt. Die gemessene OD wurde graphisch gegen die ADMA-Konzentration aufgetragen.

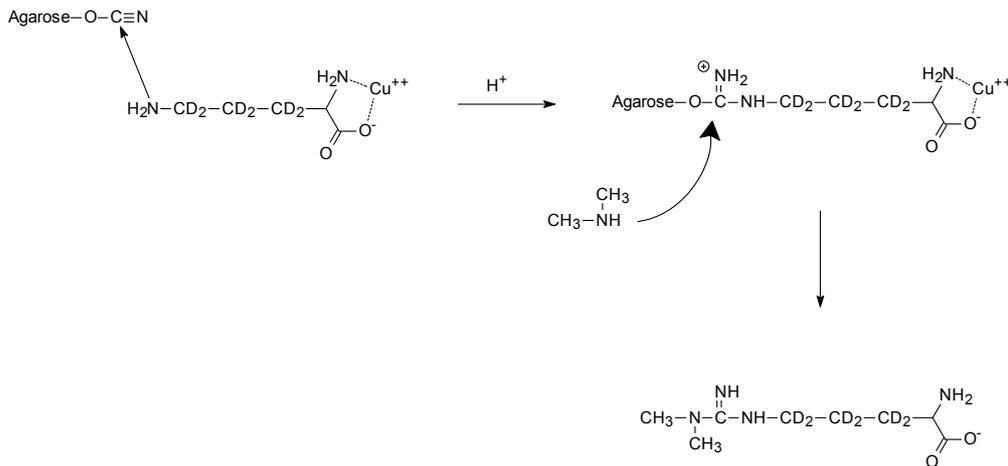
### 3.19. Bestimmung der Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität für einen Antikörper wurde bestimmt, indem mit dem Antikörper eine Standardkurve nach 3.18 für ADMA, L-Arginin und SDMA ermittelt wurde. Zur Darstellung der Kurven wurden zunächst die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen gegen die Absorption aufgetragen. Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde eine zweite graphische Darstellung gewählt. Der Testmittelpunkt lässt sich einfach bestimmen, wenn man die Konzentrationen der einzelnen Substanzen nicht gegen die Absorption, sondern gegen die prozentuale Absorption berechnet auf die maximale Absorption (Nullwert) aufgetragen ( $\%B/B_0$ ) hat. Bei dieser Form der Darstellung ließ sich der Testmittelpunkt bestimmen, in dem die Konzentration abgelesen wurde, die einem  $\%B/B_0$ -Wert von 50% entspricht. Die Kreuzreaktivität berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Kreuzreaktivität [\%]} = \frac{C_{50\%(\text{Testsubstanz})}}{C_{50\%(\text{Referenz})}} * 100 \quad (\text{siehe Abbildung 21}).$$

### 3.20. **Synthese von N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]Dimethylarginin ([<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]ADMA)**

Für die quantitative Bestimmung von ADMA mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) war es nötig, isotopenmarkiertes ADMA als internen Standard herzustellen. 0,4 g Cyanogenbromid-aktivierte Agarose (BrCN-Agarose) wurde, um Stabilisatoren zu entfernen, in 10 ml HCl 1 mM suspendiert und für 30 Minuten unter gelegentlichem Umschütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die BrCN-Agarose abfiltriert und mit reichlich 1 mM HCl und Wasser gewaschen. Parallel dazu wurde ein Kupfer-L-Ornithin-Komplex hergestellt. Dazu wurden 0,125 g [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]L-Ornithin x HCl in 1,25 ml Aqua bidest. gelöst. Zu der Lösung wurde eine Spatelspitze CuCO<sub>3</sub> (q.s.) gegeben und die Blaufärbung der Lösung abgewartet (~ 5 Minuten, Komplexbildung). Überschüssiges CuCO<sub>3</sub> wurde abfiltriert und die erhaltene Lösung mit KOH 10 N auf einen pH von 10 eingestellt. Die BrCN-Agarose wurde in die Kupfer-L-Ornithin Lösung gegeben und der Reaktionsansatz bei 4 °C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde der Reaktionsansatz filtriert und die BrCN-Agarose, an welche nun der Kupfer-L-Ornithin-Komplex gebunden war, mit 1 M HCl gewaschen, um das Kupfer von dem L-Ornithin zu entfernen. Danach wurde die BrCN-Agarose mit reichlich Aqua bidest. gewaschen. Die so erhaltene L-Ornithin-Agarose wurde nun in 1,2 ml einer 20%igen Dimethylaminlösung für 24 Stunden bei 50°C geschüttelt. Nach Ende der Reaktion wurde der Ansatz filtriert und mit zwei mal 5 ml Aqua bidest. gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und in der SpeedVac zur Trockne eingeeengt, Der Rückstand wurde erneut mit Dimethylamin, wie oben beschrieben umgesetzt. Die Rückstände der eingeeengten Lösungen wurden zusammen in 500 µl Aqua bidest. aufgenommen und erneut zur Trockne eingeeengt, um das Dimethylamin restlos zu entfernen. Der Rückstand wurde in 400 µl Aqua bidest. aufgenommen und der Gehalt an [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]ADMA mittels GC-MS unter Verwendung von ADMA als internem Standard bestimmt.



**Abbildung 20** Schematische Darstellung der Synthese von  $[^2\text{H}_6]\text{ADMA}$ .  $[^2\text{H}_6]\text{Ornithin}$  wurde im ersten Schritt mit BrCN-Agarose umgesetzt, wobei das  $\omega$ -N des  $[^2\text{H}_6]\text{Ornithin}$  mit Cyanogruppe der BrCN-Agarose unter Bildung eines Isoharnstoffderivates reagierte. Dieses Isoharnstoffderivat wurde mit Dimethylamin zu  $[^2\text{H}_6]\text{ADMA}$  umgesetzt.

### 3.21. Quantifizierung des deuterierten ADMA mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Menge an  $[^2\text{H}_6]\text{ADMA}$  die bei der Synthese erhalten wurde, wurde mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie bestimmt. Dazu wurde zuerst eine ungefähre Bestimmung der Konzentration der nach 3.20 erhaltenen Lösung mittels HPLC nach 3.4 durchgeführt. Ein Aliquot der  $[^2\text{H}_6]\text{ADMA}$ -Lösung wurde zu einer Konzentration von ca. 20  $\mu\text{M}$  mit Aqua bidest. verdünnt. 5  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden mit 0; 2,5; 5; 10 und 20  $\mu\text{l}$  einer 20,0  $\mu\text{M}$  ADMA-Lösung (interner Standard) versetzt, in der SpeedVac zur Trockne eingengt und in 100  $\mu\text{l}$  2 M methanolischer Salzsäure aufgenommen. Der Ansatz wurde gut gevortext und nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile in Autosamplergefäße überführt.

Zur Messung von Zellkulturüberständen wurden die Proben zunächst analog der HPLC-Methode mit Hilfe der CBA-Kartuschen aufgereinigt (siehe 3.4). Es wurden 500  $\mu\text{l}$  Zellkulturüberstand unter dem Zusatz des selbst synthetisierten und quantifizierten Standards, dem  $[^2\text{H}_6]\text{ADMA}$ , verwendet. Das aus der Aufreinigung erhaltene ameisensaure Eluat wurde ebenfalls in der SpeedVac zur Trockne eingengt und in 100  $\mu\text{l}$  2M methanolischer Salzsäure aufgenommen, gut gevortext und nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile in Autosamplergefäße überführt.

Plasmaproben (50 µl) erforderten dagegen keine Vorbehandlung der Proben 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 2M methanolischer HCl versetzt, 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 einer weiteren Derivatisierung zu schützen. Im weiteren Verlauf der Aufarbeitung wurden die Proben unter Stickstoff zur Trockne eingengt und mit Pentafluoropropionsäureanhydrid (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 min zentrifugiert. Die Toluolphase wurde anschließend in Autosamplergefäße mit 0,3 ml Mikroeinsätzen überführt.

Die GC-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 mit einer Filmdicke von 0,25 µM. Mit folgendem Temperaturprogramm wurde die Kapillarsäule erwärmt: 2 min bei 80°C, Erhöhung der Temperatur auf 300°C mit 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 am Elektronen-Multiplier angelegt. Im SIM (single ion monitoring)-Modus wurden die Zielionen m/z 634,3 und m/z 640,3 für ADMA bzw. [2H6]ADMA bestimmt.

## 3.22. Entwicklung eines polyklonalen ADMA-Antiserum und eines Immunoassay daraus

In Zusammenarbeit mit der Firma DLD Diagnostika GmbH, Adlerhorst 15, Hamburg wurde ein Antiserum gegen ADMA und ein ELISA zur Bestimmung von ADMA entwickelt. Bei der Firma DLD wurden Kaninchen mit einem ADMA-Proteinkonjugat immunisiert und das Serum der Tiere gewonnen. Aus dem Antiserum wurde ein ELISA zur kommerziellen Verwertung entwickelt.

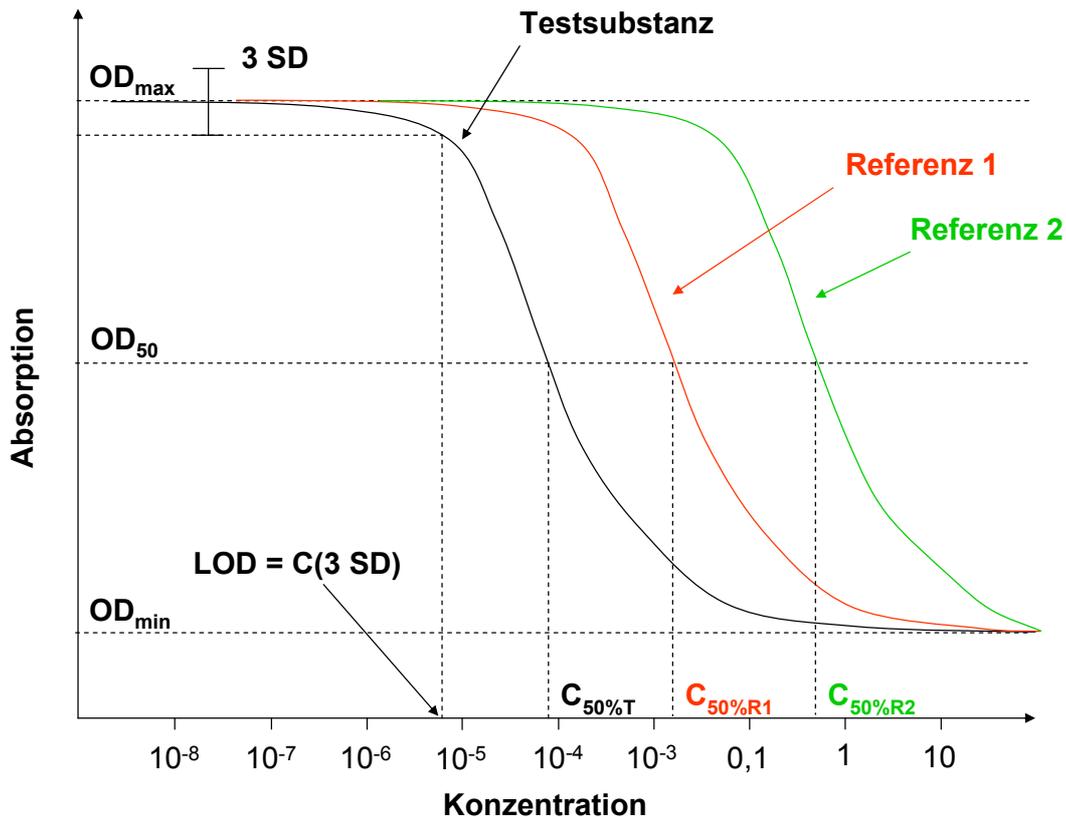
Der ELISA wird in zwei Schritten durchgeführt. Der erste Schritt besteht in einer Probenvorbereitung, bei der die Standards und die zu messenden Proben acyliert werden. Die Vorbehandelten Proben werden dann in einem kompetitiven ELISA eingesetzt.

Von diesem ELISA wurden die Kreuzreaktivität, die Sensitivität, die Präzision und die Richtigkeit bestimmt. Des Weiteren wurde der ELISA mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Flüssigkeitschromatographie-tandem Massenspektrometrie (LC-tandem MS) verglichen.

### 3.22.1. Bestimmung der Kreuzreaktivität

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde zuerst eine Standardkurve für ADMA gemessen. Dann wurden für die Substanzen SDMA, L-NMMA und L-Arginin ebenfalls „Standardkurven“ mit den gleichen Konzentrationen wie bei ADMA aufgenommen. Von jeder Kurve wurde der Testmittelpunkt  $C_{50\%}$  bestimmt, in dem die Konzentration bestimmt wurde, bei der die OD erreicht war, die genau zwischen der maximalen und der minimalen OD liegt. Die Kreuzreaktivität errechnet sich nach der Formel:

$$\text{Kreuzreaktivität [\%]} = \frac{C_{50\%(\text{Testsubstanz})}}{C_{50\%(\text{Referenz})}} * 100 \text{ (siehe Abbildung 21).}$$



**Abbildung 21** Darstellung der Assayparameter. Dargestellt ist die typisch Standardkurve eines ELISA für die Testsubstanz und zwei Referenzsubstanzen zur Berechnung deren Kreuzreaktivität. Die Kreuzreaktivität errechnet sich aus dem Verhältnis der Testmittelpunkte ( $C_{50\%}$ ) der Referenzsubstanzen zur Testsubstanz. LOD = limit of detection

### 3.22.2. Bestimmung der Sensitivität

Die Sensitivität wurde durch Bestimmung des „limit of detection“ (LOD) ermittelt. Dazu wurde die Konzentration ermittelt, die der Absorption von drei Standardabweichungen unter der Absorption des Nullstandards liegt (siehe Abbildung 21).

### 3.22.3. Bestimmung der Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurden die Intraassayvariabilität und die Interassayvariabilität bestimmt.

Die Intraassayvariabilität wurde bestimmt, indem zwei humane Serumproben je 36 mal in einem Assay eingesetzt wurden. Die niedrigere Probe hatte eine ADMA-Konzentration von  $0.81 \mu\text{mol/l}$  und die höhere eine ADMA-Konzentration von  $1.76 \mu\text{mol/l}$ .

Die Interassayvariabilität wurde bestimmt, indem vier humane Serumproben an zwei aufeinander folgenden Tagen je 28 mal in einem Assay gemessen wurden. Die Proben hatten ADMA-Konzentrationen von 0.63  $\mu\text{mol/l}$ , 1.01  $\mu\text{mol/l}$ , 1.38  $\mu\text{mol/l}$  und 2.26  $\mu\text{mol/l}$ .

### **3.22.4. Bestimmung der Richtigkeit**

Zuerst wurde die Wiederfindung für humane Serumproben bestimmt. Dazu wurde in einer Probe die ADMA-Konzentration bestimmt und zu dieser Probe steigende Mengen ADMA zugegeben (siehe Tabelle 7). Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen und die erhaltenen Werte mit den theoretisch ermittelten verglichen. Es wurde die prozentuale Wiederfindung berechnet.

Das Gleiche wurde für das Plasma von Mäusen (siehe Tabelle 8) und Ratten (siehe Tabelle 9) durchgeführt.

Als zweites wurde eine Verdünnungsreihe für eine mit ADMA versetzte Serumprobe von Mensch (siehe Tabelle 10), Maus (siehe Tabelle 11) und Ratte (siehe Tabelle 12) hergestellt und in Doppelbestimmung gemessen. Auch hier wurde die prozentuale Wiederfindung im Vergleich zu der theoretisch berechneten Konzentration berechnet.

### **3.22.5. Vergleich verschiedener Methoden**

Der ELISA wurde mit zwei anderen Methoden verglichen. Zum einen wurden 29 humane Serumproben mit dem ELISA und mit LC-tandem MS gemessen. Die Messungen mit LC-tandem MS wurden im Auftrag bei Medizinisches Labor Bremen; Haferwende 12; D-28357 Bremen durchgeführt. Diese Firma bietet kommerziell klinische Laboruntersuchungen an, die auch außerhalb der üblichen Parameter liegen. Die mit den beiden Methoden erhaltenen Messwerte wurden mit Hilfe linearer Regression verglichen. Alle Berechnungen wurden mit dem Programm Microcal Origin™; Microcal Software; Northampton; MA USA durchgeführt.

Zum anderen wurden die ADMA-Konzentrationen in 15 Zellkulturüberstände (DMEM + 5% FCS) aus laufenden Versuchen mit „human coronary arterial endothelial cells“ (HCAEC) sowohl mit ELISA als auch mit GC-MS gemessen (siehe 3.21). Der Vergleich der beiden Methoden erfolgte über die Mittelwerte, die mit den beiden Methoden erhalten wurden, mittels t-Test.

### **3.23. Verwendung des polyklonalen ELISA zur Messung von ADMA-Konzentrationen bei Patienten im Rahmen einer klinischen Studie**

Im Rahmen einer klinischen Studie wurden die ADMA-Konzentrationen bei 213 Patienten mit akutem Myokardinfarkt mittels des polyklonalen ELISA bestimmt. Die Patienten erhielten nach ihrem akutem Myokardinfarkt randomisiert Captopril (n = 108) oder Losartan (n = 105) während eines Follow-up von drei Jahren. Die Blutproben wurden zum ersten mal nach dem Myokardinfarkt (Median drei Tage nach Infarkt) und ein Jahr später genommen. Endpunkte der Studie waren Tod, erneuter akuter Myokardinfarkt, Schlaganfall und Reanimation.

Zur Auswertung der Studie wurden alle Patienten zusammen ihrer ADMA-Konzentration entsprechend, zu Beginn der Studie, in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe bildeten die Patienten deren ADMA-Konzentration unter dem Median lag, die andere Gruppe bildeten diejenigen deren ADMA-Konzentration über dem Median lag.

In einer multivariaten Risikoanalyse wurde untersucht, ob zwischen den beiden Gruppen Unterschiede im Erreichen eines der Endpunkte bestand und ob eine eventuelle Risikoerhöhung unabhängig von anderen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse (Alter, Geschlecht, Diabetes, Hypercholesterinämie, Blutdruck, Raucher, BNP und CRP) war. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Computerprogramms SPSS 11.0 durchgeführt. Des weiteren wurde untersucht, ob sich die ADMA-Konzentrationen in den einzelnen Gruppen im Laufe des Follow-up ändern.

## 4. Ergebnisse

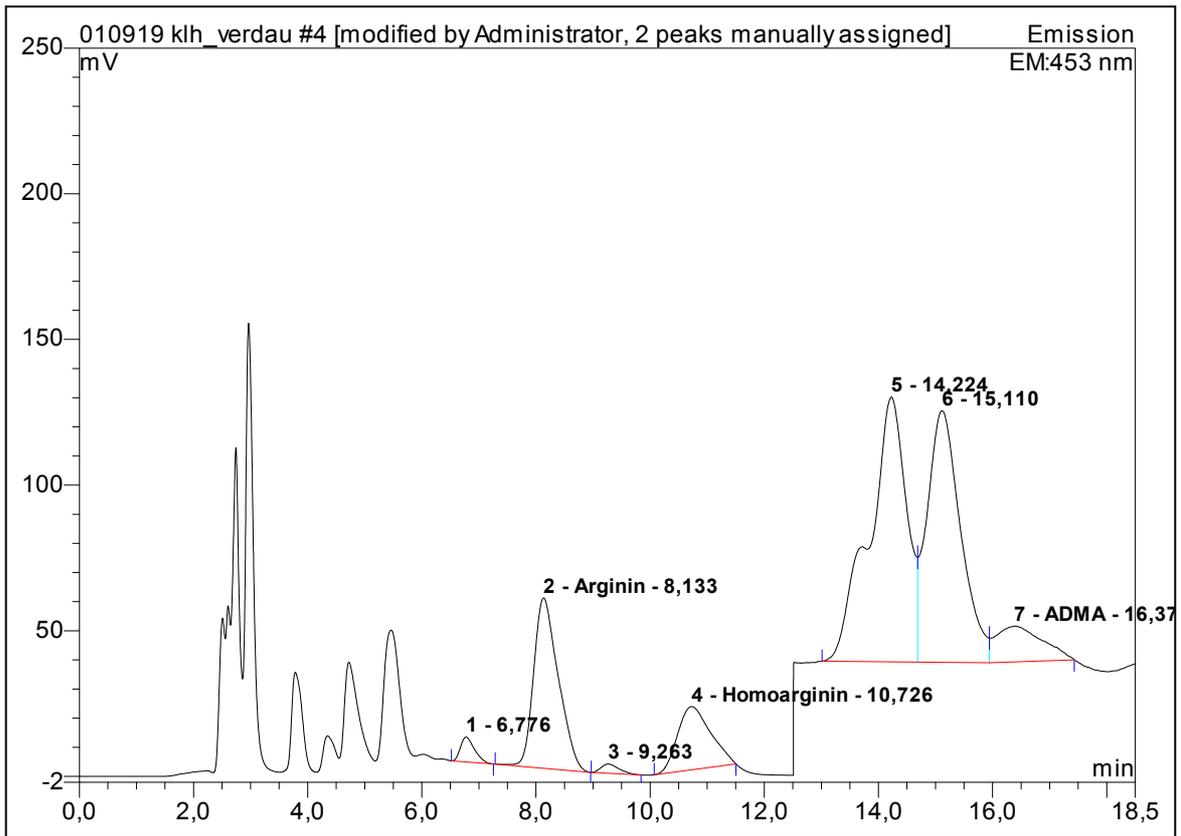
### 4.1. Herstellung des Immunogens

Um bei einem Säugetier eine Immunantwort gegen eine Substanz wie N,N-Dimethyl-L-Arginin mit einer relativen Molmasse von 202 g/mol (Hapten) zu erreichen, muss die Substanz an ein größeres Trägerprotein (Carrier) gekoppelt werden, da Substanzen mit einer relativen Molmasse unter 1000 g/mol in der Regel nicht in der Lage sind, immunogen zu wirken. Wir hatten uns für das KLH entschieden und das ADMA nach der oben beschriebenen Methode gekoppelt (siehe 3.1).

Um zu untersuchen, wie viel ADMA erfolgreich gekoppelt wurde, wurden 50 µg Konjugat einem Verdau mit Salzsäure unterzogen (siehe 3.3). 100 µl des Verdau wurden einer Festfasenextraktion (SPE) unterzogen und mit Hilfe der HPLC gemessen (siehe 3.4). Das Ergebnis ist in Abbildung 22 zu sehen. Das exakte Verhältnis von KLH zu gebundenem ADMA ist nicht ganz einfach zu quantifizieren, da das KLH zum einen nicht zur Gänze untersucht ist und es zum anderen in unterschiedlichen Zusammensetzungen vorkommt. Um eine Berechnung durchzuführen, wurde die Molmasse des KLH mit 450 KD angenommen, womit das errechnete Verhältnis von KLH zu gebundenem ADMA als eine Art „Mindestverhältnis“ anzusehen ist. Unter diesen Voraussetzungen wurde das Verhältnis mit 40,5 mol ADMA je 1 mol KLH berechnet.

Um die Vollständigkeit der Hydrolyse zu untersuchen, wurde der Verdau auch mit Serumalbumin vom Rind (BSA) durchgeführt und die erhaltene Menge an L-Arginin mittels HPLC bestimmt. Rinderalbumin wurde deshalb verwendet, da es als definiertes Monomer vorliegt und sein Gehalt an L-Arginin genau bekannt ist (25 mol L-Arginin je 1 mol BSA). Es konnte exakt das bekannte Ergebnis reproduziert werden. Die Übertragbarkeit dieses Ergebnisses wurde als gegeben angenommen, da 6 N Salzsäure in beiden Proteinen die gleiche Degradation bewirken sollte. Eine eventuell unterschiedliche Empfindlichkeit von ADMA und L-Arginin gegenüber der Salzsäure wurde vernachlässigt.

## Ergebnisse



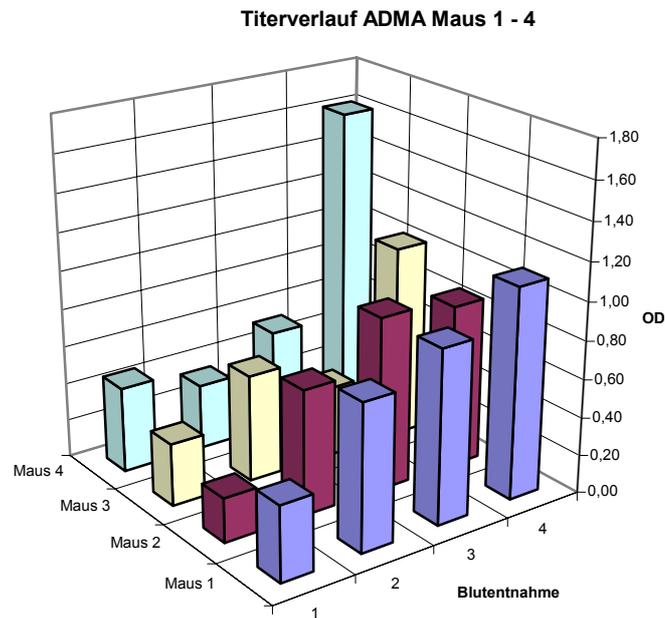
**Abbildung 22** HPLC-Chromatogramm der ADMA-KLH-Hydrolyse

**Tabelle 3** Peak-Tabelle zum HPLC-Chromatogramm der ADMA-KLH-Hydrolyse

No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mV	Area mV*min	Rel.Area %	Amount µmol/l	Type
1	6,78	n.a.	8,555	2,433	1,30	n.a.	BMB
2	8,13	Arginin	58,456	29,294	15,64	155,366	BMB
3	9,26	n.a.	3,169	1,160	0,62	n.a.	BMB
4	10,73	Homoarginin	21,712	14,498	7,74	12,500	BMB
5	14,22	n.a.	90,861	69,208	36,96	n.a.	BM *^
6	15,11	n.a.	86,310	59,110	31,57	n.a.	M *^
7	16,38	ADMA	12,304	11,552	6,17	2,993	MB*
Total:			281,367	187,256	100,00	170,859	

## 4.2. Immunisierung

Die Immunisierung der vier Mäuse erfolgte mit dem zuvor hergestellten ADMA-KLH-Konjugat (siehe 3.1 und 4.1). Der Erfolg der Immunisierung wurde überprüft, indem das Blut, welches den Mäusen in regelmäßigen Abständen abgenommen wurde (Blutprobe 1 bis 4 bei je vier Mäusen), in einem einfachen Test auf die Veränderung der Antikörpermenge im Vergleich zur vorhergehenden Blutabnahme kontrolliert wurde (siehe 3.6.1). Das Ergebnis wurde in einem Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 23). Es ist der typische Verlauf der Immunantwort bei den vier Tieren zu erkennen. Bei Maus 1 sieht man eine kontinuierliche Zunahme der Menge an Antikörper im Serum. Bei Maus 2 nimmt die Menge an Antikörper ebenfalls zu, erreicht aber nicht ganz die Menge wie bei der ersten Maus. Bei Maus 3 und Maus 4 ist ein Phänomen zu beobachten, welches nicht selten ist. Die Antikörperkonzentration im Serum nimmt im Verlauf der Immunisierung zwischenzeitlich wieder ab. Dies ist damit zu erklären, dass die Menge an Antikörper im Serum Wellenförmig zunimmt, da die Antikörperproduktion des immunisierten Tieres nach einem Maximum kurz nach der Injektion wieder abfällt.



**Abbildung 23** Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der anti-ADMA-Antikörpermenge im Serum der vier immunisierten Mäuse.

Aus dem Serum der letzten Blutentnahme wurde eine Titerbestimmung durchgeführt (siehe 3.6.2). Dafür wurde diejenige Verdünnung bestimmt, bei der gerade noch ein Nachweis

des Antikörpers geführt werden konnte. Das Serum wurde in verschiedenen Stufen verdünnt und die enthaltenen anti-ADMA-Antikörper wie oben beschrieben nachgewiesen. Bei der graphischen Darstellung ergab sich das Bild, wie es in Abbildung 24 zu sehen ist. Mit zunehmender Verdünnung des Serum nahm die Menge der an die Mikrotiterplatte gebundenen Antikörper linear ab, bis ein Plateau erreicht wurde. Als Titer wurde die Verdünnung berechnet, deren Absorption um drei Standardabweichungen über der Absorption der höchsten Verdünnung lag. Es wurden folgende Titer bestimmt: Maus 1: 1/88214, Maus 2: 1/38240, Maus 3: 1/45708 und Maus 4: 1/79910.

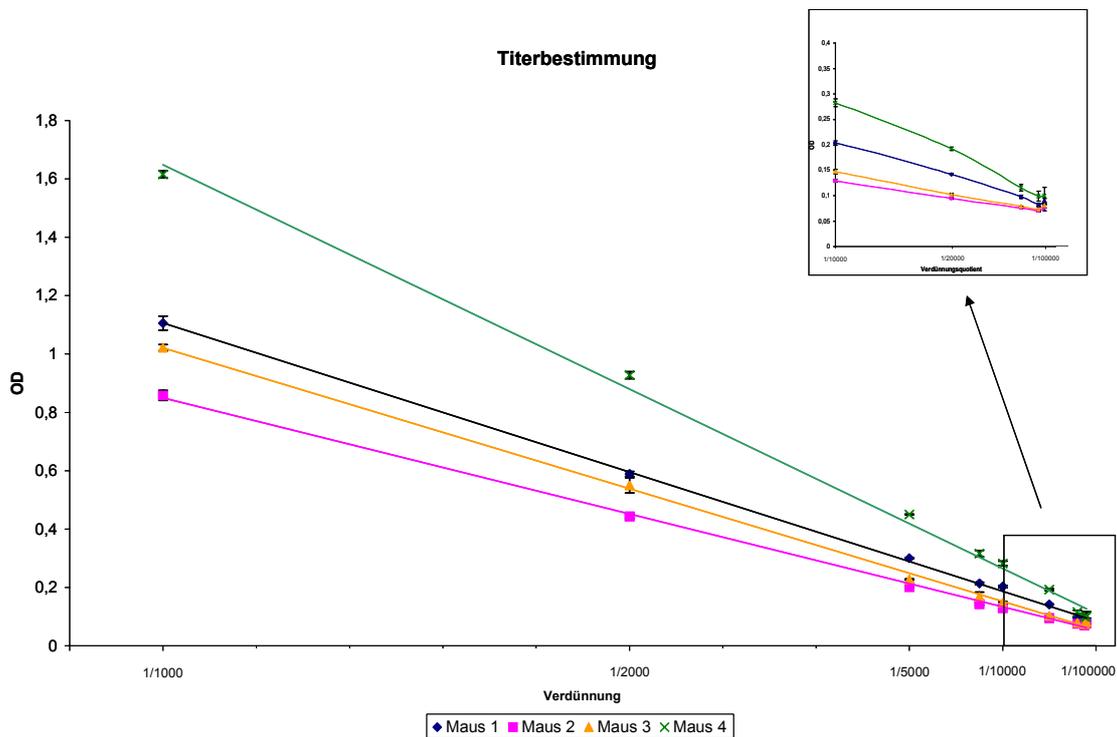


Abbildung 24 Verdünnungsreihe (Titer) der vier Seren der letzten Blutentnahme.

### 4.3. Fusion

B-Lymphozyten lassen sich als Primärzellen praktisch nicht in Zellkultur halten. Sie sterben selbst bei optimalen Kulturbedingungen innerhalb von 14 Tagen ab. Um nun Zellen zu erhalten, die sich unter Zellkulturbedingungen teilen und Antikörper produzieren, müssen die primären B-Lympho-

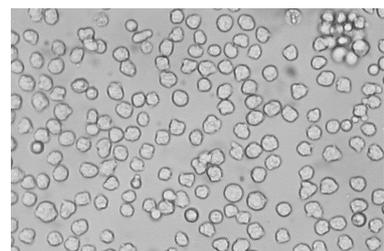


Abbildung 25 X63Ag8

zyten aus der Milz der immunisierten Mäuse „unsterblich“ gemacht werden. Dazu wurden die B-Lymphozyten der Maus 4 nach erfolgter Immunisierung (siehe 3.5) und Überprüfung des Immunisierungserfolges (siehe 3.6 und 0) nach Töten der Maus durch cervicale Dislokation aus deren Milz präpariert (siehe 3.7). Um vermehrungsfähige Zellen zu erhalten, die in der Lage waren, Antikörper zu produzieren, wurden nun die B-Lymphozyten mit Myelomzellen (Abbildung 25) der Linie P3X63Ag8.653 (X63AG8) fusioniert (siehe 3.9). Die frisch fusionierten Hybridzellen (Hybridome) (Abbildung 26) wurden in Selektionsmedium auf vier 96-Well-Zellkulturplatten verteilt und für 14 Tage wachsen gelassen. In den Wells wuchsen zwischen null und fünf Hybridome zu kleinen Kolonien (Abbildung 27). Nach 14 Tagen wurden die Zellkulturüberstände der einzelnen Wells auf Antikörperproduktion gegen ADMA getestet. Um die verschiedenen Hybridome unterscheiden zu können, wurden sie nach folgendem Schema nummeriert: X.Y.Z.A.B-C.D.E

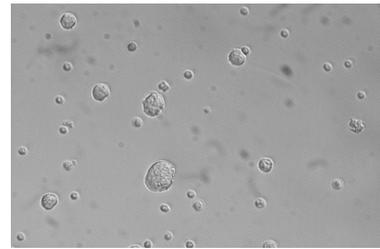


Abbildung 26 Hybridome



Abbildung 27 Kolonie

X	Nummer der Maus (1 – 4)
Y	Nummer des fusionierten Zehntels (1 – 10)
Z	Nummer der Zellkulturplatte (1 – 4)
A	Zeile des Wells der Zellkulturplatte (A – H)
B	Spalte der Zellkulturplatte (1 – 12)
C	Plattenummer der Klonierung (1 – 4)
D	Zeile des Wells der Klonierungsplatte (A – H)
E	Spalte des Wells der Klonierungsplatte (1 – 12)

Beispiel: 1.4.2.D6-3.B8

Das bedeutet, dass dieser Klon von der Maus Nummer eins stammt, aus dem vierten Zehntel der B-Lymphozyten und in der zweiten Zellkulturplatte im Well D6 gefunden wurde. Des Weiteren wurde der Klon rekloniert und dabei in der dritten Zellkulturplatte in Well B8 gefunden.

#### 4.4. Test der fusionierten Zellen auf Antikörperproduktion gegen ADMA

Nach dem die Hybridome innerhalb von 14 Tagen zu kleinen Kolonien herangewachsen waren, mussten sie auf Antikörperproduktion getestet werden (siehe 3.11), da zum einen nicht in jedem Well eine Kolonie gewachsen war und zum anderen nicht alle Hybridome auch wirklich Antikörper gegen ADMA produzieren. In diesem Test wurde qualitativ nachgewiesen, in welchen Wells der vier 96-

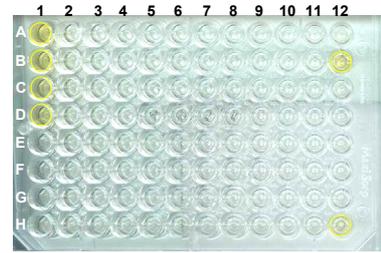


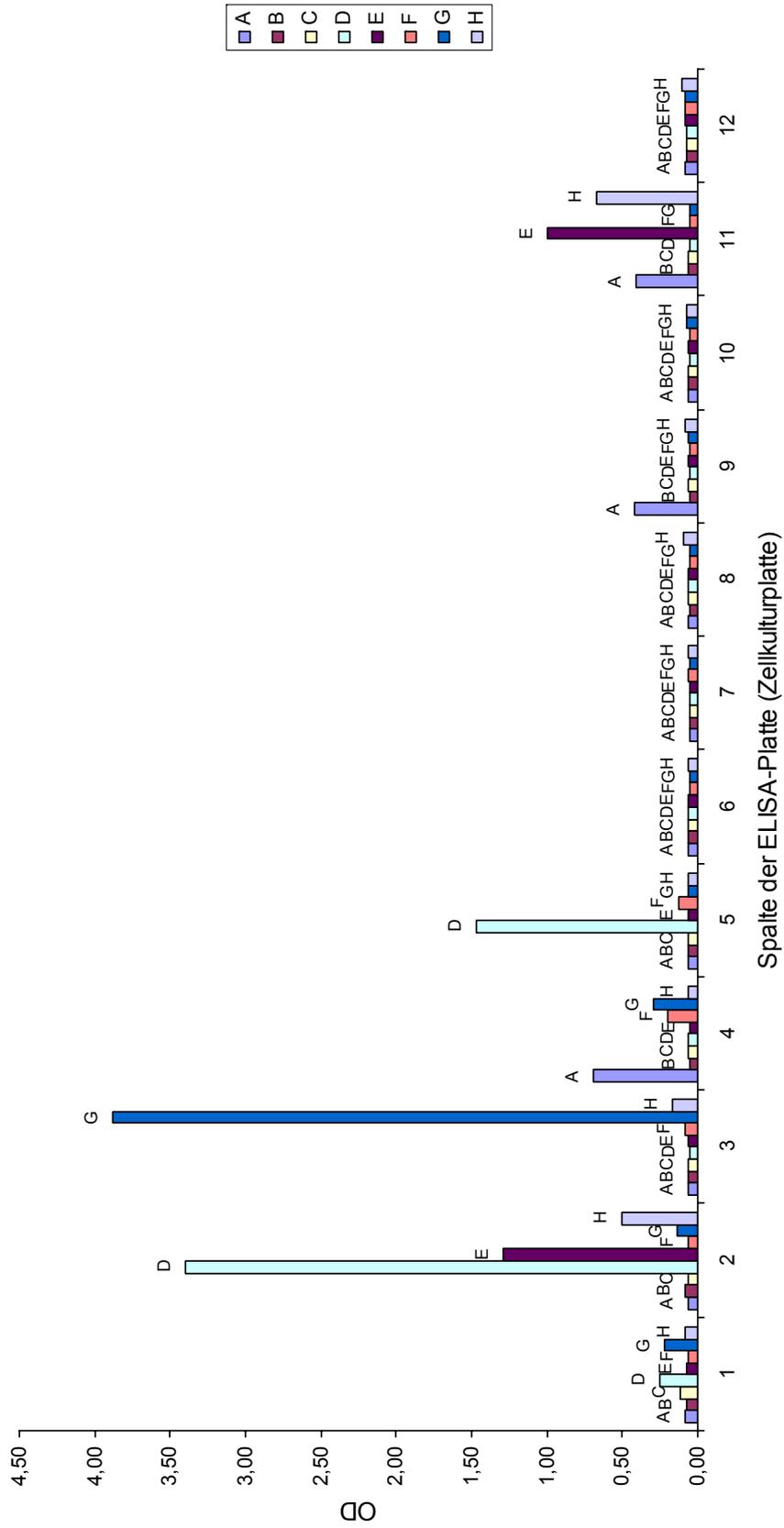
Abbildung 28 Mikrotiterplatte mit positiven Wells

Well-Zellkulturplatten Hybridome wuchsen, die Antikörper gegen ADMA produzierten. Dazu wurden vier Mikrotiterplatten mit ADMA-BSA-Konjugat beschichtet und 100 µl Zellkulturüberstand aus den Zellkulturplatten in die gleichen Wells der Mikrotiterplatten pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Mikrotiterplatten gewaschen und gebundener Antikörper mit der Hilfe eines Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers und TMB als Farbreagenz nachgewiesen. Dabei erschienen positive Wells gelb. In Abbildung 28 ist eine solche Mikrotiterplatte zu sehen. In der ersten Spalte ist eine Positivkontrolle (A1 – D1) und eine Negativkontrolle (E1 – H1) zu sehen. Die Wells B12 und H12 enthalten Hybridome, die Antikörper gegen ADMA produzieren. Abbildung 29 zeigt die Auswertung mit dem Plattenphotometer exemplarisch an einer Mikrotiterplatte. In diesem Fall wurden die Zellen der Wells D2, E2, H2, G3, A4 D5, A9, A11, E11 und H11 weitergeführt (siehe 3.12).

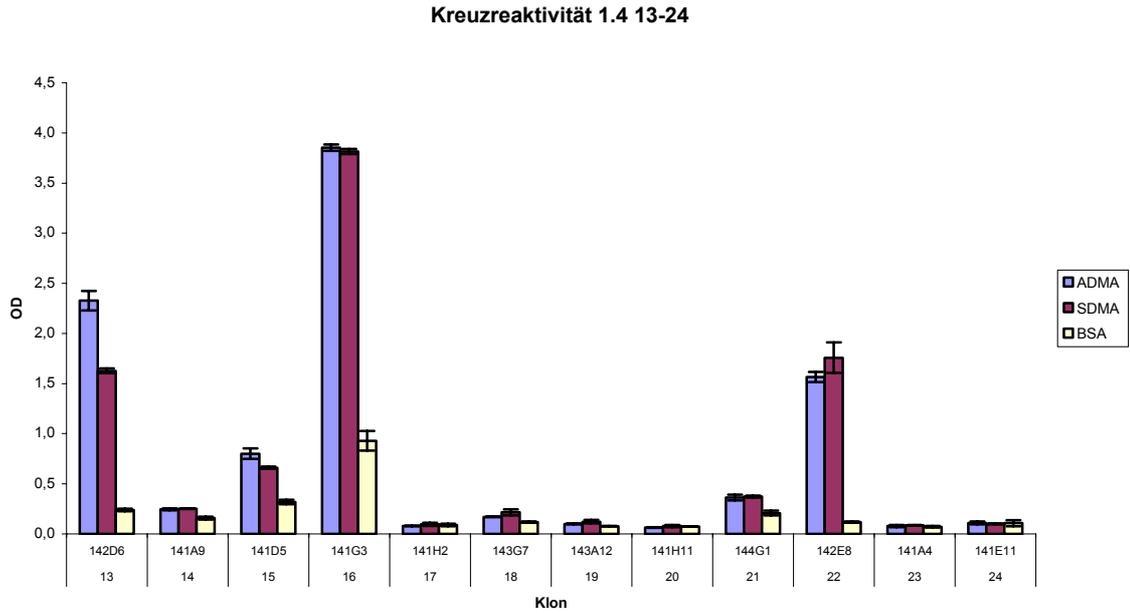
#### 4.5. Test zur Abschätzung der Kreuzreaktivität

Um die große Anzahl verschiedener Zellkulturen, die im Verlauf der Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers entstehen, besser bewältigen zu können, wurde versucht die Kreuzreaktivität der einzelnen Antikörper mit einem einfachen Test abschätzen zu können (siehe 3.13). Dazu wurde Zellkulturüberstand in verschieden beschichtete Wells einer Mikrotiterplatte gegeben und semiquantitativ mit einem Sekundärantikörper die gebundene Menge an Antikörper aus dem Zellkulturüberstand bestimmt. Die gemessene Absorption nach Entwicklung der Mikrotiterplatte mit TMB wurde in einem Balkendiagramm graphisch dargestellt (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31). Es wurden nur Zellkulturen weitergeführt, bei denen sich ein signifikanter Unterschied in der Bindung von ADMA-BSA und SDMA-BSA feststellen ließ.

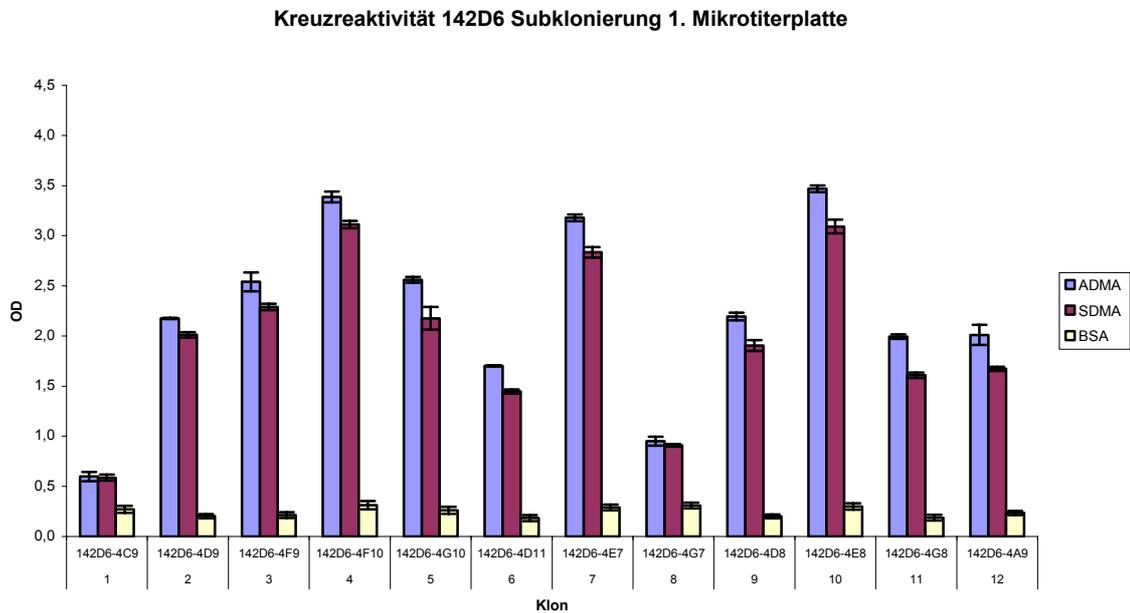
1.4.1



**Abbildung 29** Diese Abbildung zeigt exemplarisch das Ergebnis der photometrischen Auswertung eines Tests auf Antikörperproduktion.



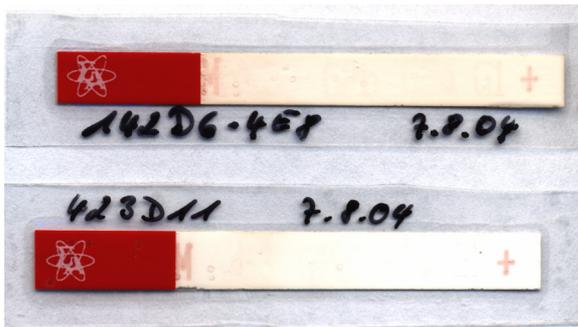
**Abbildung 30** Photometrische Auswertung des Test auf Kreuzreaktivität für die Hybridome der Maus 1 aus der 4. Fusion Nummer 13 bis 24



**Abbildung 31** Photometrische Auswertung des Test auf Kreuzreaktivität für die Hybridome aus der Subklonierung von 142D6 Nummer 1 bis 12

## 4.6. Bestimmung des Antikörpersubtyps

Die Bestimmung des Antikörpersubtyps wurde mit einem Fertig-Kit der Firma Sigma-Aldrich durchgeführt. Sie beruhte darauf, dass ein Träger mit einem Nitrozellulosestreifen beschichtet war, auf den Antikörper gegen die einzelnen Immunglobulinsubtypen aufgebracht waren (siehe 3.15). Bei der Inkubation des Teststreifen mit Zellkulturüberstand eines Hybridoms band der in dem Zellkulturüberstand vorhandene Antikörper an den entsprechenden anti-Subtyp-Antikörper. Der gebundene murine Antikörper aus dem Zellkulturüberstand wurde mittels eines dritten Antikörpers (Sandwich), an welchen das Farbreaktionssystem gekoppelt war, über einen roten Farbstoff nachgewiesen. Der Immunglobulinsubtyp konnte nun einfach abgelesen werden, da der Primäantikörper (anti-Subtyp) in „Buchstabenform“ auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht war (siehe Abbildung 32). Die Bestimmung des Antikörpersubtyp wurde für die Antikörper 142D6-4E8 und 423D11 durchgeführt, da sie auch in späteren Versuchen eingesetzt wurden. Die Antikörper waren beide vom Subtyp M.



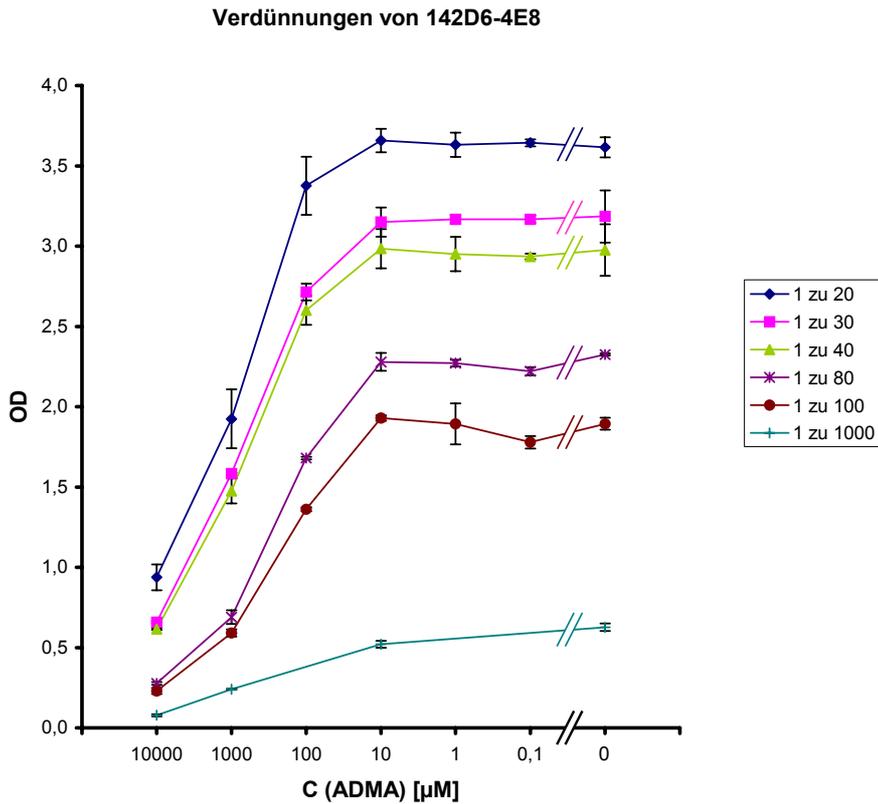
**Abbildung 32** Abbildung der Teststreifen zur Antikörpersubtypbestimmung nach dem erfolgten Test. Es sind die Teststreifen für die Antikörper 142D6-4E8 und 423D11 abgebildet. Es waren deutlich die Positivkontrolle (+) und der Subtyp (M) zu erkennen.

## 4.7. Kompetitiver ELISA zu Bestimmung von ADMA

### 4.7.1. Bestimmung einer geeigneten Verdünnung des Antikörpers 142D6-4E8

Um eine geeignete Verdünnung für eine Verwendung des Antikörpers 142D6-4E8 zu ermitteln, wurden zunächst von dem Zellkulturüberstand verschiedene Verdünnungen erstellt und diese dann in einem ELISA nach den Standardvorschriften (3.16) eingesetzt. Zur Auswertung wurden in einer Graphik nebeneinander die einzelnen Kurven der unterschiedlichen Konzentrationen in Abhängigkeit von der OD dargestellt. Die graphische

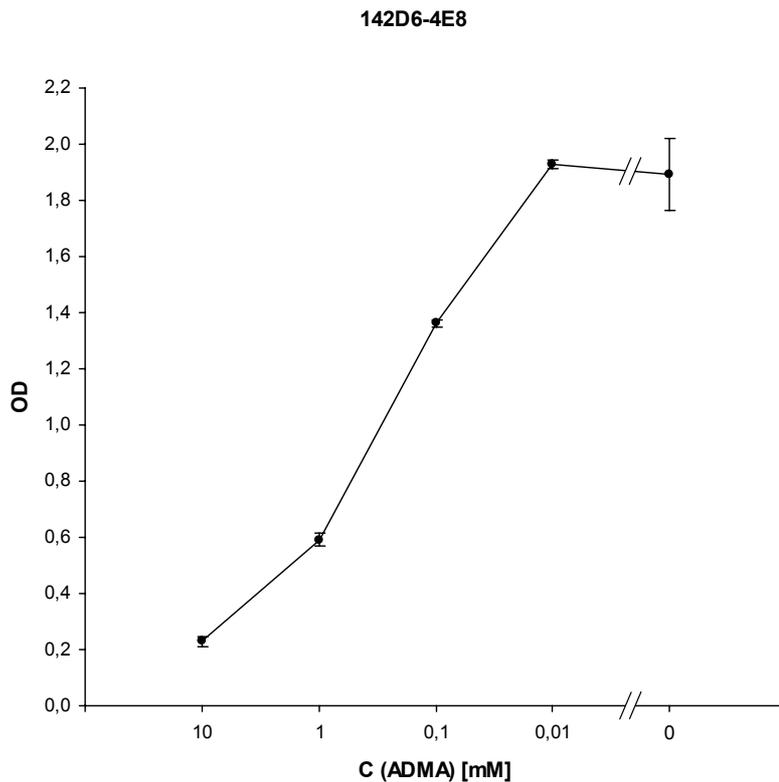
Darstellung ist in Abbildung 33 zu sehen. Man konnte hier deutlich erkennen, dass mit zunehmender Verdünnung des Antikörpers die Kurve flacher wird. Um einen Absorptionsbereich zu erreichen, der möglichst einen Bereich von 0 bis 2,0 OD abdeckt, wurde für weitere Experimente eine Antikörperverdünnung von 1/100 verwendet. Bei niedrigeren Verdünnungen lag der Absorptionsbereich des Nullwertes außerhalb des linearen Bereiches des Lambert-Beerschen-Gesetzes. Bei zu hohen Verdünnungen wurde die Kurve zu flach.



**Abbildung 33** Vergleich verschiedener Antikörperverdünnungen. Der Zellkulturüberstand des Antikörper 142D6-4E8 wurde mit Verdünnungspuffer verdünnt und in einem ELISA nach der Standardvorschrift eingesetzt.

### 4.7.2. Erstellung einer Standardkurve

Zur Erstellung einer Standardkurve für ADMA wurde eine 1/100 Verdünnung des Antikörpers 142D6-4E8 gewählt. Es wurde ein ELISA nach 3.16 und 3.18 durchgeführt. Dazu wurden ADMA-Konzentrationen von 10  $\mu$ M bis 10 mM verwendet. Zur Darstellung der Standardkurve wurden die erhaltenen Absorptionswerte gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Der lineare Bereich der Standardkurve deckte genau die eingesetzten Konzentrationen ab (siehe Abbildung 34).



**Abbildung 34** Standardkurve für einen kompetitiven ELISA aus dem Zellkulturüberstand des Klon 142D6-4E8. Es wurde eine Verdünnung des Zellkulturüberstandes von 1/100 verwendet

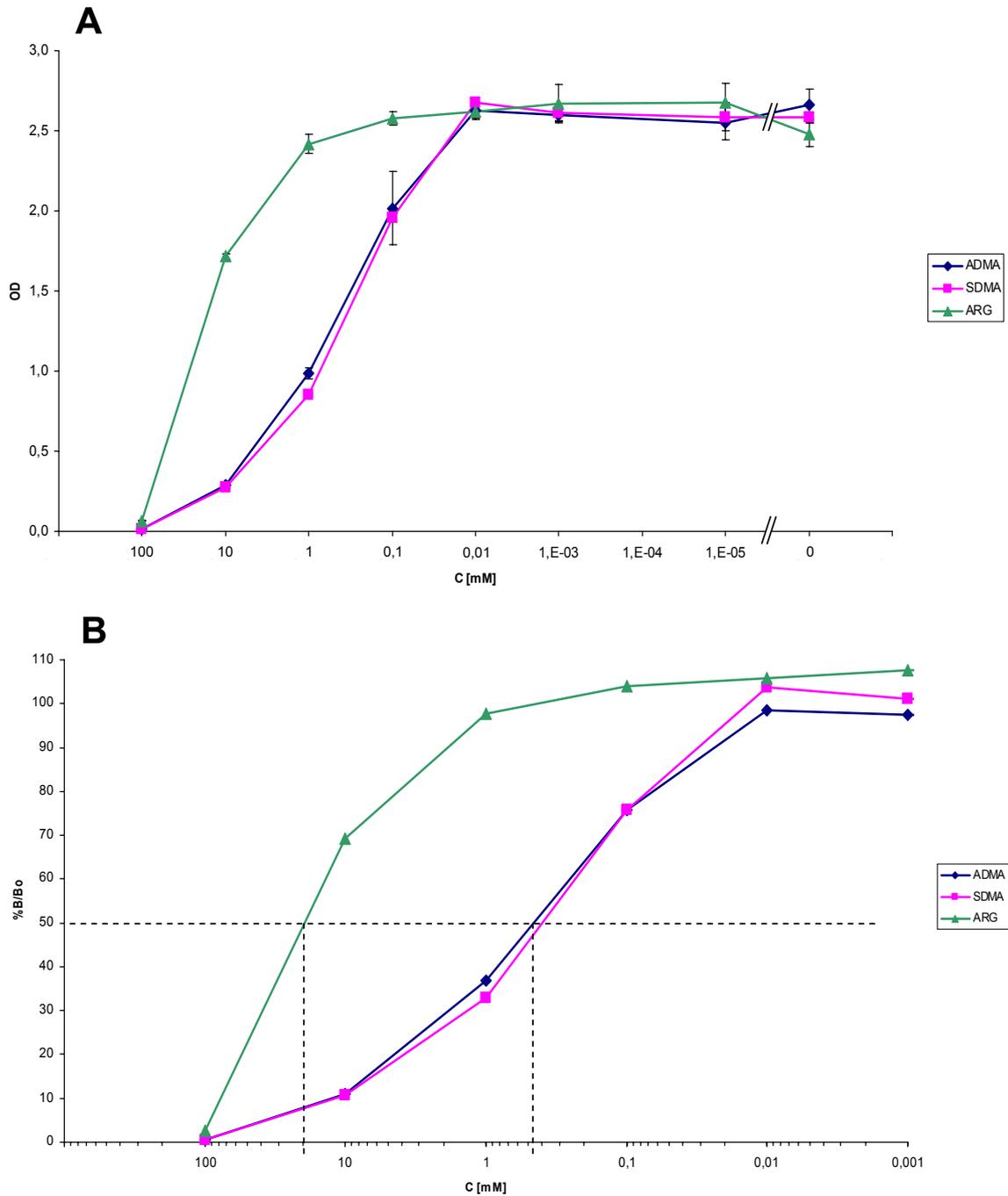
Die Form der Standardkurve entsprach genau den Anforderungen an eine Standardkurve für einen kompetitiven ELISA. Mit abnehmender Konzentration des Analyten nahm die Absorption zu. Die Kurve erstreckte sich über einen Bereich von 1,5 bis 2 OD. Das Minimum der Kurve lag unter 0,3 OD und das Maximum unter 2,0 OD.

Eine Verwendung von Antikörper, der nach 3.14 aus Zellkulturüberstand aufgereinigt wurde, erbrachte keine Verbesserung der Sensitivität.

### **4.7.3. Bestimmung der Kreuzreaktivität**

Zur näheren Charakterisierung des Antikörpers 142D6-4E8 seine Kreuzreaktivität zu den Substanzen SDMA und L-Arginin ermittelt: zu L-Arginin, da es in biologischen Proben in relativ hohen Konzentrationen vorhanden ist, und zu SDMA, da es sich von ADMA lediglich in der Position einer Methylgruppe unterscheidet und in etwa ähnlichen Konzentrationen vorkommt, aber im Gegensatz zu ADMA ohne Einfluss auf die Funktion der eNOS ist.

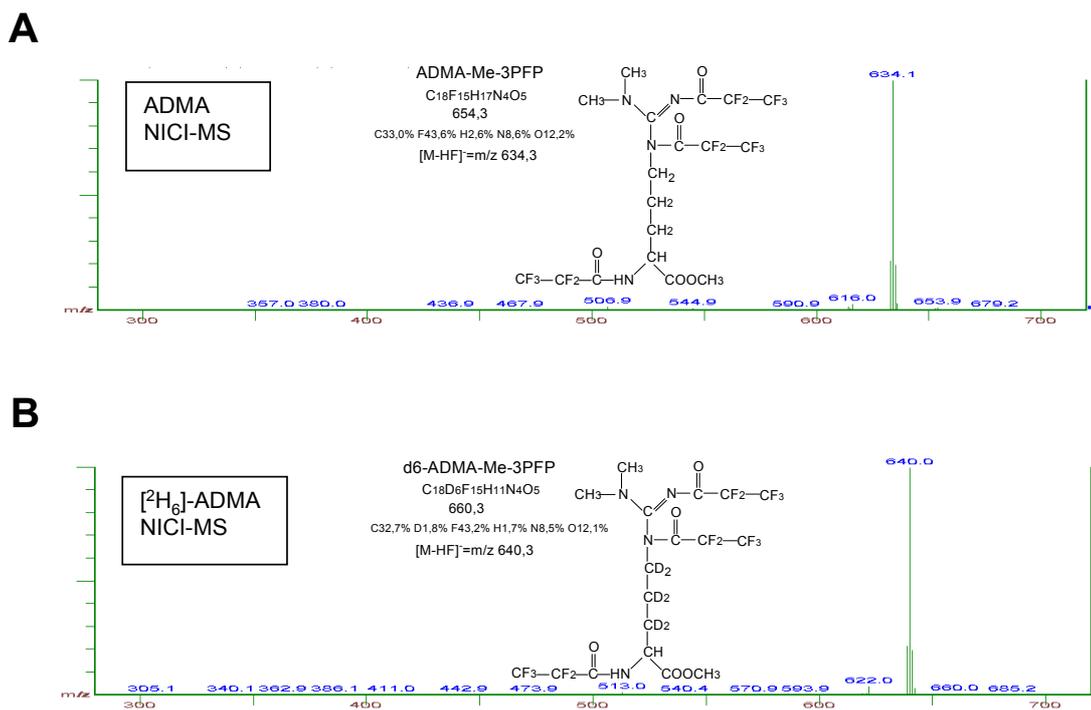
Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des Antikörpers wurden für ADMA, SDMA und L-Arginin Standardkurven bestimmt und deren Testmittelpunkte mit einander verglichen (siehe 3.19). Zur besseren Bestimmung des Testmittelpunktes wurden die gefundenen Werte der Standardkurve transformiert. Der Testmittelpunkt wurde aus einer graphischen Darstellung von %B/B<sub>0</sub> gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentration abgelesen (siehe 3.19). Die Kurven sind in der Abbildung 35 dargestellt. Als Kreuzreaktivitäten ergaben sich für L-Arginin 2,25% und für SDMA 100%.



**Abbildung 35** Graphische Bestimmung der Kreuzreaktivität des Antikörpers 142D6-4E8. Die Abbildung **A** zeigt die "Standardkurven" mit ADMA, SDMA und L-Arginin. Es wurde die Konzentration der zu untersuchenden Substanz gegen die Absorption aufgetragen. In der Abbildung **B** wurde die Konzentration der jeweiligen Substanz gegen die prozentuale Absorption bezogen auf die Absorption des Nullwertes aufgetragen. So lässt sich einfach der Testmittelpunkt für die zu vergleichenden Substanzen bestimmen (gestrichelte Linien).

#### 4.8. Synthese von $N^G, N^G$ - $[^2H_6]$ Dimethylarginin ( $[^2H_6]$ ADMA)

Die Synthese von ADMA durch Methylierung von L-Arginin resultiert in der Bildung einer Mischung aus L-Arginin, ADMA, SDMA und L-NMMA. Um eine anschließende aufwendige Reinigung der Reaktionsprodukte zu umgehen, wurde von uns eine Synthese wie in 3.20 beschrieben gewählt. Dabei wurde L-Ornithin über die  $\omega$ -Aminogruppe an Bromcyan-Agarose gebunden. Dieser Komplex wurde mit Dimethylamin umgesetzt, wobei ADMA entstand. Der große Vorteil einer solchen Festphasensynthese bestand darin, dass sich durch die Syntheseführung selektiv ADMA bildete und dieses in hoher Reinheit von der Matrix freigesetzt wurde. Durch Bestimmung mit HPLC nach 3.4 konnte eine Verunreinigung mit SDMA, L-Arginin, L-Ornithin oder L-NMMA ausgeschlossen werden. Die Isotopenreinheit wurde mit GC-MS bestimmt. Sie betrug 99,0%. Die absolute Ausbeute der Synthese betrug 0,59% beziehungsweise 0,736 mg  $[^2H_6]$ -ADMA.



**Abbildung 36** GC-MS Massenspektrum der PFP-methylester Derivate von **A** ADMA und **B**  $[^2H_6]$ ADMA. Die Ionen konnten bei m/z 634 für ADMA und bei m/z 640 für  $[^2H_6]$ ADMA detektiert werden. (aus J. Albsmeier et al. J Chromatogr B. 2004;809:59-65)

## 4.9. Entwicklung eines polyklonalen Antiserums

### 4.9.1. Bestimmung der Kreuzreaktivität

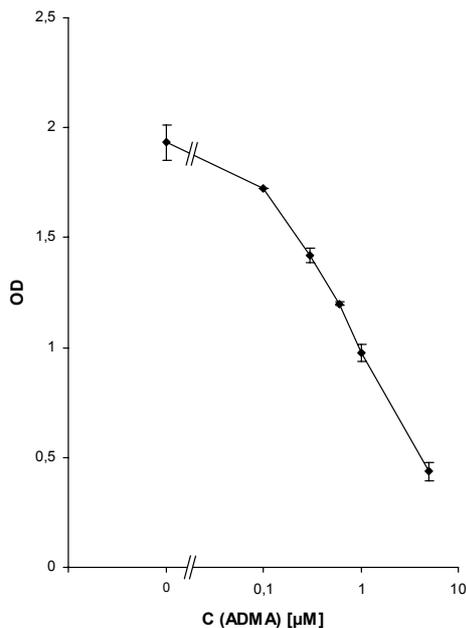
Die Ergebnisse der Bestimmung der Kreuzreaktivität sind in Tabelle 4 zusammengefasst. In den ELISA konnte eine Kreuzreaktivität für L-Arginin von 0,019%, für L-NMMA von 1,03% und für SDMA von 1,2% erreicht werden.

Substanz	C <sub>50%</sub> [ng/ml]	Kreuzreaktivität [%]
ADMA	126	100
L-Arginin	660000	0,019
L-NMMA	12200	1,03
SDMA	10500	1,2

**Tabelle 4** Kreuzreaktivität des polyklonalen Antiserum im ELISA gegenüber den drei ähnlichsten Blutbestandteilen L-Arginin, N-Monomethyl-L-arginin und SDMA.

### 4.9.2. Bestimmung von Standardkurve und Sensitivität

Eine Standardkurve wurde für den Konzentrationsbereich von 0 bis 5  $\mu\text{mol/l}$  ADMA entwickelt. Der Absorptionsbereich lag zwischen 0,3 und 1,8 OD (siehe Abbildung 37). Die Sensitivität wurde als dreifache Standardabweichung des Nullstandards berechnet. Sie betrug 0,05  $\mu\text{mol/l}$  ADMA. Der ELISA deckte damit gut den Bereich ab, in dem die ADMA-Konzentrationen bei Mensch, Maus, Ratte und Zellkultur liegen.



**Abbildung 37** Standardkurve des ELISA für ADMA aus dem polyklonalen Antiserum

### 4.9.3. Bestimmung der Präzision

Die relative Standardabweichung innerhalb eines Assays wurde durch wiederholte Messung ( $n = 36$ ) von zwei humanen Kontrollseren bestimmt (siehe Tabelle 5). Die niedriger konzentrierte Probe hatte eine ADMA-Konzentration von  $0,81 \mu\text{mol/l}$  und die höher konzentrierte Probe hatte eine ADMA-Konzentration von  $1,76 \mu\text{mol/l}$ . Die relative Standardabweichung für das niedriger konzentrierte Kontrollserum betrug  $7,5\%$ , die für das höher konzentrierte Kontrollserum  $4,5\%$ .

Die relative Standardabweichung zwischen zwei Assays wurde bestimmt, in dem vier humane Kontrollseren ( $n = 28$ ) an zwei aufeinander folgenden Tagen in einem Assay bestimmt wurden. Die Kontrollseren hatte ADMA-Konzentrationen von  $0,63 \mu\text{mol/l}$ ,  $1,01 \mu\text{mol/l}$ ,  $1,38 \mu\text{mol/l}$  und  $2,26 \mu\text{mol/l}$  (siehe Tabelle 6). Die relativen Standardabweichungen für die Seren betragen  $10,3\%$ ,  $9,8\%$ ,  $9,4\%$  und  $8,3\%$ .

Probe	Mittel [ $\mu\text{mol/l}$ ]	SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
1	0,81	0,06	7,5
2	1,76	0,08	4,5

**Tabelle 5** Intraassay Variabilität des polyklonale ADMA-ELISA ( $n = 36$ )

Probe	Mittel [ $\mu\text{mol/l}$ ]	SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
1	0,63	0,07	10,3
2	1,01	0,10	9,8
3	1,38	0,13	9,4
4	2,26	0,19	8,3

**Tabelle 6** Interassay Variabilität des polyklonalen ADMA-ELISA ( $n = 28$ )

#### **4.9.4. Bestimmung der Richtigkeit**

Um die Richtigkeit für die mit dem ELISA gemessenen Werte zu bestimmen, wurden zuerst Standardadditionen durchgeführt. Dazu wurden steigende Mengen ADMA zu einer humanen Serumprobe zugesetzt (siehe Tabelle 7). Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen und die Wiederfindung berechnet. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 94,56%.

Das gleiche wurde für Mausplasma und Rattenplasma durchgeführt (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9). Die durchschnittliche Wiederfindung für Mausplasma betrug 84,69% und die durchschnittliche Wiederfindung für Rattenplasma betrug 80,72%.

Um die Richtigkeit des Assay mit einer zweiten Methode zu zeigen, wurde zu einer humanen Serumprobe ADMA zugesetzt und aus dieser Probe eine Verdünnungsreihe erstellt (siehe Tabelle 10). Die ADMA-Konzentrationen der einzelnen Verdünnungen wurden in Doppelbestimmung gemessen und die Wiederfindung errechnet. Die Wiederfindung lag in einem Bereich von 86% und 101%. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 91,17%.

Das gleiche wurde wieder für Mausplasma und Rattenplasma durchgeführt (siehe Tabelle 11 und Tabelle 12). Die durchschnittliche Wiederfindung für das Mausplasma betrug 114,02% und die durchschnittliche Wiederfindung für das Rattenplasma betrug 100,36%.

## Ergebnisse

Zugegeben	Gemessen	Berechnet	Wiederfindung [%]
ADMA [ $\mu\text{mol/l}$ ]			
0	0,59		
0,25	0,85	0,84	101
0,5	0,98	1,09	90
1,0	1,46	1,59	92
1,5	1,86	2,09	89
2,0	2,39	2,59	92
2,5	2,87	3,09	93
3,0	3,37	3,59	94
3,5	3,90	4,09	95
4,0	4,81	4,59	105
Mittel $\pm$ SD			94,56 $\pm$ 5,22

**Tabelle 7** Wiederfindung von zugegebenem ADMA in humanem Serum

Zugegeben	Gemessen	Berechnet	Wiederfindung [%]
ADMA [ $\mu\text{mol/l}$ ]			
0	0,53		
0,25	0,75	0,78	96,2
0,5	0,94	1,03	91,3
1,0	1,25	1,53	81,7
1,5	1,68	2,03	82,8
2,0	2,3	2,52	90,9
2,5	2,3	3,03	75,9
3,0	2,9	3,53	82,2
3,5	3,25	4,02	80,6
4,0	3,65	4,53	80,6
Mittel $\pm$ SD			84,69 $\pm$ 6,56

**Tabelle 8** Wiederfindung von zugegebenem ADMA im Plasma der Maus

## Ergebnisse

Zugegeben [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Gemessen	Berechnet	Wiederfindung [%]
ADMA [ $\mu\text{mol/l}$ ]			
0	0,79		
0,25	1,0	1,04	96,2
0,5	1,1	1,29	85,3
1,0	1,5	1,79	83,8
1,5	1,75	2,29	76,4
2,0	2,2	2,79	78,9
2,5	2,45	3,29	74,5
3,0	2,75	3,79	72,6
3,5	3,5	4,29	81,6
4,0	3,7	4,79	77,2
		Mittel $\pm$ SD	80,72 $\pm$ 7,16

**Tabelle 9** Wiederfindung von zugegebenem ADMA im Plasma der Ratte

Verdünnung	Gemessen	Extrapolation auf den Ausgangswert	Wiederfindung [%]
	ADMA [ $\mu\text{mol/l}$ ]		
0	3,84	3,84	
3 + 1	2,90	3,87	101
1 + 1	1,67	3,34	87
1 + 2	1,22	3,66	95
1 + 4	0,69	3,45	90
1 + 9	0,33	3,30	86
1 + 20	0,16	3,36	88
		Mittel $\pm$ SD	91,17 $\pm$ 5,78

**Tabelle 10** Linearität des ELISA bei Verdünnung von humanem Serum

## Ergebnisse

Verdünnung	Gemessen	Extrapolation auf den Ausgangswert	Wiederfindung [%]
	ADMA [ $\mu\text{mol/l}$ ]		
0	0,97	0,97	
3 + 1	0,84	1,12	115,5
1 + 1	0,53	1,06	109,3
1 + 2	0,46	1,38	142,3
1 + 4	0,21	1,05	108,2
1 + 9	0,092	0,92	94,8
		Mittel $\pm$ SD	114,02 $\pm$ 17,52

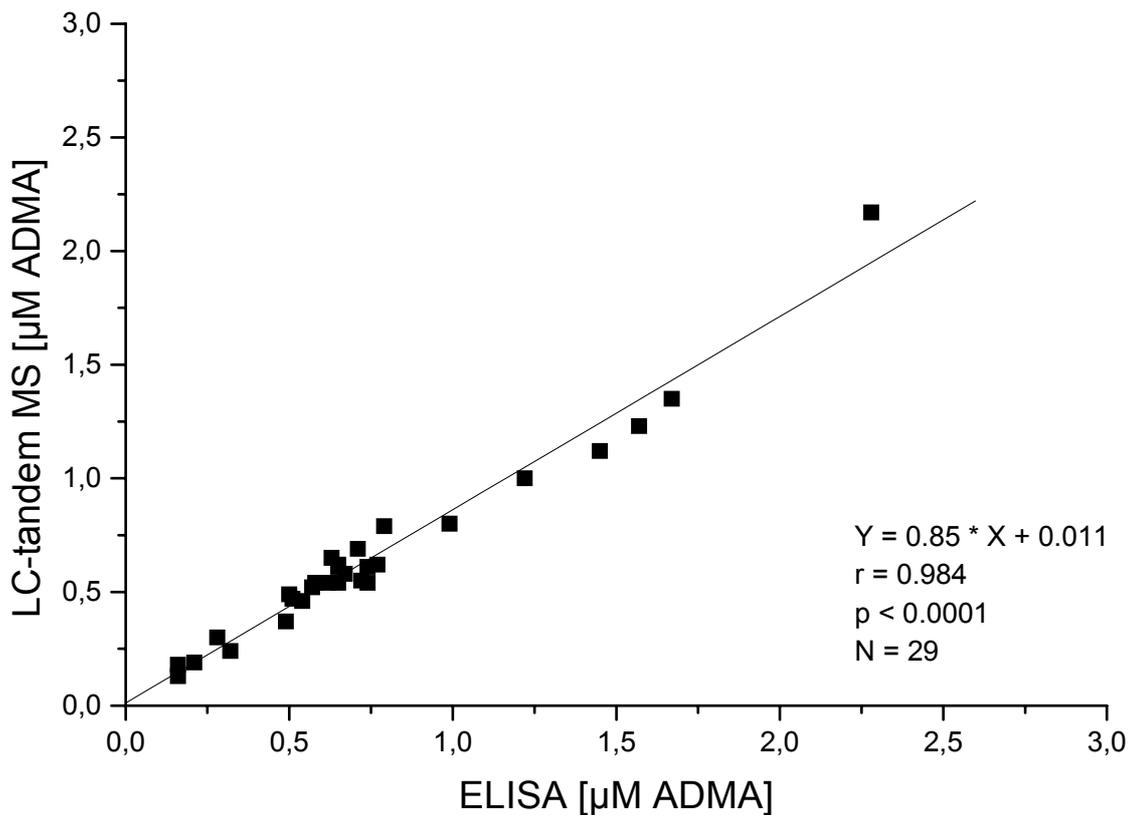
**Tabelle 11** Linearität des ELISA bei Verdünnung von Plasma einer Maus

Verdünnung	Gemessen	Extrapolation auf den Ausgangswert	Wiederfindung [%]
	ADMA [ $\mu\text{mol/l}$ ]		
0	1,15	1,15	
3 + 1	0,9	1,2	104,3
1 + 1	0,58	1,16	100,9
1 + 2	0,42	1,26	109,6
1 + 4	0,22	1,1	95,7
1 + 9	0,105	1,05	91,3
		Mittel $\pm$ SD	100,36 $\pm$ 7,16

**Tabelle 12** Linearität des ELISA bei Verdünnung von Plasma einer Ratte

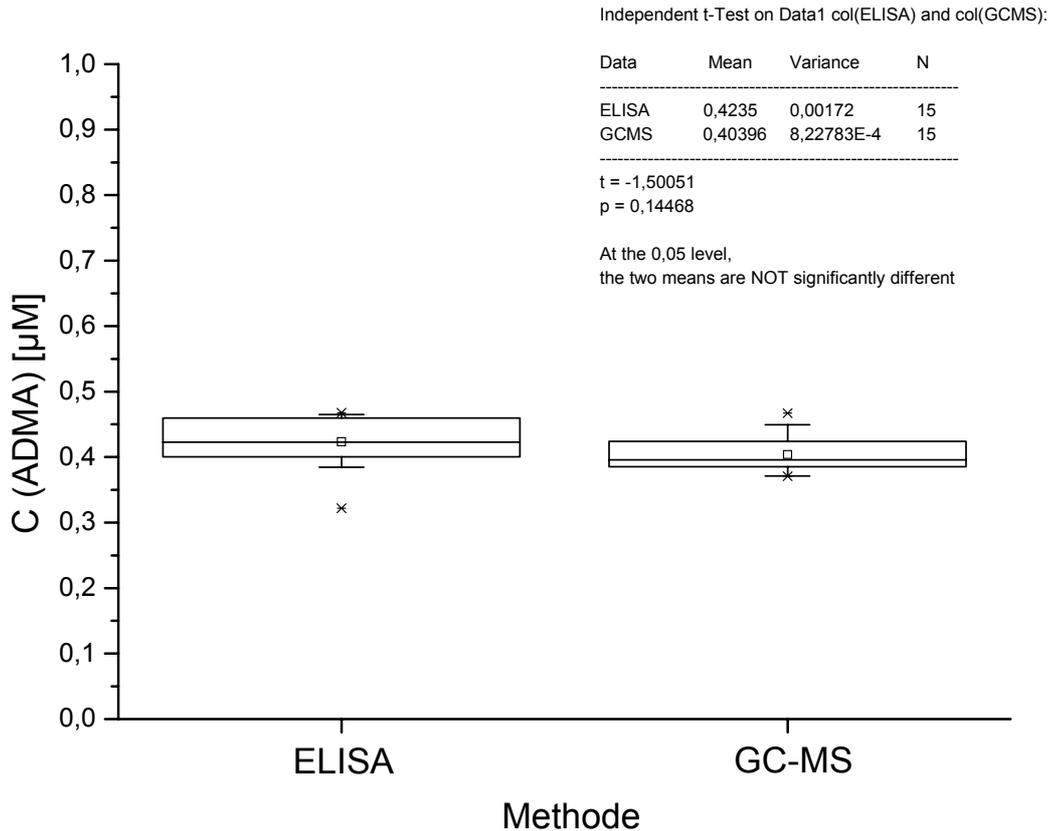
#### 4.9.5. Vergleich verschiedener Methoden

Zum Vergleich von dem ELISA und LC-tandem MS wurde in 29 humane Serumproben einmal mit ELISA und einmal mit LC-tandem MS die ADMA-Konzentration gemessen (siehe Abbildung 38). Die Messwerte wurden mittels linearer Regression verglichen. Es wurde eine Korrelation zwischen den Methoden mit  $r = 0,984$  ( $p < 0,0001$ ) gefunden. Der Y-Achsenabschnitt war mit 0,011 sehr gering. Es zeigte sich jedoch, dass mit dem ELISA geringfügig höhere Werte gemessen wurden. Die Steigung betrug 0,85.



**Abbildung 38** Vergleich von ELISA und LC-tandem MS an Hand von 29 humanen Serumproben

Zum Vergleich von ELISA und GC-MS wurden die ADMA-Konzentrationen in 15 Zellkulturüberständen mit beiden Methoden gemessen. Zum Vergleich der Methoden konnte keine lineare Regression durchgeführt werden, da die Spannweiten der gemessenen Werte zu gering war, um eine Regressionsgerade anlegen zu können. Statt dessen wurden die Mittelwerte der beiden Methoden mittels t-Test verglichen. Die Normalverteilung der beiden Messreihen war gegeben. Die Mittelwerte der beiden Messreihen unterschieden sich nicht signifikant (siehe Abbildung 39).



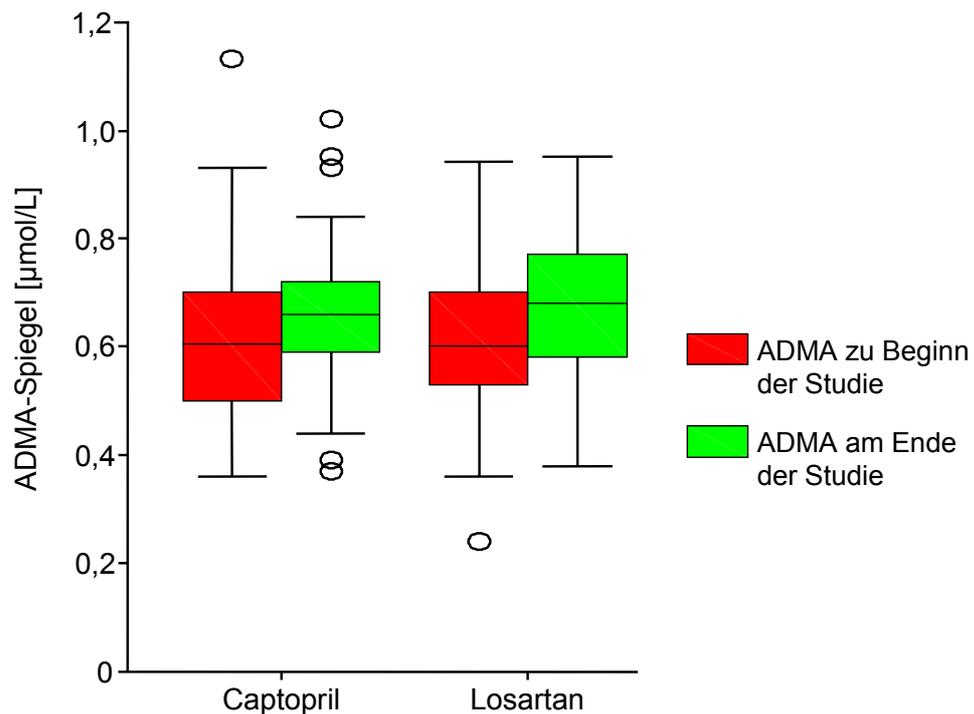
**Abbildung 39** Darstellung des Vergleichs der Mittelwerte der einmal mit ELISA und einmal mit GC-MS gemessenen ADMA-Konzentrationen in 15 Zellkulturüberständen

#### 4.10. Verwendung des polyklonalen ELISA zur Messung von ADMA-Konzentrationen bei Patienten im Rahmen einer klinischen Studie

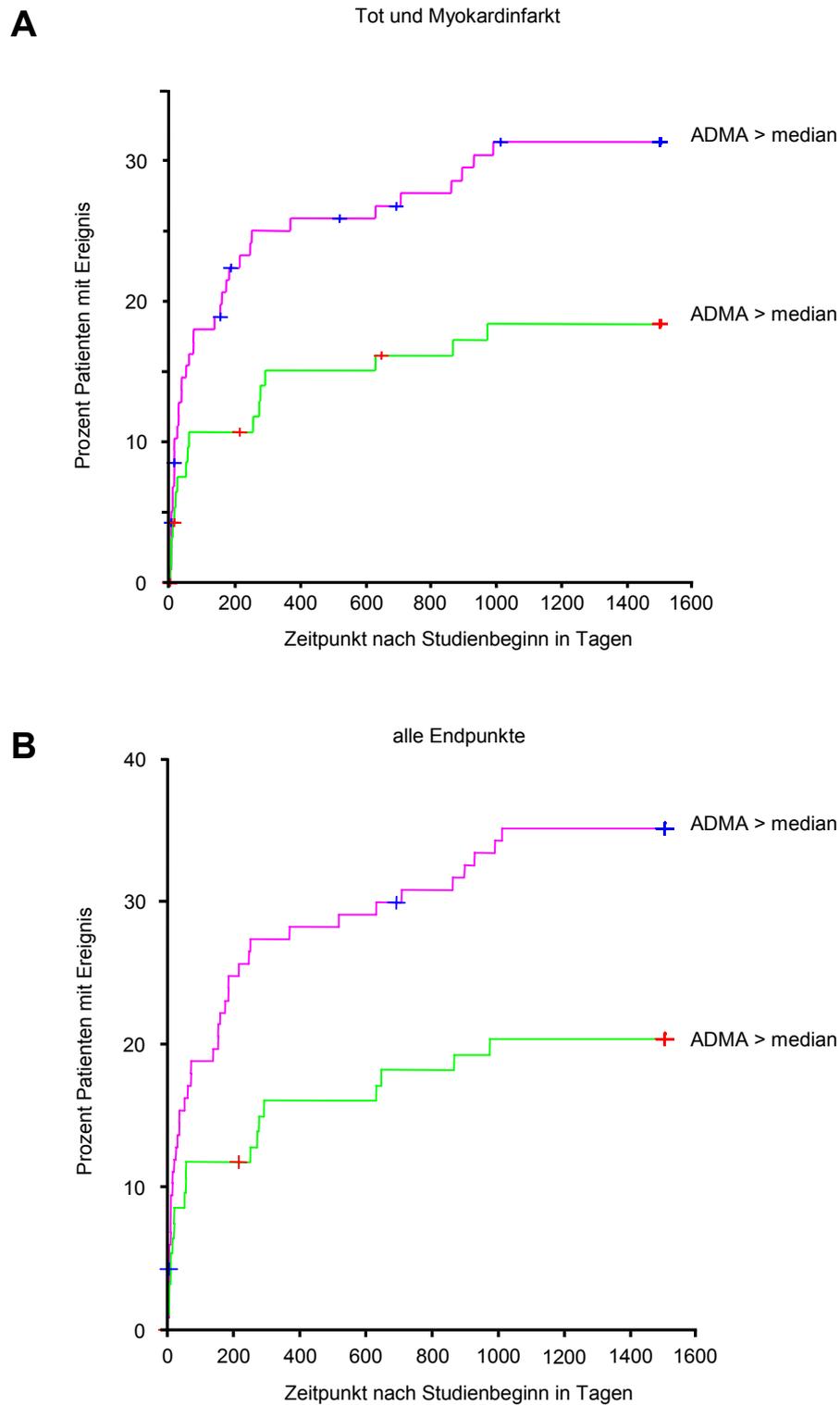
Die 213 Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die in die Studie eingeschlossen worden waren, wurden zur Auswertung der Ergebnisse in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe bildeten die Patienten mit einer basalen ADMA-Konzentration von weniger als dem Median (0,59 [0,24 - 1,13] µmol/l), die andere Gruppe wurde von den Patienten gebildet, deren basale ADMA-Konzentration über dem Median lag.

ADMA-Konzentrationen über dem Median zu Beginn der Studie waren mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko während des Follow-up (Median 27 Monate) verbunden. Das Risiko erhöhte sich in einer univariaten Analyse um 110% (univariate hazard ratio 2,10 [95% CI 1,14 - 3,89]; p = 0,018). Die Risikoerhöhung bestand für alle einzelnen Endpunkte einschließlich Tod. In der Gruppe mit der niedrigeren ADMA-Konzentration trat der kombinierte Endpunkt mit einer Wahrscheinlichkeit von 20,8% , Tod oder akuter Myokardinfarkt mit einer Wahrscheinlichkeit von 17,9% und nur Tod mit einer

Wahrscheinlichkeit von 10,4% ein. In der Gruppe mit den höheren ADMA-Konzentrationen lagen die Risiken für das Eintreten eines der Endpunkte deutlich höher. In dieser Gruppe lag das Risiko für das Erleiden des kombinierten Endpunktes bei 35,5%, für Tod oder akuten Myokardinfarkt bei 31,8% und für Tod bei 20,6% (siehe Abbildung 41). Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren alle statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Die ADMA-Konzentration blieb ein statistisch signifikanter unabhängiger prognostischer Faktor, wenn eine statistische Adjustierung für andere kardiovaskuläre Risikofaktoren durchgeführt wurde (Alter, Geschlecht, Diabetes, Hypercholesterinämie, Blutdruck, Raucher, BNP und CRP; adjusted hazard ratio 2,45 [95% CI 1,25 - 4,80 ];  $p = 0,009$ ). Die ADMA-Konzentrationen, speziell der Gruppe mit den erhöhten Werten, änderten sich im Laufe der Studie nicht (anfangs:  $0,64 \pm 0,15 \mu\text{mol/l}$ ; Follow-up:  $0,67 \pm 0,11 \mu\text{mol/l}$ ). Auch hatte die Art der Therapie (Captopril vs. Losartan) keinen Einfluss auf die ADMA-Konzentration der Patienten (siehe Abbildung 40).



**Abbildung 40** Vergleich der ADMA-Konzentrationen der Patienten unter Captopril und Losartan. Es zeigte sich, dass zum einen zu Beginn der Studie zwischen der Captopril- und der Losartangruppe kein Unterschied in der ADMA-Konzentration bestand. Dies änderte sich auch nicht im Verlauf des Follow-up. Die Therapie hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die ADMA-Konzentration der Patienten.



**Abbildung 41** Kumulative Darstellung der kardiovaskulären Ereignisse im Zeitverlauf des Follow-up. Es ist kumulativ der Anteil an Patienten an der jeweiligen Gruppe, welcher ein kardiovaskuläres Ereignis erlitten hat, in Prozent im Verlauf des Follow-up dargestellt. In der Abbildung A sind als kardiovaskuläres Ereignis Tod und Myokardinfarkt berücksichtigt. In der Abbildung B sind alle kardiovaskulären Ereignisse (siehe 3.23) dargestellt.

## 5. Diskussion

N,N-Dimethyl-L-arginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Erhöhte ADMA-Konzentrationen sind bei einer Reihe von Erkrankungen, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen, beobachtet worden (terminale Niereninsuffizienz, Hyperlipidämie, Hypertonus u.a.) (siehe 1.4).

Die Messung von ADMA-Konzentrationen wurde bisher mit Hilfe der HPLC durchgeführt (Bode-Böger SM. et al., 1996). Die Herausforderung besteht hier in der Trennung von ADMA und SDMA. Die Laufzeit für eine Messung beträgt inklusive eines zwischenzeitlichen Eluentenwechsels zur Säulenspülung ca. 45 Minuten. Einige Arbeitsgruppen haben versucht diese Methode durch verschiedene Modifikationen zu verbessern. Sie sind aber im wesentlichen nicht erfolgreich gewesen (Chen BM. et al., 1997; Marra M. et al., 2003 und Petterson A. et al., 1997) (siehe 1.5).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden ganz andere analytische Ansätze, wie LC-tandem MS- (Vishwanathan K. et al., 2000 und Martens-Lobenhofer L. et al., 2003), GC-MS- (Albsmeier J. et al., 2004) und GC-tandem MS-Methoden (Tsikas D. et al., 2003) gewählt. Die Methoden zeichnen sich durch eine verbesserte Genauigkeit gegenüber der HPLC aus. Vor allem die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte GC-MS-Methode hat den zusätzlichen Vorteil, dass die Zeit für die Messung einer Probe nur noch rund zehn Minuten beträgt. Trotz dem haben die Massenspektrometrie-basierten Methoden den Nachteil, dass sie in der Anschaffung teuer und daher nicht sehr weit verbreitet sind.

Für die Messung von biologischen Parametern im Rahmen einer klinischen Studien ist es nötig, dass die Messmethode robust, kostengünstig um zum Zwecke der Vergleichbarkeit weit verbreitet ist. Diese Anforderungen werden durch die Antikörper-basierten Testformate erfüllt.

Es war daher Ziel der Arbeit, zum einen einen monoklonalen Antikörper und zum anderen ein polyklonales Antiserum zu entwickeln. Darauf basierend sollte ein ELISA konstruiert werden. Der ELISA sollte validiert und im Rahmen einer klinischen Studie eingesetzt werden. Die Entwicklung des polyklonalen Antiserum und des ELISA erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma DLD Diagnostika, Adlerhorst 15, Hamburg.

## **5.1. Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers**

### **5.1.1. Immunogenentwicklung und Immunisierung**

Ein Molekül sollte eine Größe von mehr als 1000 Da haben, um sicher in einem Vertebraten eine Reaktion des Immunsystems hervorrufen zu können. Mit einer Molmasse von 202 g/mol ist ADMA also zu klein, um als Immunogen zur Antikörperentwicklung dienen zu können. ADMA musste daher an ein größeres Trägerprotein gekoppelt werden, um als Immunogen wirken zu können. Dafür standen mehrere mögliche Substanzen zur Verfügung. Die gebräuchlichsten zu diesem Zweck sind Albumine, KLH und Thyroglobulin. Ich habe mich für KLH entschieden, da es schon häufig erfolgreich eingesetzt wurde und zum anderen über viele Lysin-Gruppen verfügt, die sich gut für eine Kopplung von Haptenen eignen (Markl J. et al., 1991 und Herskovits T. et al., 1988). Über die Anzahl der gekoppelten Hapten-Moleküle an ein Molekül Trägerprotein gibt es keine einheitlichen Angaben. Es wurden Antikörper beschrieben, bei denen Immunogene mit einer geringen Menge gekoppelten Haptens verwendet wurden (Erlanger BF, 1980), es gibt aber auch die Meinung, dass möglichst viele Hapten-Moleküle an ein Trägermolekül gekoppelt sein sollten (Rittenberg MB. et al., 1966). Die meisten in der Literatur beschriebenen Hapten-Trägerprotein-Konjugate hatten ein Verhältnis von 20/1 bis 200/1. Ich habe daher für die Immunisierung der Mäuse ein ADMA-KLH-Konjugat verwendet, das ein Verhältnis von 40,5 mol ADMA je 1 mol KLH, bei einer angenommenen Molmasse für KLH von 450 kDa hat. Die Menge gekoppelter ADMA liegt also in dem mittleren Bereich dessen, was in der Literatur empfohlen wird. Wenn man sich die Literatur genauer anschaut, sieht man aber, dass es das optimale Hapten-Trägerprotein-Verhältnis nicht zu geben scheint und hier viel von den persönlichen Erfahrungen der Experimentatoren abhängt.

Das gleiche gilt genau so für das optimale Immunisierungsschema. Hier reichen die Literaturangaben von einer täglichen Immunisierung über drei Wochen, gefolgt von wöchentlichen Boostinjektionen über zwei bis vier Monate (Strobach H, 1994), bis zu einer Immunisierung mit einer einzigen Dosis (Trucco mM. et al., 1978). Bei der Auswahl der richtigen Kombination von Hapten-Trägerprotein-Kombination und Immunisierungsschema hat jeder Experimentator sein eigenes „Geheimrezept“. Dies spiegelt sich in der Tatsache wider, dass über die genauen Mechanismen der Immunantwort eines Organismus sehr wenig bekannt ist, was Rückschlüsse darauf zulässt, wie ein optimales Immunogen und das dazu passende Immunisierungsschema aussehen müssen. Das Immunisierungs-

schema habe ich so gewählt, wie es bei JH Peters (1988) beschrieben ist, da es einen Mittelweg der am häufigsten beschriebenen darstellt. Die Immunisierung wurde durch intraperitoneale Injektion durchgeführt. Alternativen sind die intravenöse, die intrasplenische und die intranodale Injektion. Die intravenöse Immunisierung geht mit einem hohen Risiko eines anaphylaktischen Schocks einher. Sie wird daher praktisch nicht durchgeführt, außer bei der letzten Boost-Injektion mit dem reinen Hapten ohne Immunstimulanzien drei Tage vor der Entnahme der B-Lymphozyten. Die intrasplenische und die intranodale Injektion sind zwar prinzipiell gut geeignet, sind aber schwierig durchzuführen.

Um die Immunantwort auf das Immunogen zu steigern, werden Adjuvantien eingesetzt. Sie dienen zum einen dazu, das Immunogen, welches meist in einer wässrigen Lösung vorliegt, in einem Depot zu binden und zum anderen durch eine Reizung Zellen des Immunsystems an die Injektionsstelle zu locken. Der „Retard-Effekt“ wird entweder durch die Bildung einer stabilen Wasser in Öl Emulsion oder durch den Zusatz von Aluminiumhydroxid zum Immunogen erreicht. Die „Reizung“ des Immunsystems erreicht man durch die Verwendung von Mineralölen oder den Zusatz von abgetöteter Bakterien. Die Bakterien bewirken eine Aktivierung von Makrophagen und T-Helfer-Zellen.

Ich habe für die Immunisierung das 1937 von Freund Entwickelte Freundesche Adjuvans verwendet. Von dem Adjuvans gibt es zwei Formen: komplettes und inkomplettes. Das komplette Freundesche Adjuvans besteht aus einer Mischung von Mineralölen mit abgetötetem *Mycobacterium tuberculosis*. Bei dem inkompletten Freundeschen Adjuvans fehlen die Bakterien. Für die Erstimmunisierung habe ich das komplette Freundesche Adjuvans und für die zweite und dritte Immunisierung habe ich das inkomplette Freundesche Adjuvans verwendet. In dieser Kombination werden die besten Ergebnisse erzielt (Harlow E. et al., 1988).

Der Nachteil bei der Verwendung von Freundeschem Adjuvans ist, dass es leicht zu entzündlichen Reaktion und Fieber bei den Versuchstieren kommen kann (was für die gute immunstimulierende Wirkung spricht). Des weiteren kann es zu bindegewebigen Verwachsungen im Bauchraum der Tiere kommen und ein multiples Myelom kann induziert werden (Herr Freund verstarb an einem solchen).

Der Erfolg der Immunisierung wurde auf zwei verschiedenen Wegen überprüft. Zum Einen wurde auf semiquantitative Weise der Verlauf der Antikörpermenge im Blut der Mäuse bestimmt. Es zeigte sich das typische wellenförmige auf und ab. Zum anderen wurde nach dem Töten der Tiere der Antikörpertiter der gegen ADMA gerichteten Antikörper aus dem

Serum der Mäuse bestimmt. Der schwankte zwischen 1/38240 und 1/88214. Das zeigt, dass unterschiedliche Individuen durchaus unterschiedlich auf das gleiche Immunogen reagieren können.

Die Antikörper produzierenden Zellen einer Maus, die zu Plasmazellen differenzierten B-Lymphozyten, können nicht auf Dauer zwecks Antikörperproduktion kultiviert werden. Man braucht also eine Methode, um die Zellen zu immortalisieren. Dafür wurden im Wesentlichen drei Methoden entwickelt. Die älteste Methode zur Fusion zweier lebender Zellen ist die Verwendung von Sendai-Viren, wie sie schon von Köhler und Milstein angewendet wurde. Wesentlich effektiver und einfacher ist die Verwendung von Polyethylenglycol (PEG), einem oberflächenaktiven Polymer (Davidson RL. et al., 1977). Es wird PEG mit einer Molmasse zwischen 1500 g/mol und 6000 g/mol verwendet. Meist werden Mischungen verschiedener Molmassen verwendet. Der Vorteil von PEG gegenüber den Sendai-Viren ist, dass die Durchführung der Fusion einfacher ist und man eine höhere Ausbeute an Hybridomen erhält. Eine weitere Methode zur Fusion zweier Zellen ist die Elektrofusion. Hier werden die Zellen in einem elektrischen Feld zur Fusion gebracht. Die Methode zeigt zwar eine der PEG-Fusion vergleichbare bis leicht höhere Ausbeute, ist aber mit einem deutlich höheren zeitlichen und apparativen Aufwand (Elektroporator für eukariote Zellen) verbunden (Schmitt JJ. et al., 1989 und Hewish DR. et al., 1989).

Der Fusionspartner für die B-Lymphozyten muss einige Voraussetzungen erfüllen. Es begünstigt die Entstehung lebensfähiger Zellen, wenn die beiden Fusionspartner den gleichen genetischen Hintergrund haben. Deshalb verwendet man zur Immunisierung Mäuse vom Stamm Balb/c und als Fusionspartner Myelomzellen, die sich von diesem Stamm ableiten (Harlow E et al., 1988). Die von mir verwendeten Zellen sind P3X63Ag8.653-Zellen. Diese Zellen leiten sich von den Balb/c-Mäusen ab. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie zum einen als Myelomzellen praktisch unbeschränkt teilungsfähig sind und zum anderen durch gezielte Selektion über einen Defekt im HGPRT-Gen verfügen und dadurch einer Selektion durch Aminopterin zugänglich sind. Ein weiterer Vorteil der Zellen ist, dass sie selber keine Antikörper sezernieren (Peters JH. et al., 1988). Prinzipiell können monoklonale Antikörper auch in anderen Spezies gewonnen werden, hier besteht jedoch die Schwierigkeit, geeignete Fusionspartner zu finden.

Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse durch cervikale Dislokation getötet und die Milz entnommen. Aus der Milz wurden alle Zellen gewonnen. Eine Anreicherung der B-Lymphozyten wurde nicht durchgeführt. Zum einen besteht die

überwiegende Zahl der in der Milz enthaltenen Zellen aus B-Lymphozyten und zum anderen ist auf Grund der Kultur- und Fusionsbedingungen gewährleistet, dass nur Hybridome aus B-Lymphozyten und Myelomzellen überlebensfähig sind. Eine Milz enthält ca.  $10^8$ - B-Lymphozyten. Für ein Fusionsexperiment wurden  $10^7$  B-Lymphozyten eingesetzt und der Rest zur späteren Verwendung in neun Aliquots eingefroren (Bennick A. et al., 1991). Das geschah, da ansonsten der Arbeitsaufwand für eine Person nicht zu bewältigen gewesen wäre. So wurden die B-Lymphozyten nach und nach aufgetaut und fusioniert (Marusich MF., 1988).

Nach der Fusion wurden die Zellen in vier 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Das liegt darin begründet, dass bei einer angenommenen Fusionsrate von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  bei  $10^7$  B-Lymphozyten ungefähr 500 Hybridome entstehen sollten. So habe ich versucht gleich bei der ersten Aussaat annähernd monoklonale Kulturen zu erhalten (Peters JH. et al., 1988).

Nach der Aussaat der fusionierten Zellen wurden sie über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. In dieser Zeit lief die Selektionierung ab. Das bedeutet, dass unter den gewählten Kulturbedingungen nur Hybridome, die aus einem (oder mehreren) B-Lymphozyten und einer Myelomzelle entstanden sind, wachsen konnten. Alle anderen Zellen wurden entweder auf Grund ihrer eingeschränkten Kultivierbarkeit oder der Aminopterin-Selektion aus der Zellkultur eliminiert. Nach den 14 Tagen lagen in den vier 96-Well-Zellkulturplatten also nur noch Hybridome vor. Diese mussten nun im nächsten Schritt auf Produktion eines gegen ADMA gerichteten Antikörpers untersucht werden. Die entstandenen Hybridome produzieren ja Antikörper gegen fast alle Antigene, mit denen die Maus im Laufe ihres Lebens je in Kontakt gekommen ist. Um also die Hybridome zu finden, die von Interesse waren, wurde das so genannte Screening durchgeführt. Dabei wurden vier Mikrotiterplatten mit ADMA-BSA-Konjugat beschichtet, welches mit einem anderen Linker hergestellt wurde als das ADMA-KLH-Konjugat, das zur Immunisierung verwendet wurde. Der Zellkulturüberstand der Hybridome wurde nun auf die ADMA-BSA-Konjugat beschichteten Mikrotiterplatten gegeben und mit einem gegen Maus-Ig gerichteten Sekundärantikörper eventuell gebundener anti-ADMA-Antikörper nachgewiesen. Mit diesem Versuchsansatz ließen sich in relativ kurzer Zeit aus den entstandenen Hybridomen diejenigen herausuchen, die einen Antikörper gegen ADMA sezernierten.

Da nach einer Fusion immer noch zwischen 20 und 50 Hybridome zu versorgen waren, die Antikörper gegen ADMA produzierten, musste eine möglichst schnelle Aussage über die Kreuzreaktivität der von den Hybridomen sezernierten Antikörper getroffen werden, um

sich schnell auf Hybridome mit einer geringen Kreuzreaktivität gegenüber SDMA und L-Arginin konzentrieren zu können. Die Kreuzreaktivität eines Antikörpers ist abhängig von dem Assay, in dem sie untersucht wird, und wird in der Regel in einem ELISA-Format bestimmt. Dafür ist es aber notwendig, zuerst einen ELISA zu entwickeln. Dies war in der frühen Phase der Hybridom-Kultur mangels ausreichender Mengen an Antikörper (bzw. Zellkulturüberstand) nicht möglich. Ich entwickelte daher eine einfache Methode, mit der sich ohne großen Aufwand die Kreuzreaktivität abschätzen lassen sollte. Eine Mikrotiterplatte wurde mit ADMA-BSA-Konjugat, SDMA-Konjugat und nur mit BSA beschichtet. Dann wurde die Platte mit Zellkulturüberstand inkubiert und eventuell gebundener Antikörper mit Hilfe eines Sekundärantikörpers nachgewiesen. Das Testprinzip bestand darin, dass ein ADMA-spezifischer Antikörper nur an das ADMA-BSA-Konjugat und nicht an das SDMA-BSA-Konjugat oder an BSA binden sollte. Der Antikörper 142D6 band das ADMA-BSA-Konjugat stärker als das SDMA-BSA-Konjugat und wesentlich stärker als das BSA alleine. Die entsprechende Zellkultur wurde propagiert und der Klon wurde rekloniert. Das heißt, dass die Zellen mit einer Zelldichte von 0,5 Zellen je Well erneut in vier 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät wurden. So war sicher gestellt, dass die nun heranwachsenden Kulturen monoklonal waren. Die reklonierten Zellen wurden erneut auf Produktion von Antikörpern gegen ADMA getestet. Hybridome sind relativ instabile Gebilde. Durch die Fusion von zwei Zellen entstehen Zellen, die unnatürliche Chromosomensätze haben. Die Zellen versuchen ihren Chromosomensatz zu stabilisieren, in dem sie teilweise ganze Chromosomen aus der Zelle eliminieren. Dadurch verändern sich primäre Hybridome im Laufe der Kultivierung in manchen Fällen ganz erheblich (Peters JH. et al., 1988). Die Reklonierung dient daher nicht nur dazu, sicher zu gehen, dass die Kultur wirklich monoklonal ist, sondern auch dazu, sicher zu gehen, stabile Zellen zu haben. Die reklonierten Zellen, die im Screening auf Produktion ADMA erkennender Antikörper positiv waren, wurden auch noch einmal im Test auf Kreuzreaktivität eingesetzt. Hier zeigte sich, dass nicht mehr alle erhaltenen Zellkulturen die anfänglichen Ergebnisse zeigten. Das zeigt deutlich, dass die erhaltenen primären Hybridome im Laufe von Kultur und Reklonierung sich teilweise verändert hatten. Der Klon 142D6-4E8 zeigt ein ähnliches Ergebnis im Test auf Kreuzreaktivität wie der Mutterklon 142D6 und wurde in den weiteren Versuchen eingesetzt.

Der Antikörpersubtyp zeigt zum einen, wie die Immunisierung verlaufen ist, und zum anderen ist er wichtig für eine eventuelle Aufreinigung des Antikörpers aus biologischen Flüssigkeiten. Der Subtyp wurde für zwei Antikörper bestimmt. Der Antikörper 142D6-

4E8 (gewonnen aus Maus 1) hatte wie der Antikörper 423D11 (aus Maus 4) den Immunglobulinsubtyp M. Zwei Gründe kommen hier zusammen. Zum einen besteht hier die Möglichkeit, dass die Mäuse auf die Immunisierung nicht wie geplant reagiert haben. Das heißt, dass es nach der ersten Immunisierung, bei der der Subtyp M gebildet wird, während den weiteren Boostinjektionen nicht zu einem Klassenwechsel zum Immunglobulinsubtyp G kam. Dagegen spricht allerdings, dass die Mäuse einen regelgerechten Verlauf der Antikörpertiter im Verlauf der Immunisierung gezeigt haben, und zum anderen, dass der finale Antikörpertiter mit  $1/88214$  für Maus 1 und  $1/79910$  für Maus 4 ausgesprochen hoch war. Der zweite Grund könnte gewesen sein, dass der Sekundärantikörper, der für alle Immunoassays verwendet wurde, sowohl mit Immunglobulinen vom Subtyp M, als auch mit Immunglobulinen vom Subtyp G reagierte. Das heißt, dass nicht nur Hybridome, die Immunglobuline vom Subtyp G sezernieren, propagiert wurden, sondern auch Hybridome, die Immunglobuline vom Subtyp M sezernieren.

Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, einen quantitativen Assay auf der Basis von monoklonalen Antikörpern zu konfigurieren. Wie ich bereits in der Einleitung beschrieben habe, habe ich mich aus den genannten Gründen für einen indirekten kompetitiven heterogenen Assay entschieden.

Antikörper, die gegen sehr kleine Haptene gerichtet sind, binden in der Regel nicht nur das Hapten, sondern auch Teile des Linkers oder Trägerproteins. Das macht es in viele Fällen notwendig, das Hapten für den Einsatz in einem ELISA zu derivatisieren. Dazu wird in der Regel ein Linker-Reagenz zu den zu messenden Proben gegeben. Der Linker reagiert mit dem in der Probe befindlichen Antigen, so dass es in einer für den Antikörper erkennbaren Form vorliegt.

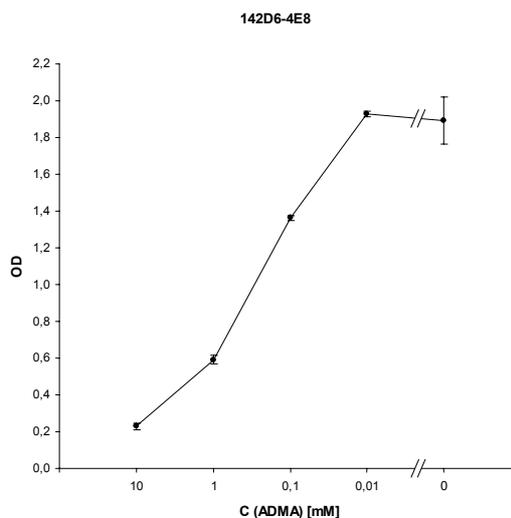
Die Tatsache, dass ADMA ein Hapten ist und die Immunisierung daher mit einem Konjugat aus ADMA, EDC und KLH erfolgte, machte eine Derivatisierung des ADMA für die Entwicklung eines ELISA notwendig. Zu allen Standards und Proben, die in dem ELISA eingesetzt werden sollten, wurde eine EDC-Lösung zugegeben und die Mischung für eine halbe Stunde inkubiert. Underivatisiertes ADMA wurde erwartungsgemäß von den untersuchten Antikörpern nicht erkannt.

Der erste Schritt bei der Entwicklung eines ELISA besteht immer in der Austitration einer geeigneten Antikörperverdünnung. Ich habe dabei eine Standardvorschrift mit einem weiten Konzentrationsbereich der verwendeten ADMA-Standards ( $0,1 \mu\text{M}$  bis  $100 \text{ mM}$ ) und einer konstanten Konzentration an Sekundärantikörper ( $1/2000$ ) verwendet. Die Variable war die Verdünnung des verwendeten Zellkulturüberstandes. Ich habe von den

verwendeten Zellkulturüberständen Verdünnungen in einem Bereich von 1/20 bis 1/1000 hergestellt und diese in einem ELISA nach der Standardvorschrift eingesetzt. Dabei hat sich ergeben, dass eine Verdünnung von 1/100 das beste Ergebnis erzielte. Bei der Verdünnung von 1/100 lag die ermittelte Standardkurve in einem Bereich von 0,3 bis 2,0 OD über einem Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 10 mM bei einer Messwellenlänge von 450 nm unter Verwendung von Tetramethylbenzidin als Reaktionspartner für die enzymatische Farbreaktion durch den Peroxidase-markierten Sekundärantikörper.

Die Standardkurve für den ELISA wurde mit der ermittelten Antikörperverdünnung für einen Konzentrationsbereich von 0,01 mM bis 10 mM ADMA erstellt (siehe Abbildung 42). Mit Hilfe der Standardkurve konnte nun die Kreuzreaktivität des Antikörpers 142D6-4E8, für den die Standardkurve entwickelt wurde, bestimmt werden. Um die Kreuzreaktivität zu bestimmen, wurde im ELISA das ADMA durch L-Arginin und SDMA, das biologisch inaktive Isomer von ADMA, ersetzt. Die Testmittelpunkte der drei so erhaltenen Standardkurven wurden zu einander ins Verhältnis gesetzt und die prozentuale Kreuzreaktivität berechnet. Zu L-Arginin ergab sich eine Kreuzreaktivität von 4,09% und zu SDMA von 100%.

Die physiologischen und pathophysiologischen ADMA-Konzentrationen liegen in einem Bereich von 0,4  $\mu\text{M}$  bis 4,2  $\mu\text{M}$  für Plasma (Böger RH. et al., 2003). Der Messbereich des von mir auf der Basis eines monoklonalen Antikörpers entwickelten ELISA endet allerdings bei 10  $\mu\text{M}$ . Dies führt leider dazu, dass der ELISA in der jetzigen Form nicht zur Bestimmung von ADMA-Konzentrationen in humanen Plasmaproben geeignet ist. Hier sind sicherlich noch weitere Arbeiten zur Optimierung der unteren Nachweisgrenze erforderlich. Das gleiche gilt für die Kreuzreaktivität des von mir entwickelten Assays.



**Abbildung 42** Standardkurve des ELISA auf der Basis des monoklonalen Antikörpers 142D6-4E8.

## 5.2. Entwicklung eines polyklonalen Antikörpers und eines ELISA daraus

Neben dem monoklonalen Antikörper wurde von mir in Zusammenarbeit mit der Firma DLD Diagnostika, Adlerhorst 15, Hamburg ein polyklonales Antiserum gegen ADMA entwickelt und auf dessen Basis ein weiterer ELISA zur Bestimmung von ADMA-Konzentrationen in humanen, tierischen und Zellkulturproben.

Die Immunisierung der Kaninchen und die Optimierung des ELISA für den Routineeinsatz wurde durch die Firma DLD vorgenommen. Im weiteren Verlauf wurde der ELISA von uns validiert. Dazu wurde von uns die Sensitivität, die Präzision und die Richtigkeit bestimmt. Der ELISA wurde mit GC-MS und LC-tandem MS verglichen.

Das von der Firma DLD entwickelte ADMA-Antiserum zeigte Kreuzreaktivitäten von 0,019% für L-Arginin und 1,2% für SDMA. L-Arginin liegt in menschlichem Plasma mit einer ungefähr 100-fach höheren Konzentration als ADMA vor. Die 0,019% Kreuzreaktivität des Antiserums zu L-Arginin wirkt sich mit einem 2%-igen Fehler auf das Ergebnis der ADMA-Messung aus. Die 1,2% Kreuzreaktivität des Antiserums zu SDMA wirkt sich mit 1,2% auf das Ergebnis einer ADMA-Messung aus, da ADMA und SDMA in annähernd gleichen Konzentrationen im Plasma vorliegen.

Die Standardkurve für den ELISA erstreckte sich über einen OD-Bereich von 0,4 bis 1,8 über einem Konzentrationsbereich von 0  $\mu\text{M}$  bis 5  $\mu\text{M}$  ADMA. Die untere Nachweisgrenze des ELISA lag bei 0,05  $\mu\text{M}$  ADMA. Sie liegt damit im unteren Bereich dessen, was für LC-tandem MS-Methoden publiziert wurde (Martens-Lobenhofer J. et al., 2003 und Vishwanatan K. et al., 2000). Die Nachweisgrenzen der beiden Methoden lagen bei 0,2  $\mu\text{M}$  und 0,05  $\mu\text{M}$ .

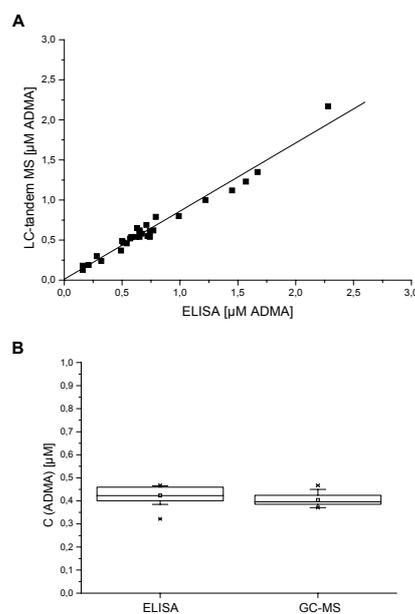
Der ELISA deckte damit den ganzen Konzentrationsbereich physiologisch und pathophysiologisch relevanter ADMA-Konzentrationen ab.

Nachdem der ELISA entwickelt worden war, wurde er von uns für die klinische Routine validiert. Als Maß für die Präzision der Methode wurden die Intraassay- und Interassay-Variabilität bestimmt. Die gefundenen Werte waren mit 7,5% für die Intraassay-Variabilität (n = 36) und 10,3% für die Interassay-Variabilität (n = 28) recht niedrig. Besonders, wenn man berücksichtigt, dass die Kreuzreaktivität mit ungefähr 3% eingeht.

Um die Richtigkeit der Methode zu bestimmen, wurden zum einen Standardadditionen und zum andere Standardverdünnungen erstellt und die ADMA-Konzentrationen bei diesen gemessen. Die Experimente wurden mit humanem Serum, Mausplasma und Rattenplasma

durchgeführt. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug für die humanen Proben 94,56% bei der Standardaddition und 91,17% für die Standardverdünnung. Für das Mäuseplasma betrugen die Werte 84,69% und 114,02%, für das Rattenplasma 80,72% und 100,36%. Diese Werte zeigten, dass der ELISA sowohl zur Messung von ADMA-Konzentrationen in humanen Proben, als auch in Proben von Mäusen und Ratten geeignet war. Das war uns besonders wichtig, da Mäuse und Ratten zu den bevorzugten Versuchstieren in der Pharmakologie gehören. In Proben von Kaninchen konnten keine ADMA-Konzentrationen gemessen werden, da das Antiserum im Kaninchen entwickelt worden war. In den Blutproben von Kaninchen sind Immunglobuline enthalten, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse durch Bindung des gegen Immunglobuline vom Kaninchen gerichteten Sekundärantikörpers geführt hätte.

Um den ELISA mit anderen Methoden zu vergleichen, wurde zum einen die ADMA-Konzentration in 29 humanen Serumproben sowohl mit dem ELISA als auch mittels LC-tandem MS gemessen und zum anderen wurde die ADMA-Konzentration in 15 Zellkulturüberständen mit ELISA und GC-MS gemessen. Die Messungen mittels LC-tandem MS wurden in einem Auftragslabor durchgeführt, die GC-MS-Messungen wurden nach einer von Albsmeier 2004 in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Methode durchgeführt. Die Messwerte des Vergleichs von ELISA und LC-tandem MS wurden mittels linearer Regression verglichen. Der Korrelationskoeffizient  $r$  betrug 0,984 ( $p < 0,0001$ ) (siehe Abbildung 43). Mit dem ELISA wurden geringfügig höhere ADMA-Konzentrationen gemessen, als mit der LC-tandem MS-Methode. Die Steigung der Regressionsgeraden betrug 0,85. Die Messwerte des Vergleichs von ELISA und GC-MS konnten nicht mittels linearer Regression ausgewertet werden. Die ADMA-Konzentrationen der einzelnen Zellkulturüberstände lagen zu dicht zusammen, um eine Regressionsgerade anlegen zu können. Aus den Messwerten wurde für jede Methode ein Mittelwert gebildet und die Mittelwerte wurden mit dem t-Test verglichen (siehe Abbildung 43). Die Normalverteilung



**Abbildung 43**

- A) Regression LC-tandem MS vs. ELISA (humane Serumproben)
- B) Vergleich GC-MS vs. ELISA (Zellkulturüberstand)

betrug 0,85. Die Messwerte des Vergleichs von ELISA und GC-MS konnten nicht mittels linearer Regression ausgewertet werden. Die ADMA-Konzentrationen der einzelnen Zellkulturüberstände lagen zu dicht zusammen, um eine Regressionsgerade anlegen zu können. Aus den Messwerten wurde für jede Methode ein Mittelwert gebildet und die Mittelwerte wurden mit dem t-Test verglichen (siehe Abbildung 43). Die Normalverteilung

der Messwerte war gegeben. Mit  $p = 0,14468$  waren die Mittelwerte nicht signifikant unterschiedlich. Wir konnten zeigen, dass der ELISA den etablierten Methoden äquivalente Ergebnisse liefert und sich für den Einsatz in der klinischen Routine eignet. Zusätzlich eignet sich der ELISA für die Arbeit mit Zellkulturen.

### **5.3. Messung einer klinischen Studie mit dem ELISA aus dem polyklonalen Antiserum**

Der auf der Basis des polyklonalen Antiserums entwickelte ELISA wurde in einer klinischen Studie zur Messung von ADMA-Konzentrationen bei 213 Patienten eingesetzt. Die Patienten hatten einen akuten Myokardinfarkt erlitten und wurden im Anschluss an die Akutversorgung mit Captopril oder Losartan behandelt. Die ADMA-Konzentration im Plasma der Patienten wurde zu Beginn der Studie und nach Ende des Follow-up von drei Jahren (im Media 27 Monate) gemessen. Die Endpunkte der Studie waren Tod, erneuter Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Reanimation. Zur Auswertung der Studie wurden die Patienten entsprechend ihrer Plasma-ADMA-Konzentration zu Beginn der Studie in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe bildeten die Patienten, deren ADMA-Konzentration unter dem Median lag. Die andere Gruppe bildeten die Patienten, deren ADMA-Konzentration über dem Median lag. In einer multivariaten Analyse wurden die beiden Gruppen hinsichtlich des Erreichens eines Endpunktes in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Diabetes, Hypercholesterinämie, Blutdruck, Raucher, BNP und CRP untersucht. Des Weiteren wurde untersucht, ob Losartan oder Captopril einen Einfluss auf die ADMA-Konzentration hatten.

Die Patienten der Gruppe mit einer Plasma-ADMA-Konzentration über dem Median zu Beginn der Studie hatten ein deutlich erhöhtes Risiko, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden (univariate hazard ratio 2,10 [95% CI 1,14 - 3,89];  $p = 0,018$ ) (siehe Tabelle 13).

	ADMA-Konzentration < Median	ADMA-Konzentration > Median
kombinierter Endpunkt	20,8%	35,5%
Tod / akuter Myokardinfarkt	17,9%	31,8%
Tod	10,4%	20,6%

**Tabelle 13** Vergleich der Häufigkeit des Auftretens der Endpunkte in den beiden Studiengruppen.

Nach statistischer Adjustierung des Risikos für das Erleiden eines kardiovaskulären Ereignisses für andere kardiovaskuläre Risikofaktoren (s.o.), war die Plasma-ADMA-Konzentration ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignis (adjusted hazard ratio 2,45 [95% CI 1,25 - 4,80]; p = 0,009).

Die Plasma-ADMA-Konzentration änderte sich im Lauf der Studie weder in der Captopril-Gruppe noch in der Losartan-Gruppe. Es bestand kein Unterschied in der Plasma-ADMA-Konzentration zwischen den Patienten, die mit Captopril behandelt wurden, zu denen, die mit Losartan behandelt wurden.

Autor	Patientenkollektiv	Dauer in Wochen	n	Wirkstoff	ADMA
Ito A. et al., 2001	Bluthochdruck	4	7	Perindopril	↓
		4	7	Losartan	↓
		4	7	Bisoprolol	=
Ito A. et al., 2002	NIDDM	4	11	Perindopril	↓
Delle C. et al., 2002	„mildly hypertensive“	1	20 cross over	Enalapril	↓
				Eprosartan	(↓)
Chen JW. et al., 2002	syndrom-x	8	10	Enalapril	↓
Napoli C. et al., 2004	Bluthochdruck	12	38	Zofenopril	↓
				Enalapril	(↓)

**Tabelle 14** Studien mit ACE-Inhibitoren und Effekten auf die ADMA-Konzentration.

Der Zusammenhang zwischen ADMA und dem Renin-Angiotensin-System ist nicht geklärt. Zum einen gibt es Studien, die für einen Zusammenhang sprechen, zum anderen gibt es Studien, die dagegen sprechen. Bei der Infusion von ADMA in NOS-defiziente Mäuse (NOS-ko) über vier Wochen via implantierter Minipumpe konnte beobachtet

werden, dass die gleichen vaskulären Läsionen entstanden wie bei den Wildtyp-Mäusen (wt). Dieser Effekt war also von einer ADMA-vermittelten NOS-Hemmung unabhängig. Eine Behandlung der NOS-ko Mäuse mit Temocapril oder Olmesartan während der Infusion verhinderte die Entstehung der vaskulären Läsionen (Suda O. et al., 2004). Zu dieser Arbeit ist jedoch anzumerken, dass die Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen zweifelhaft ist. Die Arbeitsgruppe konnte in den Wildtyp-Mäusen keine Hemmung der NO-Synthase durch ADMA zeigen. Dieser Effekt gilt jedoch als gesichert (Vallance P. et al., 1992). A. Ito hat in zwei Studien aus den Jahren 2001 und 2002 den Einfluss von Perindopril auf die ADMA-Konzentration bei Hypertonikern und Typ-II Diabetiker untersucht. Er fand, dass die ADMA-Konzentrationen seiner Probanden unter der Therapie mit Perindopril sanken. Die beiden Studien haben jedoch zwei methodische Einschränkungen. Zum einen war die Zahl der Probanden in den beiden Studien sehr gering ( $n = 7$  und  $n = 11$ ), zum anderen waren weder die Patienten noch die Ärzte verblindet. Der Kritikpunkt der sehr geringen Probandenzahlen gilt genauso für die Studien von C. Delle und JW Chen (siehe Tabelle 14). C. Napoli hat in 2004 eine Studie mit hypertensiven Patienten durchgeführt. Er untersuchte unter anderem den Effekt von Zofenopril und Enalapril im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf die ADMA-Konzentration der Patienten und ihre NOx-Konzentrationen im Plasma als Maß für die NO-Produktion. Die Zahl der Probanden in jeder Gruppe betrug 38. In der Studie wurde gefunden, dass Zofenopril und Enalapril die Plasma-ADMA-Konzentrationen der Patienten im Gegensatz zu Placebo senken und der Effekt von Zofenopril stärker war als der von Enalapril. Die Plasma-NOx-Konzentrationen der hypertensiven Patienten waren höher als die der gesunden Kontrollen. Dieser Befund ist sehr erstaunlich und steht im Widerspruch zu anderen publizierten Arbeiten (Camilletti A. et al, 2001; Pierdomenico SD. et al., 2002 und Lyamina NP. et al., 2003).

In einer anderen Studie wurde untersucht, ob die Infusion von ADMA bei Menschen einen akuten Effekt auf das Renin-Angiotensin-System hat. Gesunde Probanden ( $n = 12$ ) bekamen eine ADMA-Infusion und die Menge aktiven Renins im Plasma wurde gemessen und mit einer Placebo-Infusion verglichen. Die ADMA-Infusion hatte keinen Effekt auf das aktive Renin (Kielstein JT. et al., 2004b). Die von uns gefundenen Daten, dass die Therapie mit Captopril oder Losartan keinen Einfluss auf die Plasma-ADMA-Konzentrationen der Patienten hat, passen zu dem von JT Kielstein gefundenen Ergebnis. In unserer Studie befanden sich in der Captopril-Gruppe 108 Patienten und in der Losartan-Gruppe 105 Patienten. Die Studie war verblindet und die Beobachtungszeit lag im Median

bei 27 Monaten. Aus meiner Sicht spricht mehr dafür, dass ADMA nicht durch die Gabe von ACE-Inhibitoren oder AT<sub>1</sub>-Antagonisten beeinflusst wird.

Der zweite Befund unserer Studie war, dass Patienten mit einer Plasma-ADMA-Konzentration über dem Median ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse als solche mit einer Plasma-ADMA-Konzentration unter dem Median haben. Dieses Ergebnis passt genau zu drei anderen Veröffentlichungen, die bereits in anderen Patientenkollektiven zu einem äquivalenten Ergebnis gekommen waren (Lu TM. et al., 2003; Valkonen VP. et al., 2001 und Zoccali C. et al., 2001).

## 6. Zusammenfassung

Asymmetrisches Dimethyl-L-arginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der NO-Synthase. Es entsteht durch Freisetzung bei dem Abbau methylierter Proteine und wird entweder renal eliminiert oder durch das Enzym DDAH, abgebaut. Die Plasma-ADMA-Konzentrationen sind bei einer Reihe von Erkrankungen, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen, erhöht. Die endotheliale Dysfunktion zeichnet sich durch ein Missverhältnis von NO-Angebot und NO-Bedarf aus.

Bisher wurden ADMA-Konzentrationen in der Regel mittels HPLC bestimmt, was relativ zeitaufwändig und für größere klinische Studien zu langwierig ist. In den letzten drei Jahren wurden neben der HPLC auch Methoden mittels LC-tandem MS, GC-tandem MS und GC-MS entwickelt. Mit diesen Methoden lassen sich die Messungen zwar schneller und einfacher durchführen, die benötigten Geräte sind jedoch teuer und nicht überall verbreitet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine Methode zur Messung von ADMA-Konzentrationen auf der Basis eines immunologischen Nachweisverfahrens zu entwickeln.

Zu diesem Zweck wurden ein monoklonaler Antikörper und ein polyklonales Antiserum gegen ADMA entwickelt. Zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers wurden vier Balb/c-Mäuse mit einem ADMA-KLH-Konjugat immunisiert. Nach erfolgreicher Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entnommen und die B-Lymphozyten präpariert. Die B-Lymphozyten wurden mit Myelomzellen des gleichen genetischen Hintergrundes fusioniert und Hybridome etabliert. Aus den Hybridomen wurden durch ein Screening diejenigen herausgesucht, die einen gegen ADMA gerichteten Antikörper sezernierten. Aus diesen Hybridomen wurden diejenigen selektioniert, welche in einem stark vereinfachten Test auf Kreuzreaktivität eine bevorzugte Bindung an ein ADMA-BSA-Konjugat im Vergleich zu einem SDMA-BSA-Konjugat zeigten. Hier wurde das Hybridom 142D6 selektioniert und rekloniert. Aus dem Zellkulturüberstand des monoklonalen Hybridom 142D6-4E8 wurde ein ELISA entwickelt.

Parallel dazu wurde von der Firma DLD Diagnostika, Hamburg ein polyklonales Antiserum gegen ADMA im Kaninchen gezogen und aus dem Antiserum ein ELISA entwickelt. Dieser ELISA wurde von uns validiert. Zur Validierung wurden die Variation, die Richtigkeit und die Präzision bestimmt. Diese Validierungsschritte wurden für Proben von Mensch, Maus und Ratte durchgeführt. Der ELISA wurde im Anschluss mit LC-tandem MS und GC-MS verglichen. Für den LC-tandem MS-Vergleich wurden 29 humane

Serumproben sowohl mit dem ELISA als auch mit LC-tandem MS gemessen. Die Ergebnisse wurden mittels linearer Regression verglichen. Zum Vergleich von ELISA und GC-MS wurden 15 Zellkulturüberstände sowohl mit ELISA als auch mit GC-MS gemessen. Die Mittelwerte der mit den beiden Methoden erhobenen Werte wurden mittels t-Test verglichen, da die Spannweite der einzelnen Konzentrationen zu gering für einen Vergleich mittels linearer Regression waren. Im Ergebnis waren die mittels ELISA ermittelten Messwerte mit denen von LC-tandem MS und GC-MS vergleichbar.

Mit dem validierten ELISA auf der Basis des polyklonalen Antiserum wurden die ADMA-Konzentrationen im Rahmen einer klinischen Studie gemessen. 213 Patienten mit Zustand nach akutem Myokardinfarkt wurden entweder mit Captopril (n = 108) oder Losartan (n = 105) behandelt. Das „Follow-up“ betrug drei Jahre (Median 27 Monate). Die Plasma-ADMA-Konzentrationen wurden zu Beginn der Studie und am Ende des Follow-up gemessen. Endpunkte der Studie waren Tod, erneuter Myokardinfarkt, Schlaganfall und Reanimation. Die Auswertung der Studie ergab, dass die Plasma-ADMA-Konzentration zu Beginn der Studie ein prognostischer Faktor für das Auftreten eines der Endpunkte unabhängig von weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren war. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass eine Therapie mit Captopril oder Losartan keinen Einfluss auf die Plasma-ADMA-Konzentration hat.

## 7. Summary

Asymmetric Dimethyl-L-arginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of the NO-synthase. ADMA originates from the degradation of methylated proteins. ADMA is eliminated either by renal excretion or enzymatic degradation by DDAH. Plasma-ADMA-concentrations are elevated in diseases linked to endothelial dysfunction. The endothelial dysfunction is characterised by a disproportion between NO availability and NO demand.

So far, the determination of ADMA has been done by HPLC. This method is time consuming and therefore not optimal for the measurement of ADMA in clinical trials. In the last three years, several other methods have been developed, namely LC-tandem MS, GC-tandem MS and GC-MS. They are easier to perform and faster, but the equipment is expensive and not available in many laboratories. The aim of this work was to develop a simple assay for the determination of ADMA by an immunological method.

For this purpose a monoclonal antibody and a polyclonal antiserum were developed. To create the monoclonal antibody four Balb/c-mice were immunized with an ADMA-KLH-conjugate. After successful immunization, the mice were sacrificed and their spleen removed. The B-lymphocytes were isolated from the spleens and were fused with myeloma cells from the same genetic background. From these fusions several hybridoma cell lines were established. The hybridomas were screened for anti-ADMA antibody secreting cells. In a simplified test for cross reactivity, the hybridomas were tested in order to find out whether the secreted antibodies bind more strongly to an ADMA-BSA-conjugate than to a SDMA-BSA-conjugate. At this step the hybridoma 142D6 was isolated and recloned. The ELISA was developed with the cell culture supernatant of the clone 142D6-4E8.

In parallel a polyclonal antiserum against ADMA was raised from rabbits by DLD Diagnostika, Hamburg. DLD developed an ELISA from the antiserum which was validated by us. To validate the ELISA, we determined the variation, the precision and the accuracy. The validation was done for samples from human, mouse and rat. After the validation we compared the ELISA to LC-tandem MS and GC-MS. For the comparison with LC-tandem MS, we measured the ADMA-concentrations in 29 human subjects by LC-tandem MS and by ELISA. The results were compared by linear regression. For the comparison of the ELISA and GC-MS, we measured the ADMA-concentrations in 15 cell culture supernatants by ELISA and GC-MS. The mean of the results determined by each method were compared by t-test, because the range of ADMA concentrations was too low for a

comparison by linear regression. The result was that the ADMA-concentrations determined by the ELISA were comparable to those determined by LC-tandem MS and GC-MS.

The validated ELISA on the basis of the polyclonal antiserum was used to measure the ADMA concentrations in the plasma of patients who participated in a clinical trial. 213 patients with acute myocardial infarction received randomly either captopril or losartan for a follow-up period of three years (median 27 months). The plasma ADMA concentrations were measured at the beginning and at the end of the follow-up. The endpoints of the trial were death, reinfarction, stroke and resuscitation. The analysis of the data showed that the plasma ADMA concentration is a prognostic factor for cardiovascular events, independent from other cardiovascular risk factors. Furthermore, we were able to show that therapy with either captopril or losartan has no effect on the plasma ADMA concentration.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting-enzyme
ADMA	Asymmetrisches Dimethyl-L-arginin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
DA	Dalton
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EC <sub>50</sub>	Konzentration, die zum halbmaximalen Effekt führt
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDRF	endothelium derived relaxing factor
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
FKS	fötales Kälberserum
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-tandem MS	Gaschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HCAEC	human coronary arterial endothelial cell
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HPLC	high performance liquid chromatography
HT	Hypoxanthin, Thymidin
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Inhibitorkonzentration
Ig	Immunglobulin
kDA	Kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanin
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LC-tandem MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
LDL	low density lipoprotein

## Abkürzungsverzeichnis

---

LOD	limit of detection
MES	(2-(N-Morpholino)ethansulfon-säure
min	Minute
mol, mmol, $\mu$ mol	Mol, Millimol, Mikromol
n	Probenanzahl
NICI	negative-ion chemical ionization
NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-arginin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OD	Optische Dichte
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PBS	Phosphatpuffer
PEG	Polyethylenglycol
PFAA	Pentafluorpropionic acid anhydride
PPAR	Peroxisome proliferators-activated receptor
PRMT	Protein-Arginin-N-Methyl-Transferase
RIA	Radio-Immuno-Assay
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDMA	Symmetrisches Dimethyl-L-arginin
SIM	selected-ion monitoring
SPE	solid phase extraction
TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## 9. Literatur

- Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(8):1455-9
- Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Böger RH. Determination of NG,NG-dimethyl-L-Arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;809(1):59-65.
- Asagami T, Abbasi F, Stühlinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 2002;51(7):843-6
- Baldwin GS, Carnegie PR. Isolation and partial characterization of methylated arginines from the encephalitogenic basic protein of myelin. *Biochem J.* 1971;123:69-74
- Bech JN, Nielsen CB, Pedersen EB. Effects of systemic NO synthesis inhibition on RPF, GFR, UNa, and vasoactive hormones in healthy humans. *Am J Physiol.* 1996;270:F845-51.
- Behring EK. Ueber das Zustandekommen der Diphterie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Tieren. *Dtsch Med Wochenschr.* 1890;14:1113-1114
- Bennick A, Gron B, Brosstad F. Hybridomas can successfully be prepared from frozen/thawed spleen cells. *Hybridoma.* 1991;10(6):761-5
- Bode-Böger SM, Böger RH, Kienke S, Junker W, Frölich JC. Elevated L-Arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-Arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;219(2):598-603.

- Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(7):2287-95
- Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. 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.* 2000b;20(6):1557-64
- Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res.* 2000c;87(2):99-105
- Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (London).* 2001;100(2):161-7
- Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl.* 2003;4(4):23-8
- Boffa LC, Karn J, Vidali G, Allfrey VG. Distribution of NG, NG-dimethylarginine in nuclear protein fractions. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;74:969-76
- Bradford mM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254
- Calver A, Collier J, Leone A, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens.* 1993;7(2):193-4

- Camilletti A, Moretti N, Giacchetti G, Faloia E, Martarelli D, Mantero F, Mazzanti L. Decreased nitric oxide levels and increased calcium content in platelets of hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2001;14(4):382-6
- Causse E, Siri N, Arnal JF, Bayle C, Malatray P, Valdiguie P, Salvayre R, Couderc F. Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;741(1):77-783
- Chen BM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of N(G),N(G)-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;692(2):467-471
- Chen JW, Hsu NW, Wu TC, Lin SJ, Chang MS. Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition reduces plasma asymmetric dimethylarginine and improves endothelial nitric oxide bioavailability and coronary microvascular function in patients with syndrome X. *Am J Cardiol.* 2002;90(9):974-82
- Davidson RL. and Gerald PS. Induction of mammalian somatic cell hybridization by polyethylene glycol. *Meth. Cell Biol.* 1977;15:325-338
- Delles C, Schneider MP, John S, Gekle M, Schmieder RE. 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.* 2002;15(7):590-3
- Edelman GM, Gall WE, Waxdal MJ, Konigsberg WH. The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. I. Isolation and characterization of the whole molecule, the polypeptide chains, and the tryptic fragments. *Biochemistry.* 1968;7(5):1950-8
- Erlanger BF. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey. *Methods Enzymol.* 1980;70(A):85-104

- Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res.* 1999;43(3):532-41
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-6
- Garlick PJ, Waterlow JC, Swick RW. Measurement of protein turnover in rat liver. Analysis of the complex curve for decay of label in a mixture of proteins. *Biochem J* 1976;156:657-63
- Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, Frennd A, Shah V, Dillon MJ. Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens.* 1997;15(8):901-9
- Harlow E and Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual.* 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Herskovits TT. Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. *Comp Biochem Physiol B.* 1988;91(4):597-611
- Hewish DR, Werkmeister JA. The use of an electroporation apparatus for the production of murine hybridomas. *J Immunol Methods.* 1989;120(2):285-9
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(24):9265-9
- Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 1999;99(24):3092-5
- Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. *Jpn Circ J.* 2001;65(9):775-8

- Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circ J.* 2002;66(9):811-5
- Jang JJ, Ho HK, Kwan HH, Fajardo LF, Cooke JP. Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2000;102(12):1414-9
- Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of NG,NG- and NG,N'-G-dimethyl-L-Arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970;245:5751-8
- Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Schaffer J, Barbey M, Koch KM, Frölich JC. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(3):594-600
- Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Frölich JC, Hoepfer mM, Haller H, Fliser D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation.* 2004;109(2):172-7
- Kielstein JT, Simmel S, Bode-Böger SM, Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Haller H, Fliser D. Subpressor dose asymmetric dimethylarginine modulates renal function in humans through nitric oxide synthase inhibition. *Kidney Blood Press Res.* 2004b;27(3):143-7
- Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys.* 1993;300(2):657-62
- Kimoto M, Miyatake S, Sasagawa T, Yamashita H, Okita M, Oka T, Ogawa T, Tsuji H. Purification, cDNA cloning and expression of human NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Eur J Biochem.* 1998;258(2):863-8

- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994;298:249-58
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-7
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Biotechnology.* 1975;24:524-6
- Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J.* 1999;343:209-14
- Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2003;24(21):1912-9
- Lyamina NP, Dolotovskaya PV, Lyamina SV, Malyshev IY, Manukhina EB. Nitric oxide production and intensity of free radical processes in young men with high normal and hypertensive blood pressure. *Med Sci Monit.* 2003;9(7):CR304-10
- MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol.* 1996;119(8):1533-40
- MacAllister RJ, Rambašek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E. Concentration of dimethyl-L-Arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1996b;11(12):2449-52
- Markl J, Nour el Din M, Winter-Simanowski S, Simanowski UA. Specific IgG activity of sera from Egyptian schistosomiasis patients to keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften.* 1991;78(1):30-1

- Marusich MF. Efficient hybridoma production using previously frozen splenocytes. *J Immunol Methods*. 1988;114(1-2):155-9
- Marra M, Bonfigli AR, Testa R, Testa I, Gambini A, Coppa G. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Anal Biochem*. 2003;318(1):13-17
- Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003;798(2):231-239
- McDermott JR. Studies on the catabolism of NG-methylarginine, NG, NG-dimethylarginine and NG, N'-G-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976;154:179-84
- Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99(9):1141-6
- Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329(27):2002-12
- Nakajima T, Matsuoka Y, Kakimoto Y. Isolation and identification of N-G-monomethyl, N-G, N-G-dimethyl- and N-G,N'-G-dimethylarginine from the hydrolysate of proteins of bovine brain. *Biochim Biophys Acta*. 1971;230(2):212-22
- Napoli C, Sica V, de Nigris F, Pignalosa O, Condorelli M, Ignarro LJ, Liguori A. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am Heart J*. 2004;148(1):e5

- Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K. Metabolism of NG,NG-and NG,N'G-dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys.* 1987;252(2):526-37
- Osnai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension.* 2003;42:985-990
- Paik WK, Kim S. Protein methylase. I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem.* 1968;243:2108-14
- Paiva H, Lehtimäki T, Laakso J, Ruukonen I, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Laaksonen R. Plasma concentrations of asymmetric-dimethyl-L-Arginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. *Metabolism.* 2003;52(3):303-7
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-6
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-Arginine. *Nature.* 1988;333(6174):664-6
- Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 1999;43(3):509-20
- Peters JH, Baumgarten H. *Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung.* 1988 Springer, Heidelberg
- Pettersson A, Uggla L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;692(2):257-262
- Pierdomenico SD, Cipollone F, Lapenna D, Bucci A, Cuccurullo F, Mezzetti A. Endothelial function in sustained and white coat hypertension. *Am J Hypertens.* 2002;15(11):946-52

- Porter RR. The structure of antibodies. The basic pattern of the principal class of molecules that neutralize antigens (foreign substances in the body) is four cross-linked chains. This pattern is modified so that antibodies can fit different antigens. *Sci Am.* 1967;217(4):81-7
- Riede UN, Förstermann U, Drexler H. Inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(4):964-9
- Rittenberg MB, Amkraut AA. Immunogenicity of trinitrophenyl-hemocyanin: production of primary and secondary anti-hapten precipitins. *J Immunol.* 1966;97(3):421-30
- Schmitt JJ, Zimmermann U, Neil GA. Efficient generation of stable antibody forming hybridoma cells by electrofusion. *Hybridoma.* 1989;8(1):107-15
- Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 1994;78(6):931-6
- Strobach H. Kochbuch der immunologischen Analytik: Radioimmunoassay und verwandte Methoden. 1994 Thieme, Stuttgart, New York
- Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2001;104(21):2569-75
- Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA.* 2002;287(11):1420-6
- Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tasaki H, Ueno S, Nakata S, Tsujimoto T, Toyohira Y, Hayashida Y, Sasaguri Y, Ueta Y, Nakashima Y, Yanagihara N. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(9):1682-8

- Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int.* 1997;52(6):1593-601
- Trucco MM, Stocker JW, Caepellini R. Monoclonal antibodies against human lymphocyte antigens. *Nature.* 1978;273(5664):666-8.
- Tsikis D, Schubert B, Gutzki FM, Sandmann J, Frolich JC. 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.* 2003;798(1):87-99
- Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimaki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet.* 2001;358(9299):2127-8
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339(8793):572-5
- Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Bartlett mg. Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;748(1):157-166
- Xiong Y, Fu YF, Fu SH, Zhou HH. Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42(2):191-6
- Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science.* 1998;279(5348):234-7

Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169(5):1316-20

Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.* 1959;184(Suppl 21):1648-9

Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet.* 2001;358(9299):2113-7

## 10. Material

### 10.1. Substanzen

Alle Chemikalien waren von p.a.-Qualität, soweit nicht anders angegeben.

(2-(N-Morpholino)ethansulfon-säure (MES))	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma (Steinheim)
[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]L-Ornithin x HCl		Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid hydrochlorid (EDC)	R: 36/37/38 S: 26/28	Pierce (Rockford, USA)
2-Mercaptoethanol	R: 24-20/22-36/37-41 S: 26-36/37/39-45	Sigma (Steinheim)
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin-lösung (TMB-Lösung), Liquid Substrate Supersensitive <sup>®</sup>	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma (Steinheim)
Ameisensäure	R: 35 S: 23-26-45	Merck (Darmstadt)
Antikörpersubtyp-Assay: Sigma Immunotype <sup>®</sup>		Sigma (Steinheim)
Argon		Linde (Hannover)
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS <sup>3</sup> )	R: 36/37 S: 26	Pierce (Rockford, USA)

Material

---

Borsäure		Merck (Darmstadt)
Bradford-Reagenz	R: 34-20/21/22 S: 24-25-45-36/37/39	Bio-Rad (München)
Cyanogenbromid aktivierte Agarose	R: 26/27/28-32-50/53 S: 7-28-29-45-60-61	Sigma (Steinheim)
Dimethylaminlösung, 40%	R: 22-36/37/38 S: 26-36	Sigma (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Merck (Darmstadt)
Dinatriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )		Merck (Darmstadt)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)		Biochrom (Berlin)
Ethanol, 96%	R: 11 S: 7-16	Merck (Darmstadt)
Ether	R: 12/19/22/66/67 S: 9-16-29-33	Merck (Darmstadt)
Freundsches Adjuvans, inkomplett		Sigma (Steinheim)
Freundsches Adjuvans, komplett		Sigma (Steinheim)
Hämocyanin aus <i>Megathura crenulata</i> (keyhole limpet hemocyanin, KLH)		Sigma (Steinheim)
HAT-Supplement (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)	R: 61-20/21/22 S: 53-45	Biochrom (Berlin)

Material

---

HT-Supplement (Hypoxanthin, Thymidin)		Biochrom (Berlin)
Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (HFCS)		Roche (Mannheim)
ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L), Peroxidase Conjugated		Pierce (Rockford, USA)
Kälberserum, fötal		Gibco (Karlsruhe)
Kaliumhydroxid (KOH)	R: 22-35 S: 26-36/37/39-45	Merck (Darmstadt)
Kochsalzlösung, isoton		Baxter (Unterschleißheim)
Kupfercarbonat (CuCO <sub>3</sub> ), basisch	R: 22-36/37/38 S: 26-36	Aldrich (Steinheim)
L-Arginin		Sigma (Steinheim)
L-Homoarginin		Sigma (Steinheim)
Methanol	R: 11-23/24/25-39/23/24/25 S: 7-16-36/37-45	Merck (Darmstadt)
N,N'-Dimethyl-L-arginin (SDMA)		Sigma (Steinheim)
N,N-Dimethyl-L-arginin (ADMA)		Sigma (Steinheim)
Natriumhydroxid (NaOH)	R: 35 S: 26-37/39-45	Merck (Darmstadt)

Material

---

Natriumchlorid (NaCl)		J. T. Baker (Deventer, NL)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )		Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )		Merck (Darmstadt)
ortho-Phthaldialdehyd (OPA)	R: 20/21/22-36/37/38 S: 26-36	Sigma (Steinheim)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) 10.000 IE / 10.000 µg/ml		Biochrom (Berlin)
Phenol	R: 24/25-34 S: 28.6-45	Merck (Darmstadt)
Phosphate bufferd saline (PBS) (Pulver zum auflösen)		Biochrom (Berlin)
Polyethylenglycol Mr 1450, 50% in PBS (Hybri-Max <sup>®</sup> )		Sigma (Steinheim)
Proteinstandard (Broad Range)		Bio-Rad (München)
Protein A Antibody Purification Kit		Sigma (Steinheim)
Rinder Serumalbumin (BSA)		Serva (Heidelberg)
RPMI 1640 Zellkulturmedium		Biochrom (Berlin)
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	R: 35 S: 26-30-45	Merck (Darmstadt)

Stickstoff, flüssig		Linde (Hannover)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma (Steinheim)
Trypanblau	R: 45 S: 53/45	Sigma (Steinheim)
Tween 20		Sigma (Steinheim)
Wasser, doppelt destilliert (Aqua Aqua bidest.)		aus der eigenen Wasseraufbereitungsanlage Millipore (Schwalbach)
Zitronensäure, wasserfrei	R: 36 S: 26	Merck (Darmstadt)

## 10.2. Zellkulturmedien

### *DMEM*

### *Einfriermedium*

RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 10% DMSO

### *Selektionsmedium*

RPMI 1640 mit HFCS, HAT, Pen/Strep

### *Zellkulturmedium*

RPMI 1640 mit 10% FKS

### *Propagiermedium*

RPMI 1640 mit 20% FKS und HAT

## 10.3. Puffer und Lösungen

### 10.3.1. HPLC

#### Eluent A

Zitronensäure, wasserfrei		11,52 g
Aqua bidest.	ad	1000 ml
mit NaOH 2 M auf pH 6,8 einstellen		
Aqua bidest.	ad	1200 ml
Methanol		600 ml

#### Eluent B

900 ml Methanol  
100 ml Aqua bidest.

#### Ortho-Phthaldialdehyd (OPA)-Reagenz

ortho-Phthaldialdehyd (OPA)		135 mg
Methanol		2,5 ml
2-Mercaptoethanol		100 µl
0,4 M Boratpuffer	ad	25 ml

#### 0,4 M Boratpuffer

Borsäure		0,742 g
Aqua bidest.		20 ml
mit 2 M NaOH auf pH 8,5 einstellen		
Aqua bidest	ad	30 ml

### 10.3.2. andere Puffer

#### MES-Puffer für die Antigenkopplung

(0,1 M MES; 0,9 M NaCL; pH 4,7)

MES		1,95 g
NaCL		14,26 g
Aqua bidest.		80 ml
pH auf 4,7 mit NaOH 0,1 N einstellen		
Aqua bidest.	ad	100,0 ml

#### PBS-Puffer

PBS (Biochrom) wird nach Herstellerangaben in Aqua bidest. gelöst

#### Kopplungspuffer

(20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,15 M NaCL; pH 7,5)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		284 mg
NaCL		878 mg
Aqua bidest.		80 ml
auf pH 7,5 einstellen		
Aqua bidest	ad	100,0 ml

#### Beschichtungspuffer

(0,2 M Na-Carbonat; pH 9,4 – 9,7)

2,12 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 100 ml Aqua bidest. lösen

1,68 g NaHCO<sub>3</sub> in 100 ml Aqua bidest. lösen

74 ml Lösung 1. mit ~26 ml Lösung 2. auf pH 9,4 – 9,7 einstellen

#### Waschpuffer

(0,9% NaCl; 0,1% Tween 20)

NaCl		9 g
Tween 20		1 ml
Aqua bidest	ad	1000 ml

Stammlösung für Blockpuffer und Verdünnungspuffer

(50 mM Tris-HCL; 150 mM NaCl; pH 7,5)

Tris-HCl		6,06 g
NaCl		8,77 g
Aqua bidest		800 ml
mit HCl 2 M auf pH 7,5 einstellen		
Aqua bidest.	ad	1000 ml

Blockpuffer

(50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1% Rinderserum Albumin (BSA); pH 7,5)

BSA		1 g
Stammlösung	ad	100 ml

Verdünnungspuffer

(50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,5% BSA; 0,05% Tween 20; pH 7,5)

BSA		0,5 g
Tween 20		50 µl
Stammlösung	ad	100 ml

## 10.4. Tiere

Balb/C Mäuse, sechs Wochen alt, weiblich

Tierversuchshaltung UKE

## 10.5. Zellen

P3X63Ag8.653 (X63AG8)

ATCC (Manassas, VA, USA)

## 10.6. Serum- und Plasmaproben

Die Serum- und Plasmaproben von Menschen stammten von gesunden freiwilligen Probanden und wurden im Lauf von genehmigten klinischen Studien genommen. Proben von Mäusen und Ratten wurden im Einklang mit den tierschutzrechtlichen Bestimmungen im Rahmen von Versuchen gewonnen.

Die klinische Studie, in deren Rahmen ADMA-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt wurden, war durch die örtlichen Ethikkommissionen im Einklang mit den einschlägigen rechtlichen Bestimmungen und der Deklaration von Helsinki genehmigt worden.

## 10.7. Verbrauchsmaterial

24-Well-Zellkulturschalen	Becton Dickinson (Heidelberg)
96-Well-Mikrotiterplatten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
96-Well-Zellkulturschalen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Autosamplergefäße mit Rundboden, Chromacol (HPLC)	Abimed (Langenfeld)
Autosamplergefäße mit Bördelverschluss (GC-MS)	GC-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)
Autosamplergefäße mit Schnappdeckelverschluss(GC-MS)	GC-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)
Bördelkappen mit geschlitztem Deckel (HPLC)	Macherey-Nagel (Düren)

Material

---

Eppendorfggefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Röhrchen (15, 50 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
HPLC-Säule: CC 250/4 Nucleosil 100-5 C6H6	Macherey-Nagel (Düren)
HPLC-Vorsäule: CC 8/4 Nucleosil 100-5-C6H6	Macherey-Nagel (Düren)
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)
Pasteurpipetten	Brand GmbH (Wertheim)
PP-Röhrchen (5 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Präparationsbesteck	VWR International (Darmstadt)
Rührspatel 120mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten (1, 2, 10, 25 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Slide-A-Lyzer <sup>®</sup> Dialysekassette (MWCO 10,000, 0,5- 3ml, 3-15 ml)	Pierce (Rockford, USA)
Spritzen	B.Braun (Melsungen)
Sterican <sup>®</sup> -Kanülen	B.Braun (Melsungen)

Sterilfilter (0,22, 0,45 $\mu$ M)	Merck (Darmstadt)
Zellkulturflaschen 80 cm <sup>2</sup>	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturschale (Ø 10 cm)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Zellkulturschalen (35 x 10 mM, 60 x 10 mM)	Greiner (Frickenhausen)

## 10.8. Geräte

8-Kanalpipette	Eppendorf (Hamburg)
Analysenwaage	Mettler (Greifensee, CH)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Chromabond Vakuumkammer	Macherey-Nagel (Düren)
Digitalwaage	Mettler (Greifensee, CH)
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, -80 °C)	Kryotec (Hamburg)

Material

---

Magnetrührer	Heidolph (Kelheim)
Mikroskop, Axiovert HBO 50	Zeiss (Jena)
Mikrotiterplatten Photometer	Tecan (Gröding/Salzburg, A)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Photometer	Perkin Elmer (Palo Alto, USA)
Pipettus Accu-jet	Eppendorf (Hamburg)
Reinraumwerkbank LaminAir HB 2448	Heraeus (Hanau)
Speed-Vac RVC 2-25	Christ (Osterode)
Thermoblock Telex Bioblock 890436 F	Bioblock Scientific (Illkirch Cedex, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
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)

## 11. Lebenslauf

Name: Friedrich Schulze

Geburtsdatum: 7. Juli 1974

Geburtsort: Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Schulbildung: 1980 - 1984 Grundschule Marbach, Marburg  
 1984 - 1990 Gymnasium Philippinum, Marburg  
 1990 - 1993 Hollenberggymnasium, Waldbröl

Wehrdienst: 1993 - 1994 Wachbatallion, Siegburg

Studium: 1994 - 1999 Freie Universität Berlin  
 Fachbereich Pharmazie  
 03/1997 1. Staatsexamen  
 06/1999 2. Staatsexamen

Praktische Ausbildung: 07/1999 - 12/1999 Schering AG, Berlin  
 01/2000 - 06/2000 Seydlitz-Apotheke, Berlin  
 08/2000 3. Staatsexamen

Berufstätigkeit: 09/2000 - 03/2001 Marktapotheke am Harburger Ring,  
 Hamburg  
 03/2001 - 12/2002 Goldbek-Apotheke, Hamburg

Promotion: 09/2000 - 09/2004 Institut für Experimentelle und Klinische  
 Pharmakologie,  
 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
 Arbeitsgruppe Klinische Pharmakologie

## 12. Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Originalarbeiten

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH.  
Determination of ADMA using a novel ELISA assay. Clin Chem Lab Med. in press

Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Böger RH. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;809(1):59-65.

und Kongressbeiträgen veröffentlicht:

Schulze F, Schwedhelm E, Maas R, Benndorf R, Steenpass A, Silberhorn L, Böger RH.  
Measurement of asymmetric dimethylarginine by a novel, specific enzyme immunoassay. First joint French-German NO Meeting. Straßburg, 2-4 Oktober 2003

Schulze F, Schwedhelm E, Albsmeier J, Böger RH. Development of a new enzymatic immunoassay for the determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA). ADMA: An Emerging Cardiovascular Risk Factor, 2nd International Symposium. New Orleans, 6. November 2004

### **13. Erklärung**

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

Entwicklung und Validierung immunologischer Nachweisverfahren für asymmetrisches Dimethyl-L-arginin (ADMA)

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 verwendet habe.

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

Hamburg, den 02.12.04

Schulze

## 14. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Scholz und Herrn Prof. Dr. T. Eschenhagen danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie diese Arbeit anfertigen zu können.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R.H. Böger für die Überlassung des Themas und für die umfassende und kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit, die ständige Bereitschaft, kritisch und helfend die verschiedenen Aspekte dieser Arbeit zu diskutieren, die tatkräftige Unterstützung und Förderung der Publikationen und Kongressbeiträge und nicht zuletzt für die schnelle Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.J. Duchstein möchte ich für Vertretung dieser Arbeit gegenüber dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg und die interessanten neuen Anregungen aus dem von ihm regelmäßig veranstalteten Kolloquium danken.

Besonders möchte ich Anna Steenpaß, Mariola Kastner, Elisabeth Silberhorn, Cornelia Wörmann, Jennifer Albsmeier, Renke Maas, Edzard Schwedhelm und allen nicht namentlich genannten Institutsmitgliedern für das hervorragende Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft danken. Frau Jennifer Albsmeier danke ich besonders für die GC-MS-Messungen der Zellkulturüberstände bei der Validierung des ELISA, Herrn Dr. Renke Maas für die Auswertung der klinischen Studie und Herrn Dr. Schwedhelm für seine Hilfsbereitschaft bei jeglicher Art von Fragestellungen.

Die Arbeit wurde in Teilen durch den Forschungsförderungsfonds des Fachbereiches Medizin des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf (F-120-1) unterstützt.

Besonders danke ich meiner Frau und meiner Tochter dafür, dass sie mich zu jeder Zeit uneingeschränkt unterstützt haben.