

Substituierte L-Arginin-Derivate als Modulatoren des Stickstoffmonoxid- generierenden Systems



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Jürke Kotthaus

Kiel 2008

Referent:	Prof. Dr. B. Clement
Korreferent:	Prof. Dr. E. Beitz
Tag der mündlichen Prüfung:	28. November 2008
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 10. Januar 2009

Prof. Dr. L. Kipp
(Dekan)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XII
Verzeichnis getesteter Verbindungen	XV

1 Einleitung

1.1 Stickstoffmonoxid	1
1.1.1 Wirkung von NO im kardiovaskulären System	2
1.1.2 Wirkung von NO im Nervensystem	4
1.1.3 Wirkung von NO im Immunsystem	4
1.2 L-Arginin	5
1.3 Enzyme des Stickstoffmonoxid-Stoffwechsels	6
1.3.1 NO-Synthase	7
1.3.2 Protein-Arginin-Methyltransferasen	11
1.3.3 Arginase	13
1.3.4 Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase	15
1.4 <i>N</i> ^ω -methylierte L-Arginine und das „L-Arginin Paradoxon“	17
1.5 Modulatoren des NO-generierenden Systems	20
1.5.1 Modulatoren der NO-Synthase	20
1.5.1.1 Therapeutische Bedeutung	20
1.5.1.2 Bekannte NOS-Substrate	21
1.5.1.3 Bekannte NOS-Inhibitoren	22
1.5.2 Modulatoren der Arginase	24
1.5.2.1 Therapeutische Bedeutung	24
1.5.2.2 Bekannte Arginase-Inhibitoren	25
1.5.3 Modulatoren der DDAH	27
1.5.3.1 Therapeutische Bedeutung	27
1.5.3.2 Bekannte DDAH-Inhibitoren	28

1.6	<i>N</i> ^ϕ -Methyl-L-arginin	29
1.7	Zielsetzung der Arbeit	30
2	Untersuchungen an rekombinanten humanen NO-Synthasen	
2.1	Einleitung und Zielsetzung	33
2.2	Materialien und Methoden	34
2.2.1	Materialien	34
2.2.1.1	Chemikalien	34
2.2.1.2	Geräte	34
2.2.1.3	Enzyme	35
2.2.2	Analytische Methoden	35
2.2.2.1	Nitrit-Assay (Griess-Reaktion)	35
2.2.2.2	Kalibrierung und Wiederfindung Nitrit-Assay	35
2.2.2.3	HPLC-Methode	36
2.2.2.4	Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode	38
2.2.2.5	LC/MS-Analytik	38
2.2.3	Biochemische Methoden	40
2.2.3.1	Hemmstudien mit humanen NOS-Isoenzymen	40
2.2.3.1.1	<i>In vitro</i> eNOS-Assay	40
2.2.3.1.2	<i>In vitro</i> iNOS-Assay	40
2.2.3.1.3	<i>In vitro</i> nNOS-Assay	41
2.2.3.2	Assay Validierung für Substratstudien	41
2.2.3.2.1	Proteinabhängigkeit der nNOS-Katalyse	41
2.2.3.2.2	Proteinabhängigkeit der eNOS-Katalyse	41
2.2.3.3	Aktivitätsverlust durch einen Einfrier- / Auftau-Zyklus	41
2.2.3.4	Substratstudien mit humanen NOS-Isoenzymen	42
2.3	Ergebnisse & Diskussion	43
2.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung Nitrit-Assay	43
2.3.2	Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode	43

2.3.3	Hemmstudien mit humanen NOS-Isoenzymen	45
2.3.4	Assay Validierung für Substratstudien	48
2.3.4.1	Proteinabhängigkeit der nNOS-Katalyse	48
2.3.4.2	Proteinabhängigkeit der eNOS-Katalyse	48
2.3.4.3	Aktivitätsverlust durch einen Einfrier- / Auftau-Zyklus	49
2.3.5	Substratstudien mit humanen NOS-Isoenzymen	50
2.3.5.1	Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin	50
2.3.5.2	Substratstudien mit N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin	54
2.4	Zusammenfassung	60

3 Untersuchungen an boviner Arginase

3.1	Einleitung und Zielsetzung	62
3.2	Materialien und Methoden	63
3.2.1	Materialien	63
3.2.1.1	Chemikalien	63
3.2.1.2	Geräte	63
3.2.1.3	Enzym	63
3.2.2	Analytische Methoden	64
3.2.2.1	HPLC-Methode	64
3.2.2.2	Kalibrierung und Wiederfindung	65
3.2.3	Biochemische Methoden	66
3.2.3.1	Substratstudien mit boviner Arginase	66
3.2.3.2	Assay Validierung für Hemmstudien	66
3.2.3.2.1	Bestimmung der einzusetzenden Enzymmenge	66
3.2.3.2.2	Bestimmung der einzusetzenden L-Arginin-Konzentration	67
3.2.3.3	K_m -Wert Bestimmung	67
3.2.3.4	Hemmstudien mit boviner Arginase	67
3.2.3.5	K_i -Wert Bestimmung	68

3.3	Ergebnisse & Diskussion	69
3.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode	69
3.3.2	Substratstudien mit boviner Arginase	70
3.3.3	Assay-Validierung für Hemmstudien	70
3.3.3.1	Bestimmung der einzusetzenden Enzymmenge	70
3.3.3.2	Bestimmung der einzusetzenden L-Arginin-Konzentration	73
3.3.4	K_m -Wert Bestimmung	74
3.3.5	Hemmstudien mit boviner Arginase	75
3.3.5.1	Hemmstudien mit N^δ -Methyl-D,L-arginin	75
3.3.5.2	Hemmstudien mit N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin	76
3.4	Zusammenfassung	82

4 Reduktion von N^ω -Hydroxy-L-arginin und N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin

4.1	Einleitung und Zielsetzung	83
4.2	Materialien und Methoden	84
4.2.1	Materialien	84
4.2.1.1	Chemikalien	84
4.2.1.2	Geräte	85
4.2.1.3	Enzyme	85
4.2.1.3.1	Gewinnung von Schweinelebermikrosomen	85
4.2.1.3.2	Gewinnung von Schweinelebermitochondrien	86
4.2.1.3.3	Isolierung der mikrosomalen NADH Cytochrom b_5 Reduktase	86
4.2.1.3.4	Isolierung des mikrosomalen Cytochrom b_5	86
4.2.1.3.5	Gewinnung der äußeren Mitochondrienmembran (OMV)	86
4.2.2	Analytische Methoden	87
4.2.2.1	HPLC-Methode	87
4.2.2.2	Kalibrierung und Wiederfindung	89

4.2.3	Biochemische Methoden	89
4.2.3.1	<i>In vitro</i> Reduktions-Assay: Mikrosomen / Mitochondrien / OMV	89
4.2.3.2	<i>In vitro</i> Reduktions-Assay: hmARC-Isoenzyme	90
4.3	Ergebnisse & Diskussion	90
4.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode	90
4.3.2	Reduktion durch Mikrosomen, Mitochondrien und der äußeren Mitochondrienmembran	92
4.3.3	Reduktion durch humane mARC-Isoenzyme	94
4.4	Zusammenfassung	97

5 Untersuchungen mit flavinhaltigen Monooxygenasen

5.1	Einleitung und Zielsetzung	98
5.2	Materialien und Methoden	101
5.2.1	Materialien	101
5.2.1.1	Chemikalien	101
5.2.1.2	Geräte	101
5.2.1.3	Enzyme	102
5.2.2	Analytische Methoden	102
5.2.2.1	HPLC-Methode: Methyl-(<i>p</i> -tolyl)sulfid	102
5.2.2.2	HPLC-Methode: 8-DPT	103
5.2.2.3	HPLC-Methode: L-Arginin-Derivate	103
5.2.2.4	Kalibrierung und Wiederfindung	104
5.2.2.5	LC/MS Methode	105
5.2.3	Biochemische Methoden	106
5.2.3.1	Muriner FMO1-Assay	106
5.2.3.2	Humaner FMO3-Assay	106
5.2.3.3	Humaner FMO5-Assay	106
5.2.3.4	Muriner FMO5-Assay	107

5.3	Ergebnisse & Diskussion	107
5.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode: L-Arginin-Derivate	107
5.3.2	Substratstudien mit FMOs	108
5.3.2.1	Inkubationen mit muriner FMO1	109
5.3.2.1.1	Substratstudien mit L-Arginin	109
5.3.2.1.2	Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin	110
5.3.2.2	Inkubationen mit humaner FMO3	110
5.3.2.2.1	Inkubationen mit L-Arginin	110
5.3.2.2.2	Inkubationen mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin	110
5.3.2.3	Inkubationen mit humaner FMO5	110
5.3.2.3.1	Substratstudien mit L-Arginin	110
5.3.2.3.2	Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin	111
5.3.2.4	Inkubationen mit muriner FMO5	111
5.3.2.4.1	Substratstudien mit L-Arginin	111
5.3.2.4.2	Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin	112
5.3.3	Beurteilung der Ergebnisse	112
5.4	Zusammenfassung	113
6	Hemmstudien mit PRMT1	
6.1	Einleitung und Zielsetzung	114
6.2	Materialien und Methoden	114
6.3	Ergebnisse & Diskussion	115
7	Rekombinante Expression humaner DDAH	
7.1	Einleitung und Zielsetzung	116
7.2	Materialien & Methoden	117
7.2.1	Materialien	117
7.2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Kits	117

7.2.1.2	Geräte	118
7.2.1.3	Oligonukleotide	119
7.2.1.4	DNA-Sequenzen der humanen DDAHs	120
7.2.1.5	Vektoren	122
7.2.1.6	Puffer & Lösungen	125
7.2.2	Analytische Methoden	127
7.2.2.1	HPLC-Methode	127
7.2.2.2	Kalibrierung und Wiederfindung	128
7.2.3	Methoden	129
7.2.3.1	Plasmid-DNA Isolierung (Miniprep)	129
7.2.3.2	Agarosegelelektrophorese	129
7.2.3.3	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	129
7.2.3.4	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	130
7.2.3.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	130
7.2.3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	131
7.2.3.7	Annealing von DNA-Einzelsträngen	132
7.2.3.8	Ligation von DNA	132
7.2.3.9	Herstellung von kompetenten Zellen	133
7.2.3.10	Transformation in <i>E. Coli</i>	133
7.2.3.11	Schnelltransformation von <i>E. Coli</i>	134
7.2.3.12	Verwendete Antibiotika-Endkonzentrationen	134
7.2.3.13	Anlegen von Dauerkulturen	134
7.2.3.14	DNA-Sequenzierung	134
7.2.3.15	Enzym-Expression	135
7.2.3.15.1	Expression der hDDAH-1	135
7.2.3.15.2	Expression der hDDAH-2	136
7.2.3.16	Herstellung: Säuregewaschene Glaskugeln	136
7.2.3.17	Zell-Lyse	136
7.2.3.18	Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatographie	137
7.2.3.18.1	Aufreinigung der hDDAH-1	137

7.2.3.18.2	Aufreinigung der hDDAH-2	138
7.2.3.19	Bestimmung des Proteingehaltes	138
7.2.3.20	SDS-PAGE	139
7.2.3.21	Western Blot	139
7.2.3.22	Aktivitäts-Assay	140
7.2.3.22.1	hDDAH-1 Aktivitäts-Assay	140
7.2.3.22.2	hDDAH-2 Aktivitäts-Assay	140
7.3	Ergebnisse & Diskussion	141
7.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode	141
7.3.2	Rekombinante Expression humaner DDAH-1	142
7.3.2.1	Klonierung der humanen DDAH-1	142
7.3.2.2	Expression der humanen DDAH-1	144
7.3.2.3	Aufreinigung der exprimierten humanen DDAH-1	145
7.3.2.4	Bestimmung des Proteingehaltes	148
7.3.2.5	Aktivitätsnachweis der humanen DDAH-1	148
7.3.3	Rekombinante Expression humaner DDAH-2	149
7.3.3.1	Klonierung der humanen DDAH-2	149
7.3.3.2	Expression und Aufreinigung der humanen DDAH-2	150
7.3.3.3	Western Blot	151
7.3.3.4	Aktivitäts-Assay der humanen DDAH-2	151
7.4	Zusammenfassung	153
8	Untersuchungen mit rekombinanter humaner DDAH-1	
8.1	Einleitung und Zielsetzung	155
8.2	Materialien und Methoden	156
8.2.1	Materialien	156
8.2.1.1	Chemikalien	156
8.2.1.2	Geräte	156
8.2.1.3	Enzyme	156

8.2.2	HPLC-Methode	156
8.2.3	Biochemische Methoden	157
8.2.3.1	Assay-Validierung	157
8.2.3.1.1	Untersuchung der pH-Abhängigkeit der hDDAH-1-Katalyse	157
8.2.3.1.2	Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge	157
8.2.3.1.3	Zeitabhängigkeit der Umsetzung	157
8.2.3.2	K_m -Wert Bestimmung	158
8.2.3.3	Hemmstudien mit N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivaten	158
8.2.3.4	Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin	158
8.3	Ergebnisse & Diskussion	159
8.3.1	Assay-Validierung	159
8.3.1.1	Untersuchung der pH-Abhängigkeit der hDDAH-1-Katalyse	159
8.3.1.2	Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge	160
8.3.1.3	Zeitabhängigkeit der Umsetzung	161
8.3.2	K_m -Wert Bestimmung	162
8.3.3	Hemmstudien mit N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivaten	163
8.3.4	Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin	167
8.4	Zusammenfassung	169
9	Entwicklung von Inhibitoren für die humane DDAH-1	
<hr/>		
9.1	Einleitung und Zielsetzung	170
9.2	Materialien und Methoden	173
9.2.1	Materialien	173
9.2.1.1	Chemikalien	173
9.2.1.2	Geräte	173
9.2.1.3	Enzyme	174
9.2.2	Analytische Methoden	174
9.2.2.1	HPLC-Methode	174

9.2.2.2	Kolorimetrischer Citrullin Plattenreader-Assay	175
9.2.2.2.1	Derivatisierung	175
9.2.2.2.2	Bestimmung des Absorptionsmaximums	175
9.2.2.2.3	Nichtenzymatische Hydrolyse von NMMA	175
9.2.2.2.4	Kalibrierung und Wiederfindung	176
9.2.3	Biochemische Methoden	176
9.2.3.1	Hemmstudien mit humaner DDAH-1	176
9.2.3.1.1	<i>In vitro</i> hDDAH-1-Assay (HPLC)	176
9.2.3.1.2	IC ₅₀ -Wert Bestimmung (Plattenreader-Assay)	176
9.2.3.1.3	K _i -Wert Bestimmung (Plattenreader-Assay)	177
9.2.3.1.4	K _m -Wert Bestimmung (Plattenreader-Assay)	177
9.2.3.2	<i>In vitro</i> NOS-Assay	178
9.3	Ergebnisse & Diskussion	179
9.3.1	Validierung des Plattenreader-Assays	179
9.3.1.1	Bestimmung des Absorptionsmaximums	180
9.3.1.2	Nichtenzymatische Hydrolyse von NMMA	180
9.3.1.3	Kalibrierung und Wiederfindung	181
9.3.2	Hemmstudien mit humaner DDAH-1	182
9.3.2.1	Guanidine	184
9.3.2.2	Benzamidine	186
9.3.2.3	NO-Synthase- und Arginase-Inhibitoren	187
9.3.2.4	Pyrido[1,2-a]pyrimidine / Butyrophenone	188
9.3.2.5	Indolthiobarbitursäure-Derivate	190
9.3.2.6	N ^δ -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivate	192
9.3.2.6.1	Hemmung der hDDAH-1	192
9.3.2.6.2	Hemmung der NOS-Isoenzyme	194
9.3.2.7	N ^ω -substituierte L-Arginin-Derivate	195
9.3.2.7.1	Hemmung der hDDAH-1	195
9.3.2.7.2	Hemmung der NOS-Isoenzyme	198

9.3.2.8	<i>N</i> -(2-Methoxyethyl)guanidine	199
9.3.2.8.1	Hemmung der hDDAH-1	199
9.3.2.8.2	Hemmung der NOS-Isoenzyme	202
9.3.2.9	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)but-3-enamidin	203
9.3.2.9.1	Hemmung der hDDAH-1	203
9.3.2.9.2	Hemmung der NOS-Isoenzyme	204
9.3.3	Substratstudien mit humaner DDAH-1	205
9.4	Zusammenfassung und Ausblick	208
10	Zusammenfassung und Ausblick	211

11	Literatur	216
-----------	------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis

8-DPT	10-(<i>N,N</i> -Dimethylaminooktyl)phenothiazin
Ach	Acetylcholin
ADMA	Asymmetrisches <i>N</i> ^ω , <i>N</i> ^ω -Dimethyl-L-arginin
ADP	Adenosindiphosphat
AdoHcy	<i>S</i> -Adenosyl- <i>homo</i> -L-cystein
AdoMet	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
Arg	L-Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BamHI	Restriktionsendonuklease aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Cit	L-Citrullin
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
H ₄ B	Tetrahydrobiopterin
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N</i> '-2-ethansulfonsäure
HindIII	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus influenza</i>
hnRNPs	heterogene nukleäre Ribonukleoproteine
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase)
IC ₅₀	Konzentration für eine halbmaximale Hemmung
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP Kinase Substrat

K_i	Konstante für die Affinität eines kompetitiven Inhibitors zum Enzym
K_{iu}	Konstante für die Affinität eines unkompetitiven Inhibitors zum Enzym
K_m	Michaelis Konstante
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
mARC	Mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (<i>mitochondrial amidoxime reducing component</i>)
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MW	Mittelwert
NADH	β -Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	β -Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NANC	Nichtadrenerg-nichtcholinerg (nitreg)
NMMA	N^ω -Monomethyl-L-arginin
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOHA	N^ω -Hydroxy-L-arginin
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
OD ₆₀₀	Absorption gemessen bei 600 nm
OMV	Äußere Mitochondrienmembran (<i>outer membrane vesicles</i>)
α -PA	α -Phthaldialdehyd
PAD	Peptidyl-Arginin-Deiminase
PaDDAH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIPES	Piperazin- N,N -bis-(2-ethansulfonsäure)
PKG	Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
Rmt2	Hefe Protein-Arginin-Methyltransferase
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDMA	Symmetrisches $N^\omega, N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin
SDS	Natriumlaurylsulfat
sGC	Lösliche Guanylatcyclase
SL	Schweineleber
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Acetat-EDTA Elektrophorese-Puffer

Abkürzungsverzeichnis

TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V_{\max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
(v/v)	Volumenprozent pro Volumen
(w/v)	Massenprozent pro Volumen

Verzeichnis getesteter Verbindungen

3MeBuMEG	<i>N</i> -(2-Methoxyethyl)- <i>N'</i> -(3-methylbutyl)guanidin
ABH	(<i>S</i>)-2-Amino-6-boronhexansäure
AbMEG	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin
Allyl-Arg	<i>N</i> ^ω -Allyl-L-arginin
Butenyl-Arg	<i>N</i> ^ω -(But-3-enyl)-L-arginin
C741	<i>N</i> -(2-Furanylmethyl)-3-[(tetrahydro-4,6-dioxo-2-thioxo-5(2 <i>H</i>)-pyrimidinyliden)methyl]-1 <i>H</i> -indol-1-acetamid
Carb-Arg	<i>N</i> ^ω -(2-Carbamoylethyl)-L-arginin
CbMEG	<i>N</i> -(4-Carboxybutyl)- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin
CMO	<i>N</i> ^δ -Cyan- <i>N</i> ^δ -methyl-L-ornithin
decVNIO	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)but-3-enamidin
ENIPO	<i>N</i> ^δ -(1-Iminopent-3-enyl)-L-ornithin
Ethyl-NIO	<i>N</i> ^δ -(1-Iminobutyl)-L-ornithin
L-257	<i>N</i> ^ω -(2-Methoxyethyl)-L-arginin
MA	<i>N</i> ^δ -Methyl-D,L-arginin
MC	<i>N</i> ^δ -Methyl-L-citrullin
Me-NIO	<i>N</i> ^δ -(1-Iminopropyl)-L-ornithin
MeOArg	<i>N</i> ^ω -Methoxyl-L-arginin
MO-Arg	<i>N</i> ^δ -[(Aminomorpholino)methyliden]-L-ornithin
NHAM	<i>N</i> ^ω -Hydroxy- <i>N</i> ^δ -methyl-L-arginin
NIL	<i>N</i> ^ε -(1-Iminoethyl)-L-lysin
NIO	<i>N</i> ^δ -(1-Iminoethyl)-L-ornithin
NO ₂ -Arg	<i>N</i> ^ω -Nitro-L-arginin
PenMEG	<i>N</i> -(2-Methoxyethyl)- <i>N'</i> -(<i>n</i> -pentyl)guanidin
Propargyl-Arg	<i>N</i> ^ω -Propargyl-L-arginin
Propyl-Arg	<i>N</i> ^ω -Propyl-L-arginin
Pyr-Arg	<i>N</i> ^δ -[(Amino-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)methyliden]-L-ornithin
SR445	Dihydro-5-(1 <i>H</i> -indol-3-ylmetylen)-1-(4-methoxyphenyl)-2-thioxo-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-pyrimidindion
Tfe-Arg	<i>N</i> ^ω -(2,2,2-Trifluorethyl)-L-arginin
TryMEG	<i>N</i> -[2-(Indol-3'-yl)ethyl]- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin
Vinyl-NIO	<i>N</i> ^δ -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin

1 Einleitung

1.1 Stickstoffmonoxid

Mit der Entdeckung des Stickstoffmonoxids (NO) im Jahre 1987 als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) begann eine intensive Forschung auf diesem Gebiet.¹ Die immense Bedeutung von NO wurde 1992 von der Zeitschrift Science mit dem Titel „Molekül des Jahres“ gewürdigt und im Jahre 1998 durch den Verleih des Nobel-Preises an Furchgott, Ignarro und Murad deutlich, deren Forschung zu der Entdeckung von NO als biologischen Mediator in Säugetieren führte.

Schon viele Jahre vor der Entdeckung der vasorelaxierenden Wirkung von NO wurden sogenannte organische Nitrate (Salpetersäureester), Nitroprussid-Natrium und Isoamylnitrit therapeutisch zur Blutdrucksenkung eingesetzt.² Diese Verbindungen setzen entweder enzymatisch oder spontan NO frei.³

Stickstoffmonoxid ist unter Normalbedingungen ein farbloses Gas und stellt als Radikal eine sehr reaktionsfähige Verbindung dar. In wässriger Lösung wird NO rasch zu NO_2^- und NO_3^- oxidiert, die Reaktion mit Oxyhämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin verläuft noch schneller und wird auch zum Nachweis von NO ausgenutzt.^{4,5} Darüber hinaus reagiert NO beinahe diffusionskontrolliert mit Superoxidanionen zu Peroxynitrit.⁶ Diese vielfältigen Inaktivierungsmechanismen für NO führen zu einer physiologischen Halbwertszeit von wenigen Sekunden.² Dennoch ist diese kurze Zeit ausreichend für die Diffusion zum Wirkort, da NO aufgrund seiner lipophilen Struktur hervorragend durch Membranen in benachbarte Gewebe diffundieren kann.²

NO besitzt zudem eine sehr hohe Affinität zu Häm-Eisen und bildet stabile NO-Häm-Komplexe.⁷ Diese Reaktion ist die biochemische Grundlage für die vielseitigen physiologischen Funktionen des NOs, die hauptsächlich auf eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) zurückzuführen sind.^{4,6} Die Reaktion von NO mit der prosthetischen Hämgruppe des Enzyms bewirkt eine Konformationsänderung mit einer Orientierung der GTP-Bindungsstelle zur Enzymoberfläche, die mit einer Erhöhung der Enzymaktivität um den Faktor 50 - 100 einhergeht.^{4,8} Die ausführlichsten untersuchten physiologischen Funktionen von NO sind die

Regulation des vaskulären Tonus, die Hemmung der Plättchenaggregation, die Funktion als neuronaler Transmitter und die zytostatischen Eigenschaften.^{7,9-11}

1.1.1 Wirkung von NO im kardiovaskulären System

Ein sehr wichtiger physiologischer Reiz für die NO-Freisetzung besteht in den Scherkräften, die das Blut auf das Endothel ausübt. Dort erfolgt die NO-Biosynthese durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die darüber hinaus über verschiedene Botenstoffe wie Acetylcholin, Bradykinin, Histamin und Serotonin aktiviert wird.¹² Das gebildete NO diffundiert vom Endothel zum Wirkort - der glatten Muskulatur und den Thrombozyten - und übt dort die vasorelaxierenden Funktion über eine Aktivierung der sGC aus.³ Die sGC wandelt GTP zu cGMP um, das anschließend verschiedene Kinasen aktiviert.¹⁰ Eine besondere Bedeutung nimmt die Proteinkinase G (PKG) ein, die über verschiedene Mechanismen die vasodilatierende und Plättchenaggregations-hemmende Wirkung von NO vermittelt.¹²

- (1) Die Phosphorylierung von Phospholamban, einem Membranprotein des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), führt durch eine Aktivierung von Ca^{2+} -ATPasen zu einer Sequestrierung von Ca^{2+} -Ionen in das SR und bewirkt somit einen Abfall der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.¹²
- (2) Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle werden aktiviert und so der K^+ -Ausstrom erhöht. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle und einer Senkung des Ca^{2+} -Einstroms.¹²
- (3) Die Phosphorylierung von IRAG (IP₃-Rezeptor assoziiertes cGMP Kinase Substrat) bewirkt eine Hemmung der IP₃-induzierten Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR.¹²

All diese Effekte senken die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, die eine Inaktivierung der Myosinkinase zur Folge hat und in einer Vasodilatation resultiert.² Eine schematische Übersicht über diesen Mechanismus gibt Abb. 1.1.

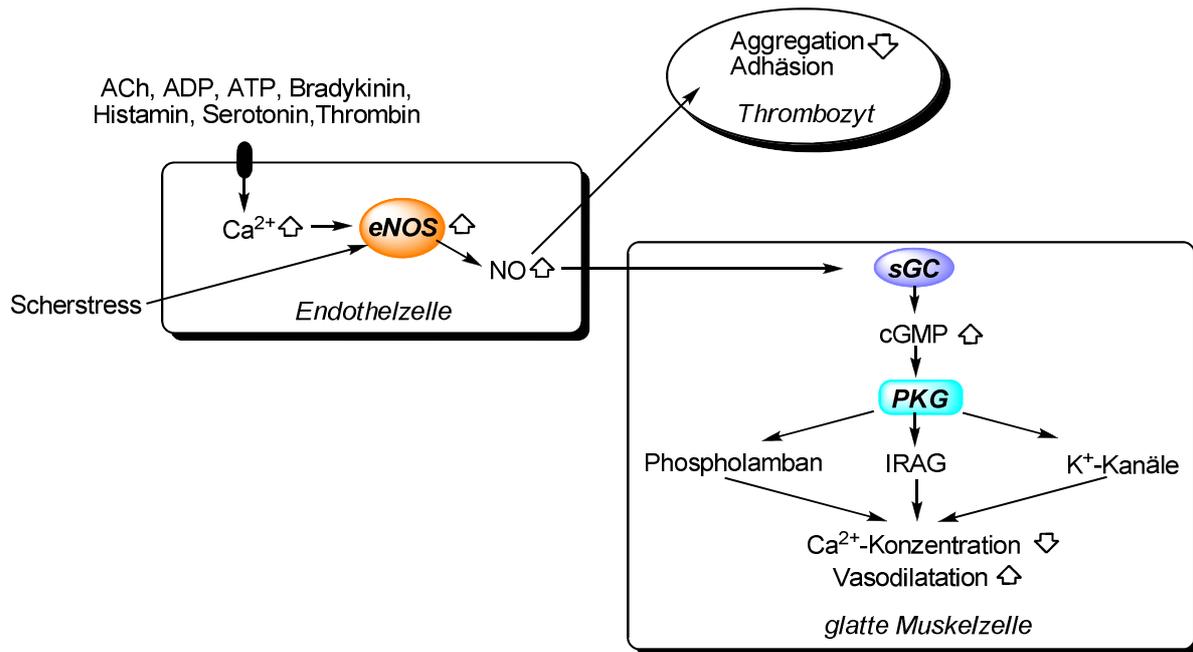


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Mechanismus der NO-Wirkung auf das Gefäßsystem (modifiziert nach Müller et al.).¹² ACh, Acetylcholin; ADP (ATP), Adenosindi(tri)phosphat; cGMP, zyklisches Guanosinmonophosphat; eNOS, endotheliale NO-Synthase; IRAG, IP₃-Rezeptor assoziiertes cGMP Kinase Substrat; PKG, Proteinkinase G; sGC, lösliche Guanylatcyclase.

Die Hemmung der Thrombozyten- bzw. Leukozytenaggregation führt dazu, dass NO eine bedeutende anti-atherosklerotische Funktion einnimmt. Eine verringerte Bildung oder vermehrter Verbrauch von NO durch reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen erhöht das Risiko der Atherosklerose.^{13,14}

Zusätzlich besitzt NO über einen Proteinkinase A vermittelten Mechanismus antiproliferative Wirkung auf die glatte Muskulatur. Die Proliferation der glatten Muskulatur stellt einen Faktor in der Pathogenese der Herzinsuffizienz und der koronaren Herzkrankheit dar, da sie zu einer Gefäßverengung mit einem Verlust an Funktion des Endothels führt.¹² Darüber hinaus ist die neuronale NOS (nNOS) an der Relaxation des Myokards über einen cGMP/PKG unabhängigen Mechanismus beteiligt.¹⁵ Zusammengenommen reguliert NO die vaskuläre Homöostase und reduziert das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen.

Eine massive Bildung von NO im Gefäßsystem hingegen ist pathologisch, da sie zu einer überhöhten Vasodilatation führt, welche Hauptursache für die Ausbildung des septischen Schockes ist.¹⁶

1.1.2 Wirkung von NO im Nervensystem

Im zentralnervösen System wird NO in postsynaptischen Neuronen nach Anregung durch exzitatorische Aminosäuren gebildet und repräsentiert einen wichtigen Mediator von Zell-Zell-Interaktionen.¹⁷ Es ist an der Regulation der zerebralen Durchblutung sowie der Langzeit-Potenzierung – einem Phänomen der Gedächtnisbildung – beteiligt.¹⁸

Im peripheren Nervengewebe fungiert NO als Neurotransmitter in nichtadrenergen-nichtcholinergen (NANC oder nitrengen) Neuronen und vermittelt die Relaxation des Magens und Sphinkters sowie die peristaltische Bewegung des Magen-Darm-Traktes.¹⁸ Ebenfalls über NANC-Neurone wird die NO-Freisetzung im *Corpus cavernosum* vermittelt, und über die weitere Aktivierung der sGC die Relaxation der glatten Muskulatur bewirkt.¹⁹

Eine erhöhte Produktion von NO wird in der Pathophysiologie des Schlaganfalls sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson und M. Alzheimer angenommen.¹⁸ Des Weiteren wird eine Beteiligung von NO an der Ausbildung der Epilepsie vermutet, da nachgewiesen wurde, dass eine übermäßige Ausschüttung von Glutamat - einem Mediator der NO-Freisetzung - mit Krämpfen und Neurotoxizität verbunden ist.²⁰ Darüber hinaus nimmt NO eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Migräne ein.²¹

1.1.3 Wirkung von NO im Immunsystem

Während NO in geringen Konzentrationen wichtige protektive Funktionen im Gefäßsystem ausübt sowie als Neuromediator im Nervensystem fungiert, besitzt es in höheren Konzentrationen zytotoxische Eigenschaften. Im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr wird die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch Endotoxine und Zytokine induziert und somit erhöhte Konzentrationen an NO gebildet.² NO vermittelt seine zytostatische und zytotoxische Wirkung durch Interaktionen mit eisenhaltigen Enzymen der Atmungskette und der DNA-Synthese in den Zellen.¹⁶ Von besonderer Bedeutung sind die Hemmung der Aconitase, der Komplexe I und II der Atmungskette sowie von Cytochrom c.²² Darüber hinaus nimmt Peroxynitrit (ONOO^-), das aus NO und Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) gebildet wird, eine wesentliche Rolle in der unspezifischen Immunabwehr ein, da es reaktiver als NO ist und verschiedene Proteine bzw. DNA oxidieren kann.^{6,22}

Die erhöhten NO-Konzentrationen werden jedoch auch mit der Pathogenese einiger Krankheiten in Verbindung gebracht wie Nephritis, Krebs und Diabetes.¹³ Darüber hinaus sind sie auch an chronischen Entzündungen beteiligt wie *Colitis ulcerosa* und rheumatoider Arthritis.^{20,23}

1.2 L-Arginin

L-Arginin, eine semi-essenzielle Aminosäure, wird über die Nahrung aufgenommen, durch Proteinabbau freigesetzt oder physiologisch aus L-Citrullin über die Enzyme Argininosuccinat Synthase und Argininosuccinat Lyase gebildet.²⁴ Beim Erwachsenen reicht die körpereigene Bildung von L-Arginin zur Deckung des täglichen Bedarfs aus, wohingegen Kinder während des Wachstums auf exogenes L-Arginin angewiesen sind.²⁴ L-Arginin stellt eine der am stärksten metabolisierten Aminosäuren des Körpers dar. Eine Übersicht über die vielseitigen Metabolismuswege des L-Arginins ist in Abb. 1.2 dargestellt.

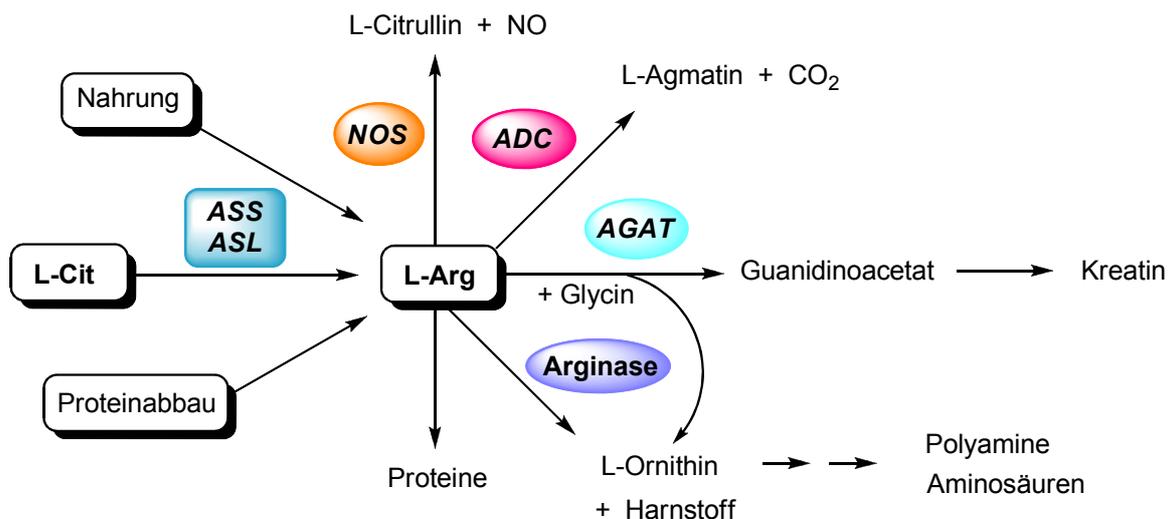


Abb. 1.2: Übersicht über den L-Arginin Stoffwechsel (modifiziert nach Wu et al.).²⁴ ADC, Arginin Decarboxylase; AGAT, Arginin-Glycin-Amidino-transferase; ASL, Argininosuccinat Lyase; ASS, Argininosuccinat Synthase; L-Arg, L-Arginin; L-Cit, L-Citrullin; NOS, NO-Synthase.

Neben den Metabolismuswegen im NO-generierenden System über die NO-Synthase (NOS, EC 1.14.13.39) und Arginase (EC 3.5.3.1) kann L-Arginin über die Arginin Decarboxylase (EC 4.1.1.19) zu L-Agmatin und CO₂ verstoffwechselt werden. Darüber hinaus katalysiert die Arginin-Glycin-Amidino-transferase (EC 2.1.4.1) die Bildung von L-Ornithin und Guanidinoacetat aus L-Arginin und L-Glycin. Das Guanidinoacetat wird physiologisch weiter zu Kreatin umgesetzt.²⁵

1.3.1 NO-Synthase

Die NO-Synthasen (NOSs, EC 1.14.13.39) katalysieren die Zwei-Schritt-Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Im ersten Schritt erfolgt, im Sinne einer klassischen Zweielektronen-Übertragung einer Monooxygenase, eine Hydroxylierung eines terminalen Stickstoffatoms der Guanidinstruktur von L-Arginin zu dem Intermediat *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA).³⁰ Im zweiten Schritt reagiert dieses Zwischenprodukt zu L-Citrullin und NO. In beiden Schritten werden als Cosubstrate O₂ und NADPH benötigt (Abb. 1.4).

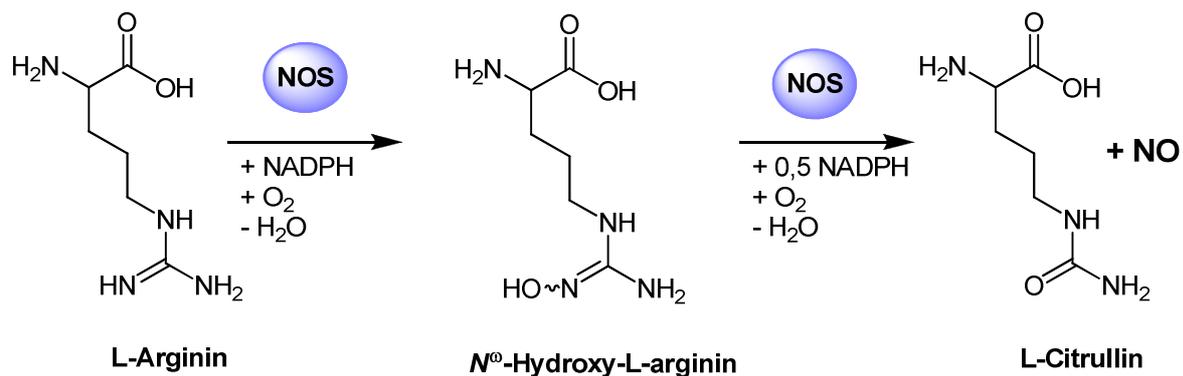


Abb. 1.4: Katalytische Bildung von Stickstoffmonoxid und L-Citrullin aus L-Arginin durch die NO-Synthase.

Bisher wurden drei verschiedene Isoenzyme der NO-Synthase identifiziert:³¹

- (1) die neuronale NOS (nNOS, bNOS, NOS I) wird konstitutiv insbesondere im Nervengewebe exprimiert;
- (2) die induzierbare NOS (iNOS, NOS II) wird in Makrophagen im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr gebildet;
- (3) die endotheliale NOS (eNOS, NOS III) ist insbesondere im Endothel lokalisiert und an der Homöostase des vaskulären Tonus beteiligt.

In den letzten Jahren wurden viele Hinweise auf die Existenz einer weiteren NO-Synthase veröffentlicht.^{32,33} Diese neu entdeckte NO-Synthase ist in der inneren Membran der Mitochondrien in Nachbarschaft zum Cytochrom *c* der Atmungskette lokalisiert und scheint eine Funktion in der Regulation der Mitochondrienatmung einzunehmen, da das gebildete NO einen sehr potenten kompetitiven Inhibitor von Cytochrom *c* darstellt. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die mitochondriale NO-Synthase (mtNOS) eine Funktion in der physiologischen Regulation des O₂-Verbrauchs in Mitochondrien einnimmt.³²

Während die Existenz einer NOS in den Mitochondrien zweifelsfrei nachgewiesen wurde, ist bis heute jedoch nicht abschließend geklärt, ob diese mtNOS eine neue Isoform repräsentiert oder nur eine Unterform der nNOS darstellt.³³

Die Bezeichnungen eNOS und nNOS sind auf das jeweilige Gewebe zurückzuführen, aus denen diese Isoformen erstmalig isoliert wurden. In geringerem Ausmaß werden sie jedoch auch in anderen Geweben exprimiert. Diese drei verschiedenen Isoformen besitzen neben der unterschiedlichen Gewebeverteilung auch verschiedene Regulationsmechanismen, Cofaktorabhängigkeiten, katalytische Eigenschaften und Inhibitor-Sensitivitäten.^{31,34,35} Im Gegensatz zu den anderen zytosolischen Isoformen ist die eNOS durch Myristoylierung oder Palmitoylierung am N-Terminus membranassoziiert.³⁶

Sowohl die nNOS als auch die eNOS werden konstitutiv im Gewebe exprimiert und durch Ca^{2+} -Ionen in ihrer Aktivität reguliert. Ein Anstieg der Ca^{2+} -Ionen führt zu einer Anlagerung von Calmodulin an die NOS und aktiviert das Enzym. Dieser Calcium-Einstrom wird bei der nNOS beispielsweise durch eine Glutamat-Aktivierung der NMDA-Rezeptoren bewirkt. Bei der eNOS erfolgt dieser unter anderem durch Acetylcholin, Histamin, Bradykinin und Serotonin.^{12,37}

Die Expression der iNOS hingegen wird erst durch die Ausschüttung von Endotoxinen oder Zytokinen induziert. Sie besitzt eine sehr hohe Affinität zu Calmodulin, das nahezu irreversibel an der iNOS bindet, und ist dadurch unabhängig von Ca^{2+} -Ionen.³⁸ Im Gegensatz zu den beiden anderen Isoformen produziert sie NO in größeren Mengen über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen, wohingegen die anderen Isoenzyme NO in wesentlich geringeren Konzentrationen innerhalb von Sekunden bis Minuten bilden.³⁹

Alle NOS-Isoformen besitzen ähnliche Strukturen mit Sequenzhomologien von 51 - 57 % zwischen den humanen Isoformen.³¹ Sie bestehen aus einer N-terminalen Oxygenase-Domäne und einer C-terminalen Reduktase-Domäne. Die Reduktase-Domäne enthält die Bindungsstellen für je ein NADPH, FAD und FMN. Calmodulin wird an einer etwa 30 Aminosäuren umfassenden Region zwischen der Reduktase-Domäne und der Oxygenase-Domäne angelagert und beschleunigt den

Elektronentransport sowohl innerhalb der Reduktase-Domäne als auch die Elektronenübertragung auf das Häm.^{34,40,41}

Die Oxygenase-Domäne enthält das aktive Zentrum mit einem prosthetischen Häm, das wie im Cytochrom P450 über einen Cystein-Rest gebunden ist.⁴² Die Bindungsstellen für H₄B und L-Arginin sind ebenfalls auf dieser Domäne enthalten. Mittlerweile sind Kristallstrukturen aller Oxygenase-Domänen der verschiedenen Isoenzyme publiziert worden, die verdeutlichen, dass alle Aminosäure-Seitenketten, die Bindungen mit dem Substrat eingehen, innerhalb der verschiedenen Isoformen hochkonserviert sind.⁴³⁻⁴⁶ Insbesondere ein Glutamat-Rest ist für die Katalyse essenziell, denn er bewirkt die Orientierung der Guanidinstruktur des Substrates in der Nähe des Häms.⁴⁷

Alle NOS-Isoenzyme sind nur in homodimerer Form aktiv. In der Dimerisierung der NOS-Monomere nimmt das Häm eine wesentliche Rolle ein - insbesondere für die Dimerisierung der eNOS und nNOS ist es essenziell.^{35,48} In der Nähe des Häms ist ein H₄B gebunden, das neben dem Häm ebenfalls eine wichtige Funktion in der Dimerisierung der iNOS einnimmt.⁴⁹ Die Dimerisierung von eNOS und nNOS ist nicht so strikt von H₄B abhängig, jedoch werden auch diese Dimere durch H₄B stabilisiert.⁵⁰ Darüber hinaus besitzt H₄B synergistische Eigenschaften auf die L-Arginin Anlagerung und fungiert als Redox-Cofaktor, da die erste Oxidation des katalytischen Mechanismus zu NOHA ohne H₄B nicht stattfindet.⁵¹⁻⁵³ Die Dimerisierung wird bei einigen Spezies zusätzlich durch ein Zn²⁺-Atom stabilisiert, das tetrahedral zwischen je zwei Cystein-Resten der beiden Monomere koordiniert ist, oder durch eine Disulfidbrücke zwischen je einem Cystein-Rest der Monomere.^{31,45}

Innerhalb des katalytischen Mechanismus werden die Elektronen vom NADPH über die Flavine der Reduktase-Domäne auf das Häm der Oxygenase-Domäne übertragen. Siddhanta *et al.* konnten zeigen, dass diese Elektronenübertragung von der Reduktase-Domäne des einen Monomers auf die Oxygenase-Domäne des anderen Monomers erfolgt.⁵⁴ Eine schematische Abbildung ist in Abb. 1.5 gegeben.

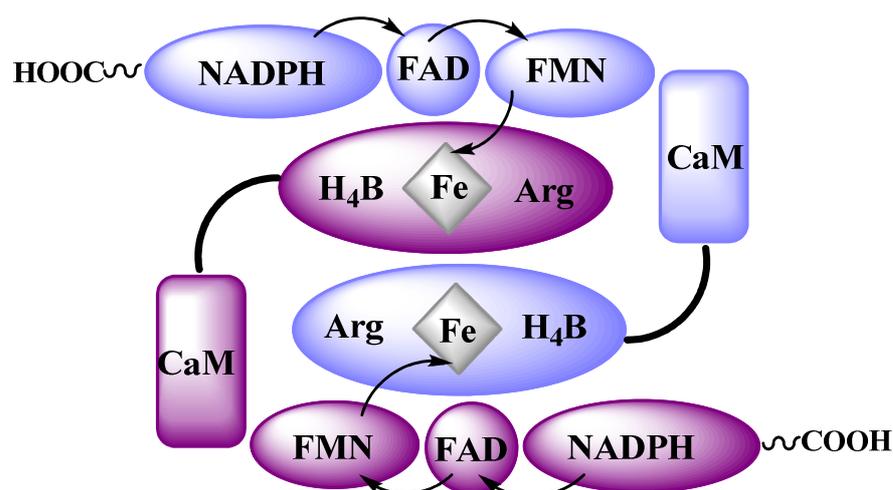


Abb. 1.5: Schematischer Aufbau und Elektronentransfer des iNOS Dimers nach Siddhanta et al.⁵⁴ Arg, L-Arginin; CaM, Calmodulin; Fe, Häm; H₄B, Tetrahydrobiopterin; FAD, Flavinadenindinukleotid; FMN, Flavinmononukleotid; NADPH, Nikotinamidadenindinukleotidphosphat.

In der NO-Biosynthese stellt die Reduktion des Häms den langsamsten Schritt dar. Aus diesem Grund ist die Anlagerung von Calmodulin für die Aktivität der NO-Synthasen von entscheidender Bedeutung, da Calmodulin den Elektronentransport zwischen den Flavinen und somit die Reduktion beschleunigt.⁵⁵ Durch diese Reduktion wird das Häm befähigt O₂ anzulagern und den Fe³⁺-Superoxid Zustand (I) auszubilden (Abb. 1.6). Im Folgenden wird ein Elektron von H₄B übertragen und es bildet sich eine Fe³⁺-Peroxy Spezies (II), die durch Protonierung und Wasserabspaltung in eine Häm-Eisen-Oxo Verbindung (III) übergeht.^{56,57} Der erste Schritt der NOS-Umsetzung von L-Arginin zu NOHA wird von der reaktiven Spezies III katalysiert, der zweite Schritt zu L-Citrullin und NO von Spezies II.³⁵ Über den genauen Mechanismus wird auch 20 Jahre nach der Entdeckung der NO-Synthasen intensiv diskutiert, insbesondere die Funktion des H₄B als Redox-Faktor blieb lange umstritten. Heute scheint bewiesen, dass das zweite Elektron in der Reduktion des Häms von H₄B bereitgestellt werden kann.⁵⁷

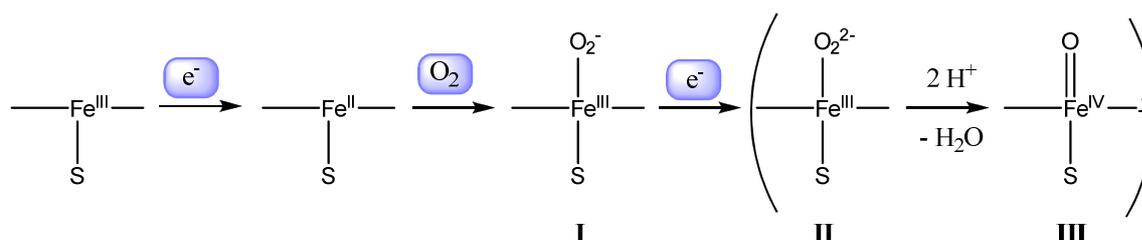


Abb. 1.6: Katalytischer Mechanismus der NO-Synthasen nach Stuehr et al.⁵⁷

Inkubationen mit NO-Synthasen ohne H₄B führen zur Entkopplung des katalytischen Mechanismus mit einer Freisetzung von Superoxidanionen.⁵⁸ Dieser Entkopplungsmechanismus ist besonders bei der nNOS ausgeprägt und kann auch bei geringen Substrat-Konzentrationen oder durch Inhibitoren beobachtet werden.³⁴ Interessant ist, dass bei Inkubationen mit H₄B die Anlagerung des ersten H₄Bs einen antikooperativen Effekt auf die Bindung des zweiten H₄Bs ausübt, dessen Anlagerung erst bei wesentlich höheren Konzentrationen von H₄B erfolgt.⁵⁹ So lange jedoch nicht beide Bindungsstellen besetzt sind, werden NO und Superoxidanionen von diesem Dimer parallel gebildet und es kommt zur Bildung von Peroxynitrit.³⁴

Alle Isoenzyme werden durch ihr Katalyseprodukt NO kompetitiv gehemmt, welches ebenso wie O₂ bzw. CO eine hohe Affinität zum Häm besitzt. Durch O₂ oder den Zerfall des Häm-NO-Komplexes werden die NOSs wieder regeneriert. Inwieweit es sich hierbei um einen physiologischen Regulationsmechanismus der NO-Biosynthese handelt, muss noch genauer untersucht werden.⁶⁰

Neben den bisher dargestellten Funktionen, Regulationsmechanismen und Unterschieden der verschiedenen Isoformen gibt es eine Vielzahl weiterer interessanter Eigenschaften, auf die im Rahmen dieses kurzen Überblicks nicht weiter eingegangen werden soll. Für genauere Details gibt es zahlreiche hervorragende Reviews.^{31,34,35,60}

1.3.2 Protein-Arginin-Methyltransferasen

Proteine können posttranslational vielfältig modifiziert werden. Zu diesen Modifikationen gehören unter anderem Methylierungsreaktionen, welche an den C-terminalen Carboxylgruppen erfolgen und zur Bildung von Methylestern führen können. Solche Reaktionen sind generell reversibel.⁶¹

Darüber hinaus können Methylierungen an Lysin-, Histidin-, Asparagin- und Arginin-Resten stattfinden.⁶¹ Das für die Arginin-Methylierung verantwortliche Enzym wurde schon vor über 40 Jahren entdeckt.⁶² Heute sind von den Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs, EC 2.1.1.23) verschiedene Isoformen identifiziert, die S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) abhängig proteingebundene Arginin-Reste an einem oder beiden N^ω-Atomen der Guanidinstruktur des Arginins methylieren. Es gibt drei generell unterschiedliche Typen dieser PRMTs. Typ I ist

verantwortlich für die Bildung von N^ω -Monomethyl-L-arginin (NMMA) und dem asymmetrischen N^ω, N^ω -Dimethyl-L-arginin (ADMA), wohingegen die Typ II PRMTs die Bildung von NMMA und dem symmetrischen $N^\omega, N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin (SDMA) katalysieren (Abb. 1.7).⁶³ Die PRMTs vom Typ III, die bisher nur in Hefen nachgewiesen wurden, katalysieren eine Monomethylierung am N^δ -Atom (Kap. 1.6).⁶³ Der größte Teil der bisher identifizierten PRMTs gehört zu den Typ I PRMTs.⁶³ Durch Proteinabbau werden diese N^ω -methylierten L-Arginine physiologisch freigesetzt. Eine direkte Methylierung von freiem L-Arginin konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

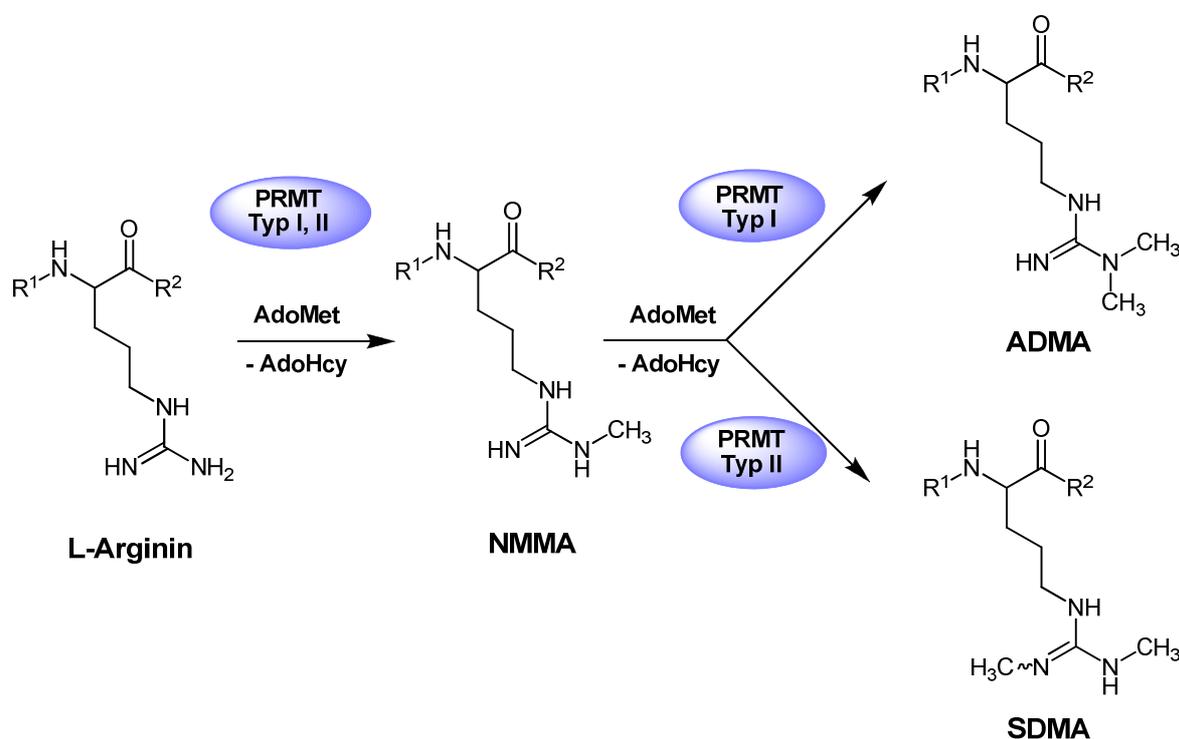


Abb. 1.7: Methylierung von proteingebundenen Arginin-Resten durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) in Säugetieren.⁶³ ADMA, asymmetrisches N^ω, N^ω -Dimethyl-L-arginin; AdoHcy, S-Adenosyl-homo-L-cystein; AdoMet, S-Adenosyl-L-methionin; NMMA, N^ω -Monomethyl-L-arginin; SDMA, symmetrisches $N^\omega, N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin.

Die Methylierung erfolgt im Protein insbesondere in so genannten RGG-Boxen, in denen Glycin-Glycin-Dipeptide durch Arginin oder Aminosäuren mit aromatischen Resten unterbrochen werden.⁶⁴ Substrate der PRMTs sind vorwiegend RNA-bindende Proteine wie die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs).⁶⁵ Von dem im Nukleus lokalisierten ADMA befinden sich 65 % in den hnRNPs, in denen 12 % der Arginin-Reste methyliert sind.⁶⁶ Diese Proteine binden unmittelbar

nach oder schon während der Translation an die *prä*-mRNA und bleiben an ihr gebunden, so lange sie sich im Zellkern befindet. Sie sind an der Reifung von *prä*-mRNA und am Export aus dem Zellkern ins Zytosol beteiligt.⁶⁴

Von diesen Methylierungsreaktionen wurde lange Zeit angenommen, dass sie irreversibel sind. Inzwischen gibt es einige Nachweise, dass auch diese Methylgruppen durch Peptidyl-Arginin-Deiminasen (PAD, EC 3.5.3.15) entfernt werden können. So konnte gezeigt werden, dass die humane PAD4 monomethylierte Arginin-Reste in Histonen zu L-Citrullin und Methylamin deiminieren kann.^{67,68} Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten eine Umsetzung von NMMA in Proteinen durch PADs nicht bestätigen.⁶⁹ Kürzlich konnte ein Enzym identifiziert werden, dass eine Demethylierung sowohl von mono- als auch von dimethylierten Arginin-Resten in Histonen katalysiert.⁷⁰

Es ist anzunehmen, dass diese Methylierung eine sehr bedeutende physiologische Funktion in Regulationsprozessen einnimmt, schließlich ist eine Methylierung mit einem Nettoverbrauch von 12 ATP verbunden.⁷¹ Durch den kürzlichen Nachweis von demethylierenden Enzymen ist ein Regulationsmechanismus ähnlich der Interkonversion denkbar. Die Methylierung von Arginin-Resten beeinflusst eine Vielzahl von Prozessen an denen Nukleinsäuren beteiligt sind wie den Transport von *prä*-mRNAs im Zellkern und den Export aus dem Zellkern.⁷² Darüber hinaus wird durch Arginin-Methylierung die Anlagerung des Promotors und die Transkription moduliert sowie die Aggregation von Spliceosomen beeinflusst.⁷³⁻⁷⁶ Eine Unterbindung von Protein-Protein-Interaktionen wurde ebenfalls beschrieben.⁷⁷

1.3.3 Arginase

Die Arginase (EC 3.5.3.1) wurde in verschiedensten Lebensformen wie Bakterien, Hefen, Pflanzen und höher entwickelten Tieren entdeckt. Sie stellt ein zytosolisches Enzym des Harnstoff-Zyklus dar und katalysiert die Umwandlung von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff (Abb. 1.8). Über diese Reaktion werden im menschlichen Organismus ~30 g Harnstoff pro Tag generiert.⁷⁸ Das pH-Optimum der Arginase liegt zwischen 9,0 und 10,0.⁷⁸

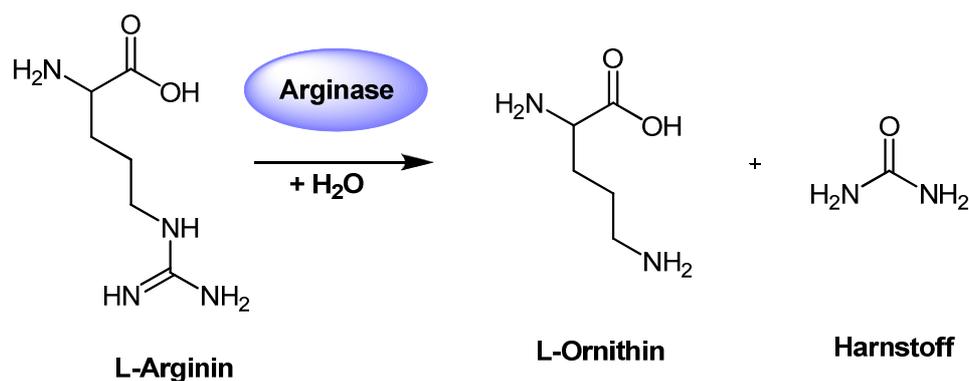


Abb. 1.8: Arginase katalysierte Umsetzung von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff.

In Eukaryoten bildet die Arginase ein aktives Homotrimer, wobei jede Untereinheit ein katalytisches Zentrum besitzt, in dem zwei Mn^{2+} -Atome gebunden sind.⁷⁸ Dieser binukleare Mn^{2+} -Cluster ist für die katalytische Aktivität essenziell. In einigen Spezies werden anstelle der Mn^{2+} -Ionen andere divalente Kationen wie Ni^{2+} , Co^{2+} oder Fe^{2+} akzeptiert.⁷⁹ Im Ruhezustand wird zwischen diesen Kationen ein Wassermolekül gebunden, das im aktiven Zentrum leicht zum Hydroxid-Ion ionisiert wird. Die Bindung des Hydroxid-Ions wird durch eine Wasserstoffbrücke zu einem Aspartat-Rest stabilisiert. Lagert sich das Substrat L-Arginin an, kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Hydroxid-Ions auf den Guanidiniumkohlenstoff und zu der Ausbildung eines tetrahedralen Übergangszustandes, der anschließend zu L-Ornithin und Harnstoff zerfällt. Während der Katalyse fungiert ein Histidin-Rest als Protonenrelais.⁸⁰

Bei den Arginasen ist eine Unterscheidung von zwei immunologisch verschiedenen Isoformen möglich, deren Sequenzhomologie im Menschen 58 % beträgt.⁷⁹ Die Arginase I ist ein zytosolisches Enzym, das insbesondere in der Leber exprimiert wird und dort an der Entgiftung von Ammoniak beteiligt ist. In neueren Arbeiten konnte sie ebenfalls im Endothel, in den Koronararterien und in der glatten Muskulatur identifiziert werden.^{81,82} Die Arginase II ist ein mitochondriales ubiquitär vorkommendes Enzym, dessen Funktion in der Bereitstellung von L-Ornithin für die Polyamin-, Prolin- und Glutamat-Biosynthese besteht.⁷⁸ Darüber hinaus scheint sie an der L-Arginin Homöostase beteiligt zu sein. Die höchste Expression dieser Isoform erfolgt in der Niere.⁸²

In den vergangenen Jahren rückte eine gegenseitige Beeinflussung der Aktivität von Arginase und NOS in den Fokus des Forschungsinteresses.^{39,83,84} Beide

Enzyme verstoffwechseln das gleiche Substrat L-Arginin. Obwohl die NOS einen wesentlich geringeren K_m -Wert für L-Arginin besitzt ($\sim 2 - 20 \mu\text{M}$ NOS, $\sim 1 - 5 \text{mM}$ Arginase), kommt es zu einer gegenseitigen Beeinflussung, da die Arginase eine um den Faktor 1000 höhere Aktivität als die NOS zeigt.⁸² Durch eine erhöhte Arginase-Aktivität kommt es also zu einer Verminderung des L-Arginin-Substrat-Pools für die NO-Synthase und somit zu einer verringerten NO-Freisetzung.

Die gegenseitige Regulation dieser beiden L-Arginin metabolisierenden Stoffwechselwege wird dadurch unterstrichen, dass das Intermediat der NO-Biosynthese, N^0 -Hydroxy-L-arginin, einen sehr potenten physiologischen Inhibitor der Arginase repräsentiert.^{29,84} Es besitzt eine ungefähr gleich hohe Affinität zu Arginase bzw. NO-Synthase (Arginase: $K_i \sim 30 - 42 \mu\text{M}$; NOS: $K_m \sim 7 - 59 \mu\text{M}$).⁸⁴⁻⁸⁶ Dieses Intermediat kann während der NOS-Katalyse vom aktiven Zentrum freigesetzt werden und im Blut zirkulieren.^{87,88} Im humanen Plasma wurden Konzentrationen von $\sim 9 \mu\text{M}$ detektiert.⁸⁹ Darüber hinaus wird angenommen, dass NOHA als Vorstufe für NO im Gewebe zirkuliert und in Geweben, die keine NOS exprimieren, NOS-unabhängig über Hämproteine NO freisetzen kann.²⁷

Neben der Konkurrenz um das Substrat L-Arginin kommt es zu weiteren Beeinflussungen der NOS-Aktivität durch die Arginase. Die verminderte Verfügbarkeit des Substrates L-Arginin für die NOS führt zu einem Entkopplungsmechanismus, der Superoxidanionen freisetzt, welche NO-Radikalfänger Eigenschaften besitzen.³⁴

1.3.4 Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase

Physiologisch im Körper gebildete N^0 -methylierte L-Arginine (Kap. 1.3.2) sind chemisch stabil und können vom jeweiligen Bildungsort in andere Gewebe diffundieren.⁹⁰ ADMA und NMMA sind potente kompetitive Inhibitoren aller drei Isoformen der NO-Synthase, während SDMA keinen Effekt auf die NOSs ausübt.²⁸ SDMA wird ausschließlich über die Niere ausgeschieden, wohingegen ADMA und NMMA nur zu einem geringen Prozentsatz ($\sim 10 \%$) über die Niere eliminiert werden.⁹¹ Vorwiegend werden sie über die zytosolische Cystein-Hydrolase Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH oder Dimethylarginase, EC 3.5.3.18) zu L-Citrullin und Mono- bzw. Dimethylamin abgebaut (Abb. 1.9).⁹²

hierbei um einen weiteren physiologischen Regulationsmechanismus der NO-Biosynthese handeln, um überschießende NO-Bildung zu verhindern.¹⁰⁰ Neuere Studien zeigen, dass L-Arginin einen kompetitiven Hemmstoff für die DDAH repräsentiert und somit ebenfalls regulatorisch in die DDAH-Aktivität eingreift.¹⁰¹

Während der Katalyse führt die Anlagerung eines *N*^ω-methylierten L-Arginins zur Deprotonierung eines Cysteins im aktiven Zentrum. Das gebildete Thiolat greift im Folgenden den Guanidiniumkohlenstoff des Substrates nukleophil an. Durch Kollabieren des tetraedrischen Übergangszustandes wird das alkylierte Amin (Mono- bzw. Dimethylamin) abgespalten und es bildet sich ein stabiles Thiouronium Intermediat aus. Durch Hydrolyse wird anschließend das Produkt L-Citrullin freigesetzt. Die Abspaltung des Alkylamins sowie die Hydrolyse des Thiouroniums wird durch ein Histidin des aktiven Zentrums katalysiert.¹⁰²

Neben der regulatorischen Funktion der DDAH auf die NO-Biosynthese übt sie auch noch NO-unabhängige Funktionen aus wie die Regulation der Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) über die direkte Bindung der DDAH-2 an die Proteinkinase A und folgender Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Sp1. Dieser phosphorylierte Sp1 aktiviert im Zellkern die VEGF-Transkription.¹⁰³

Des Weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass eine H162G Mutante der *Pa*DDAH inaktiv ist, da das Histidin des aktiven Zentrums entfernt wurde. Interessanterweise kann durch Zugabe von Imidazol die Aktivität wieder hergestellt werden. Darüber hinaus ist diese Mutante jedoch auch in der Lage, eine Amidinotransferase-Aktivität auszuüben. Beim Einsatz von *S*-Methyl-L-thiocitrullin und einem substituierten Amin kann diese Mutante auch zur enzymatischen Synthese von *N*^ω-substituierten L-Arginin-Derivaten verwendet werden.¹⁰⁴

1.4 *N*^ω-methylierte L-Arginine und das „L-Arginin Paradoxon“

Die physiologischen ADMA-Plasma-Konzentrationen variieren zwischen 0,4 und 1,0 µM, können jedoch in pathologischen Zuständen deutlich ansteigen (bis zu 10 µM).^{28,105} Intrazellulär sind die ADMA-Spiegel etwa um den Faktor 5 - 10 erhöht, da ADMA durch den kationischen Aminosäure-Transporter γ^+ (CAT1) in die Zelle

aufgenommen wird und dort akkumuliert.^{106,107} Die Konzentrationen für NMMA sind etwa um den Faktor 10 geringer.¹⁰⁸

Die physiologischen L-Arginin-Plasma-Konzentrationen liegen zwischen 70 und 120 μM . Aufgrund der hohen Konzentrationsunterschiede von ADMA ($< 1 \mu\text{M}$) und L-Arginin wurde lange Zeit bezweifelt, dass die physiologischen ADMA-Konzentrationen für eine Inhibition der NOS ausreichen. Mittlerweile konnte dieser Nachweis jedoch in verschiedenen Studien erbracht werden, wodurch die N^ω -methylierten L-Arginine in den Mittelpunkt des Interesses rückten.^{106,107,109} Heute gilt die Hemmung der NOSs durch endogenes ADMA ($K_i \sim 1 \mu\text{M}$) als Erklärung für das „L-Arginin Paradoxon“.^{107,110} Unter diesem Phänomen versteht man die Beobachtung, dass in vielen NO-defizienten Krankheitsbildern eine Besserung durch eine L-Arginintherapie erzielt werden kann, obwohl die physiologischen L-Arginin-Plasma-Konzentrationen ($\sim 100 \mu\text{M}$) deutlich über den K_m -Werten der NOSs liegen (2 - 20 μM).^{82,111,112} Der kompetitive Inhibitor ADMA bewirkt eine Erhöhung des K_m -Wertes der NO-Synthasen für L-Arginin, so dass eine Erhöhung der L-Arginin-Konzentration in einer gesteigerten NO-Biosynthese resultiert.¹¹³ Eine andere Erklärung für das „L-Arginin Paradoxon“ ist die oben beschriebene Konkurrenz zwischen Arginase und NO-Synthase um das gemeinsame Substrat L-Arginin.³⁹

In den vergangenen Jahren hat ADMA eine besondere Bedeutung als Risikofaktor für endotheliale Dysfunktion, Hypertonie und Atherosklerose erlangt.^{114,115} Neuere Arbeiten gehen sogar soweit, dass sie ADMA als einen der aussagekräftigsten Marker für kardiovaskuläre Ereignisse ansehen und eine Bestimmung der ADMA-Spiegel bei kardiovaskulären Risikopatienten anstreben.¹¹⁶ Inzwischen konnten erhöhte Werte von ADMA in einer Vielzahl an pathologischen Zuständen nachgewiesen werden (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Krankheitsbilder, in denen erhöhte ADMA-Plasma-Konzentrationen in Menschen nachgewiesen wurden.^{28,90}

Nierenversagen ¹¹⁷	Preeklampsie
Pulmonale Hypertension ¹¹⁸	Atherosklerose
Hypercholesterolämie ¹¹⁹	Thrombotische Mikroangiopathie
Diabetes mellitus Typ 2 ¹²⁰	Herzinsuffizienz
Schlaganfall	Hyperthyreose ¹²¹
Schizophrenie	Multiple Sklerose
Hyperhomocysteinämie	Erektile Dysfunktion ¹²²

Eine Verbesserung der pathologischen Zustände durch L-Arginin-Ergänzung konnte bei Hypertonie, Angina pectoris, Herzinsuffizienz, erektiler Dysfunktion und pulmonaler Hypertonie nachgewiesen werden.¹¹² Allerdings sind die Studienergebnisse uneinheitlich, was auf unterschiedliche ADMA-Plasma-Spiegel der Probandengruppen zurückgeführt wird. Eine positive Wirkung der L-Arginintherapie wurde insbesondere bei Patienten mit erhöhten ADMA-Plasma-Konzentrationen nachgewiesen, während Patienten mit normalen ADMA-Spiegeln keine Besserung durch die Therapie erfuhren. Aus diesem Grund sollte vor Therapiebeginn von NO-defizienten Krankheitsbildern mit L-Arginin eine Bestimmung des ADMA-Spiegels erfolgen.¹¹¹

1.5 Modulatoren des NO-generierenden Systems

Wie in Kap.1.1 dargestellt, besitzt NO vielseitige physiologische Funktionen. Aus diesem Grund ist es eine große Herausforderung, durch Modulatoren des NO-generierenden Systems gezielt bestimmte Effekte hervorzurufen.

1.5.1 Modulatoren der NO-Synthase

Für eine pharmazeutische Anwendbarkeit der NOS-Modulatoren ist eine Isoform-Selektivität der Verbindungen erforderlich. Jedoch ist die Entwicklung von Isoform selektiven Modulatoren aufgrund der hohen Konservierung des katalytischen Zentrums erschwert. In den vergangenen Jahren wurden zwar zum Teil sehr selektive Verbindungen entdeckt, jedoch zeigten diese Verbindungen toxische Nebenwirkungen oder besaßen schlechte pharmakokinetische Eigenschaften.

1.5.1.1 Therapeutische Bedeutung

Substrate für die NO-Synthase

Eine Steigerung der NO-Synthase kann mit Hilfe alternativer Substrate für die Isoformen der NO-Synthase erreicht werden.¹²³ Neben diesen Substraten gibt es Verbindungen, die über andere Metabolismuswege oder nichtenzymatisch NO freisetzen. Beispiele für diese Verbindungen sind Glyceroltrinitrat, Nitroprussid-Natrium und Molsidomin, welche Arzneistoffe darstellen, die schon sehr lange im Handel sind. Einen Überblick über NO-freisetzende Verbindungen bieten Napoli und Ignarro.¹²⁴

Aufgrund der oben ausgeführten Funktionen von NO im Rahmen der Vasodilatation und der Thrombozytenaggregations-Hemmung stellen insbesondere kardiovaskuläre Erkrankungen Indikationen für eine vermehrte NO-Freisetzung dar. Ein therapeutischer Einsatz bei Hypertonie, endothelialer Dysfunktion, Herzinsuffizienz, Atherosklerose oder erektiler Dysfunktion ist denkbar.

Hemmung der NO-Synthase

In gewissen pathologischen Zuständen kann jedoch auch eine Hemmung der NO-Freisetzung erstrebenswert sein. Hier kann der Einsatz von NOS-Inhibitoren die NO-Biosynthese senken. Es steht jedoch außer Frage, dass lediglich die iNOS

und die nNOS gehemmt werden dürfen, da eine Hemmung der eNOS gravierende Auswirkungen auf den vaskulären Tonus besitzen würde.²³ Folglich können nur Isoform selektive Inhibitoren der NOS eingesetzt werden.

Als Indikationen für NOS-Inhibitoren werden Septischer Schock, Schlaganfall, neurodegenerative Erkrankungen, chronische Entzündungen, rheumatoide Arthritis, Migräne, Entzündungsschmerz (Nozizeption), Diabetes und Meningitis diskutiert.^{22,23}

1.5.1.2 Bekannte NOS-Substrate

In den vergangenen Jahren wurden Untersuchungen durchgeführt, um direkte Substrate für die NO-Synthase zu entwickeln, die meist Modifikationen des natürlichen Substrates L-Arginin bzw. *N*^ω-Hydroxy-L-arginin darstellten. In diesen Studien wurde eine Kettenverlängerung des L-Arginins um eine Methyleneinheit vom Enzym toleriert, während eine Verkürzung der Kettenlänge zum Verlust der Affinität führte.¹²⁵

Interessanterweise führte die Entwicklung von L-Arginin-Analoga ohne α -Amino- bzw. α -Carboxylfunktion zu Substanzen, die eine nur sehr geringe Affinität zur NOS besitzen. Beachtlicherweise wird diese Affinität jedoch wieder hergestellt, wenn sowohl die Amino- als auch die Carboxylfunktion entfernt wurden.¹²³ Daher wurden als weitere Substratklasse die Guanidine und Hydroxyguanidine identifiziert und vielfältige Variationen untersucht. Als Beispiel für die Substrate auf Guanidin-Basis sei das *N*-(4,4,4-Trifluorbutyl)guanidin genannt, das immerhin etwa die Hälfte der NO-Freisetzung des natürlichen Substrates L-Arginin erreicht.¹²⁶ Eine größere Anzahl von Substraten ist auf Basis des *N*-Hydroxyguanidins beschrieben. Das beste Substrat dieser Klasse repräsentiert *N*-Butyl-*N'*-hydroxyguanidin, das 80 % der NO-Freisetzung des NOHAs erzielt.¹²⁷ Eine etwas geringere NO-Bildung wird durch *N*-Hydroxyguanidine mit einer Iso- bzw. Cyclopropyl-Substitution erreicht. Diese beiden Derivate zeigen eine starke nNOS-Selektivität.¹²⁸ Eine weitere Modifikation der Hydroxyguanidine sind arylsubstituierte Derivate wie das *N*-(4-Fluorphenyl)-*N'*-hydroxyguanidin, das 40 % der Aktivität von NOHA an der iNOS zeigt.¹²⁹ Ein großer Nachteil der *N*-hydroxylierten Verbindungen ist ihre leichte enzymatische Reduzierbarkeit, so dass hierdurch *in vivo* keine NO-Spiegel erreicht werden dürften.^{26,130,131} Eine Übersicht über die Strukturen der hier beschriebenen Verbindungen bietet Abb. 1.10.

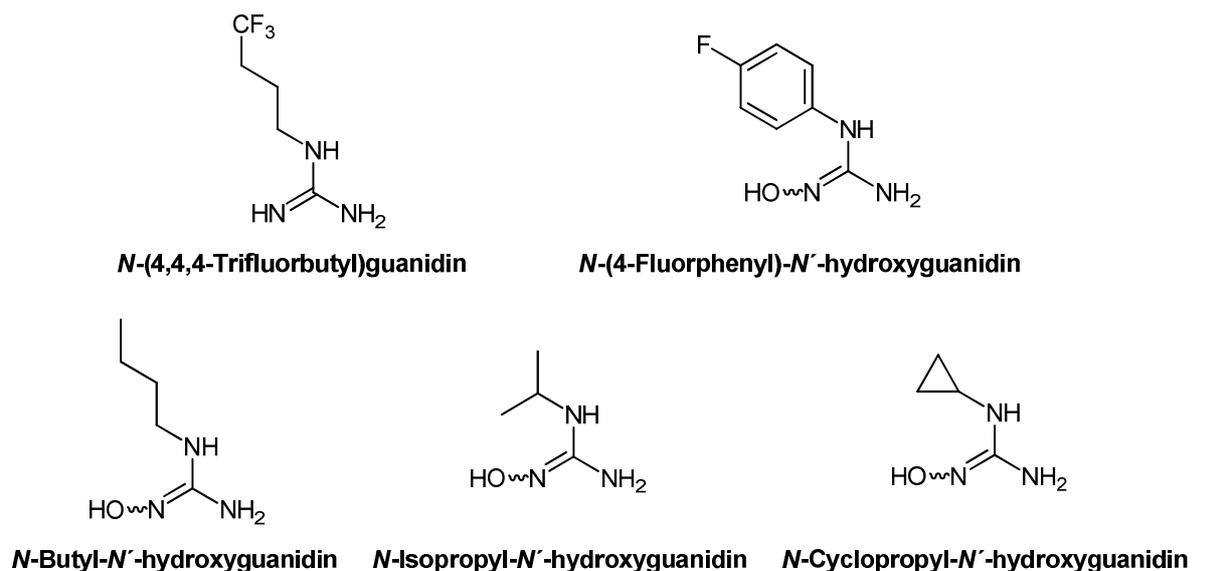


Abb. 1.10: Übersicht über die besten bekannten alternativen Substrate der NO-Synthasen.¹²⁶⁻¹²⁹

1.5.1.3 Bekannte NOS-Inhibitoren

In den vergangenen Jahren wurden Inhibitoren für die NO-Synthasen mit einer großen strukturellen Vielfalt identifiziert. Hierzu zählen Aminosäuren (s.u.), Guanidine (z.B. Aminoguanidin), Amidine (z.B. 1400W, ein selektiver iNOS-Inhibitor) und Isothioharnstoffe (z.B. S-Methylisothioharnstoff).¹³²⁻¹³⁴ Darüber hinaus gibt es weitere Inhibitoren auf Indazol-, Imidazol-, Pteridin- oder Pyridin-Basis.¹³⁵⁻¹³⁸

Aufgrund der komplexen Struktur der NO-Synthasen besitzen diese Inhibitoren eine Vielzahl an unterschiedlichen Angriffspunkten. Bisher wurden Inhibitoren identifiziert, die ihre Wirkung über die L-Arginin-, die Tetrahydrobiopterin-, die Häm-, die Calmodulin- oder die NADPH-Bindungsstelle ausüben.³¹

Im Rahmen dieser Arbeit soll lediglich eine kurze Übersicht über Inhibitoren auf Aminosäure-Basis gegeben werden. Diese Inhibitoren stellen die zuerst entdeckte Hemmstoffklasse dar. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat L-Arginin binden sie vorwiegend in der L-Arginin-Bindungstasche in der Nähe des Häms. Bei den meisten Vertretern dieser Klasse handelt es sich um N^o-substituierte L-Arginin-Derivate wie NMMA, ADMA, N^o-Cyclopropyl-L-arginin, N^o-Propargyl-L-arginin, N^o-Amino-L-arginin und N^o-Allyl-L-arginin.^{132,139,140} Des

Weiteren gibt es N^{δ} -Amino-L-arginin-Derivate, die am aminosubstituierten N^{δ} -Atom eine weitere Alkyl-Gruppe wie beispielsweise einen Trifluorethyl-Rest tragen.¹⁴¹

Neben den L-Arginin-Analoga gibt es die N^{δ} -(1-Iminoethyl)-L-ornithin-Derivate (NIO). Potente Vertreter dieser Klasse sind neben der Grundstruktur NIO das N^{δ} -(1-Iminobutyl)-L-ornithin (Ethyl-NIO) und insbesondere das N^{δ} -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin (Vinyl-NIO).^{142,143} Gute Hemmwirkungen zeigen auch Derivate, deren Hauptkette um eine Methylengruppe verlängert wurde wie das N^{ϵ} -(1-Iminoethyl)-L-lysin. Diese Struktur wurde durch Einbringen einer Thioetherbrücke (GW274150) weiter modifiziert, was zu einer Selektivität für die iNOS führte.^{31,144}

Eine dritte Substanzklasse stellen die L-Thiocitrullin-Derivate dar. L-Thiocitrullin bindet direkt an das Häm, wohingegen S-alkylierte L-Thiocitrullin-Derivate keine direkte Bindung zum Häm ausbilden. Sie stellen klassische kompetitive und derzeit die potentesten Inhibitoren der NO-Synthasen auf Aminosäure-Basis dar (S-Methyl-L-thiocitrullin; K_i 1,2 nM für nNOS).¹⁴⁵ Während L-Thiocitrullin keine Isoform-Selektivität aufweist, zeigen die alkylierten Derivate eine gewisse nNOS-Selektivität.¹⁴⁶ Neuere Verbindungen aus dieser Klasse besitzen einen Ringschluss zwischen dem N^{δ} -Atom und dem S-Atom.¹⁴⁷

Die Grundgerüste dieser drei Inhibitor-Klassen sind in Abb. 1.11 dargestellt.

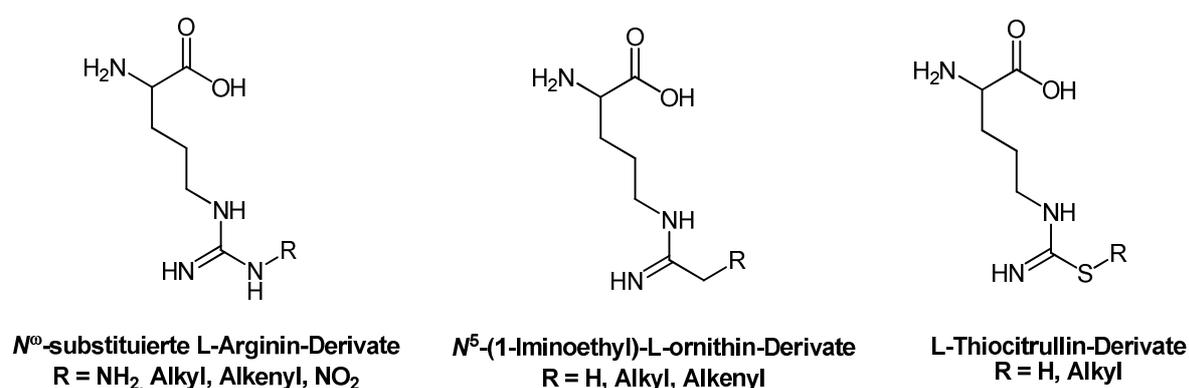


Abb. 1.11: Übersicht über die Grundgerüste der NOS-Inhibitoren auf Aminosäure-Basis.

Neben den bisher beschriebenen Inhibitoren gibt es weitere Hemmstoffe wie z.B. N^{δ} -(2-Nitroaryl)aminosäuren, 5-fluorierte Lysin-Derivate sowie *Homo*-cystein- und Alanin-Analoga.^{16,148}

Alle oben genannten Inhibitoren bis auf *N*⁰-Propyl-L-arginin und die *S*-alkylierten L-Thiocitrullin-Derivate, die eine gewisse Selektivität für die nNOS aufweisen, besitzen eine nur sehr gering ausgeprägte Isoenzym-Selektivität.^{139,142,146} GW274150 hingegen besitzt eine gewisse iNOS-Selektivität.¹⁴⁴

1.5.2 Modulatoren der Arginase

1.5.2.1 Therapeutische Bedeutung

Hemmung der Arginase

In den vergangenen Jahren wurde in mehreren Studien gezeigt, dass eine Arginase-Inhibition zur Erhöhung der NO-Biosynthese ausgenutzt werden kann. So bestätigten Studien an Ratten, dass durch eine Hemmung der Arginase eine endotheliale Dysfunktion reduziert werden kann.¹⁴⁹ In hypertensiven Menschen konnte durch eine Arginase-Inhibition eine Besserung der Erkrankung durch eine erhöhte Vasodilatation erzielt werden.¹⁵⁰ In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Hypertension mit einer erhöhten Expression der Arginase einhergeht und an der verminderten NO-Verfügbarkeit beteiligt ist. Folglich wurde in diesen Studien eine Besserung der Hypertension durch den Einsatz von Arginase-Inhibitoren erzielt.¹⁵¹⁻¹⁵³ Darüber hinaus wurde eine Beteiligung der endothelialen Arginase an der Ausbildung der Atherosklerose identifiziert und es wird spekuliert, dass eine Hemmung der Arginase eine neuartige Therapieoption darstellen kann.¹⁵⁴

In anderen Studien erfolgte der Nachweis, dass altersabhängig eine vermehrte Expression der Arginase stattfindet und diese an der verschlechterten Vasodilatation im Alter beteiligt ist. So konnten in einer klinischen Studie Arginase-Inhibitoren bei älteren Probanden die Vasodilatation auf die Kontrollwerte der jüngeren Kontrollgruppe verbessern.¹⁵⁵ Darüber hinaus ist bemerkenswert, dass in Tierversuchen eine Arginase Hemmung bei jungen Kontrollgruppen nahezu keine Wirkung zeigte, wohingegen bei älteren Versuchstieren eine deutliche Verbesserung der endothelialen Dysfunktion gezeigt werden konnte.⁸³ Eine vermehrte Arginase Expression konnte auch bei erektiler Dysfunktion nachgewiesen werden und wird auch hier als Ursache der Erkrankung diskutiert, da die NO-Biosynthese durch die erhöhte Arginase-Aktivität eingeschränkt wird.¹⁵⁶

Mehrere Arbeiten haben inzwischen gezeigt, dass eine Hemmung der Arginase zu einer Verbesserung bei erektiler Dysfunktion führt.^{157,158}

Mittlerweile ist eine Vielzahl weiterer Indikationen entdeckt worden, beispielsweise wird eine Inhibition der Arginase bei Tumorerkrankungen diskutiert, da L-Ornithin das Ausgangsprodukt für die Polyaminsynthese ist. Polyamine wie Putrescin und Spermidin werden insbesondere während der Zellteilung benötigt und sind folglich speziell im schnell proliferierenden Tumorgewebe essenziell. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Arginase-Inhibitor *N*⁰-Hydroxy-L-arginin die Tumorzell-Proliferation hemmt.^{159,160} Als weiteres mögliches Indikationsgebiet für Arginase-Inhibitoren kristallisierte sich in den letzten Jahren die Therapie von *Leishmania* Infektionen heraus. Die Wirkung scheint hierbei neben der erhöhten Freisetzung von zytotoxischem NO insbesondere die Hemmung der Polyamin-Synthese zu sein.^{161,162}

Zusätzlich bemerkenswert ist, dass in Tierversuchen an gesunden Versuchstieren keine unmittelbaren Nebenwirkungen durch eine Arginase Hemmung identifiziert werden konnten.^{153,163}

Zusammenfassend stellt die Arginase ein pharmazeutisch sehr interessantes Target dar. Eine Hemmung der Arginase ist generell vorstellbar zur Therapie von Krankheiten, die mit einem NO-Defizit einhergehen, wie endothelialer Dysfunktion, Hypertension, Atherosklerose, erektiler Dysfunktion sowie bei Tumorerkrankungen und Leishmaniose.

1.5.2.2 Bekannte Arginase-Inhibitoren

Die potentesten Inhibitoren der Arginase stellen die Boronsäure-Derivate S-(2-Boronethyl)-L-cystein und (S)-2-Amino-6-boronhexansäure dar. Sie besitzen bei einem physiologischen pH-Wert K_i -Werte im dreistelligen nanomolaren Bereich. Im schwach Alkalischen bei pH ~ 9 wurden K_i -Werte im einstelligen nanomolaren Bereich bestimmt.¹⁶⁴ Diese Boronsäuren besitzen ein Elektronendefizit, werden daher leicht durch Hydroxid-Ionen nukleophil angegriffen und imitieren als Boronat-Anion den tetraedrischen Übergangszustand des L-Arginins in der Arginase-Katalyse. Diese strukturelle Ähnlichkeit ist für die hohe Affinität zum aktiven Zentrum verantwortlich und erklärt die starke pH-Abhängigkeit dieser Verbindungsklasse.¹⁶⁵

1 Einleitung

Weitere potente Inhibitoren bilden die Derivate auf L-Arginin-Basis, wobei *N*^ω-Hydroxy-*nor*-L-arginin den besten Vertreter dieser Klasse mit einem K_i -Wert von 0,5 μ M repräsentiert.¹⁶⁶ Mittlerweile wurde eine Vielzahl weiterer Inhibitoren auf Aminosäure-Basis identifiziert wie *N*^ω-Hydroxy-L-arginin, *N*^ε-Hydroxy-L-lysin, *N*^ω-Hydroxy-L-indospicin oder (S)-2-Amino-7-oxoheptansäure.^{29,85,167}

Abb. 1.12 liefert einen Überblick über die Strukturen der potentesten Arginase-Inhibitoren.

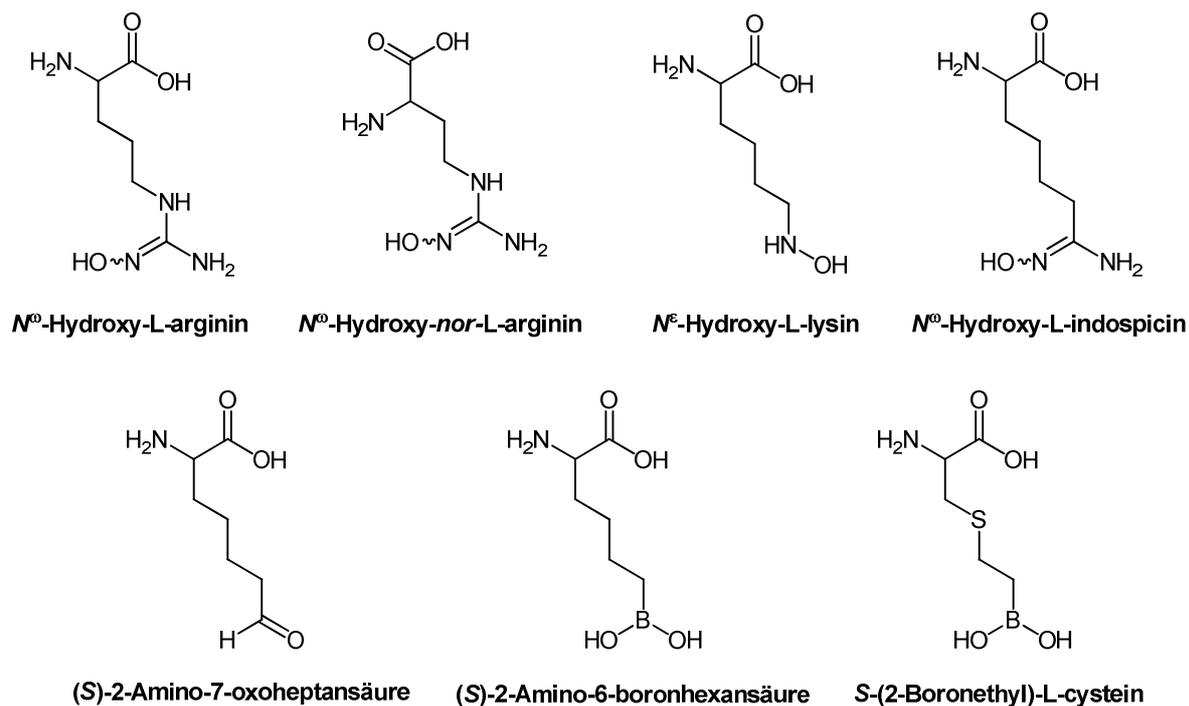


Abb. 1.12: Übersicht über die Strukturen der potentesten Arginase-Inhibitoren.^{29,85,164,166,167}

1.5.3 Modulatoren der DDAH

1.5.3.1 Therapeutische Bedeutung

Die Substrate der DDAH, ADMA und NMMA, repräsentieren endogene Inhibitoren der NO-Synthase und somit stellt eine Modulation der Aktivität der DDAH einen neuen interessanten Mechanismus zur indirekten Beeinflussung der NOS-Aktivität dar.¹⁶⁸

Aktivierung der DDAH

Eine Aktivierung der DDAH stellt einen pharmazeutisch sehr interessanten Ansatzpunkt zur Therapie von Krankheiten dar, die auf eine mangelnde NO-Bioverfügbarkeit zurückzuführen sind. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass durch eine Überexpression der DDAH-1 die Plasmaspiegel von ADMA gesenkt wurden und eine vermehrte NO-Biosynthese stattfand.¹⁶⁹ Theoretisch besteht die Möglichkeit, die Expression der DDAH-1 zu steigern. Jedoch sind hierfür nur wenige Verbindungen bekannt und die Selektivität einer solchen Therapie ist fraglich.¹⁶⁸ Darüber hinaus sind allosterische Effektoren oder eine Beeinflussung posttranskriptioneller Prozesse denkbar. Jedoch ist über solche Verbindungen bisher nichts bekannt.

Hemmung der DDAH

Die Entwicklung von DDAH-Inhibitoren ist hingegen schon weiter fortgeschritten. Wie unter 1.3.4 bereits dargestellt, wurde eine Kolo-kalisation der DDAH-1 und der nNOS sowie eine Koexpression der DDAH-2 und der eNOS nachgewiesen.^{93,94} Dies führt zu der Hoffnung, mit Hilfe von Isoform selektiven DDAH-1-Inhibitoren gezielt die nNOS zu hemmen.

Mittlerweile konnte in mehreren Studien eine Beeinflussung der NO-Biosynthese durch eine Modulation der DDAH-Aktivität bestätigt werden. So wurde in Tiermodellen nachgewiesen, dass eine Hemmung der DDAH zu einem Anstieg der ADMA-Spiegel und des vaskulären Tonus führt.¹⁷⁰⁻¹⁷² Darüber hinaus kommen selektive DDAH-1-Inhibitoren zur Therapie von chronischen Schmerzen sowie des septischen Schockes in Frage.^{172,173} Als weitere Indikationsmöglichkeit könnte eine

Hemmung der DDAH unter anderem in der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Alzheimer Erfolge zeigen, da bei diesem Krankheitsbild sowohl verringerte ADMA-Spiegel als auch eine erhöhte DDAH-Aktivität nachgewiesen wurden.^{174,175}

Des Weiteren wurde eine Beteiligung der DDAH-1 am Tumorwachstum und der Angiogenese nachgewiesen.¹⁷⁶ Tumorgewebe mit erhöhter DDAH-1 Expression proliferierte wesentlich schneller als andere Tumorgewebe. Eine Inhibition der DDAH könnte hier eine neue pharmazeutische Strategie darstellen.

Zusammenfassend kann eine Hemmung der DDAH generell zur Therapie von Krankheiten eingesetzt werden, die mit einer Überproduktion von NO einhergehen. Als Indikationen kommen ebenso wie bei den NOS-Inhibitoren Septischer Schock, chronische Schmerzen, Schlaganfall, neurodegenerative Erkrankungen, chronische Entzündungen, rheumatoide Arthritis, Migräne, und Entzündungsschmerz in Frage.^{22,23,177,178}

1.5.3.2 Bekannte DDAH-Inhibitoren

In den vergangenen Jahren wurden wenige Inhibitoren aus verschiedenen Substanzklassen für die DDAH beschrieben. Die ersten Hemmstoffe waren unselektive Inhibitoren auf Chloracetamidin-Basis oder Derivate des S-Nitroso-*homo*-L-cysteins.^{99,179} Etwa zeitgleich wurden die Pentafluorphenylsulfonate entdeckt (IC₅₀ 16 - 58 µM, *PaDDAH*), die schon früher als Inhibitoren von Cystein-Proteasen bekannt waren.¹⁸⁰ Bei Untersuchungen an den strukturell sehr ähnlichen Enzymen wurde festgestellt, dass sie sowohl die Cystein-Hydrolase DDAH sowie auch die bakterielle Arginin-Deiminase hemmen.

Eine weitere Gruppe sind die L-Arginin-Analoga. Der derzeit potenteste Vertreter der Klasse ist das *N*^ω-(2-Methoxyethyl)-L-arginin (IC₅₀ 22 µM, murine DDAH).¹⁷¹ Im Rahmen der Entwicklung dieser Substanz wurde eine Vielzahl an Derivaten getestet, die im Vergleich zu L-Arginin um eine CH₂-Gruppe verkürzt waren. Diese Verkürzung brachte eine gewisse Selektivität für die DDAH gegenüber der NOS, führte jedoch zu einem Verlust an Hemmpotenz.¹⁷¹

Die letzte Stoffklasse wurde auf der Basis der Röntgenkristallstruktur der *PaDDAH* über virtuelles Modelling entwickelt. Es handelt sich um Indolthiobarbitursäure-Derivate mit SR445 als potentesten Vertreter (IC₅₀ 2 µM, *PaDDAH*).¹⁸¹

Die Strukturen der derzeit potentesten Inhibitoren sind in Abb. 1.13 aufgeführt.

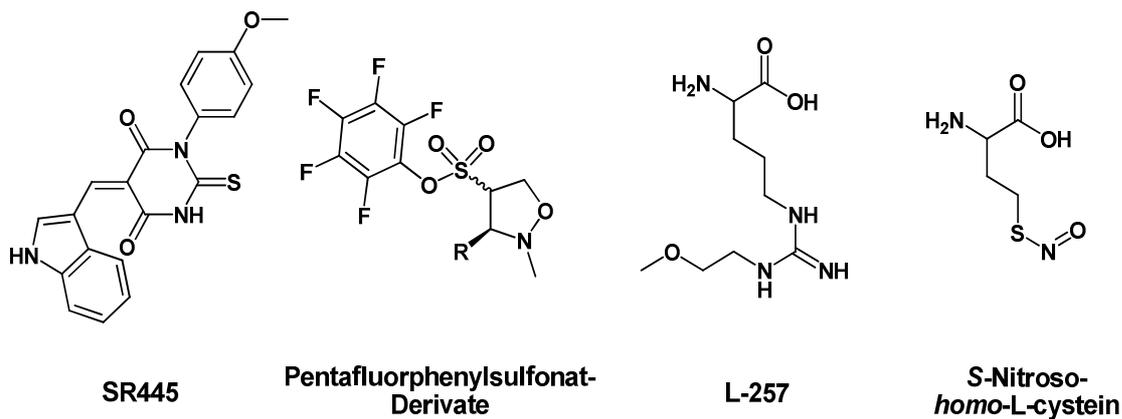


Abb. 1.13: Übersicht über die Strukturen der potentesten DDAH-Inhibitoren.^{99,171,180,181}

1.6 N^{δ} -Methyl-L-arginin

Das physiologische Vorkommen von N^{δ} -Methyl-L-arginin wurde erstmals im Jahre 1998 in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen. Diese Hefezellen verfügten durch einen Gen-Knockout nicht über die Protein-Arginin-Methyltransferase, die für die N^{ϵ} -Methylierung von L-Arginin-Resten verantwortlich ist.¹⁸² Stattdessen wurde in diesen Zellen N^{δ} -Methyl-L-arginin identifiziert. Im folgenden Jahr wurde das für die N^{δ} -Methylierung verantwortliche Enzym identifiziert und als Rmt2 bezeichnet.¹⁸³ Das neu identifizierte Enzym besitzt eine nur geringe Ähnlichkeit zu den anderen PRMTs, jedoch zeigt es strukturelle Ähnlichkeit zur Guanidinoacetat N -Methyltransferase, einem Enzym, das ebenfalls eine N -Methylierung von Guanidinstrukturen katalysiert.⁶³ Es ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert. Im Zellkern befindet es sich insbesondere in den Zellporen und scheint am Zellkernimport bzw. -export beteiligt zu sein.¹⁸⁴ Inzwischen wurde die Rmt2 auch in *Candida albicans* nachgewiesen und das ribosomale Protein L12 als Substrat für die Rmt2 identifiziert.^{185,186}

Der Nachweis eines N^{δ} -methylierenden Enzyms erfolgte bisher nur in Hefen aber nicht in Säugetieren.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die methylierten L-Arginine, N^ω -Monomethyl-L-arginin (NMMA) und N^ω, N^ω -Dimethyl-L-arginin (ADMA), repräsentieren endogene Inhibitoren aller drei Isoformen der NO-Synthase und sind somit an der physiologischen Regulation der NO-Biosynthese beteiligt. In den vergangenen Jahren konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte Plasma-Spiegel dieser Verbindungen mit der Pathologie einer Vielzahl von NO-defizienter Krankheiten korrelieren. Im Gegensatz zu den mittlerweile gut untersuchten N^ω -methylierten L-Argininen ist jedoch nahezu nichts über N^δ -methylierte L-Arginin-Derivate bekannt.

Wie bereits erwähnt, wurde vor einiger Zeit N^δ -Methyl-L-arginin in Hefezellen identifiziert. Obwohl diese Verbindung bisher nicht in Säugetieren nachgewiesen wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob N^δ -Methyl-L-arginin (MA) und seine potenziellen Metabolite aus der NOS-Katalyse, N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (NHAM) und N^δ -Methyl-L-citrullin (MC), Modulatoren des NO-generierenden Systems darstellen (Abb. 1.15).

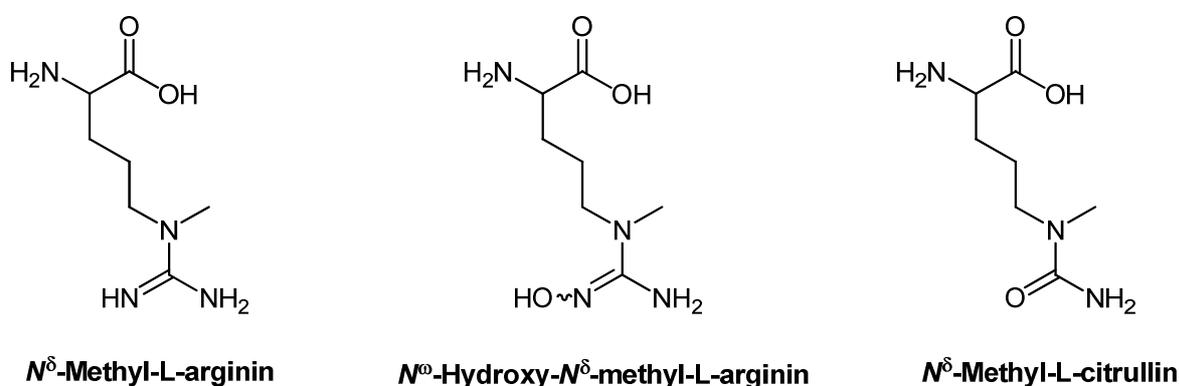


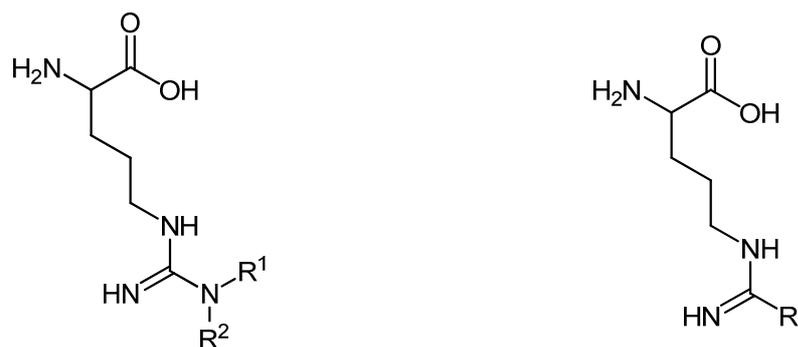
Abb. 1.15: Übersicht über die Strukturen der N^δ -methylierten L-Arginin-Derivate.

Aus diesem Grund wurde eine Modulation der NO-Synthase, Arginase, Protein-Arginin-Methyltransferase und der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) durch diese Verbindungen getestet. Die Untersuchungen sollten zum einen klären, ob N^δ -methylierte L-Arginin-Derivate, sofern sie physiologisch in Säugetieren vorkommen, eine Funktion in der Regulation der NO-Biosynthese einnehmen können. Zum anderen sollte ermittelt werden, ob eine N^δ -Methylierung von L-Arginin-Analoga möglicherweise eine Option in der Entwicklung von Modulatoren des NO-generierenden Systems darstellen kann.

Darüber hinaus sollte eine Reduktion von NHAM sowie von *N*⁰-Hydroxy-L-arginin (NOHA), dem physiologischen Intermediat der NOS-Katalyse, durch Mikrosomen und Mitochondrien untersucht werden. Hierbei sollte insbesondere eine Beteiligung der kürzlich identifizierten Isoenzyme der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente (mARC) an der mitochondrialen Reduktion getestet werden. Diese Untersuchungen sind für die NO-Biosynthese insofern von Bedeutung, da angenommen wird, dass NOHA als Vorstufe von NO im Körper zirkuliert und NOS-unabhängig NO freisetzen kann. Eine physiologische Reduktion würde die Bedeutung dieses Mechanismus erheblich einschränken.

Neben der Reduktion sollte eine mögliche Oxidation von MA und L-Arginin zu NHAM bzw. NOHA durch flavinhaltige Monooxygenasen (FMO) untersucht werden. Diese theoretisch mögliche Reaktion könnte einen weiteren bisher nicht bekannten Mechanismus in der komplexen NO-Biosynthese darstellen. Eine besondere Aufmerksamkeit besaß hierbei die FMO5, da sie die Hauptform der FMOs in der Leber darstellt, bisher jedoch noch kein physiologisches Substrat für dieses Enzym identifiziert werden konnte.

Die DDAH ist ein relativ neu entdecktes Enzym, welches an der Regulation der NO-Synthase-Aktivität beteiligt ist, da es den physiologischen Abbau von ADMA und NMMA katalysiert. In den vergangenen Jahren wurde eine Hemmung der DDAH als neue Strategie zur indirekten Hemmung der NO-Synthase diskutiert. Von der DDAH sind zwei unterschiedliche Isoformen bekannt, die unterschiedliche Gewebeexpressionen zeigen. Die DDAH-1 ist insbesondere mit der nNOS kolokalisiert, während die DDAH-2 in Geweben vorkommt, in denen die eNOS exprimiert wird. Aus diesem Grund beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der rekombinanten Expression der humanen DDAH (hDDAH) und der Entwicklung von DDAH-1-Inhibitoren, mit dem Ziel, über eine Hemmung der hDDAH-1 eine selektive Hemmung der nNOS zu erwirken. Nach einem anfänglichen Substanz-Screening mit strukturell unterschiedlichen Verbindungen sollten insbesondere mit Hilfe von *N*⁰-substituierten L-Arginin-Derivaten und den strukturell sehr ähnlichen *N*⁵-(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithinen potente Inhibitoren für die hDDAH-1 und deren Hemmmechanismus identifiziert werden (Abb. 1.16).



N^{ω} -substituierte L-Arginin-Derivate

N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivate

Abb. 1.16: Übersicht über die Grundgerüste von N^{ω} -substituierten L-Arginin-Derivaten und N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivaten.

Darüber hinaus sollten neue Erkenntnisse über die Struktur-Aktivitätsbeziehungen der hDDAH-1-Inhibitoren gesammelt werden, da trotz publizierter Kristallstrukturen relativ wenig über die Bindungstasche für den N^{ω} -Substituenten des L-Arginins bekannt ist.

2 Untersuchungen an rekombinanten humanen NO-Synthasen

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Mit der Entdeckung von Stickstoffmonoxid als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) und dessen vielseitigen Funktionen begannen Versuche, eine Aktivitätsbeeinflussung der NO-Synthasen (NOSs) pharmazeutisch auszunutzen. Damit solche Modulatoren als Arzneistoffkandidaten in Frage kommen können, ist eine Isoenzym-Selektivität dieser Verbindungen Voraussetzung (Kap 1.5).

Trotz sehr intensiver Forschung auf diesem Gebiet konnten noch keine besseren Substrate als die physiologischen Substrate L-Arginin und N^{ω} -Hydroxy-L-arginin identifiziert werden. Des Weiteren wurde eine Vielzahl an Inhibitoren für die NO-Synthasen entwickelt, doch hat noch keine dieser Verbindungen die Zulassung als Arzneistoff erhalten. Größte Defizite der bisher identifizierten Inhibitoren sind die mangelnde Isoform-Selektivität und toxische Nebenwirkungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Modulation der NOS-Aktivität durch N^{δ} -methylierte L-Arginin-Derivate untersucht. Bisher konnte N^{δ} -Methyl-L-arginin (MA) nur in Hefezellen nachgewiesen werden.¹⁸² Unter der Annahme, dass diese Verbindung auch in Säugetieren vorkommt, wurde eine mögliche Umsetzung dieser Verbindung ebenso wie eine von N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) durch die Isoenzyme der NOS untersucht. Darüber hinaus ist, aufgrund der starken strukturellen Verwandtschaft zu L-Arginin, auch eine Anlagerung dieser Verbindungen im aktiven Zentrum der NOSs und dadurch eine Hemmung der Enzyme denkbar. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Hemmung der NOS-Isoenzyme durch MA, NHAM und N^{δ} -Methyl-L-citrullin (MC) untersucht.

Obwohl die Existenz der N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivate in Säugetieren bisher nicht nachgewiesen wurde, sollten diese Untersuchungen erste Hinweise darauf geben, ob diese Verbindungen eine physiologische Bedeutung in der Regulation der NOS-Aktivität in Säugetieren einnehmen können. Zusätzlich sollten neue Erkenntnisse erhalten werden, ob eine N^{δ} -Methylierung zur Entwicklung neuartiger NOS-Modulatoren ausgenutzt werden kann.

2.2 Materialien und Methoden

2.2.1 Materialien

2.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, waren diese kommerziell erhältlich und wurden entweder über Sigma-Aldrich, Fluka, Roth oder Merck bezogen. Methanol und Acetonitril wurden von J.T. Baker (Griesheim) und Tetrahydro-L-biopterin (H₄B) von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) erworben. Die *N*^δ-methylierten Verbindungen *N*^ω-Hydroxy-*N*^δ-methyl-L-arginin (NHAM), *N*^δ-Methyl-L-citrullin (MC) und *N*^δ-Cyan-*N*^δ-methyl-L-ornithin (CMO) wurden im eigenen Arbeitskreis von D. Schade synthetisiert.¹⁸⁷ *N*^δ-Methyl-D,L-arginin wurde aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Steglich (Institut für Organische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.¹⁸⁸

2.2.1.2 Geräte

Zur Durchführung der Inkubationen wurden 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und ein IKA-Vibrax-VXR Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Die Abtrennung der Proteine erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge 2043 (Hettich, Tuttlingen). Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Das Fließmittel für die HPLC wurde mit einem Sonorex Super Rk 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast. Die photometrische Vermessung der Proben des Nitrit-Assays erfolgte mit Hilfe des Cary 50 UV-Vis Photometers (Varian, Darmstadt) in Plastibrand UV-Küvetten mikro (Brand, Wertheim).

2.2.1.3 Enzyme

Die für die Hemmstudien verwendeten rekombinant exprimierten humanen eNOS und nNOS wurden ebenso wie die rekombinante humane iNOS und das Calmodulin aus Rinderhirn von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) bezogen. Die rekombinant exprimierten humanen eNOS und nNOS für die Substratstudien wurden von Herrn Prof. Mayer (Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich) erworben. Die Laktat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel wurde über Sigma-Aldrich (München) erworben.

2.2.2 Analytische Methoden

2.2.2.1 Nitrit-Assay (Griess-Reaktion)

100 µl des Überstandes aus den Enzyminkubationen für die Hemmstudien (Kap. 2.2.3.1) wurden abgenommen und mit 24 µl Griess-Reagenz (bestehend aus gleichen Volumenanteilen Sulfanilamid 5,4 % und *N*-(1-Naphthyl)-ethylendiamin 0,9 % in 1 N HCl) versetzt. Der sich ausbildende Farbstoff wurde innerhalb von 20 min bei 543 nm in Mikroküvetten vermessen. Überschüssiges NADPH wurde vor der Farbstoffbildung durch eine weitere Inkubation mit Laktat-Dehydrogenase und Natriumpyruvat entfernt, da es sowohl das Diazoniumkation als auch den entstandenen Azo-Farbstoff reduzieren kann.⁵ Die Absorption wurde jeweils gegen einen Leerwert, der alle Cofaktoren enthielt, gemessen. Alle Ansätze wurden doppelt vermessen.

2.2.2.2 Kalibrierung und Wiederfindung Nitrit-Assay

Es wurde eine Sechspunkt-Kalibrierung für Nitrit in dem Bereich zwischen 0,8 und 25 µM durchgeführt.

Für die Wiederfindung wurden denselben Nitrit-Konzentrationen 6,8 µg hitzedenaturiertes Protein zugefügt.

2.2.2.3 HPLC-Methode

Zur Trennung der möglichen Metabolite: N^{δ} -Methyl-D,L-arginin, N^{α} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin, N^{δ} -Methyl-L-citrullin, N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin, L-Arginin und L-Citrullin wurde eine neue HPLC-Analytik mit automatisierter *o*-Phthaldialdehyd (*o*-PA) Vorsäulenderivatisierung in Anlehnung an ein Verfahren nach Patchett *et al.* entwickelt und etabliert.¹⁸⁹

HPLC-Anlage: Waters Autosampler 717plus, Waters 600 Controller, Waters 600 Pump, Waters Fluorescence Detector 470 und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)

Stationäre Phase: NovaPak RP-18-Säule 4 μm (4 x 150 mm, VDS Optilab)
Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)

Temperatur: 30 $^{\circ}\text{C}$

Mobile Phase:	Eluent A:	10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 4,65	86 %
		Acetonitril	8 %
		Methanol	6 %
	Eluent B:	Acetonitril	40 %
		Methanol	30 %
		<i>Aqua bidest.</i>	30 %

Flussrate: 1 ml / min

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	-
2	100	-
3,5	96	4
10	96	4
13	93	7
22	93	7
24	76	24
32	76	24
34	40	60
36	40	60
38	100	-
46	100	-

Detektion: Fluoreszenz: λ_{ex} : 338 nm; λ_{em} : 425 nm

Injektionsvolumen: 5 μl

Derivat.-Reagenz: 50 mg *o*-Phthaldialdehyd gelöst in 1 ml Methanol
 + 9 ml 0,2 M Kaliumborat-Puffer pH 9,4
 + 53 μl 2-Mercaptoethanol

Derivatisierung: Der Autosampler wurde so programmiert, dass 5 μl der Probe mit 7 μl des Derivatisierungs-Reagenzes gemischt wurden und 1 min bei RT vor der Injektion reagieren konnten.

Retentionszeiten:

L-Citrullin	13,5	\pm	0,3 min
L-Arginin	16,6	\pm	0,3 min
NHAM	18,8	\pm	0,4 min
MA	21,2	\pm	0,4 min
MC	23,4	\pm	0,3 min
CMO	33,6	\pm	0,2 min

2.2.2.4 Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode

Es wurden Siebenpunkt-Kalibrierungen für MC, CMO und NHAM in den Bereichen zwischen 1 und 200 µM durchgeführt.

Zur Durchführung der Wiederfindungen wurden MC, CMO und NHAM in denselben Konzentrationen wie bei der Kalibrierung eingesetzt, mit 6,8 µg hitzedenaturiertem Protein versetzt und in Triethanolamin-Puffer pH 7,4 mit allen Cofaktoren (Kap. 2.2.3.1) über 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 40 µl Acetonitril versetzt, 5 min bei 8.000 g zentrifugiert und der Überstand der HPLC zugeführt.

2.2.2.5 LC/MS-Analytik

Zur Identifizierung der gebildeten Metabolite wurde eine auf der HPLC-Methode basierende LC/MS-Analytik entwickelt.

HPLC-Pumpe:	HP Series 1100 Binary Pump G1312A
Entgaser:	HP Degasser G1322A
UV-Detektor:	HP 1314 a, 220 nm
Injektor:	Rheodyne 7725 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion
MS:	Esquire-LC (Bruker, Bremen)
Interface:	Elektronen Spray Ionisation (ESI)+, 350 °C
Trockengas:	8,5 l / min
Nebulizer:	15 psi
Scan:	50 - 650 m / z
Software:	Agilent ChemStation HPLC Aufnahme- und Auswertesoftware (Version A.09.01) Esquire Control (Version 6.14) MS Aufnahmesoftware Data Analysis (Version 3.0) MS Auswertesoftware
Stationäre Phase:	NovaPak C18 (3.9 x 150 mm, Waters) Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)
Säulentemperatur:	RT

2 Untersuchungen an rekombinanten humanen NO-Synthasen

Mobile Phase:	Eluent A:	10 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 5,0	86 %
		Acetonitril	8 %
		Methanol	6 %
	Eluent B:	Acetonitril	40 %
		Methanol	30 %
		<i>Aqua bidest.</i>	30 %

Flussrate: 1 ml / min

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	-
2	100	-
28	70	30
30	70	30
36	100	-
40	100	-

Injektionsvolumen: 10 µl

Retentionszeit:

CMO 22,7 ± 0,2 min

Die Derivatisierung mit *o*-PA wurde entsprechend der HPLC-Methode (Kap. 2.2.2.3) durchgeführt.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Hemmstudien mit humanen NOS-Isoenzymen

2.2.3.1.1 *In vitro* eNOS-Assay

Ein vollständiger Inkubationsansatz bestand aus 1 mM NADPH, 5 μ M FMN, 5 μ M FAD, 10 μ M H₄B, 1 mM CaCl₂, 1,28 μ g Calmodulin und 5 mM 1,4-Dithiothreitol gelöst in 50 mM Triethanolamin-Puffer pH 7,0 mit einem Endvolumen von 64 μ l. Der jeweilige Hemmstoff wurde in Konzentrationen von 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 und 10 mM eingesetzt. Als Enzymquelle wurden 6,8 μ g rekombinante humane eNOS (Quelle: Alexis Biochemicals) eingesetzt und durch Zugabe von 1 mM L-Arginin die Reaktion gestartet.

Die Inkubation erfolgte über 30 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C in Gegenwart von Luftsauerstoff. Anschließend wurden 16 μ l eines Gemisches aus Laktat-Dehydrogenase (20 U / ml) und 1,6 mM Natriumpyruvat hinzugefügt, um überschüssiges NADPH zu oxidieren, welches im Folgenden die Ausbildung des Farbstoffes beeinträchtigen könnte.⁵ Nach einer weiteren Inkubation von 15 min bei 37 °C wurde die Reaktion mit 40 μ l eiskaltem Acetonitril abgestoppt. Anschließend wurden die Proben für 5 min geschüttelt und dann 5 min lang bei 8.000 g zentrifugiert.

100 μ l des Überstandes wurden zur Derivatisierung mit Griess-Reagenz abgenommen und mittels des Nitrit-Assays vermessen (Kap. 2.2.2.1).

Parallel zu jeder durchgeführten Hemmstudie wurden drei Inkubationen ohne Inhibitorzusatz durchgeführt. Die in diesen Proben gebildete Nitrit-Konzentration wurde gleich 100 % gesetzt und die gebildete Nitrit-Konzentration in den gehemmten Ansätzen auf diesen Wert bezogen. Die IC₅₀-Werte wurden durch Interpolation bestimmt.

2.2.3.1.2 *In vitro* iNOS-Assay

Für den *in vitro* iNOS-Assay wurden als Enzymquelle 6,8 μ g rekombinante humane iNOS (Quelle: Alexis Biochemicals) eingesetzt und auf den Zusatz von CaCl₂ und Calmodulin verzichtet. Bis auf diese Änderung entsprach die Durchführung der für eNOS (Kap. 2.2.3.1.1).

2.2.3.1.3 *In vitro* nNOS-Assay

Als Enzymquelle wurden 6,8 µg rekombinante humane nNOS (Quelle: Alexis Biochemicals) eingesetzt und die Enzyminkubation, wie für die eNOS beschrieben (Kap. 2.2.3.1.1), durchgeführt.

2.2.3.2 Assay Validierung für Substratstudien

2.2.3.2.1 Proteinabhängigkeit der nNOS-Katalyse

Für die Substratstudien wurde eine neue HPLC-Analytik entwickelt sowie eine neue Enzymquelle (Prof. Mayer) verwendet. Daher musste die einzusetzende Enzymmenge ermittelt werden, die eine ausreichende Quantifizierung der Produkte *via* HPLC gewährleistete. Zur Ermittlung der einzusetzenden Enzymmenge für die Substratstudien wurde die Proteinabhängigkeit der Umsetzung untersucht. Dazu wurden die Inkubationsbedingungen der Hemmstudien (Kap. 2.2.3.1.3) eingehalten mit dem Unterschied, dass kein Inhibitor zugefügt wurde und die eingesetzte Proteinmenge zwischen 0,2 - 1,1 µg variierte. Die Auswertung dieser Studie erfolgte mittels des Nitrit-Assays (Kap. 2.2.2.1).

2.2.3.2.2 Proteinabhängigkeit der eNOS-Katalyse

Die Untersuchung der Proteinabhängigkeit für die eNOS (Prof. Mayer) wurde wie die voranstehend beschriebenen Hemmstudien (Kap. 2.2.3.1.1) durchgeführt mit dem Unterschied, dass den Ansätzen kein Inhibitor zugesetzt wurde und die Proteinmenge zwischen 0,8 - 4,2 µg variierte. Die Auswertung dieser Studie erfolgte mittels des Nitrit-Assays (Kap. 2.2.2.1).

2.2.3.3 Aktivitätsverlust durch einen Einfrier- / Auftau-Zyklus

Beispielhaft für alle Isoenzyme wurde für die eNOS untersucht, wie stark der Aktivitätsverlust durch einen Einfrier- / Auftau-Zyklus ist. Hierzu wurden drei Inkubationen mit eNOS sofort nach dem Auftauen des Enzyms und drei Inkubationen nach erneutem Einfrieren und Auftauen des Enzyms durchgeführt. Die Durchführung der Inkubationen entsprach der unten angegebenen Substratstudie (Kap. 2.2.3.4) mit dem Unterschied, dass L-Arginin als Substrat in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt wurde.

2.2.3.4 Substratstudien mit humanen NOS-Isoenzymen

Aufgrund einer höheren spezifischen Aktivität wurden für die Substratstudien eNOS und nNOS von Herrn Prof. Mayer verwendet. Zeitgleich wurde bei Alexis Biochemicals eine andere Formulierung der iNOS eingeführt, die für die weitere Testung eingesetzt wurde. Die eingesetzten Enzymmengen pro Inkubation betragen:

nNOS	=	0,87 µg
eNOS	=	2,52 µg
iNOS	=	10,41 µg

Zusätzlich bestand ein Inkubationsansatz aus 1 mM NADPH, 5 µM FMN, 5 µM FAD, 10 µM H₄B, 1 mM CaCl₂, 1,28 µg Calmodulin und 5 mM 1,4-Dithiotreitol gelöst in 50 mM Triethanolamin-Puffer pH 7,0 mit einem Endvolumen von 64 µl. Bei Inkubationen mit iNOS wurde auf den Zusatz von CaCl₂ und Calmodulin verzichtet. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Substrates (MA bzw. NHAM) in Endkonzentrationen von 0,1, 1 und 10 mM gestartet. Nach einer Inkubation über 30 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C in Gegenwart von Luftsauerstoff wurde die Reaktion mit 40 µl eiskaltem Acetonitril abgestoppt. Anschließend wurden die Proben für 5 min geschüttelt und 5 min lang bei 8.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt.

2.3 Ergebnisse & Diskussion

2.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung Nitrit-Assay

Die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden für Nitrit verliefen in dem Bereich von 0,8 - 25 μM linear ($R^2 > 0,999$). Die Wiederfindungsrate für Nitrit betrug 103 % (Abb. 2.1).

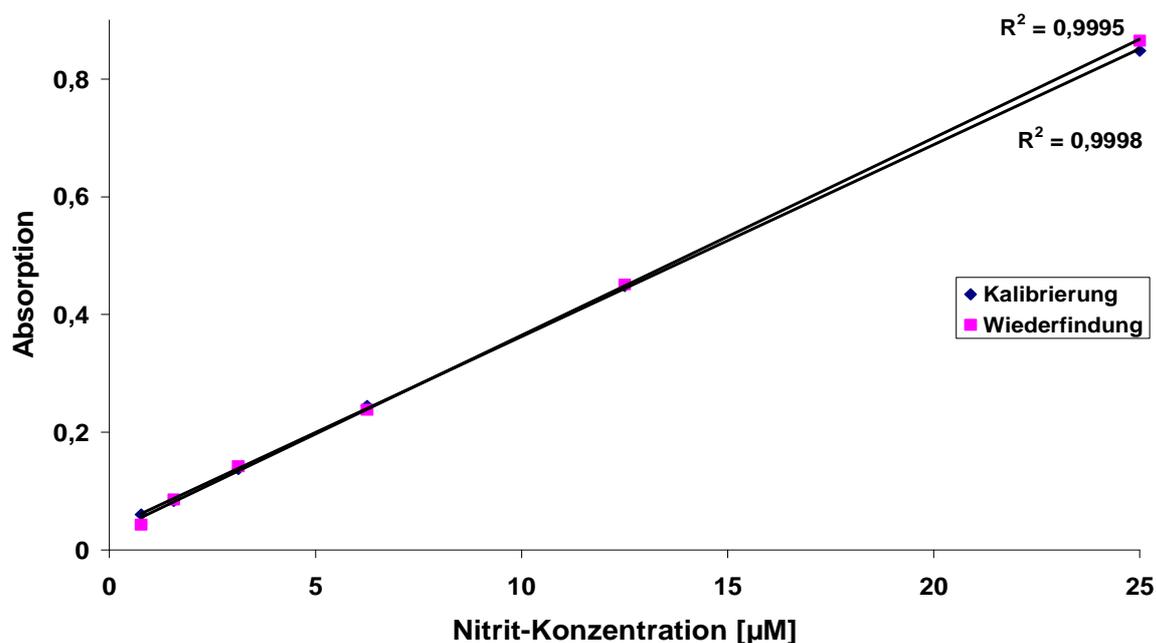


Abb. 2.1: Kalibrierung und Wiederfindung für Nitrit. Die ermittelten Absorptionen sind $MW \pm SD$ von drei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode

Die verwendete HPLC-Methode ermöglicht die Trennung von L-Citrullin, L-Arginin, N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (NHAM), N^δ -Methyl-L-arginin (MA), N^δ -Methyl-L-citrullin (MC) und N^δ -Cyan- N^δ -methyl-L-ornithin. Ein repräsentatives Chromatogramm der Standards ist in Abb. 2.2 dargestellt.

2 Untersuchungen an rekombinanten humanen NO-Synthasen

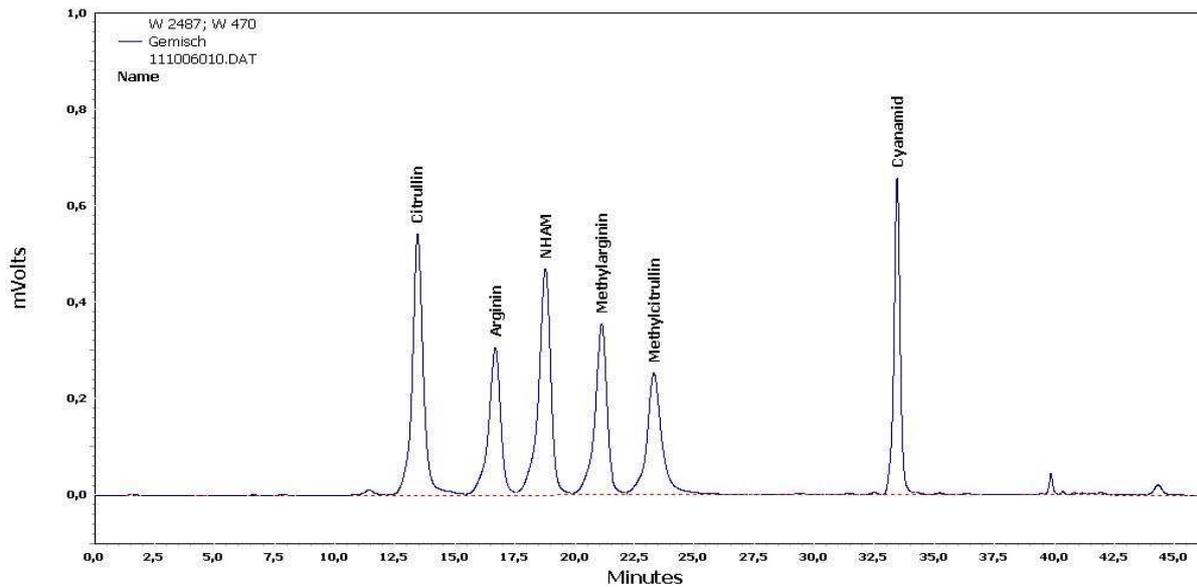


Abb. 2.2: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der NOS-Analytik zur Trennung von L-Citrullin, L-Arginin, N^{ω} -Hydroxy- N^{β} -methyl-L-arginin (NHAM), N^{β} -Methyl-L-arginin (MA), N^{β} -Methyl-L-citrullin (MC) und N^{β} -Cyan- N^{β} -methyl-L-ornithin (CMO, Cyanamid).

Die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden für MC, NHAM und CMO verliefen in dem Bereich von 1 - 200 μM linear ($R^2 > 0,996$). Die Wiederfindungsraten betragen 87 % für MC, 83 % für NHAM und 73 % für CMO (Abb 2.3).

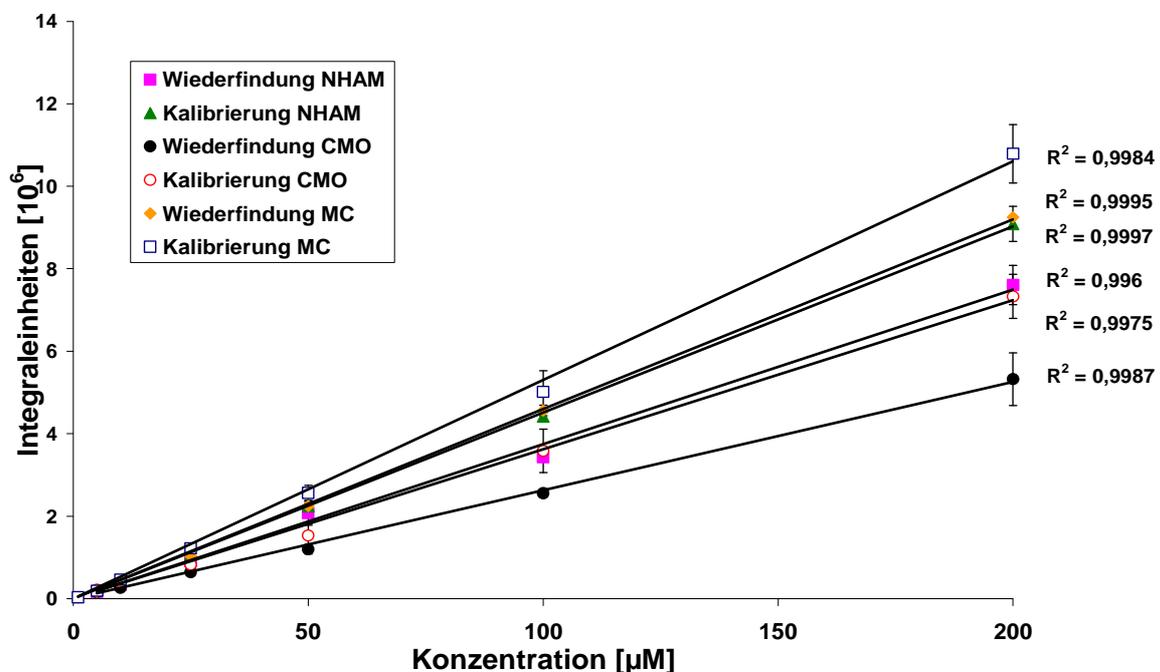


Abb. 2.3: Kalibrierung und Wiederfindung für N^{β} -Methyl-L-citrullin (MC), N^{ω} -Hydroxy- N^{β} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{β} -Cyan- N^{β} -methyl-L-ornithin (CMO) für die verwendete HPLC-Analytik. Die ermittelten Integraleinheiten sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.3 Hemmstudien mit humanen NOS-Isoenzymen

Alle getesteten N^{δ} -methylierten Verbindungen besaßen eine sehr geringe Hemmwirkung auf die Isoenzyme der humanen NO-Synthase (Abb. 2.4 - 2.6).

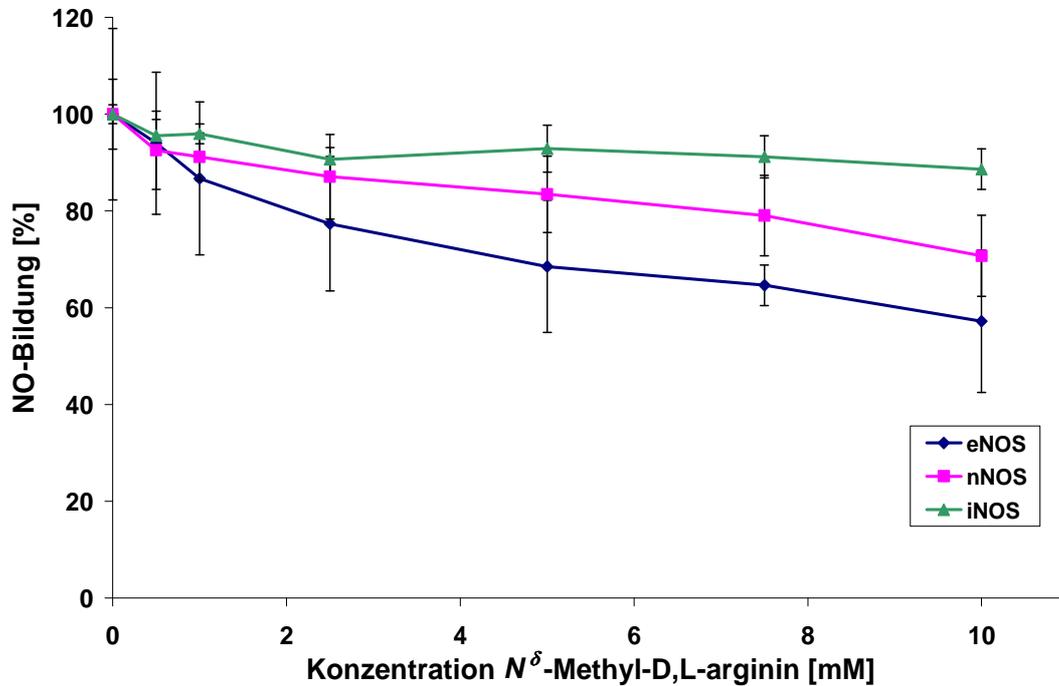


Abb. 2.4: Hemmung der humanen NO-Synthase-Isoformen durch verschiedene Konzentrationen N^{δ} -Methyl-D,L-arginin. Die prozentualen Werte sind bezogen auf drei Kontrollinkubationen ohne Inhibitorzusatz. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von sechs separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

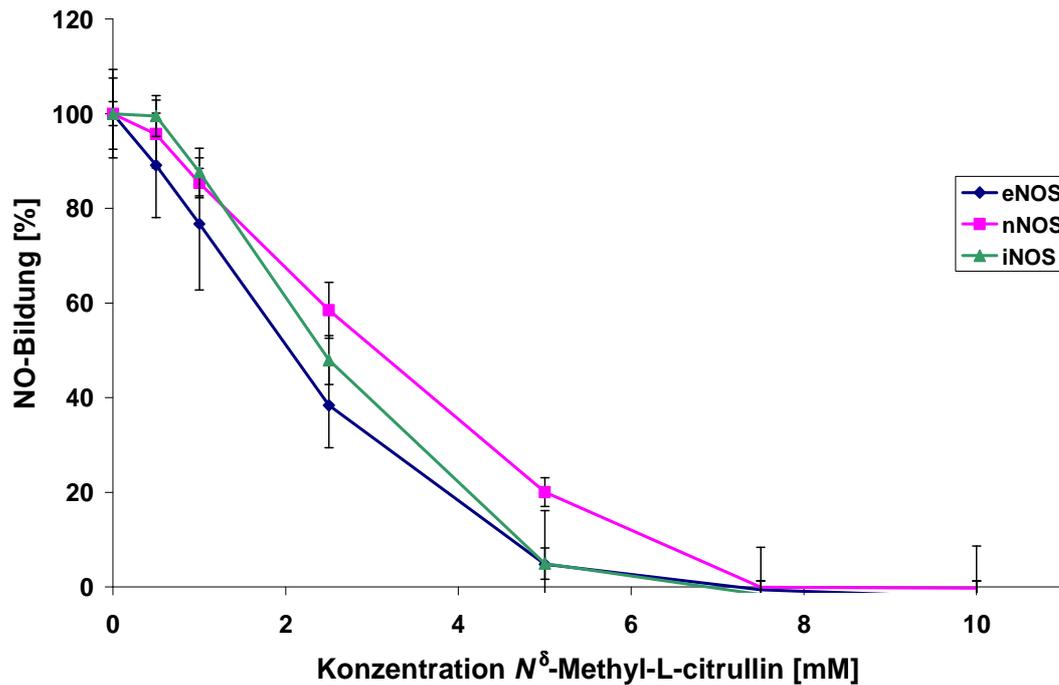


Abb. 2.5: Hemmung der humanen NO-Synthase-Isoformen durch verschiedene Konzentrationen N^δ -Methyl-L-citrullin. Die prozentualen Werte sind bezogen auf drei Kontrollinkubationen ohne Inhibitorzusatz. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von sechs separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

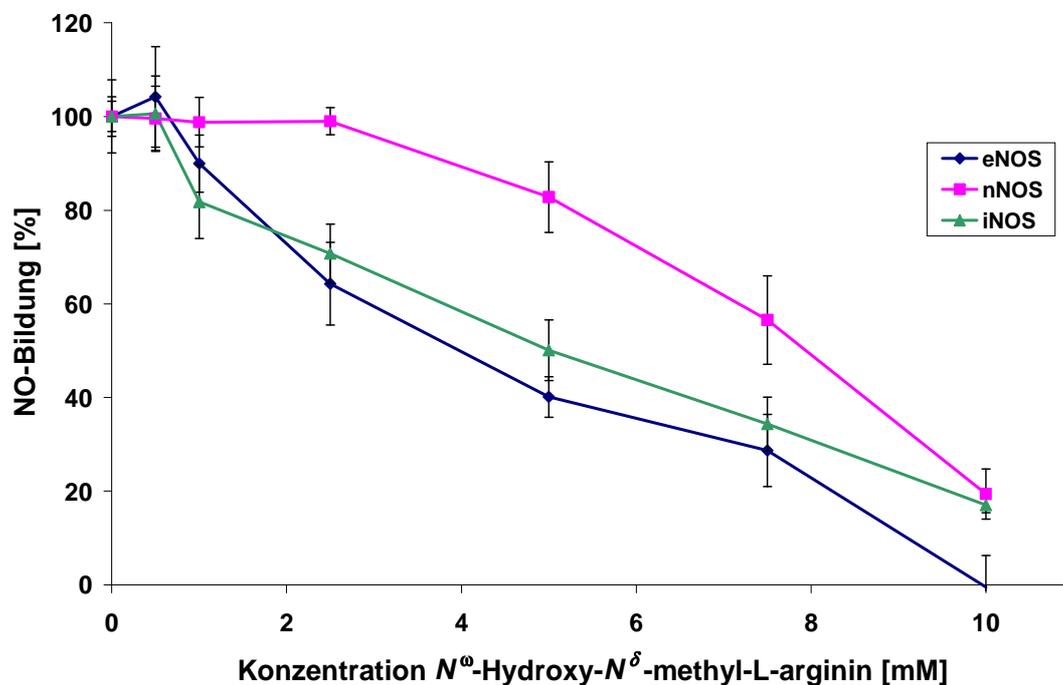


Abb. 2.6: Hemmung der humanen NO-Synthase-Isoformen durch verschiedene Konzentrationen N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin. Die prozentualen Werte sind bezogen auf drei Kontrollinkubationen ohne Inhibitorzusatz. Die ermittelten Konzentrationen sind $MW \pm SD$ von sechs separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die ermittelten IC_{50} -Werte für alle drei getesteten N^{δ} -methylierten Verbindungen liegen im millimolaren Bereich (Tab. 2.1). N^{δ} -Methyl-D,L-arginin zeigt die geringste Hemmpotenz, während N^{δ} -Methyl-L-citrullin den stärksten getesteten Hemmstoff für die verschiedenen Isoenzyme der NO-Synthase darstellt. Die Diagramme zeigen darüber hinaus deutlich, dass diese Verbindungen keine Isoform-Selektivität aufweisen, da alle drei Isoformen gehemmt werden. Die eNOS wird von allen Substanzen am stärksten gehemmt.

Tab. 2.1: *Ermittelte IC_{50} -Werte der getesteten N^{δ} -methylierten Verbindungen [mM]. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um MW \pm SD aus drei separaten Bestimmungen.*

	MA	NHAM	MC
eNOS	> 10	4,0 \pm 0,6	2,0 \pm 0,1
nNOS	> 10	7,9 \pm 0,6	3,0 \pm 0,9
iNOS	> 10	5,0 \pm 2,3	2,4 \pm 0,4

Die vergleichsweise geringen Hemmwirkungen zeigen, dass durch die N^{δ} -Methylierung der L-Arginin-Derivate die Affinität dieser Verbindungen zum aktiven Zentrum der NOSs reduziert wird, so dass sie nicht in der Lage sind, das natürliche Substrat L-Arginin zu verdrängen.

Bisher konnte noch keine der N^{δ} -methylierten Substanzen in Säugetieren nachgewiesen werden. Falls sie doch physiologisch in Säugetieren vorkommen sollten, dann in nanomolaren oder niedrigeren Konzentrationen, die keine Auswirkung auf die NOS-Aktivität besitzen. Aufgrund der hohen IC_{50} -Werte kann eine physiologische Bedeutung dieser N^{δ} -methylierten Substanzen in der Regulation der NOS-Aktivität ausgeschlossen werden.

Des Weiteren ist eine pharmazeutische Verwendbarkeit dieser Substanzen als NOS-Inhibitoren aufgrund der schwachen Hemmwirkung und der mangelnden Isoform-Selektivität ausgeschlossen. Wie in der Einleitung (Kap. 1) ausgeführt wurde, sind eine Vielzahl an potenteren Inhibitoren auf Aminosäure-Basis mit K_i -Werten im nanomolaren und mikromolaren Bereich bereits identifiziert worden. Darüber hinaus wurden einige Verbindungen mit gewissen Isoform-Selektivitäten wie das N^{δ} -Propyl-L-arginin entwickelt.¹³⁹

2.3.4 Assay Validierung für Substratstudien

2.3.4.1 Proteinabhängigkeit der nNOS-Katalyse

Innerhalb dieser Studie konnte eine lineare Abhängigkeit der nNOS-Proteinmenge zur gebildeten Nitrit-Menge nachgewiesen werden. Eine eingesetzte Enzymmenge von 0,87 μg erreichte im Nitrit-Assay eine Absorption von $\sim 0,45$ (Abb. 2.7), was einer Nitrit-Konzentration von 13 μM entspricht. Innerhalb der NOS-Katalyse werden neben NO, das zu Nitrit weiter reagiert, gleiche Mengen L-Citrullin gebildet, die mit der neu entwickelten HPLC-Analytik quantifiziert werden sollten. Eine Quantifizierung von 13 μM L-Citrullin mit Hilfe der HPLC ist unproblematisch. Daher wurde eine Enzymmenge von 0,87 μg für die weiteren Substratstudien ausgewählt.

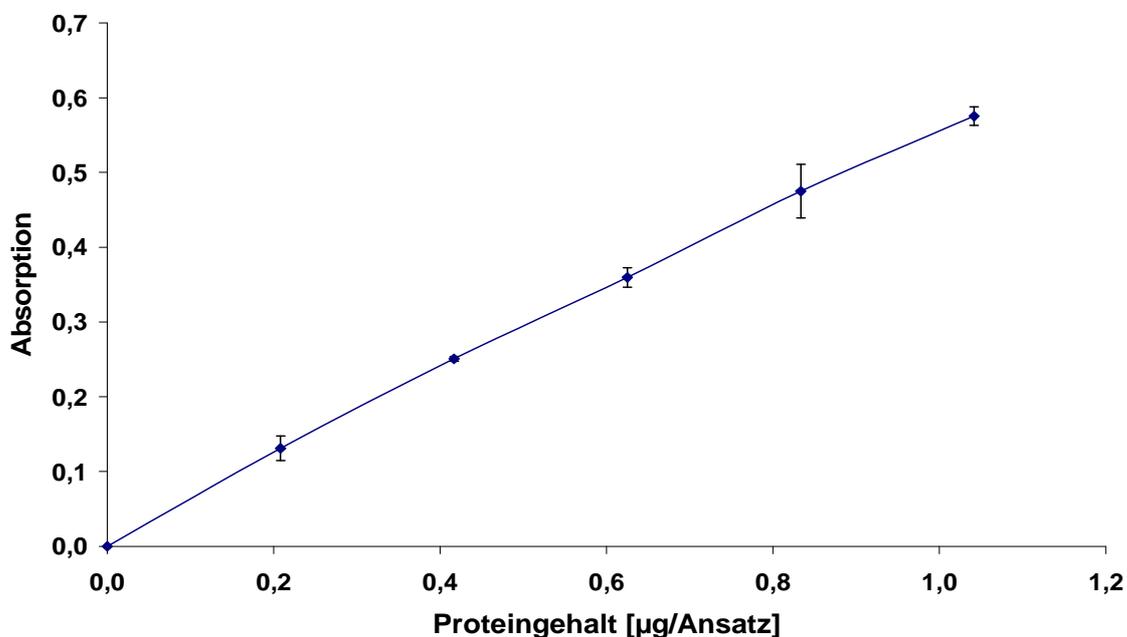


Abb. 2.7: Einfluss der eingesetzten nNOS-Proteinmenge auf die Bildung von Nitrit (gemessen via Nitrit-Assay). Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus vier separaten Bestimmungen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.4.2 Proteinabhängigkeit der eNOS-Katalyse

Bis zu einer eNOS-Enzymmenge von 2,5 μg konnte eine Steigerung der Nitrit-Bildung beobachtet werden. Eine weitere Enzymzugabe bewirkte keine Steigerung der enzymatisch gebildeten Nitrit-Menge (Abb. 2.8). Bei einer eingesetzten Enzymmenge von 2,5 μg konnte eine Nitrit-Bildung von $\sim 8 \mu\text{M}$ nachgewiesen werden. Bei der enzymatischen Umsetzung von L-Arginin durch die

NO-Synthase entstehen gleiche Mengen an L-Citrullin. Eine Quantifizierung der gebildeten Menge mittels HPLC ist möglich. Für die anschließenden Substratstudien wurde eine eNOS Konzentration von 2,5 µg pro Inkubation eingesetzt.

Darüber hinaus zeigte diese Untersuchung, dass die von Herrn Prof. Mayer erhaltene eNOS eine wesentlich geringere spezifische Aktivität als die nNOS besaß.

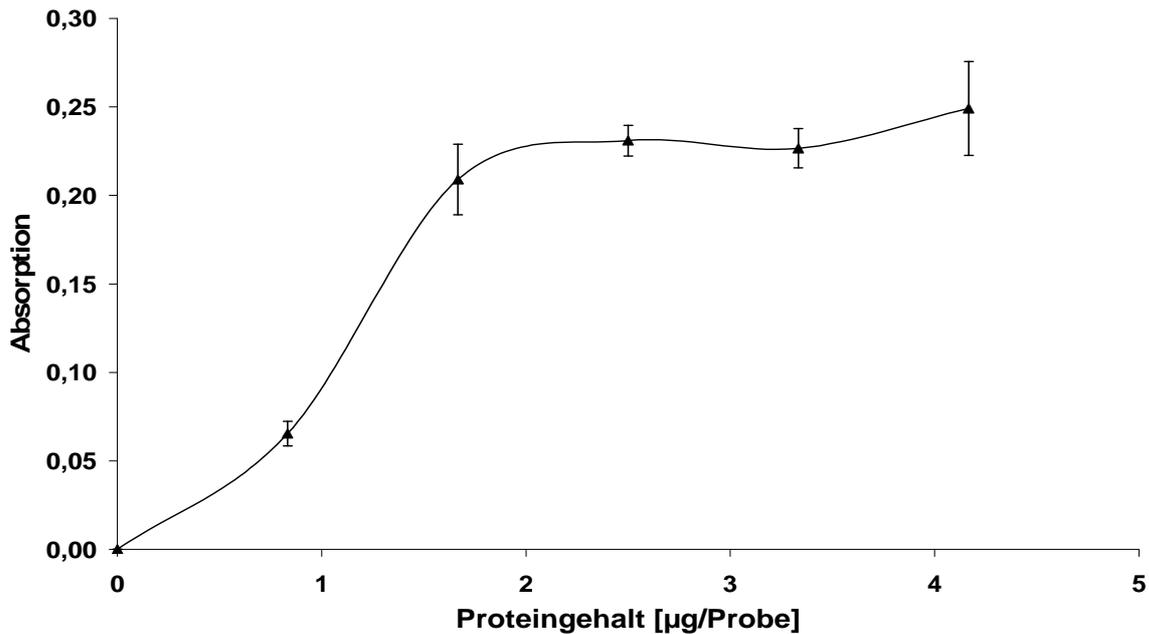


Abb. 2.8: Einfluss der eingesetzten eNOS-Proteinmenge auf die Bildung von Nitrit (gemessen via Nitrit-Assay). Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus vier separaten Bestimmungen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

2.3.4.3 Aktivitätsverlust durch einen Einfrier- / Auftau-Zyklus

Die Enzymaktivität der eNOS wurde durch einen Einfrier- / Auftau-Zyklus um $34,1 \pm 8,0$ % reduziert, so dass die erhaltenen Proteine sofort nach Erhalt aliquotiert und jegliche unnötigen Einfrier- / Auftau-Zyklen vermieden wurden.

2.3.5 Substratstudien mit humanen NOS-Isoenzymen

2.3.5.1 Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin

Substrate für die NOS besitzen, wie in der Einleitung (Kap.1) dargestellt, ein großes pharmazeutisches Potenzial zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen, die auf einem Defizit in der NO-Biosynthese basieren. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Substrataktivität für MA und NHAM getestet, da es sich bei diesen Verbindungen um potenzielle Vorstufen in der NO-Biosynthese handelt.

Bei einer Verstoffwechslung von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin durch die NO-Synthase sollte in Analogie zur L-Arginin-Katalyse über einen ersten Schritt das Intermediat NHAM gebildet werden, das in einem zweiten Schritt zu NO und dem methylierten Harnstoffderivat N^{δ} -Methyl-L-citrullin umgesetzt wird.

In der Literatur sind hierzu verschiedene Ergebnisse beschrieben worden. Zum einen wurde von Töpker mit verschiedenen Säugetier NO-Synthasen nachgewiesen, dass MA nicht durch die NOSs verstoffwechselt wird, während NHAM durch eine Entkopplung des katalytischen Zyklus nichtenzymatisch von Superoxidationen zu N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin (CMO) umgesetzt wird.¹⁹⁰ Zu diesem bekannten Entkopplungsmechanismus der NO-Synthasen, der zur Bildung von Superoxidationen führt, kommt es in Abwesenheit eines Substrates oder des Cofaktors H_4B .^{34,58} Entgegen den Ergebnissen von Töpker zeigten Luzzi *et al.*, dass eine Hydroxylierung von MA zu NHAM durch die NO-Synthase stattfindet, aber keine weitere Umsetzung zu MC und NO erfolgt. Eine Bildung von CMO wurde in dieser Studie nicht beschrieben. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse und der Tatsache, dass in den publizierten Untersuchungen nur humane iNOS als Enzymquelle verwendet sowie auf weitere Untersuchungen mit NHAM als Substrat verzichtet wurde, erfolgte eine Wiederholung der Testung sowie eine Ausweitung auf alle humanen Isoenzyme.¹⁹¹

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubationen wurde MA in drei verschiedenen Konzentrationen (0,1, 1, 10 mM) mit allen drei humanen NOS-Isoformen getestet.

In den Inkubationen mit eNOS und nNOS konnte bei allen eingesetzten Konzentrationen eine Hydroxylierung von MA zu NHAM beobachtet werden. Bei der iNOS war eine Hydroxylierung erst ab einer eingesetzten Konzentration von

1 mM MA zu detektieren (Tab. 2.2). Eine weitere Umwandlung zu MC konnte in keiner der analysierten Proben nachgewiesen werden.

Tab. 2.2: Gebildete Konzentrationen an NHAM bei Inkubationen von MA mit humanen NO-Synthase-Isoenzymen [μM]. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $\text{MW} \pm \text{SD}$ aus vier separaten Inkubationen, die jeweils doppelt per HPLC vermessen wurden. n.d., nicht detektierbar.

	Eingesetzte Menge an N^{δ} -Methyl-D,L-arginin		
	0,1 mM	1 mM	10 mM
eNOS	$0,2 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
nNOS	$0,2 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,3$
iNOS	n.d.	$0,2 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,3$

Entgegen den Erwartungen bildet sich also nicht das methylierte Harnstoffderivat MC, sondern die Reaktion bleibt auf der Stufe des Intermediates NHAM stehen. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Untersuchungen von Luzzi *et al.*¹⁹¹ Jedoch wurde im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen erstmals die Hydroxylierung von MA auch für die eNOS und nNOS nachgewiesen.

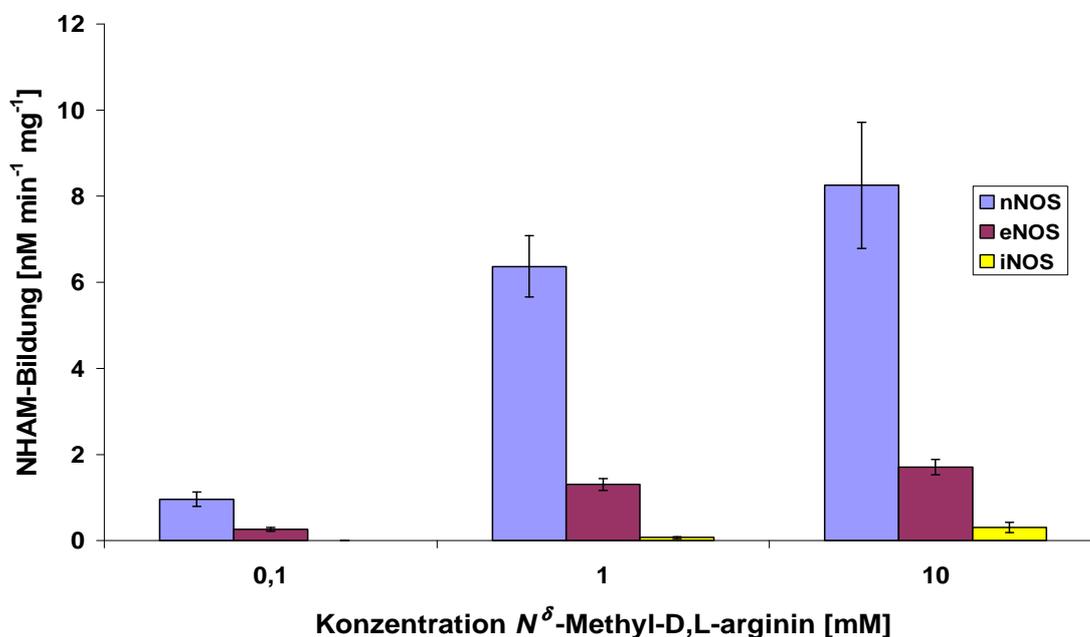


Abb. 2.9: Darstellung der spezifischen Aktivitäten der verschiedenen humanen NOS-Isoenzyme für die Hydroxylierung von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA) zu N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) mit unterschiedlichen Konzentrationen von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $\text{MW} \pm \text{SD}$ aus sechs separaten Inkubationen, die jeweils doppelt per HPLC vermessen wurden.

2 Untersuchungen an rekombinanten humanen NO-Synthasen

Die verwendete humane nNOS besitzt die höchste spezifische Aktivität für die MA-Hydroxylierung, während die iNOS die geringste Aktivität aufweist (Abb. 2.9). Die eingesetzte iNOS besitzt jedoch auch für die Umsetzung von L-Arginin eine geringere spezifische Aktivität als die anderen verwendeten Isoformen (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Spezifische Aktivitäten der verschiedenen Isoenzyme der NO-Synthase für die Umsetzung von L-Arginin.

	nNOS	eNOS	iNOS
Spezifische Aktivität [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	22,4	6,1	1,8

Aus diesem Grund wurde in Abb. 2.10 eine Darstellung gewählt, die die spezifische Aktivität für die MA-Hydroxylierung in Relation zur spezifischen Aktivität der L-Arginin-Katalyse bei einem Substrateinsatz von 1 mM wiedergibt. Bei dieser Darstellung ist zu berücksichtigen, dass die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin über das Intermediat NOHA so schnell abläuft, dass mit den zur Verfügung stehenden Möglichkeiten eine separate Aktivitätsbestimmung für die Hydroxylierungsreaktion von L-Arginin nicht möglich war und somit die MA-Hydroxylierung mit der Bildung von L-Citrullin aus L-Arginin verglichen wird.

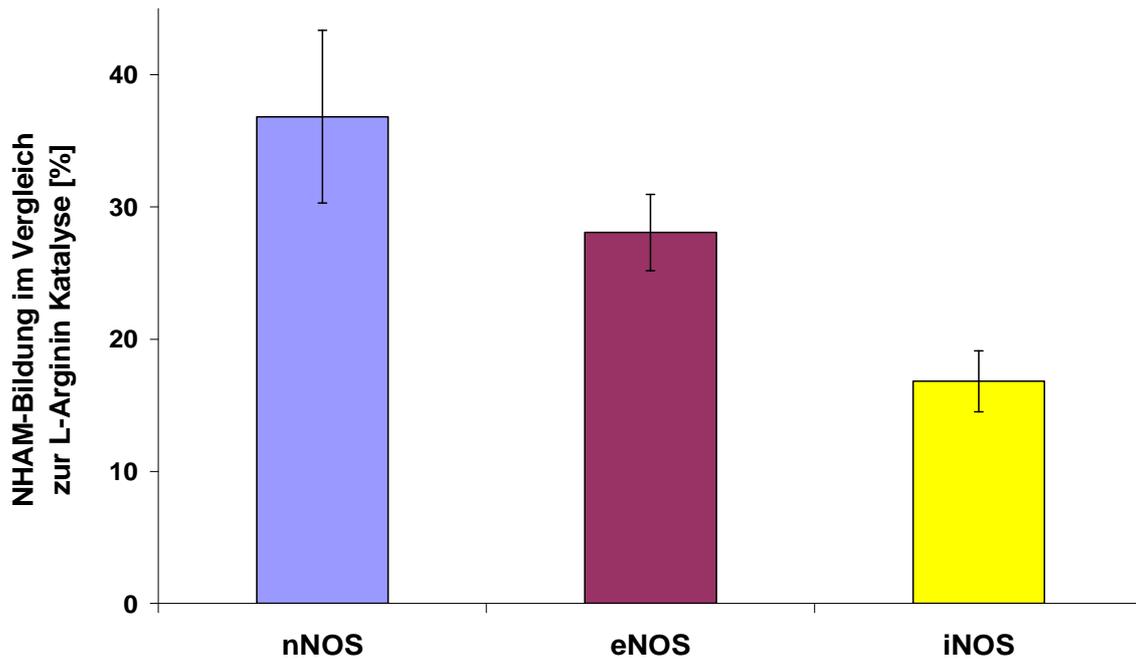


Abb. 2.10: Prozentualer Vergleich der spezifischen Aktivitäten der NOS-Isoenzyme für die Hydroxylierung von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin zu N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und der L-Arginin Umsetzung zu L-Citrullin und NO bei Einsatz der Substrate in einer Konzentration von 1 mM. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus vier separaten Inkubationen, die jeweils doppelt per HPLC vermessen wurden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Töpker konnte also eine enzymatische Umwandlung von MA durch alle Isoenzyme der NOS detektiert werden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können unter anderem darin begründet sein, dass Töpker tierische Enzymquellen für ihre Testung heranzog, während bei den hier beschriebenen Testungen humane Enzyme verwendet wurden. Einen wesentlicheren Unterschied stellt jedoch die verwendete HPLC-Methode dar, denn Töpker verwendete eine HPLC-Analytik mit *o*-PA-Nachsäulenderivatisierung und anschließender Fluoreszenzdetektion, während in dieser Arbeit eine neu entwickelte HPLC-Methode mit automatisierter *o*-PA-Vorsäulenderivatisierung zum Einsatz kam.¹⁹⁰ Diese HPLC-Methode besitzt eine um den Faktor 200 bessere Nachweisgrenze (0,1 μ M gegenüber 20 μ M), was die unterschiedlichen Ergebnisse der Substratstudie mit MA erklärt, da die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze der damals verwendeten HPLC-Methode liegen.

2.3.5.2 Substratstudien mit N^{δ} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin

Die in den Substratstudien mit MA gebildeten Mengen an NHAM waren sehr gering, die höchste Umsetzung wurde für die nNOS mit einer Bildung von $\sim 2 \mu\text{M}$ NHAM detektiert. Daher ist nicht auszuschließen, dass eine weitere Umsetzung zu MC aufgrund des Detektionslimits ($0,1 \mu\text{M}$) der verwendeten HPLC-Methode nicht mehr erfasst werden konnte. Aus diesem Grund wurden weitere Inkubationen mit NHAM als Substrat in einer Konzentration von 1 mM mit allen drei Isoenzymen der humanen NOS durchgeführt.

In den durchgeführten Inkubationen konnte MC lediglich bei einigen Inkubationen in Spuren detektiert ($< 0,1 \mu\text{M}$) werden. Des Weiteren wurde mittels der HPLC-Analytik ein neuer größerer Peak bei $t = 33,4 \text{ min}$ identifiziert.

Aufgrund der Untersuchungen von Töpker lag die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem neuen Metaboliten um N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin (CMO) handelt. Töpker konnte die Bildung dieses Metaboliten für zwei Isoenzyme der NOS sowie für Cytochrom P450 3A4 nachweisen.¹⁹⁰ Der Reaktion liegt eine Entkopplung des katalytischen Zyklus der NO-Synthasen bzw. des Cytochrom P450 mit Bildung von Superoxidanionen zugrunde, die für diese Reaktion verantwortlich sind.³⁴ Andere Arbeitskreise konnten eine Bildung von N^{δ} -Cyan-L-ornithin aus N^{δ} -Hydroxy-L-arginin an der nNOS nachweisen.¹⁹²

Zur Aufklärung der Identität dieser Substanz wurde eine LC/MS-Analytik (Kap. 2.2.2.5) in Anlehnung an die verwendete HPLC-Analytik entwickelt und bei mehreren Proben die Masse des neuen Metaboliten bestimmt. Vor der Messung mittels LC/MS wurden die Proben mit *o*-PA derivatisiert. Zu Beginn wurde ein Standard von N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin vermessen und eine Masse (M+H) von 348 g/mol ermittelt, entsprechend der Masse des *o*-PA-Derivatisierungsproduktes (Abb. 2.11).

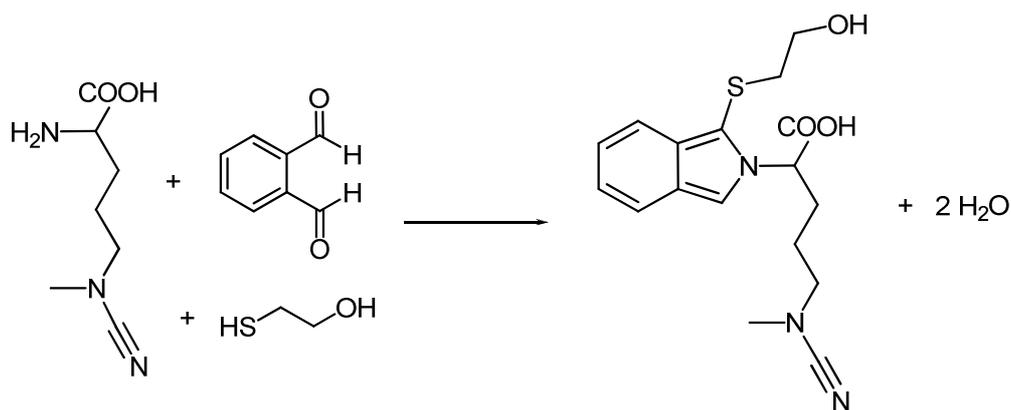


Abb. 2.11: Derivatisierungsreaktion von N^5 -Cyan- N^5 -methyl-L-ornithin mit *o*-Phthaldialdehyd (*o*-PA) und 2-Mercaptoethanol.

Die LC/MS-Analyse der Proben der Substratstudie bestätigte die Masse ($M+H$) von 348 g / mol für den neu gebildeten Metaboliten in den Enzyminkubationen (Abb. 2.12). Des Weiteren konnte durch Zumischen des synthetisierten CMO zu den Inkubationsansätzen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Signalfäche des Metaboliten in der HPLC-Analytik erreicht werden. Diese beiden Beobachtungen bestätigen, dass es sich bei dem neuen Metaboliten um CMO handelte.

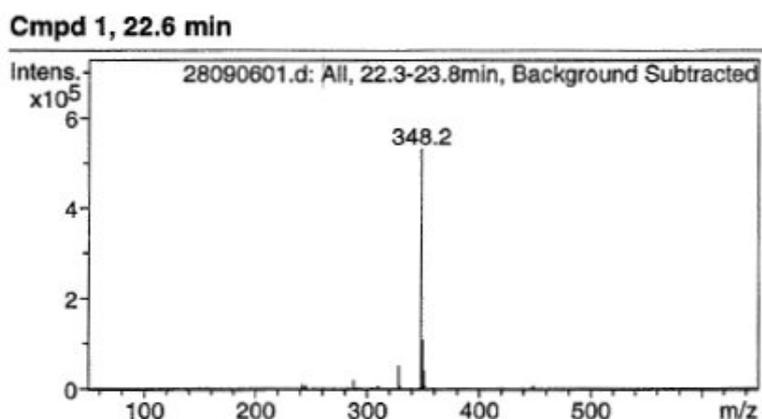


Abb. 2.12: Massenspektrum des *o*-PA-Derivates des neu gebildeten Metaboliten. Experimentelle Bedingungen siehe Kap. 2.2.2.5.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Töpker konnte diese Cyanamid-Bildung auch in Inkubationen ohne NOS-Isoenzyme detektiert werden, so dass es sich um eine nichtenzymatische Bildung des Cyanamids ohne Beteiligung von Superoxidanionen handelt. Zur Untersuchung der Enzymabhängigkeit dieser Cyanamid-Bildung wurden Vergleichsinkubationen zwischen Proben mit und ohne

NOS-Isoenzymen durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend der Anleitung in Kap. 2.2.3.4 inkubiert und aufgearbeitet.

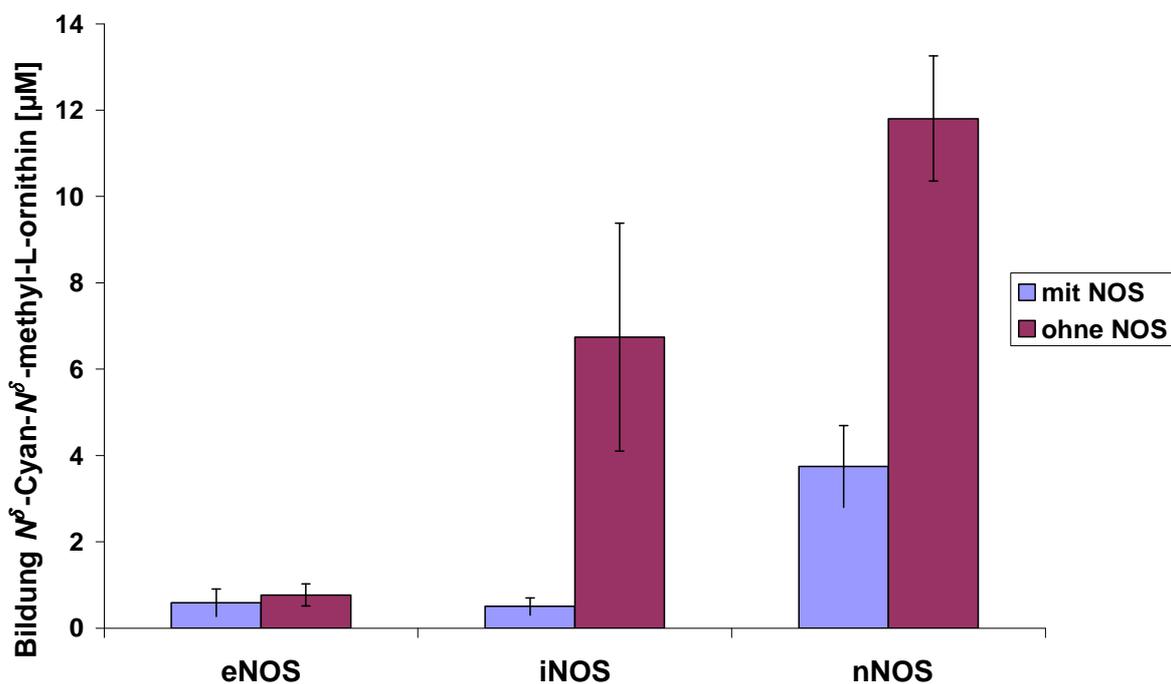


Abb. 2.13: Vergleich der gebildeten Menge N^5 -Cyan- N^5 -methyl-L-ornithin (CMO) in Inkubationen von N^5 -Hydroxy- N^5 -methyl-L-arginin mit und ohne NOS Isoenzymen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus drei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt per HPLC vermessen wurden.

Interessanterweise schwankten die gebildeten CMO-Mengen zwischen den unterschiedlichen Proben sehr stark. Jedoch zeigten die erhaltenen Daten deutlich, dass in allen Inkubationen ohne Enzymzubereitung mehr CMO detektiert werden konnte als in den Proben mit NOS-Zubereitungen (Abb. 2.13). Somit handelt es sich bei der CMO-Bildung um eine nichtenzymatische Reaktion.

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die zugesetzten Cofaktoren an der Reaktion beteiligt sind, da für H_4B bekannt ist, dass es durch Autoxidation Superoxidationen bilden kann, die im Weiteren die Umwandlung von NHAM zu CMO katalysieren könnten. Daher wurde die Cofaktorenabhängigkeit der CMO-Bildung untersucht.¹⁹³ Es wurde eine zeitabhängige Inkubation von 1 mM NHAM in 50 mM Triethanolamin-Puffer pH 7,0 mit und ohne Cofaktoren über sieben Tage durchgeführt.

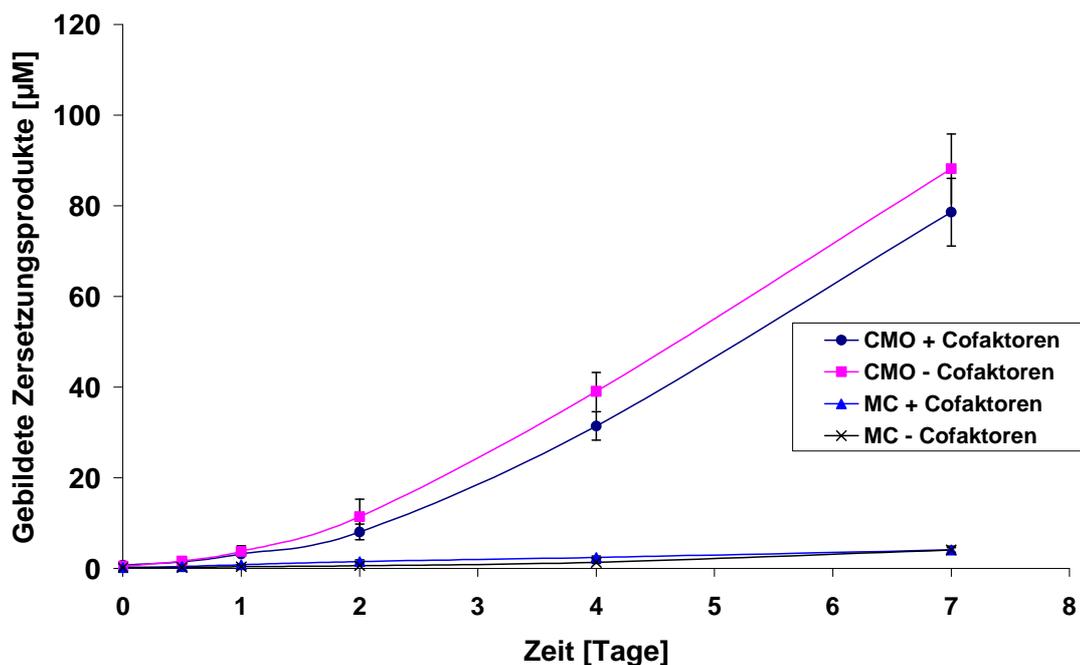


Abb. 2.14: Nichtenzymatische Bildung von N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin und N^{δ} -Methyl-L-citrullin aus 1 mM N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-arginin in 50 mM Triethanolamin-Puffer pH 7,0. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um MW \pm SD aus zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt per HPLC vermessen wurden.

Über den untersuchten Zeitraum von sieben Tagen kam es zu einer deutlichen Bildung von CMO in allen Proben (Abb. 2.14). Neben der nichtenzymatischen Bildung von CMO kam es auch zu einer geringen Bildung von MC, die wahrscheinlich auf eine Instabilität von CMO zurückführbar ist. Die Bildung von MC aus CMO wurde schon von Töpker beschrieben und daher in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.¹⁹⁰ Darüber hinaus zeigen die durchgeführten Studien, dass die zugesetzten Cofaktoren nicht an der Reaktion beteiligt sind, da kein signifikanter Unterschied zwischen den Inkubationen mit und ohne Cofaktoren nachgewiesen werden konnte. Der Umfang der nichtenzymatischen Umsetzung beträgt nach zwei Tagen ~1 % und nach sieben Tagen ~8 %.

Der Mechanismus, der der Cyanamid-Bildung zu grunde liegt, sollte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter aufgeklärt werden.

2 Untersuchungen an rekombinanten humanen NO-Synthasen

Die oben aufgeführten Ergebnisse für MA und NHAM zeigen, dass die getesteten N^{δ} -methylierten Arginin-analogen Verbindungen eine schlechtere Affinität zur NO-Synthase besitzen als das physiologische Substrat L-Arginin. Die Kristallstrukturen für die Isoformen der NO-Synthase zeigen eine Wasserstoffbrücke vom N^{δ} -gebundenen Wasserstoffatom des L-Arginins zu einem Glutamat-Rest des aktiven Zentrums.^{31,46} Die schlechtere Substrateigenschaft von MA und NHAM kann somit auf den Verlust dieser Wasserstoffbrücke durch die N^{δ} -Methylierung zurückgeführt werden. Die besondere Bedeutung der Wasserstoffbrücke zu diesem Glutamat-Rest wurde unter anderem für Substrate bzw. schwache Inhibitoren wie L-Canavanin und L-Indospicin gezeigt (Abb. 2.15). Im L-Canavanin bewirkt der Sauerstoff eine Orientierung der Doppelbindung der Guanidinstruktur in Richtung der Seitenkette. Dadurch trägt das N^{δ} -Atom keinen Wasserstoff und kann keine Wasserstoffbrücke zum Glutamat ausbilden, was zu einer schlechteren Affinität zum aktiven Zentrum führt.¹⁹⁴ Im L-Indospicin ist der N^{δ} -Stickstoff durch eine Methylengruppe ausgetauscht, was ebenfalls durch den Verlust der Wasserstoffbrücke zum Glutamat in einer geringen Affinität dieser Verbindung zur NOS resultiert.¹⁹⁵ Darüber hinaus wurden NOS-Mutanten geklont, in denen das Glutamat des aktiven Zentrums gegen andere Aminosäuren ausgetauscht wurde, die dadurch die Aktivität verloren haben.^{47,196}

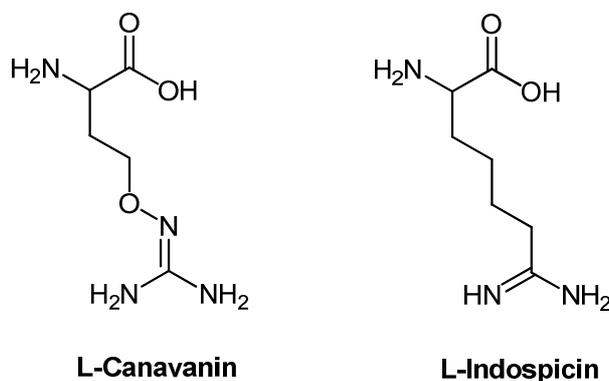


Abb. 2.15: Strukturen von L-Canavanin und L-Indospicin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Modulation des NO-generierenden Systems durch N^{δ} -methylierte L-Arginin-Derivate untersucht. MA wird zwar von allen Isoformen der humanen NO-Synthase zu NHAM umgesetzt, jedoch erfolgt keine weitere Umsetzung zu MC und NO. Darüber hinaus konnte eine nennenswerte Umsetzung erst ab einer Substrat-Konzentration von 1 mM detektiert werden. Diese Konzentration liegt weit über der, die physiologisch für

diese Verbindungen zu erwarten ist. Aus diesen Gründen ist ebenfalls anzunehmen, dass die nichtenzymatische CMO-Bildung physiologisch keine Relevanz besitzen wird, da das Ausmaß der Umsetzung mit ~1 % über zwei Tage gering ist.

Die hier erhaltenen Ergebnisse sowie die oben ausgeführten Literaturdaten zeigen ebenfalls deutlich, dass eine N^{δ} -Methylierung keine neue Option in der Entwicklung von Substraten bzw. Inhibitoren für die NO-Synthase darstellt. Eine mögliche Optimierung in der Affinität zur NOS könnte möglicherweise durch eine N^{δ} -Isopropylierung erreicht werden. Wie in der Einleitung (Kap. 1) dargestellt, wurden mittlerweile Substrate auf Guanidin-Basis für die NOSs entwickelt, die eine hohe Affinität zur NOS besitzen. Bei den sehr potenten Verbindungen dieser Klasse, die eine N -Isopropylierung tragen, konnte nachgewiesen werden, dass sich der Isopropyl-Rest nicht in der Tasche für die Aminosäure-Seitenkette einlagert, sondern in einer anderen Kavität.¹⁹⁷ Möglicherweise kann durch eine N^{δ} -Isopropylierung diese hydrophobe Kavität erreicht und somit eine höhere Affinität erzielt werden.

Des Weiteren kann eine N^{δ} -Methylierung möglicherweise bei L-Argininbasierten Verbindungen ausgenutzt werden, um eine Selektivität dieser Verbindungen für andere Enzyme gegenüber den NOS-Isoenzymen zu erreichen.

2.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, ob die N^{δ} -methylierten Analoga der NOS-Katalyse, N^{δ} -Methyl-L-arginin (MA), N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-citrullin (MC) Hemmstoffe der drei Isoformen der humanen NO-Synthase darstellen. Darüber hinaus wurde eine mögliche Umsetzung von MA und NHAM durch die verschiedenen NOS Isoformen untersucht.

Die Hemmstudien zeigten, dass alle getesteten Verbindungen nur schwache Inhibitoren der rekombinanten humanen NOS-Isoformen mit IC_{50} -Werte im millimolaren Bereich darstellen. Keine der Substanzen zeigte eine Selektivität für eines der NOS-Isoenzyme.

Die Substratstudien wurden mit einer neu entwickelten HPLC-Methode mit automatisierter α -PA-Vorsäulenderivatisierung analysiert, die eine um den Faktor 200 bessere Nachweisgrenze besitzt als die vorher verwendete Analytik. In allen Inkubationen mit MA als Substrat konnte eine geringe enzymatische Umsetzung zu NHAM aber keine weitere Umsetzung zu MC nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wurde durch Inkubationen mit NHAM als Substrat bestätigt, jedoch konnte in diesen Ansätzen eine nichtenzymatische Cofaktor-unabhängige Bildung von N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin (CMO) detektiert werden.

Die oben ausgeführten Ergebnisse verdeutlichen, dass eine N^{δ} -Methylierung von L-Arginin-Derivaten zu einem Affinitätsverlust zum aktiven Zentrum der NOS führt. Diese verringerte Affinität kann durch den Verlust einer Wasserstoffbrücke zu einem Glutamat des aktiven Zentrums erklärt werden. Somit erscheint eine physiologische Funktion von MA, NHAM und MC an diesem Enzym sehr unwahrscheinlich, da eine Hemmung der NOS-Isoformen sowie eine nennenswerte Umsetzung der N^{δ} -methylierten Verbindungen durch die NOSs erst in millimolaren Konzentrationen erfolgte. Bisher konnten noch keine N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivate in Säugetieren nachgewiesen werden. Falls sie doch physiologisch in Säugetieren vorkommen sollten, dann lediglich in sehr viel geringeren Konzentrationen, die die Aktivität der NOS nicht beeinflussen.

Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse ist eine pharmazeutische Anwendung einer N^{δ} -Methylierung von L-Arginin-Derivaten zur Entwicklung von NOS-Inhibitoren bzw. Substraten auszuschließen. Andererseits kann eine

N^δ-Methylierung von L-Arginin-Derivaten möglicherweise ausgenutzt werden, um eine Selektivität gegenüber den NO-Synthasen zu erzielen.

3 Untersuchungen an boviner Arginase

3.1 Einleitung und Zielsetzung

In den vergangenen Jahren erregte eine mögliche physiologische Konkurrenz der Stoffwechselwege durch die NOS und die Arginase immer mehr Aufsehen.^{39,82} Beide Enzyme metabolisieren dasselbe Substrat L-Arginin, wodurch es zu einer Konkurrenz um das Substrat kommt: Ist die Arginase vermehrt aktiv, führt dies zu einem Substratmangel an L-Arginin für die NOS und folglich verminderter NO-Synthese.¹⁵² Das Intermediat der NOS-Katalyse *N*^o-Hydroxy-L-arginin (NOHA) hingegen ist ein sehr potenter Hemmstoff der Arginase und stellt einen physiologischen Regulator der Arginase-Aktivität dar.²⁹ Folglich kann durch eine Hemmung der Arginase vermehrt L-Arginin für die NOS zur Verfügung gestellt werden.

Die Hemmung der Arginase stellt somit eine Option zur indirekten Aktivitätsbeeinflussung der NO-Synthase dar. Wie in der Einleitung (Kap. 1.5) dargestellt, erlangte dieser Therapieansatz in den vergangenen Jahren ein großes Interesse und offenbart einen neuen pharmazeutischen Ansatzpunkt zur Therapie von NO-defizienten pathophysiologischen Zuständen. Zahlreiche Veröffentlichungen zeigen positive Ergebnisse in Tierstudien oder an humanen Probanden, so dass dieser theoretische Mechanismus auch *in vivo* erfolversprechend erscheint.^{151,155,157,158}

Wie bereits erwähnt, repräsentiert NOHA einen potenten Inhibitor der Arginase. Der Einfluss einer *N*^δ-Methylierung wurde bisher noch nicht getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die *N*^δ-methylierten L-Arginin-Derivate *N*^δ-Methyl-D,L-arginin (MA) und *N*^o-Hydroxy-*N*^δ-methyl-L-arginin (NHAM) Hemmstoffe der bovinen Arginase darstellen. Darüber hinaus wurde getestet, ob MA durch die bovine Arginase verstoffwechselt werden kann.

3.2 Materialien und Methoden

3.2.1 Materialien

3.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, waren diese kommerziell erhältlich und wurden entweder über Sigma-Aldrich, Fluka, Roth oder Merck bezogen. Methanol und Acetonitril wurden von J.T. Baker (Griesheim) und Natriumheptansulfonat von Alfa Aesar (Karlsruhe) erworben. NHAM wurde im eigenen Arbeitskreis von D. Schade synthetisiert.¹⁸⁷ *N*^δ-Methyl-D,L-arginin wurde aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Steglich (Institut für Organische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.¹⁸⁸

3.2.1.2 Geräte

Zur Durchführung der Inkubationen wurden 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und ein IKA-Vibrax-VXR Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Die Abtrennung des Proteins erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge 2043 (Hettich, Tuttlingen). Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Das Fließmittel für die HPLC wurde mit einem Sonorex Super Rk 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast.

3.2.1.3 Enzym

Bei der verwendeten Arginase handelte es sich um eine aus Rinderleber isolierte Arginase mit einer spezifischen Aktivität von 19,3 U / mg, die von der Firma Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) bezogen wurde.

3.2.2 Analytische Methoden

3.2.2.1 HPLC-Methode

Die Bestimmung der gebildeten Metabolite aus den Arginase Inkubationsansätzen wurde mit einer HPLC-Methode mit *o*-PA-Nachsäulenderivatisierung und anschließender Fluoreszenzdetektion durchgeführt.

HPLC-Anlage: Waters Autosampler WISP 710B, 2 Waters 510 HPLC Pump, ERMA Entgaser ERC-3512, Nachsäulenpumpe Waters Model 590, Waters 470 Scanning Fluorescence Detector, Maxima HPLC Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.3.1)

Stationäre Phase: LiChrospher 60 RP-select B Säule, (125 x 4 mm, Merck)
Vorsäule: LiChroCART cartridge 4 x 4 mm; LiChrospher 60 RP-select B, 5 µm

Temperatur: RT

Mobile Phase: Eluent A: 5 mM Heptansulfonat pH 3,0

Eluent B: Methanol

Flussrate: 1 ml / min

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	-
10	100	-
11	95	5
25	95	5
26	100	-
30	100	-

Detektion: Fluoreszenz: λ_{ex} : 340 nm; λ_{em} : 455 nm

Injektionsvolumen: 10 µl

Nachsäulen-Reagenz:

6,4 g Natriumhydroxid

+19,7 g Borsäure

gelöst in 2400 ml *Aqua bidest.*

filtrieren + pH Einstellung mit KOH auf 9,25

+ 480 mg *o*-PA gelöst in 8 ml Ethanol

+ 1,2 ml 2-Mercaptoethanol

Flussrate Nachsäulen-Reagenz: 1 ml / min

Retentionszeiten:

L-Arginin 8,1 ± 0,3 min

L-Ornithin 24,8 ± 0,4 min

3.2.2.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Es wurden eine Neunpunkt-Kalibrierung für L-Ornithin in dem Bereich zwischen 10 und 1000 µM durchgeführt.

Zur Durchführung der Wiederfindung wurde L-Ornithin in denselben Konzentrationen wie bei der Kalibrierung eingesetzt, mit 0,21 µg hitzedenaturierter Arginase versetzt und über 30 min bei 37 °C in einem Volumen von 150 µl inkubiert. Im Anschluss wurden 150 µl einer Lösung aus 4,2 g Harnstoff in 10 ml 0,25 M Essigsäure zugesetzt, 5 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand per HPLC vermessen.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Substratstudien mit boviner Arginase

Zur Reaktivierung der Arginase wurde das Enzym für 3 h bei 37 °C in einem Aktivierungspuffer, bestehend aus 0,725 mM Mangan(II)chlorid und 0,725 mM Maleinsäure pH 7,0, inkubiert. Die vorinkubierte Enzymlösung wurde in den Inkubationen so eingesetzt, dass die Mn^{2+} -Konzentration in einem fertigen Inkubationsansatz 100 μ M betrug und jeder Ansatz 13 μ g Arginase enthielt.

Ein vollständiger Inkubationsansatz bestand aus 150 μ l mit unterschiedlichen Konzentrationen des Substrates (0,1, 1, 10 mM). Die eingesetzte Substratlösung wurde vor der Anwendung auf pH 9,4 eingestellt. Nach Zugabe der Enzymzubereitung erfolgte die Inkubation über 30 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 150 μ l einer Lösung aus 4,2 g Harnstoff in 10 ml 0,25 M Essigsäure. Anschließend wurden die Proben für 5 min geschüttelt, zentrifugiert (10.000 g, 5 min) und der Überstand jeder Probe zweifach mittels HPLC-Analytik mit *o*-PA-Nachsäulenderivatisierung (Kap. 3.2.2.1) analysiert.

Zur Kontrolle der Enzymaktivität wurden Inkubationen mit einer L-Arginin-Endkonzentration von 6,67 mM durchgeführt und wie oben angegeben behandelt.

3.2.3.2 Assay Validierung für Hemmstudien

3.2.3.2.1 Bestimmung der einzusetzenden Enzymmenge

Zur Ermittlung der optimalen Enzym-Konzentration wurden Inkubationen mit Arginase-Konzentrationen zwischen 50 ng und 5,2 μ g pro Ansatz durchgeführt. Es wurde jeweils L-Arginin in einer Konzentration von 6,67 mM eingesetzt und über 30 min bei 37 °C inkubiert. Die weitere Durchführung entsprach der in Kap. 3.2.3.1 beschriebenen.

Für Inkubationen mit Arginase-Konzentrationen von 0,21 μ g und 0,42 μ g pro Ansatz wurden zeitabhängige Untersuchungen mit 6,67 mM L-Arginin als Substrat durchgeführt und die Reaktionen nach 10, 20, 30 und 40 min abgestoppt. Bis auf diese Änderungen entsprach die Durchführung der unter 3.2.3.1 angegebenen.

3.2.3.2 Bestimmung der einzusetzenden L-Arginin-Konzentration

Es sollte untersucht werden, ob eine weitere Optimierung der Linearität der L-Ornithin-Bildung durch eine Erhöhung von 6,67 mM auf 10 mM erreicht werden kann.

Die Inkubationen wurden, wie unter 3.2.3.1 angegeben, durchgeführt mit dem Unterschied, dass die L-Arginin-Konzentration zwischen 6,67 mM und 10 mM variiert und 0,21 µg Arginase pro Ansatz eingesetzt wurde. Die Reaktionen wurden nach 10, 20 oder 30 min abgestoppt.

3.2.3.3 K_m -Wert Bestimmung

Zur Bestimmung des K_m -Wertes der eingesetzten bovinen Arginase wurden Inkubationen mit L-Arginin in Konzentrationen von 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2,5, 5, 25 und 50 mM durchgeführt. Die eingesetzte Arginase-Menge betrug 0,21 µg pro Ansatz. Bis auf diese Änderungen entsprach die weitere Durchführung der in Kap. 3.2.3.1 angegebenen.

3.2.3.4 Hemmstudien mit boviner Arginase

Die Arginase wurde zur Reaktivierung in einer Konzentration von 0,1 mg pro 10 ml Aktivierungspuffer, bestehend aus 0,725 mM Mangan(II)chlorid und 0,725 mM Maleinsäure pH 7,0, gelöst und für 3 h bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert.

Im Inkubationsansatz für die Hemmstudien wurde diese rekonstituierte Enzymlösung so eingesetzt, dass die Enzymmenge pro Ansatz 0,21 µg und die Mn^{2+} -Konzentration 100 µM betrug.

Die Hemmstoffe wurden in Konzentrationen von 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 und 10 mM eingesetzt. Als Substrat wurde L-Arginin in einer Endkonzentration von 6,67 mM eingesetzt und auf einen pH-Wert von 9,4 eingestellt. Bis auf diese Änderungen wurde, wie für die Substratstudien (Kap. 3.2.3.1) beschrieben, vorgegangen.

Parallel zu jeder Hemmstudie wurden drei Inkubationen mit 6,67 mM L-Arginin ohne Inhibitorzusatz durchgeführt. Die in diesen Ansätzen gebildete L-Ornithin-Konzentration wurde gleich 100 % gesetzt und die L-Ornithin-Konzentration in den gehemmten Proben prozentual auf diesen Wert bezogen.

3.2.3.5 K_i -Wert Bestimmung

Sofern der K_i -Wert nicht weiter spezifiziert wird, handelt es sich bei den angegebenen K_i -Werten immer um den K_{ic} -Wert einer kompetitiven Hemmung.

Für NHAM wurde eine K_i -Wert Bestimmung durchgeführt. Hierzu wurden Inkubationen mit unterschiedlichen L-Arginin bzw. NHAM-Konzentrationen durchgeführt, so dass jede Inhibitor-Konzentration jeweils doppelt mit jeder Substrat-Konzentration inkubiert wurde. Die eingesetzten L-Arginin-Konzentrationen betragen 0,5, 1, 2, 5 und 20 mM. Die NHAM-Konzentrationen waren 0, 5, 15, 90, 450 und 1300 μ M. Die weitere Inkubation und Aufarbeitung erfolgte gemäß der Anleitung für die Hemmstudien (Kap. 3.2.3.4).

Für jede eingesetzte NHAM-Konzentration wurde der jeweilige K_m -Wert und V_{max} bestimmt (SigmaPlot 8.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Über eine Auftragung der NHAM-Konzentration gegen K_m/V_{max} wurde der K_{ic} -Wert durch Extrapolation der Ausgleichsgeraden auf die Abszisse bestimmt.

Zur Bestimmung des K_{iu} -Wertes einer unkompetitiven Hemmung wurde die NHAM-Konzentration gegen $1/V_{max}$ aufgetragen. Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der Abszisse stellt den K_{iu} -Wert dar.

Die komplette K_i -Wert Bestimmung wurde doppelt durchgeführt.

3.3 Ergebnisse & Diskussion

3.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode

Die schlechtere Nachweisgrenze der *o*-PA-Nachsäulenderivatisierungs-Methode sowie die durch diese Art der Derivatisierung bedingte Peakverbreiterung wurden akzeptiert, da bei der Derivatisierung von L-Ornithin mit *o*-PA verschiedene Produkte entstehen.¹⁹⁸ Dies würde die Auswertung bei einer *o*-PA-Vorsäulenderivatisierung unnötig erschweren.

Die Kalibrier- und Wiederfindungsgerade für L-Ornithin ist im Bereich zwischen 10 - 1000 μM linear ($R^2 > 0,999$). Die Wiederfindungsrate für L-Ornithin betrug 108 % (Abb. 3.1).

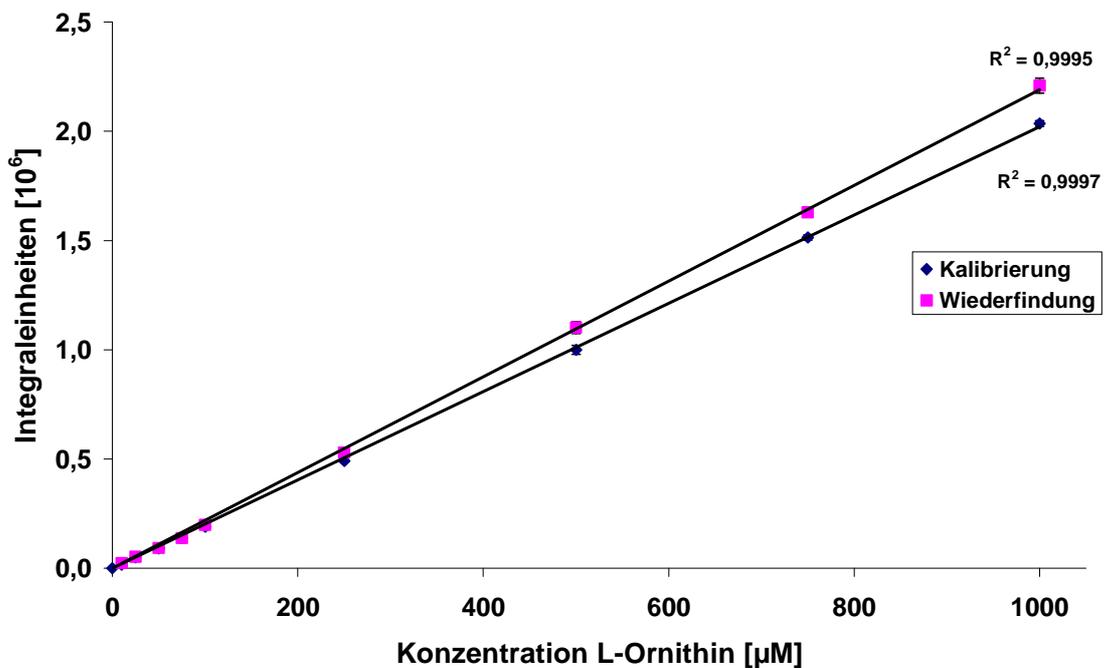


Abb. 3.1: Kalibrierung und Wiederfindung für L-Ornithin. Die ermittelten Integraleinheiten sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.2 Substratstudien mit boviner Arginase

In keiner der inkubierten Proben konnte eine Umsetzung von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin detektiert werden. Zum einen ist es möglich, dass sich diese Verbindung zwar im aktiven Zentrum der Arginase anlagert, jedoch durch die N^{δ} -Methylierung nicht mehr von diesem Enzym gespalten werden kann. Andererseits ist denkbar, dass die N^{δ} -Methylierung die Affinität zum aktiven Zentrum der Arginase derart verschlechtert, dass sie nicht mehr im aktiven Zentrum angelagert wird. Anhand der durchgeführten Hemmstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin sollte genauer untersucht werden, ob eine Anlagerung im aktiven Zentrum der Arginase stattfindet und zu einer kompetitiven Verdrängung von L-Arginin führt.

3.3.3 Assay-Validierung für Hemmstudien

Die Inkubationsbedingungen wurden durch Variation der eingesetzten L-Arginin-Konzentration sowie durch Einsatz verschiedener Mengen an Arginase optimiert.

Eine Inkubation mit einer L-Arginin-Konzentration von 6,67 mM und 0,21 μ g Arginase erzielten eine lineare Produkt-Bildung über mindestens 40 min.

3.3.3.1 Bestimmung der einzusetzenden Enzymmenge

Zur Ermittlung der optimalen Enzymmenge wurden Inkubationen mit Arginase-Konzentrationen zwischen 50 ng und 5,2 μ g pro Inkubationsansatz durchgeführt. L-Arginin wurde bei diesen Untersuchungen in einer Konzentration von 6,67 mM eingesetzt und die gebildete Menge L-Ornithin mittels HPLC-Analytik mit α -PA-Nachsäulenderivatisierung bestimmt (Abb. 3.2).

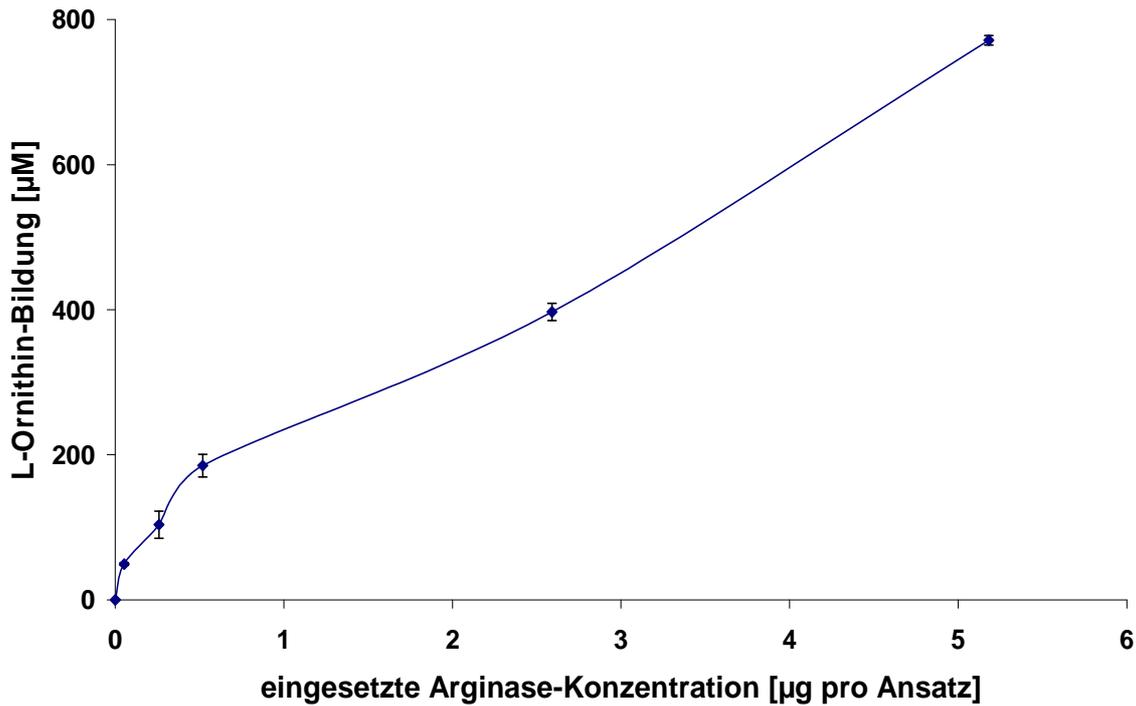


Abb. 3.2: Einfluss der eingesetzten Arginase-Menge auf die Bildung von L-Ornithin. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Bei geringen Arginase-Konzentrationen ist der Anstieg der L-Ornithin-Bildung stärker als bei höheren Konzentrationen. Ab einer Arginase-Menge von 0,52 µg erfolgte ein Abflachen der Kurve. Arginase-Konzentrationen ab 0,1 µg pro Ansatz führten zu einer L-Ornithin-Bildung, die problemlos per HPLC detektiert werden konnte, so dass Inkubationen mit 0,21 µg und 0,42 µg Arginase genauer untersucht wurden. Für diese Konzentrationen wurden zeitabhängige Untersuchungen durchgeführt.

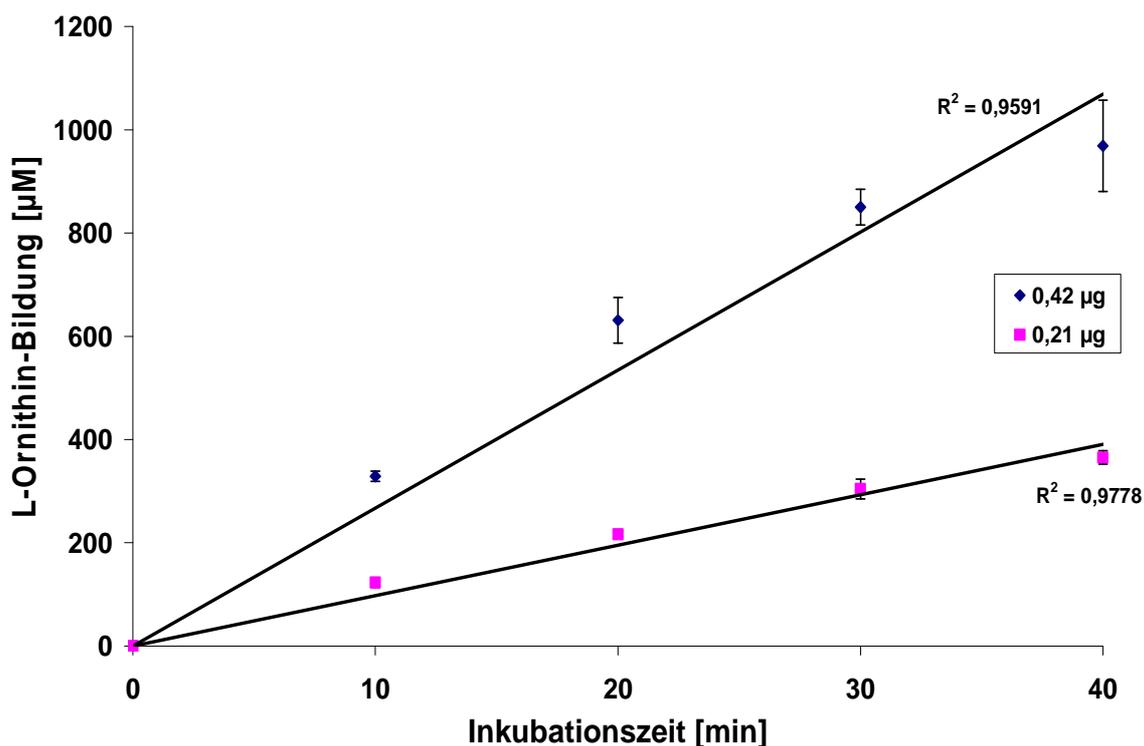


Abb. 3.3: Zeitabhängige Bildung von L-Ornithin bei der Inkubation von 6,67 mM L-Arginin mit verschiedenen Arginase-Mengen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus zwei separaten Bestimmungen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Linearität der L-Ornithin-Bildung aus L-Arginin in Inkubationen mit einer Arginase-Konzentration von 0,42 µg zeigten eine schlechtere Korrelation als die mit einer Arginase-Konzentration von 0,21 µg ($R^2 = 0,9591$ bzw. $R^2 = 0,9778$). Darüber hinaus nimmt die Aktivität in den Inkubationen mit 0,42 µg nach 30 min geringfügig ab, wohingegen bei einer Arginase-Menge von 0,21 µg eine Linearität der L-Ornithin-Bildung über mindestens 40 min gegeben war (Abb. 3.3). Der Korrelationskoeffizient über 30 min war jedoch geringfügig besser als über 40 min, und auch diese Inkubationszeit lieferte ausreichende L-Ornithin-Konzentrationen für eine zuverlässige Quantifizierung per HPLC. Aus diesen Gründen wurden im Folgenden die Inkubationen mit einer Arginase-Konzentration von 0,21 µg Arginase pro Ansatz über 30 min durchgeführt.

3.3.3.2 Bestimmung der einzusetzenden L-Arginin-Konzentration

Die vorausgegangenen Inkubationen wurden mit einer L-Arginin-Konzentration von 6,67 mM durchgeführt. Es wurde getestet, ob eine Erhöhung der L-Arginin-Konzentration auf 10 mM zu einer erhöhten Substratumsetzung mit einer besseren Linearität in der L-Ornithin-Bildung führt.

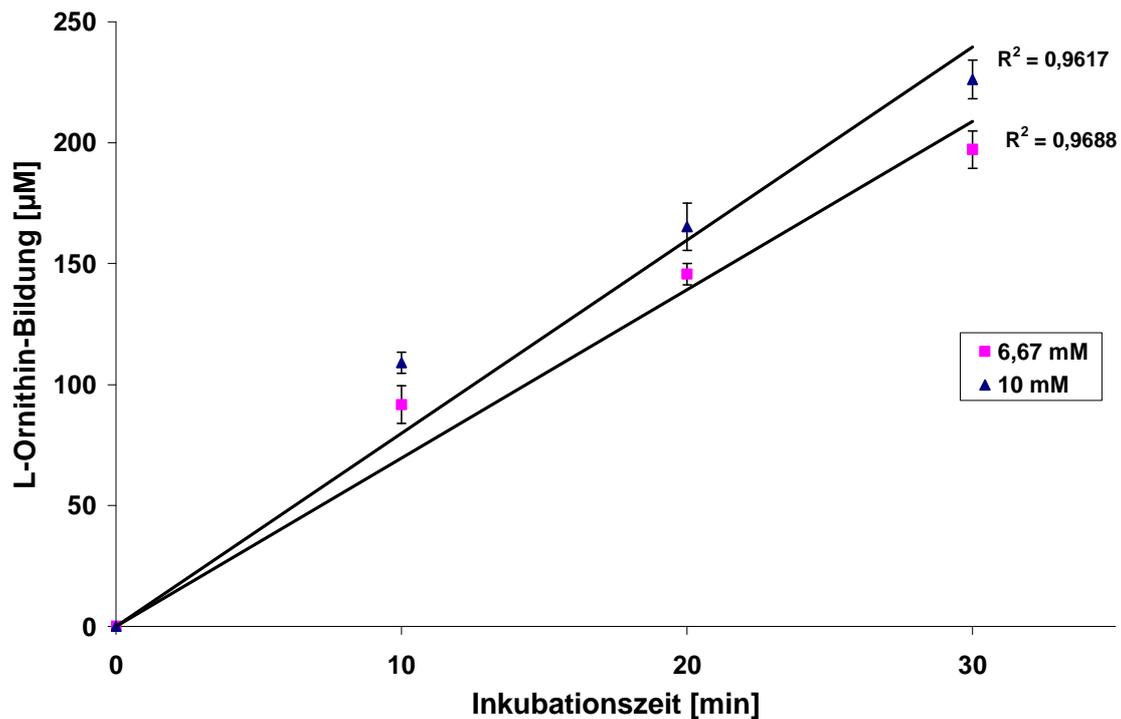


Abb. 3.4: Zeitabhängige Bildung von L-Ornithin bei der Inkubation von 6,67 mM bzw. 10 mM L-Arginin mit 0,27 µg boviner Arginase. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus zwei separaten Bestimmungen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Linearität der Bildung von L-Ornithin aus 6,67 bzw. 10 mM L-Arginin ist vergleichbar, wie aus den Korrelationsfaktoren der Geradengleichung ($R^2 = 0,9617$ bzw. $0,9688$) ersichtlich ist (Abb. 3.4). Eine Erhöhung der Substrat-Konzentration liefert zwar einen geringfügig höheren Substratumsatz, ist jedoch für die späteren Hemmstudien von Nachteil, da aufgrund der starken strukturellen Ähnlichkeit der zu testenden Substanzen mit dem physiologischen Substrat ein kompetitiver Hemmmechanismus zu erwarten ist. Unnötig hohe Substrat-Konzentrationen würden bei einer kompetitiven Hemmung die Inhibitorwirkung verschlechtern. Daher wurde für die weitere Testung eine L-Arginin-Konzentration von 6,67 mM beibehalten.

3.3.4 K_m -Wert Bestimmung

Die Arginasen von Säugetieren besitzen hohe K_m -Werte im millimolaren Bereich zwischen 1 und 18 mM.⁷⁸ Zur besseren Charakterisierung der eingesetzten Arginase wurde eine K_m -Wert Bestimmung für L-Arginin durchgeführt. Der K_m -Wert der verwendeten Arginase beträgt $4,6 \pm 0,1$ mM und V_{\max} $23,1 \pm 3,7$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Abb. 3.5).

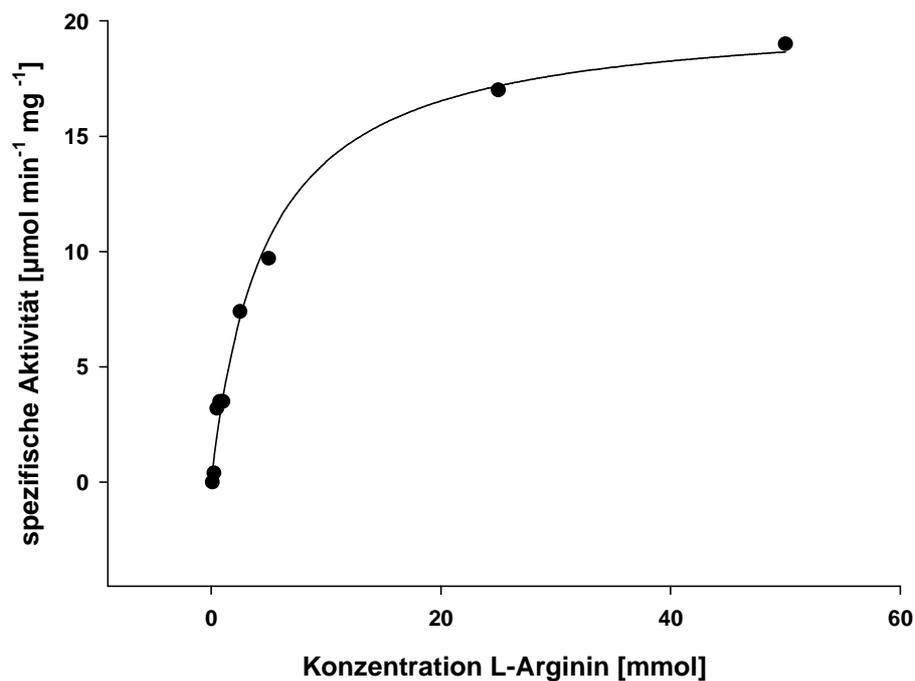


Abb. 3.5: Direkte Darstellung der K_m -Wert Bestimmung für L-Arginin an boviner Arginase. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um die Mittelwerte aus zwei unabhängigen K_m -Wert Bestimmungen.

3.3.5 Hemmstudien mit boviner Arginase

3.3.5.1 Hemmstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin

Aufgrund der starken strukturellen Verwandtschaft zum physiologischen Substrat L-Arginin ist eine Anlagerung von MA im aktiven Zentrum möglich. Die Ergebnisse aus Kap. 3.3.2 zeigen, dass MA nicht durch die Arginase umgesetzt wird. Dafür kommen zwei Erklärungen in Frage: Einerseits ist es möglich, dass durch die N^{δ} -Methylierung die Affinität zum aktiven Zentrum der Arginase reduziert wird, andererseits ist zu vermuten, dass sich MA im aktiven Zentrum anlagert, jedoch nicht durch die Arginase umgesetzt werden kann.

Die Inkubationen mit MA als Inhibitor in Konzentrationen bis zu 10 mM zeigten keine Beeinflussung der Arginase-Aktivität (Abb. 3.6). Somit erscheint es wahrscheinlich, dass MA nicht im aktiven Zentrum angelagert wird oder nur eine sehr geringe Affinität zum aktiven Zentrum besitzt, so dass es leicht von L-Arginin verdrängt werden kann.

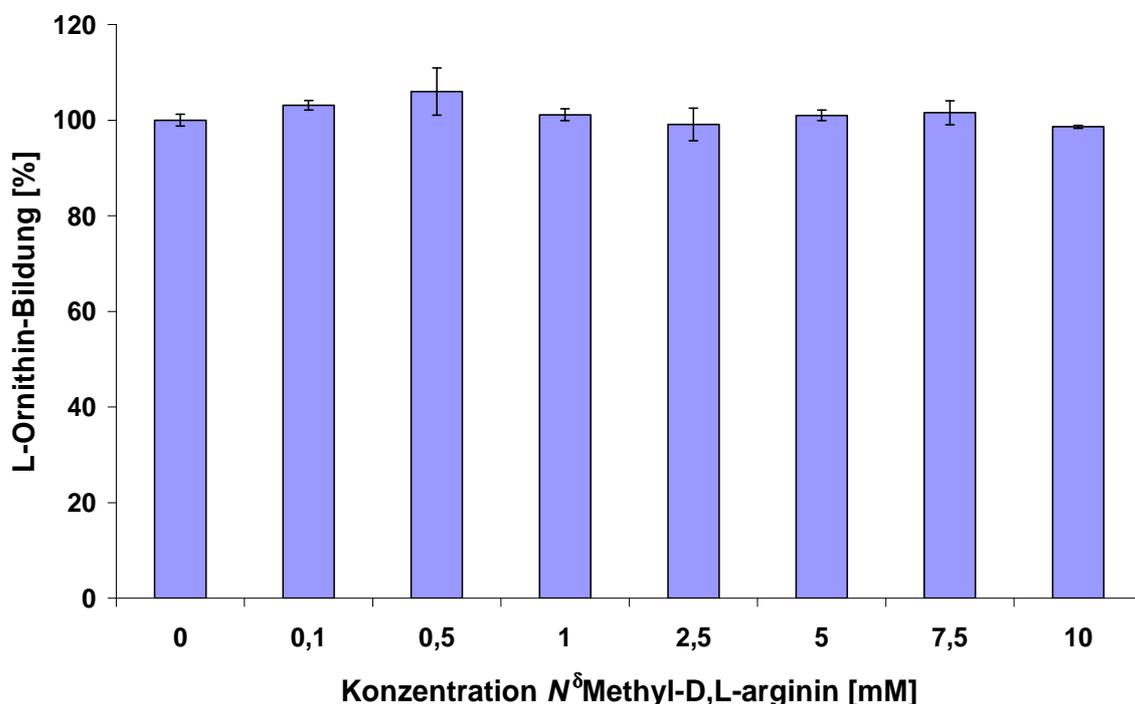


Abb. 3.6: Hemmung der bovinen Arginase durch verschiedene Konzentrationen von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin. Die prozentualen Werte sind bezogen auf drei Kontrollinkubationen ohne Inhibitorzusatz. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus vier separaten Bestimmungen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

3.3.5.2 Hemmstudien mit N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin

Eine aussichtsreiche Verbindung für die Testung stellte N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) dar, da das nicht methylierte N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA) als ein sehr potenter Inhibitor der Arginase mit einem K_i -Wert zwischen 30 - 42 μM bekannt ist.⁸⁴⁻⁸⁶ Der Einfluss einer N^{δ} -Methylierung auf die Affinität zum aktiven Zentrum ist bisher nicht erforscht worden und wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

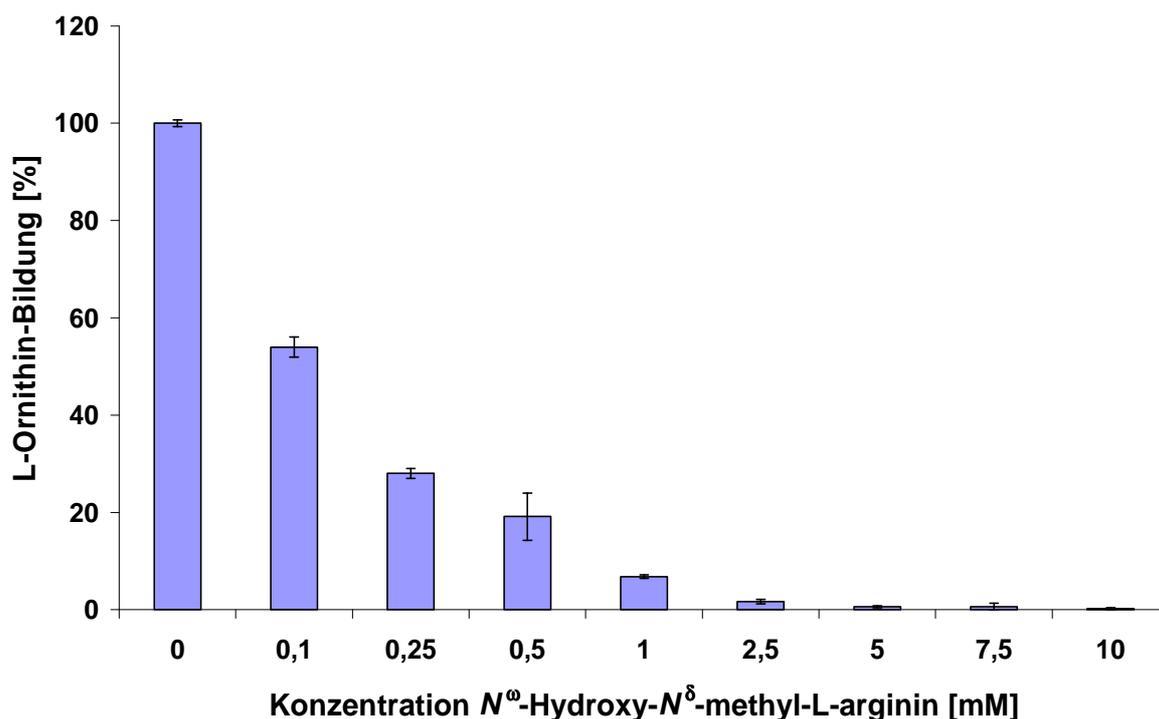


Abb. 3.7: Hemmung der bovinen Arginase durch verschiedene Konzentrationen von N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin. Die prozentualen Werte sind bezogen auf drei Kontrollinkubationen ohne Inhibitorzusatz. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus vier separaten Bestimmungen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die durchgeführten Hemmstudien zeigten eine sehr gute Hemmpotenz von NHAM auf die Arginase (Abb. 3.7). Der IC_{50} -Wert wurde zu $123 \pm 11 \mu\text{M}$ bestimmt. Da der IC_{50} -Wert bei einer kompetitiven Hemmung von den Testbedingungen beeinflusst wird, ist ein direkter Vergleich mit NOHA nur über den K_i -Wert möglich. Aus diesem Grund schloss sich eine K_i -Wert Bestimmung für NHAM an.

Sofern der K_i -Wert nicht weiter spezifiziert wird, handelt es sich bei den angegebenen K_i -Werten um den K_{ic} -Wert, der die Affinität eines kompetitiven

Inhibitors zum aktiven Zentrum des Enzyms wiedergibt. K_i -Werte der unkompetitiven Hemmung werden explizit als K_{iu} -Werte ausgewiesen.

Zur Bestimmung des K_i -Wertes für NHAM wurden scheinbare K_m -Werte und die jeweiligen V_{max} -Werte in Abhängigkeit von der jeweiligen eingesetzten Inhibitor-Konzentration ermittelt. Im Anschluss erfolgte eine Sekundärauftragung der NHAM-Konzentration gegen den Quotienten aus K_m und V_{max} . Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der Abszisse repräsentiert den negativen K_{ic} -Wert der Verbindung (Abb. 3.8).

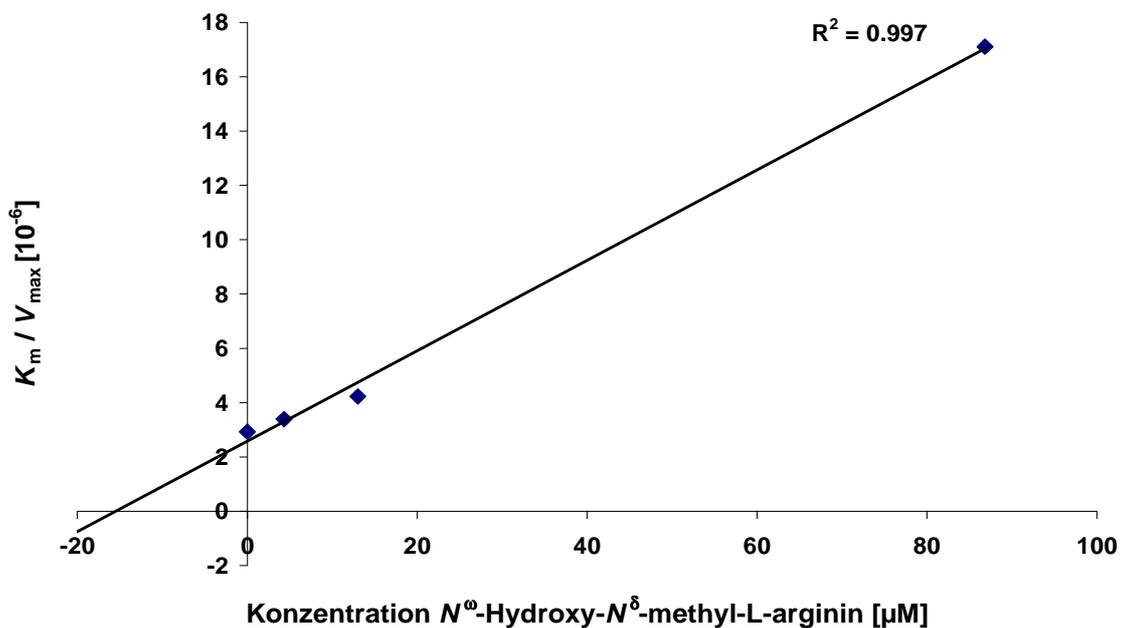


Abb. 3.8: Auftragung der Konzentration von N^ω -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin gegen den Quotienten aus K_m und V_{max} zur Bestimmung des K_i -Wertes.

Der K_i -Wert für NHAM wurde zu $17 \pm 2 \mu\text{M}$ bestimmt. Damit liegt er unter dem K_i -Wert für NOHA, der in der Literatur zwischen 30 und 42 μM angegeben wird.⁸⁴⁻⁸⁶

Für die K_{iu} -Wert Bestimmung wurde eine Auftragung der Konzentration von NHAM gegen $1 / V_{max}$ verwendet. Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der Abszisse markiert den negativen K_{iu} -Wert. Die Auftragung der erhaltenen Datenpunkte lieferte keinen Schnittpunkt mit der Abszisse, so dass es sich um eine rein kompetitive Hemmung handelt.

NHAM stellt somit einen kompetitiven Inhibitor der Arginase mit einer stärkeren Hemmpotenz als NOHA dar. Somit scheint die N^δ -Methylierung die Bindung zur

3 Untersuchungen an boviner Arginase

Arginase zu verstärken. Generell kann das aktive Zentrum der Arginase stark vereinfacht in drei unterschiedliche Regionen eingeteilt werden:⁸⁵

- (1) einer Bindungsregion für die Aminosäurefunktion
- (2) eine Bindungstasche für die Guanidinstruktur
- (3) sowie einer hydrophoben Region in der sich die Aminosäure-Seitenkette anlagert.

Möglicherweise kann durch die Methylierung am N^{δ} -Atom eine Wechselwirkung zu einer hydrophoben Kavität im aktiven Zentrum ausgebildet werden, die NOHA nicht ausnutzen kann (Abb. 3.9).

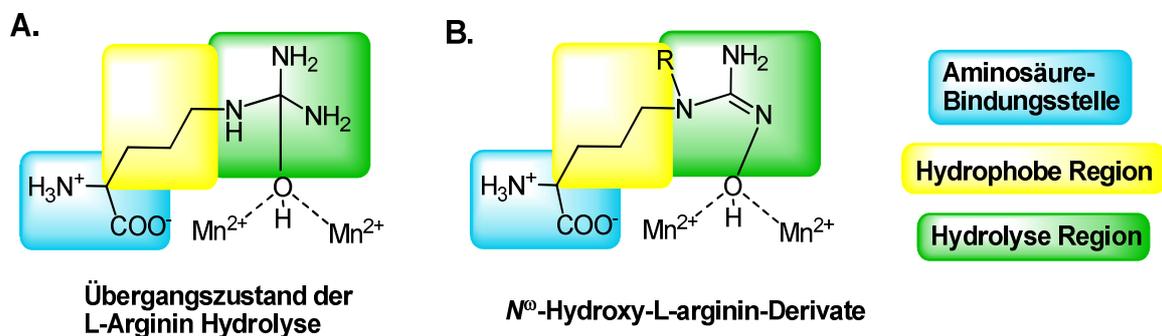


Abb. 3.9: Schematische Darstellung (A) der Bindung des Intermediates der Arginase-Katalyse und (B) der Anlagerung von N^{δ} -Hydroxy-L-arginin-Derivaten im aktiven Zentrum der Arginase (modifiziert nach Custot et al.).⁸⁵

In Abb. 3.9 ist deutlich zu sehen, dass N^{δ} -hydroxylierte L-Arginin-Derivate auf demselben Weg binden wie das gewöhnliche Intermediat der Arginase-Katalyse. Während der Arginase-katalysierten Umsetzung erfolgt im ersten Schritt ein nukleophiler Angriff eines Hydroxid-Ions auf den Guanidinkohlenstoff des L-Arginins. Die Struktur dieses physiologischen Intermediates wird durch N^{δ} -hydroxylierte L-Arginin-Derivate imitiert und erklärt die sehr gute Anlagerung im aktiven Zentrum.⁸⁵ Im Gegensatz zum L-Arginin bildet NOHA eine weitere Bindung über die Hydroxylgruppe zu den Mn^{2+} -Ionen des aktiven Zentrums aus. Im Ruhezustand des Enzyms ist zwischen diesen Mn^{2+} -Ionen ein Hydroxid-Ion gebunden, dessen Position nun die Hydroxylfunktion einnimmt und somit zu der erhöhten Bindungsstärke führt.⁸⁶

NHAM besitzt neben der besseren Hemmpotenz gegenüber NOHA den Vorteil, dass es kein Substrat für die NOS darstellt und somit voraussichtlich *in vivo* nicht so zügig metabolisiert wird. Allerdings haben die Untersuchungen in Kap. 2.3.5.2

gezeigt, dass NHAM nichtenzymatisch zu N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin umgesetzt wird. Jedoch war diese Umsetzung gering, denn nach zwei Tagen war ~1 % umgesetzt.

Wie in der Einleitung (Kap. 1) erwähnt wurde, gibt es neben den L-Arginin basierten Inhibitoren die potentere Inhibitorgruppe der Boronsäuren mit S-(2-Boronethyl)-L-cystein und (S)-2-Amino-6-boronhexansäure als Vertreter. Diese Boronsäuren besitzen ein Elektronendefizit und werden daher durch Hydroxid-Ionen sehr leicht nukleophil angegriffen und imitieren als Boronat-Anion ebenfalls den tetraedrischen Übergangszustand des L-Arginins, was die sehr potente Anlagerung erklärt.¹⁶⁵ Im Gegensatz zu den L-Arginin-Derivaten zeigen sie eine starke pH-Abhängigkeit ihrer Hemmpotenz. Bei pH 9,4 liegen die K_i -Werte im unteren nanomolaren Bereich, während die Werte bei physiologischem pH zwischen 0,2 und 0,3 μ M liegen.¹⁶⁴ Die hier bestimmten Hemmwerte für NHAM wurden bei einem nicht physiologischen pH von 9,4 generiert. Vergleichsstudien von NOHA bei physiologischem pH und einem pH von 9,0 zeigten keine pH-Abhängigkeit der Wirkpotenz dieser Verbindung, so dass der bestimmte K_i -Wert für NHAM von 17 μ M mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf physiologische Bedingungen übertragen werden kann.⁸⁵

Den besten Arginin-analogen Hemmstoff stellt das *nor*-NOHA dar. Im Unterschied zu NOHA ist es um eine Methylengruppe verkürzt. Es besitzt einen K_i -Wert von 0,5 μ M und ist somit bei physiologischem pH-Wert den Boronsäuren äquivalent.¹⁶⁶ Die Methylengruppen-Verkürzung von NOHA zu *nor*-NOHA führt somit zu einer Steigerung der Hemmwirkung um den Faktor 60 - 84 und lässt sich anhand einer anderen Konformation im aktiven Zentrum der Arginase erklären, die die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen zu der α -Amino- und der α -Carboxylfunktion des Inhibitors ermöglicht (Abb. 3.10). Interessant ist, ob eine weitere Steigerung der Hemmstärke auch bei NHAM durch eine Methylengruppen-Verkürzung zu erreichen ist. Ließe sich diese Verbesserung der Hemmwirkung durch eine Verkürzung der Hauptkette auf NHAM übertragen, wäre die Entwicklung eines der stärksten Hemmstoffes der Arginase möglich.

3 Untersuchungen an boviner Arginase

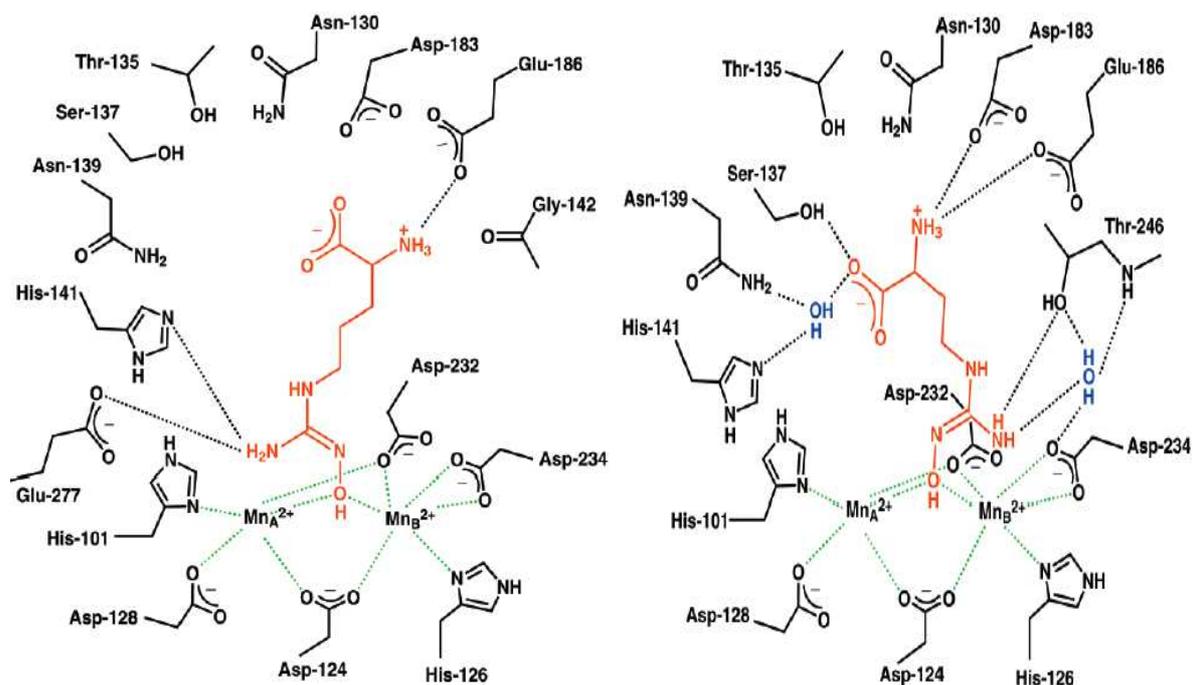


Abb. 3.10: Links : Einlagerung von N^{δ} -Hydroxy-L-arginin (NOHA) im aktiven Zentrum der Arginase. Im Gegensatz zu L-Arginin sind die Carboxyl- und Aminofunktion von NOHA nur schwach gebunden. Rechts : Einlagerung von nor-NOHA im aktiven Zentrum der Arginase. Die Carboxyl- und Aminofunktion von nor-NOHA bilden mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zum aktiven Zentrum aus.⁸⁶

Abgebildet mit Erlaubnis von Cox et al., *Mechanistic and Metabolic Inferences from the Binding of Substrate Analogues and Products to Arginase*. *Biochemistry* 2001, 40, 2689-2701 © American Chemical Society.

Anhand der hier dargestellten Ergebnisse könnte eine N^{δ} -Methylierung möglicherweise eine Option zur Abgrenzung zwischen Arginase und NOS Affinität darstellen, da die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass eine N^{δ} -Methylierung zum starken Verlust an Affinität zu der NO-Synthase führen (Kap. 2), wohingegen an der Arginase für NHAM eine erhöhte Affinität durch diese Methylierung nachgewiesen wurde. Die bisher veröffentlichten Kristallstrukturen der Arginase zeigen, dass über den N^{δ} -Stickstoff von NOHA keine Bindungen zum aktiven Zentrum der Arginase ausgebildet werden.^{86,158,165} Diese Ergebnisse werden durch weitere Studien bestätigt, in denen gezeigt wurde, dass N^{δ} -Hydroxy-D,L-indospicin einen potenteren Inhibitor als NOHA darstellt.⁸⁵ In dieser Verbindung ist das N^{δ} -Atom durch eine Methylengruppe ausgetauscht. Diese Fakten deuten darauf hin, dass im Gegensatz zur NO-Synthase bei der Arginase keine Wasserstoffbrücke zu diesem Stickstoffatom ausgebildet wird. Eine lipophilere Struktur wie die Kohlenstoffkette des N^{δ} -Hydroxy-D,L-indospicin oder

eine Alkyl-Substitution am N^{δ} -Stickstoff führen sogar zu einer Verstärkung der Affinität zum aktiven Zentrum durch Ausnutzung von lipophilen Wechselwirkungen. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen stehen die erhaltenen Ergebnisse für N^{δ} -Methyl-D,L-arginin, da diese Verbindung scheinbar nur eine sehr geringe Affinität zur Arginase besitzt. Daher ist es sinnvoll, den genauen Einfluss der N^{δ} -Methylierung im Rahmen einer Röntgenkristallstrukturanalyse zu ermitteln.

Die durchgeführten Untersuchungen sollten erste Erkenntnisse liefern, ob N^{δ} -methylierte L-Arginin-Derivate die Arginase-Aktivität beeinflussen und folglich auch an der komplexen Regulation der NO-Biosynthese beteiligt sind. Bisher wurden diese Verbindungen nur in Hefezellen nachgewiesen. Sollten sie physiologisch auch in Säugetieren vorkommen, dann in nanomolaren oder noch geringeren Konzentrationen. Theoretisch ist ein Mechanismus denkbar, in dem MA durch die NOS zu NHAM hydroxyliert wird, das anschließend als potenter Inhibitor der Arginase die NO-Biosynthese beeinflusst. Jedoch werden die physiologischen MA-Konzentrationen für eine Modulation der Enzyme zu gering sein. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse deutlich, dass die Arginase nicht am Abbau von MA beteiligt ist.

3.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche physiologische Funktion von N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivaten in der Regulation des NO-generierenden Systems untersucht werden. Hierzu wurden Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA) an boviner Arginase durchgeführt. Zusätzlich wurde die Hemmwirkung von MA und N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) auf die bovine Arginase untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass MA weder durch die Arginase umgesetzt wird noch die Aktivität der Arginase inhibiert. NHAM hingegen stellt einen sehr potenten Inhibitor der Arginase dar. Die Hemmpotenz ist besser als die von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA), dessen Bedeutung als physiologischer Regulator der NOS diskutiert wird. Aus diesem Grund kann eine physiologische Funktion von NHAM theoretisch in Betracht gezogen werden, da es aus MA durch die NOS gebildet werden kann (Kap. 2) und im Folgenden als potenter Inhibitor der Arginase die NO-Biosynthese erhöhen könnte. Jedoch konnte diese Verbindungen bisher nicht in Säugetieren identifiziert werden und daher scheint es höchst unwahrscheinlich, dass die dafür nötigen Plasmaspiegel erreicht werden.

NOHA ist seit längerer Zeit als potenter Inhibitor der Arginase bekannt.²⁹ Interessanterweise lässt sich durch eine N^{δ} -Methylierung die Affinität zum aktiven Zentrum steigern. Da NHAM im Gegensatz zu NOHA nicht durch die NOS metabolisiert wird, stellt es eine bessere Modellschubstanz für *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen dar. Möglicherweise lässt sich durch eine Verkürzung der Hauptkette um eine Methylengruppe eine weitere Verbesserung der Hemmpotenz erzielen, was zur Entwicklung eines der stärksten Arginase-Inhibitoren führen könnte. Darüber hinaus kann eine N^{δ} -Methylierung von L-Arginin-Derivaten möglicherweise ausgenutzt werden, um eine Selektivität dieser Verbindungen für die Arginase gegenüber der NO-Synthase zu erzielen.

Um einen genaueren Einblick in die Bindungsverhältnisse von NHAM und den Einfluss der N^{δ} -Methylierung zu erhalten, wäre es sinnvoll, eine Röntgenkristallstrukturanalyse durchzuführen. Dies soll Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

4 Reduktion von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin und N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin

4.1 Einleitung und Zielsetzung

Die physiologische Reduktion von basischen *N*-Hydroxy-Verbindungen wie *N*-Hydroxyamidinen oder *N*-Hydroxyguanidinen durch Mikrosomen und Mitochondrien ist mittlerweile ausführlich untersucht worden.^{199,200}

Die NO-Biosynthese durch die NO-Synthase erfolgt über das Intermediat N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA).³⁰ Diese Substanz stellt ein Hydroxyguanidin dar, dessen Reduktion vor einiger Zeit sowohl durch Mikrosomen als auch durch Mitochondrien nachgewiesen werden konnte.²⁶ Die gezeigte Reduktion kann möglicherweise eine Funktion im Regulationsmechanismus der NO-Biosynthese einnehmen, da gezeigt wurde, dass intermediär gebildetes NOHA das aktive Zentrum der NO-Synthase verlassen kann und ins extrazelluläre Medium freigesetzt wird.^{87,88,201} Somit wird angenommen, dass NOHA als eine Vorstufe für NO im Körper zirkuliert und neben der NOS über Hämproteine wie Cytochrom P450 auch in Geweben, die keine NOS exprimieren, zu NO metabolisiert werden kann.^{27,202} Darüber hinaus repräsentiert NOHA einen potenten Inhibitor der Arginase, was einen weiteren regulatorischen Einfluss auf die NO-Biosynthese ausübt.²⁹ Die nachgewiesene Reduktion von NOHA vermindert die zirkulierenden NOHA-Plasmaspiegel und schränkt somit die physiologische Bedeutung dieser Substanz als Modulator der NO-Bildung ein.

Vor Kurzem wurde das Enzymsystem identifiziert, das in Mitochondrien die Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen katalysiert.²⁰³ Länger bekannte Enzyme des mikrosomalen und mitochondrialen reduktiven Enzymsystems sind Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase.²⁰⁴⁻²⁰⁶ Die Beteiligung einer dritten Komponente an der Reduktion wurde lange Zeit diskutiert. Diese dritte Komponente wurde in Schweinelebermikrosomen als Cytochrom P450 Enzym identifiziert.²⁰⁷ Havemeyer *et al.* gelang die Identifizierung der dritten mitochondrialen Komponente als ein bislang unbekanntes 35 kDa molybdänhaltiges Enzym.²⁰³ Das neu identifizierte Protein ist in der äußeren

Mitochondrienmembran lokalisiert und wurde „mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente“ (mARC, *mitochondrial amidoxime reducing component*) genannt. Weitere Genomanalysen zeigten, dass im Menschen zwei unterschiedliche Isoenzyme von mARC existieren.

Die Aufklärung dieses neuen Enzyms wirft natürlich die Frage auf, ob es auch an der mitochondrialen Reduktion von NOHA beteiligt ist und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, um die physiologische Relevanz dieser Reduktion für die NO-Biosynthese genauer beurteilen zu können.

Neben NOHA wurde ebenfalls für N^{ϵ} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) untersucht, ob eine Reduktion durch Mikrosomen und Mitochondrien zu N^{δ} -Methyl-L-arginin (MA) erfolgt, bzw. inwieweit die mARC-Isoformen an der mitochondrialen Reduktion beteiligt sind. Hierzu wurden sowohl Studien mit Mikrosomen, Mitochondrien als auch der äußeren Mitochondrienmembran (*outer membrane vesicles* (OMV)) durchgeführt. Des Weiteren wurde die Reduktion mittels rekonstituierten Systemen aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und den humanen mARC-Isoenzymen untersucht. Bei den hier dargestellten Untersuchungen wurde ein *N*-terminal verkürztes Fragment der beiden mARC-Isoformen eingesetzt. Unveröffentlichte Studien zeigen, dass diese verkürzten mARC-Enzyme eine höhere Aktivität besitzen als die nativen Formen.²⁰⁸ Dies könnte eventuell ein Hinweis darauf sein, dass die mARC-Isoenzyme physiologisch als Zymogene gebildet werden und durch Proteolyse in die aktivere Form überführt werden.

4.2 Materialien und Methoden

4.2.1 Materialien

4.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, waren diese kommerziell erhältlich und wurden entweder über Sigma-Aldrich, Fluka, Roth oder Merck bezogen. Methanol Lichrosolv und Acetonitril Lichrosolv wurden von Acros Organics (Geel, Belgien) erworben. NOHA wurde über Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) und 5`-AMP-Sepharose 4 B über Pharmacia (Freiburg) erhalten. NHAM wurde im eigenen Arbeitskreis von D. Schade synthetisiert.¹⁸⁷ MA wurde

von Herrn Prof. Steglich (Institut für Organische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.¹⁸⁸

4.2.1.2 Geräte

Zur Durchführung der Inkubationen wurden 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

Für die Gewinnung der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen wurde ein Gewebehomogenisator (Braun, Melsungen), eine Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E (Beckman Coulter, Krefeld) sowie eine Ultrazentrifuge L7-65 (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet. Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Die Abtrennung des Proteins erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen). Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Das Fließmittel für die HPLC wurde mit einem Sonorex Super Rk 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast.

4.2.1.3 Enzyme

Das Cytochrom *b*₅ und die NADH Cytochrom *b*₅ Reduktase wurden im Arbeitskreis gereinigt und von S. Grünwald bereitgestellt. Die Schweineleber Mikrosomen und Mitochondrien sowie die äußere Mitochondrienmembran wurden im eigenen Arbeitskreis von A. Havemeyer aufgereinigt und zur Verfügung gestellt. Die rekombinanten humanen mARC-Isoformen (hmARC) wurden im Arbeitskreis von Prof. Mendel (Molekular- und Zell-Biologie, TU Carolo-Wilhelmina Braunschweig) exprimiert und für die Testung zur Verfügung gestellt.

4.2.1.3.1 Gewinnung von Schweinelebermikrosomen

Die verwendeten Schweinelebern wurden von einem lokalen Schlachthof (Bordesholm) bezogen und sofort nach Schlachtung in einem eisgekühlten 20 mM Phosphat-Puffer pH 7,4 (1 mM Na₂-EDTA) überführt. Die Leberlappen wurden mit 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,4 (1 mM Na₂-EDTA) perfundiert und gewaschen. Das Gewebe wurde im Anschluss in kleine Stücke geschnitten und mit einem Fleischwolf zerkleinert. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen 50 mM Phosphat-Puffer verdünnt und mit einem Durchflusshomogenisator homogenisiert.

Die weitere Gewinnung der Mikrosomen erfolgte entsprechend Literaturangaben mittels einer differentiellen Ultrazentrifugation.²⁰⁹ Die gewonnenen Mikrosomen wurden bei -80°C gelagert.

4.2.1.3.2 Gewinnung von Schweinelebermitochondrien

Die verwendeten Schweinelebern wurden von einem lokalen Schlachthof (Bordesholm) bezogen und wie unter 4.2.1.3.1 beschrieben homogenisiert. Nach Erhalt der Zellsuspension wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (250 mM Saccharose, 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) durchgeführt. Die Suspension wurde zweimal bei 750 g für 20 min zentrifugiert, um Zellkerne und grobe Zellfragmente zu entfernen. Die Überstände wurden vereinigt und anschließend die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 7.710 g für 20 min abgetrennt. Das Sediment wurde vorsichtig resuspendiert und über 20 min bei 7.350 g zentrifugiert. Im Weiteren folgten nach Resuspension des Pellets Zentrifugationen bei 6.450 g und 5.580 g über jeweils 20 min zum Waschen der Mitochondrien. Das 5.580 g Sediment wurde mit wenig Puffer resuspendiert und anschließend bei -80°C gelagert.²¹⁰

4.2.1.3.3 Isolierung der mikrosomalen NADH Cytochrom b_5 Reduktase

NADH Cytochrom b_5 Reduktase wurde über eine 5'-AMP-Sepharose-Affinitätschromatographie aus Schweineleber Mikrosomen gereinigt. Das Verfahren entsprach dem Verfahren für die Aufreinigung von NADH P450 Reduktase mit einigen Modifikationen.^{207,211}

4.2.1.3.4 Isolierung des mikrosomalen Cytochrom b_5

Die Isolierung von Cytochrom b_5 aus Schweineleber Mikrosomen wurde nach der Methode von Clement *et al.* durchgeführt.²⁰⁷

4.2.1.3.5 Gewinnung der äußeren Mitochondrienmembran (OMV)

Die gereinigte äußere Mitochondrienmembran wurde von A. Havemeyer zur Verfügung gestellt und entsprechend der Literaturangaben isoliert.²¹²

4.2.2 Analytische Methoden

4.2.2.1 HPLC-Methode

Die Aminosäuren wurden über eine HPLC-Analytik mit automatisierter *o*-PA-Vorsäulenderivatisierung getrennt und per Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen.

HPLC-Anlage: Waters Autosampler 717plus, Waters 600 Controller, Waters 600 Pump, Waters Fluorescence Detector 470 und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)

Stationäre Phase: NovaPak RP-18-Säule 4 µm (4 x 150 mm, VDS Optilab)
Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)

Temperatur: 30 °C

Mobile Phase:	Eluent A:	10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 4,65	86 %
		Acetonitril	8 %
		Methanol	6 %
	Eluent B:	Acetonitril	40 %
		Methanol	30 %
		<i>Aqua bidest.</i>	30 %

Flussrate: 1 ml / min

4 Reduktion von *N*^o-Hydroxy-L-arginin und *N*^o-Hydroxy-*N*^δ-methyl-L-arginin

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	-
2	100	-
3,5	95	5
10	95	5
13	90	10
23	90	10
25	40	60
30	40	60
32	100	-
37	100	-

Detektion: Fluoreszenz: λ_{ex} : 338 nm; λ_{em} : 425 nm

Injektionsvolumen: 10 μ l

Derivat.-Reagenz: 50 mg α -PA gelöst in 1 ml Methanol
+ 9 ml 0,2 M Kaliumborat-Puffer pH 9,4
+ 53 μ l 2-Mercaptoethanol

Derivatisierung: Der Autosampler wurde so programmiert, dass 10 μ l der Probe mit 14 μ l des Derivatisierungs-Reagenzes gemischt wurden und 2 min lang bei RT vor der Injektion reagieren konnten.

Retentionszeiten:

NOHA	13,7 \pm 0,1 min
L-Arginin	15,2 \pm 0,2 min
NHAM	16,6 \pm 0,2 min
MA	18,9 \pm 0,1 min

4.2.2.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Es wurde eine Sechspunkt-Kalibrierung von L-Arginin und N^{δ} -Methyl-D,L-arginin im Bereich von 5 - 100 μM in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 durchgeführt.

Zur Wiederfindung wurden L-Arginin und N^{δ} -Methyl-D,L-arginin jeweils in Konzentrationen von 5, 10, 25, 50, 75 und 100 μM mit 40 μg hitzedenaturiertem Protein in 150 μl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach 15 min wurde der Ansatz mit 150 μl Acetonitril versetzt und anschließend das Protein abzentrifugiert (12.000 g, 5 min). Der Überstand wurde der HPLC zugeführt.

4.2.3 Biochemische Methoden

4.2.3.1 *In vitro* Reduktions-Assay: Mikrosomen / Mitochondrien / OMV

Die Inkubationen wurden in einem Gesamtvolumen von 150 μl in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 mit NOHA bzw. NHAM in einer Endkonzentration von 1 mM durchgeführt. Als Enzymquellen wurden 0,3 mg Schweineleber Mikrosomen bzw. 0,1 mg Schweineleber Mitochondrien eingesetzt. Nach 3 min Vorinkubation bei 37 $^{\circ}\text{C}$ wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH in einer Endkonzentration von 1 mM gestartet und über 30 min im Schüttelwasserbad bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μl Acetonitril gestoppt, die Proben für 5 min geschüttelt und bei 12.000 g für 5 min zentrifugiert. Die Überstände wurden *via* HPLC (Kap. 4.2.2.1) analysiert.

Die Inkubationen mit äußerer Mitochondrienmembran (OMV) erfolgten, wie oben angegeben, mit folgenden Änderungen: NADH wurde in einer Endkonzentration von 0,4 mM eingesetzt und die Inkubationszeit wurde auf 15 min reduziert. Zur Inkubation wurden 6 μg OMV pro Ansatz verwendet.

4.2.3.2 *In vitro* Reduktions-Assay: hmARC-Isoenzyme

Die Inkubationen wurden in einem Gesamtvolumen von 150 μ l in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 durchgeführt. NHAM und NOHA wurden in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt. Das rekonstituierte Enzymsystem setzte sich zusammen aus 20 μ g hmARC-1 bzw. hmARC-2, 19 μ g Cytochrom b_5 und 1 μ g NADH Cytochrom b_5 Reduktase (spezifische Aktivität 51,3 U / mg). Nach einer Vorinkubationszeit von 3 min bei 37 $^{\circ}$ C wurden die Reaktionen durch Zugabe von NADH in einer Endkonzentration von 1 mM gestartet. Die Inkubation erfolgte über 15 min bei 37 $^{\circ}$ C und wurde durch Zugabe von 150 μ l Acetonitril beendet. Die Proben wurden für 5 min geschüttelt, anschließend für 5 min bei 12.000 g zentrifugiert und die Überstände der HPLC (Kap. 4.2.2.1) zugeführt.

4.3 Ergebnisse & Diskussion

4.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode

Die verwendete HPLC-Methode ermöglichte die Trennung von N^{δ} -Hydroxy-L-arginin (NOHA), L-Arginin, N^{δ} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-arginin (MA). Ein repräsentatives Chromatogramm der Standards ist in Abb. 4.1 dargestellt.

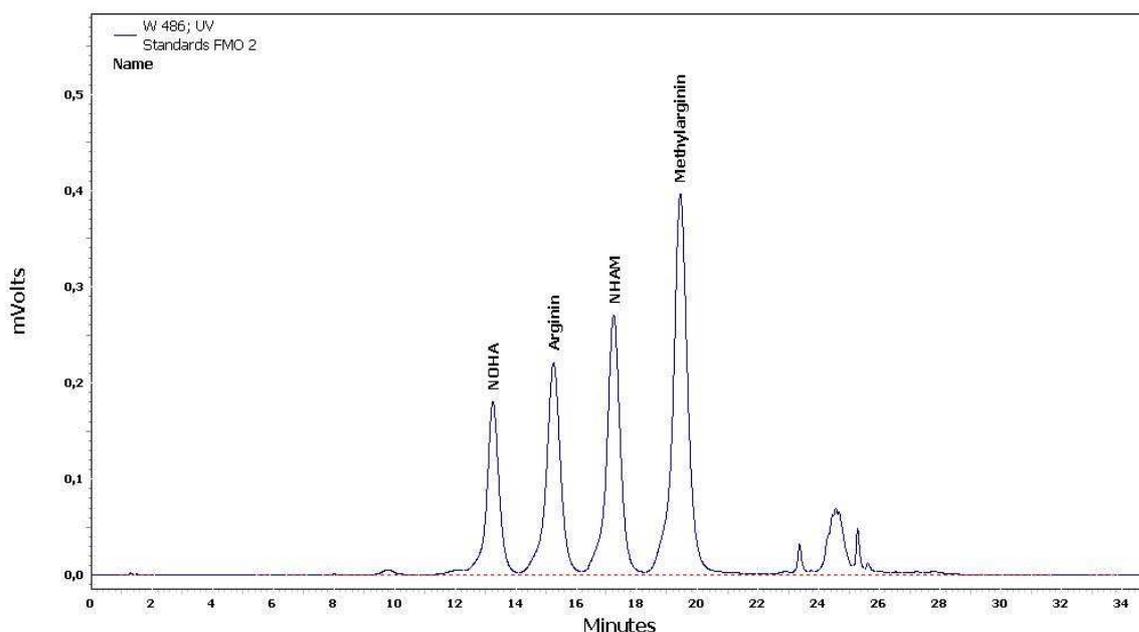


Abb. 4.1: Repräsentatives Chromatogramm der verwendeten HPLC-Analytik zur Trennung von N^{δ} -Hydroxy-L-arginin (NOHA), L-Arginin, N^{δ} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-arginin (MA).

Die durchgeführten Kalibrierungen und Wiederfindungen waren im Bereich zwischen 5 - 100 μM linear ($R^2 > 0,991$). Die Wiederfindungsraten betragen 107 % für L-Arginin und 115 % für N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (Abb. 4.2).

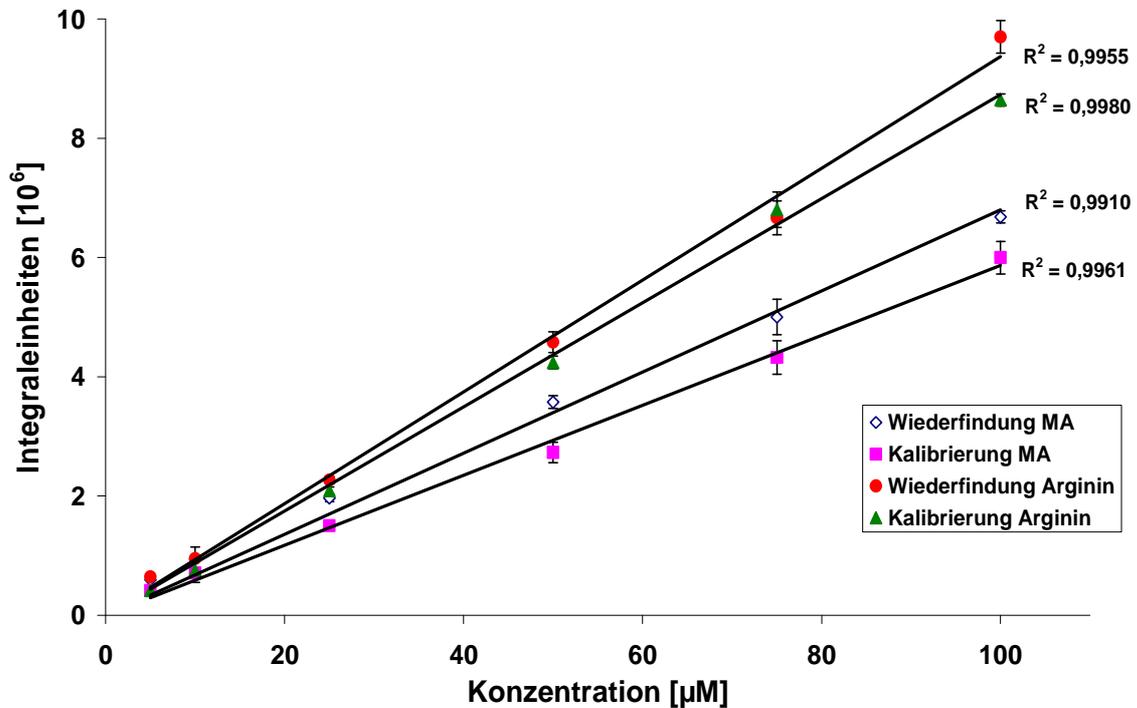


Abb. 4.2: Kalibrierung und Wiederfindung für L-Arginin und N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA) für die verwendete HPLC-Analytik. Die ermittelten Integraleinheiten sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

4.3.2 Reduktion durch Mikrosomen, Mitochondrien und der äußeren Mitochondrienmembran

Die durchgeführten Reduktionsstudien zeigten, dass NOHA und NHAM sowohl von Mikrosomen als auch von Mitochondrien reduziert wurden (Abb. 4.3).

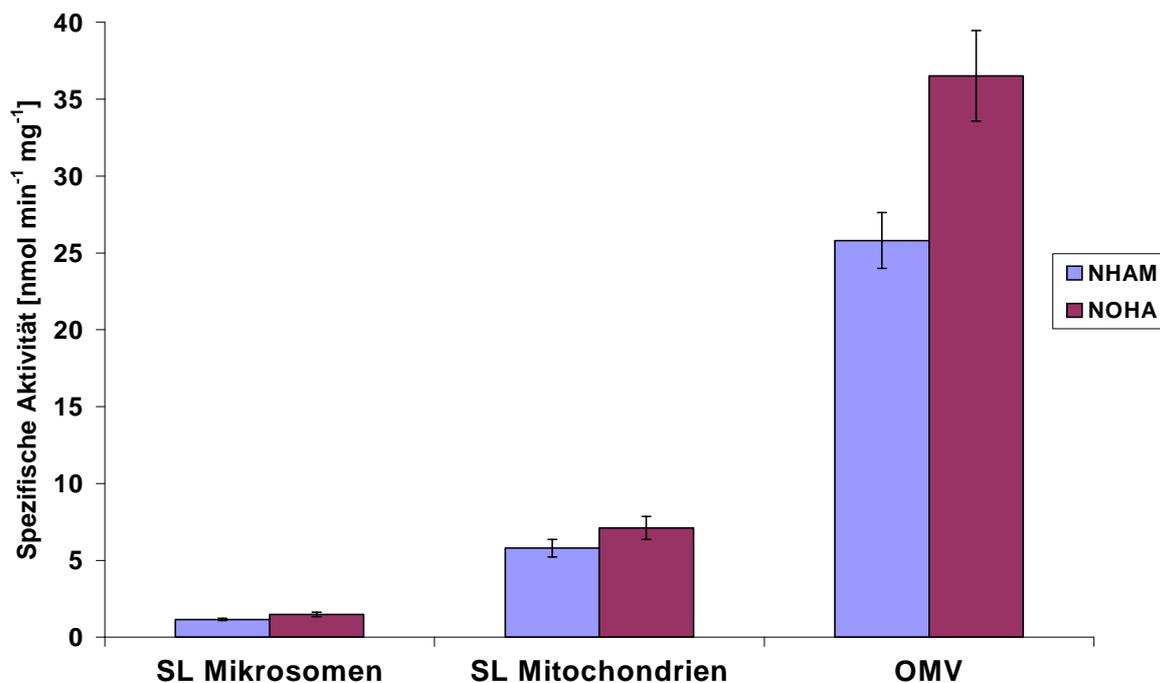


Abb. 4.3: Spezifische Aktivitäten der Reduktion von N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin und N^{ω} -Hydroxy-L-arginin durch Schweineleber (SL) Mikrosomen, Schweineleber Mitochondrien und der äußeren Mitochondrienmembran (OMV). Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus drei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Die Studien zeigten, dass Mikrosomen erwartungsgemäß die geringsten Umsetzungsraten aufwiesen, wie es auch für andere Verbindungen beobachtet wurde.²¹² Zeitgleich mit diesen Untersuchungen wurden neben dem Cytochrom b_5 und der NADH Cytochrome b_5 Reduktase die mARC-Isoenzyme identifiziert, die an der mitochondrialen Reduktion beteiligt sind.²⁰³ Voruntersuchungen zeigten, dass dieses reduktive Enzymsystem in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Um abzuklären, ob es auch an der Reduktion der N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Derivate beteiligt ist, wurden Inkubationen mit einer gereinigten Fraktion der äußeren Mitochondrienmembran (OMV) durchgeführt. Der Einsatz der OMV führte zu einem erheblichen Anstieg in den Umsetzungsraten (Tab. 4.1). Dieses Ergebnis lieferte somit den ersten Hinweis, dass die mARC-Isoenzyme auch die Reduktion

4 Reduktion von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin und N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin

von NHAM und NOHA katalysieren. Während der Anfertigung dieser Arbeit gelang die rekombinante Expression der hmARC-Isoenzyme, so dass im Folgenden Untersuchungen mit den rekombinanten Enzymen durchgeführt werden konnten.

Tab. 4.1: *Umsetzungsraten für die in vitro Reduktion von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Derivaten durch verschiedene Enzymquellen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus drei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.*

Substrat	Enzymquelle	Bildung L-Arginin bzw. N^{δ} -Methyl-L-arginin [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]
N^{ω} -Hydroxy-L-arginin	SL Mikrosomen	1,48 ± 0,15
	SL Mitochondrien	7,11 ± 0,57
	OMV	36,52 ± 2,95
N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin	SL Mikrosomen	1,15 ± 0,07
	SL Mitochondrien	5,79 ± 0,57
	OMV	25,81 ± 1,82

4.3.3 Reduktion durch humane mARC-Isoenzyme

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob die neu identifizierten mARC-Isoenzyme an der mitochondrialen Reduktion beteiligt sind. Hierzu wurden Untersuchungen im rekonstituierten Enzymsystem aus Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und den humanen mARC-Isoenzymen durchgeführt. In allen Inkubationen konnte die Reduktion der N^{ω} -hydroxylierten L-Arginin-Derivate nachgewiesen werden (Abb. 4.4).

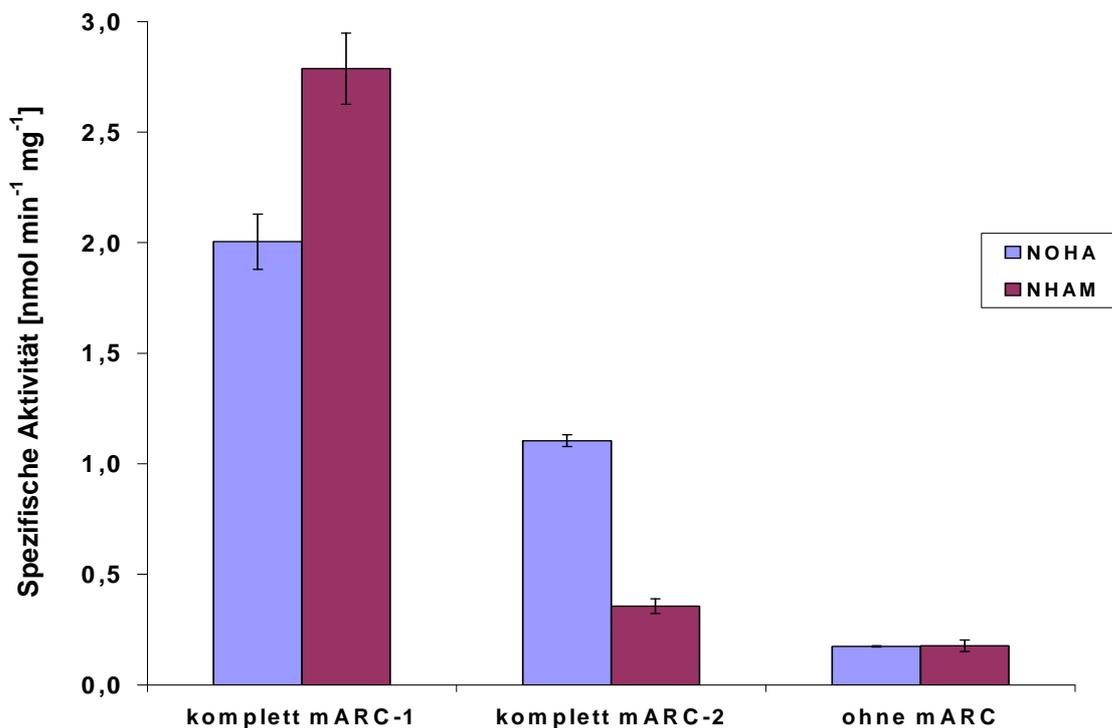


Abb. 4.4: Spezifische Aktivitäten der Reduktion von N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin und N^{ω} -Hydroxy-L-arginin durch verschiedene Enzymsysteme. Die Angabe „komplett“ entspricht einem Inkubationsansatz mit Cytochrom b_5 , NADH Cytochrom b_5 Reduktase und dem jeweiligen mARC Isoenzym; „ohne mARC“ entspricht einem Inkubationsansatz mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um MW \pm SD aus drei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Es ist bekannt, dass auch Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase allein die Reduktion katalysieren können.^{207,213} Hierfür wird ein Verhältnis von 1:10 als optimal angesehen, welches auch in diesen Studien verwendet wurde. Diese Vergleichsinkubationen mit Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase ohne mARC-Isoenzyme wiesen eine deutlich geringere Aktivität auf. Die Reduktionsraten der beiden untersuchten N^{ω} -Hydroxy-L-arginine wurden durch den

4 Reduktion von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin und N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin

Zusatz von rekombinanten humanen mARC-Isoenzymen signifikant gesteigert (Tab. 4.2). mARC-1 zeigte eine deutlich höhere Aktivität als mARC-2. Interessant ist der deutliche Unterschied zwischen den Reduktionsraten der beiden Substanzen an den unterschiedlichen mARC-Isoenzymen. Denn mARC-1 besitzt eine höhere Aktivität für NHAM als für NOHA, wohingegen NHAM von mARC-2 wesentlich schlechter reduziert wird als NOHA. Dies deutet auf eine unterschiedliche Substratspezifität beider Isoenzyme hin, die im Rahmen weiterer Arbeiten genauer untersucht wird. Bereits heute ist jedoch bekannt, dass sie ein sehr breites Substratspektrum besitzen.²⁰⁸

Tab. 4.2: Umsetzungsdaten für die *in vitro* Reduktion von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Derivaten durch verschiedene Enzymsysteme. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus drei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Substrat	Ansatz ^a	L-Arginin bzw. N^{δ} -Methyl-L-arginin [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	Aktivitäts- steigerung durch mARC	p ^b
N^{ω} -Hydroxy-L-arginin	komplett + mARC-1	2,00 ± 0,13	11x	< 0,001
	komplett + mARC-2	1,10 ± 0,03	6x	< 0,001
	- mARC	0,17 ± 0,01	-	
N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin	komplett + mARC-1	2,79 ± 0,16	15x	< 0,001
	komplett + mARC-2	0,36 ± 0,03	2x	0,005
	- mARC	0,18 ± 0,03	-	

^a Ein „kompletter“ Inkubationsansatz bestand aus 20 µg mARC-1 bzw. mARC-2, 19 µg Cytochrom b_5 , 1 µg NADH Cytochrom b_5 Reduktase, 1 mM NADH, 1 mM NOHA oder NHAM, in 150 µl 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0. Bei den Inkubationen „-mARC“ wurde auf den Zusatz von mARC-Isoenzymen verzichtet.

^b Student's *p*-Test: Signifikanz beim Vergleich von Inkubationen mit und ohne mARC-Isoformen.

Seit der Entdeckung der vielseitigen Funktionen von NO wurden intensive Forschungen durchgeführt, um die physiologischen NO-Spiegel therapeutisch zu beeinflussen. Mittlerweile sind mehrere physiologische Mechanismen bekannt, die für eine ausgewogene Balance der NO-Level im Körper sorgen. Hierbei ist unter anderem die Freisetzung von NOHA während der L-Arginin-Katalyse aus dem aktiven Zentrum der NOS zu nennen, welches die Arginase-Aktivität hemmen oder in andere Gewebe wandern und dort NOS-unabhängig NO freisetzen kann.^{27,29,88} Darüber hinaus gibt es noch andere Regulationen des Körpers, die dafür sorgen, dass die NO-Biosynthese den physiologischen Erfordernissen angepasst wird, wie beispielsweise die Hemmung der NOS durch endogen gebildete N^{ω} -methylierte L-Arginine oder die Hemmung der NO-Synthese durch NO im Sinne einer negativen Rückkopplung.^{60,106}

Die hier nachgewiesene Reduktion von NOHA durch Mikrosomen und Mitochondrien limitiert die Bedeutung dieser angenommenen Regulationsmechanismen, da NOHA physiologisch reduziert wird und somit die Relevanz von freiem NOHA im Blutplasma eingeschränkt wird. Somit ist in Frage zu stellen, ob die physiologisch zirkulierenden NOHA-Spiegel ausreichen, um die Arginase zu hemmen beziehungsweise NOS unabhängig NO durch Cytochrom P450 freizusetzen.²⁷ Dennoch kann es sich bei dieser Reduktion möglicherweise um einen weiteren Mechanismus in der komplexen Regulation der NO-Biosynthese handeln. Daher ist es von hoher Relevanz nachzuweisen, welche Enzyme an der Reduktion beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eindeutig gezeigt, dass die mARC-Isoenzyme an der mitochondrialen Reduktion von N^{ω} -hydroxylierten L-Arginin-Derivaten beteiligt sind. Inwiefern diese Ergebnisse eine physiologische Bedeutung einnehmen, muss im Rahmen weiterer Untersuchungen abgeklärt werden, da über das physiologische Vorkommen der mARC-Isoformen noch keine ausreichenden Informationen zur Verfügung stehen.

Darüber hinaus zeigten die durchgeführten Untersuchungen eindeutig, dass NHAM durch alle getesteten Enzymsysteme reduziert wird. In vorausgegangenen Untersuchungen (Kap. 3) wurde NHAM als potenter Inhibitor der Arginase identifiziert. Die hier nachgewiesene Reduktion limitiert die therapeutische Anwendbarkeit von NHAM, jedoch stellen die meisten der bekannten Arginase-Inhibitoren *N*-Hydroxyamidin- bzw. *N*-Hydroxyguanidin-Derivate dar, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls physiologisch reduziert werden.^{85,166}

4.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob N° -Hydroxy-L-arginin (NOHA) und N° -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) durch das physiologische reduktive Enzymsystem reduziert werden. Insbesondere wurde getestet, ob die neu identifizierten Isoenzyme der „mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente“ (mARC) die Umsatzraten steigern können.

Als Ergebnis ist herauszustellen, dass sowohl NOHA als auch NHAM durch Mikrosomen und Mitochondrien zu L-Arginin bzw. N^{δ} -Methyl-L-arginin reduziert werden. In den Mitochondrien scheinen insbesondere die mARC-Isoformen an der Reduktion beteiligt zu sein, da ein Zusatz dieser Isoenzyme zu Enzymsystemen aus Cytochrom b_5 und NADH Cytochrom b_5 Reduktase die Aktivität um den Faktor 2 - 15 erhöhte. Somit konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, dass die mARC-Isoenzyme an der NOHA-Reduktion beteiligt sind. NOHA wird als Intermediat in der NOS-Katalyse gebildet und kann physiologisch aus dem aktiven Zentrum der NOS freigesetzt werden. Im Weiteren zirkuliert es im Blutplasma und kann NOS-unabhängig über Hämproteine zu NO umgesetzt werden oder als potenter Inhibitor der Arginase modulierend in die NO-Biosynthese eingreifen. Die hier untersuchte Reduktion kann physiologisch eine bedeutende Rolle in der Regulation der NO-Biosynthese einnehmen, da durch sie die physiologisch zirkulierenden NOHA-Spiegel verringert werden. Daher ist es fraglich, in welchem Ausmaß die NOHA-vermittelte Hemmung der Arginase sowie die NOS-unabhängige NO-Freisetzung über Hämproteine aus frei zirkulierendem NOHA eine physiologische Funktion einnehmen.

Zusätzlich wurde die Reduktion von NHAM nachgewiesen. Diese Verbindung wurde im Rahmen dieser Arbeit als potenter Inhibitor der bovinen Arginase identifiziert. Die therapeutische Einsatzmöglichkeit dieser Substanz als Arginase-Inhibitor wird natürlich durch die hier gezeigte Reduktion erheblich limitiert. Allerdings stellen die meisten der potenten Arginase-Inhibitoren N -Hydroxy-Verbindungen dar, die wahrscheinlich alle physiologisch reduziert werden.

5 Untersuchungen mit flavinhaltigen Monooxygenasen

5.1 Einleitung und Zielsetzung

Über viele Jahre hinweg wurde angenommen, dass *N*- oder *S*-Oxygenierungen von Heteroatom-enhaltenden Xenobiotika nur durch P450 Cytochrome (EC 1.14.14.1) katalysiert werden. Flavinhaltige Monooxygenasen (FMOs, EC 1.14.13.8) wurden erst später identifiziert und repräsentieren neben den Cytochromen ein weiteres mikrosomales, Fremdstoff-metabolisierendes Enzymsystem, dessen physiologische Bedeutung in der Detoxifikation von lipophilen Substanzen liegt.^{214,215} Sie enthalten ein fest, aber nicht kovalent gebundenes FAD und katalysieren die Oxygenierung einer breiten Anzahl von nukleophilen Stickstoff-, Schwefel-, Selen- und Phosphor-enhaltenden Substanzen zu den entsprechenden Oxiden. Ebenso wie bei den P450 Cytochromen handelt es sich um Monooxygenasen, die unter Verbrauch von NADPH und O₂ Reaktionen des Phase 1 Metabolismus darstellen.^{216,217} Diese Reaktionen dienen der Überführung von Substrate in hydrophilere und somit besser ausscheidbare Substanzen. Manchmal kann es allerdings auch zu einer Bioaktivierung in toxische reaktive Substanzen kommen. Im Gegensatz zu den P450 Cytochromen werden die FMOs nicht so leicht induziert bzw. inhibiert, was die Gefahr von Arzneistoffinteraktionen für Stoffe minimiert, die über die FMOs metabolisiert werden.²¹⁸ In Säugetieren sind fünf verschiedene Isoformen sowie sechs Pseudogene bekannt.²¹⁹

Für die einzelnen Isoformen konnten unterschiedliche Gewebelokalisationen nachgewiesen werden. Interessant ist hierbei auch die unterschiedliche Expression zu den jeweiligen Entwicklungsstadien. So wird die humane FMO1 in der fetalen Leber 10fach stärker exprimiert als in der erwachsenen, wohingegen die FMO3 beim Erwachsenen 50fach häufiger vorkommt als in der fetalen Leber und dort für den größten Teil des FMO vermittelten Fremdstoffmetabolismus verantwortlich ist.^{220,221} Darüber hinaus wird die FMO1 auch in der erwachsenen Niere exprimiert.^{221,222} Die FMO2 wird insbesondere in der erwachsenen Lunge exprimiert und die FMO4 ist in Leber und Niere lokalisiert. Diese beiden Formen scheinen im Lebermetabolismus keine entscheidende Rolle zu spielen.

Die FMOs besitzen ein breites Substratspektrum, welches unter anderem Hydrazine, Phosphine, Sulfide sowie primäre, sekundäre und tertiäre Amine als Substrate beinhaltet.²¹⁶ Jedoch können sich die jeweiligen Isoenzyme insbesondere in den Metabolisierungsgeschwindigkeiten erheblich voneinander unterscheiden.

Eine Ausnahme innerhalb der FMOs stellt dabei die FMO5 dar. Sie wird sowohl in der jungen wie auch in der erwachsenen Leber exprimiert, in der sie sogar die Hauptform der FMOs darstellt.²²³ Allerdings besitzt sie im Gegensatz zu den anderen Isoenzymen eine nur sehr geringe Aktivität sowie sehr wenige Substrate, was eine Beteiligung am Metabolismus von Fremdstoffen unwahrscheinlich erscheinen lässt. Typische FMO3 Substrate wie Methimazol, Ranitidin und Trimethylamin werden von der FMO5 nicht oder nur sehr gering umgesetzt.^{224,225} Zu den wenigen bisher identifizierten Substraten gehören Methyl-(*p*-tolyl)sulfid, 8-DPT (10-[(*N,N*-Dimethylaminooktyl)-2-(trifluormethyl)]phenothiazin), *S*-Methylesonarimod und *n*-Oktylamin.^{217,226-228} Die sehr geringe Substratbreite der FMO5 wird dadurch unterstrichen, dass schon kleine strukturelle Änderungen an diesen Substraten zu einer Abnahme oder gar einem Verlust der Substrateigenschaft führen. Eine spezielle physiologische Funktion dieser Isoform konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Der erste Schritt der Katalyse durch die FMOs besteht aus einer Zwei-Elektronen-Reduktion des FAD durch NADPH. An das reduzierte FAD lagert sich im Anschluss molekularer Sauerstoff an und es bildet sich ein relativ stabiles C4a-Hydroperoxyflavin. Das aktive Zentrum verhindert den Zerfall des Intermediates und schützt vor der Bildung von reaktiven Spezies.²²⁹ Im Gegensatz zu den Cytochromen bildet sich hier der reaktive Intermediärzustand schon in Abwesenheit des Substrates.²¹⁸ Diese Besonderheit wird unter anderem für das breite Substratspektrum der FMOs verantwortlich gemacht. Da das reaktive C4a-Hydroperoxyflavin bereits ohne Substrat gebildet wurde, können alle Nucleophile, die das aktive Zentrum erreichen, oxidiert werden. Nach Anlagerung des Substrates wird es durch das Hydroperoxyflavoprotein oxygeniert und anschließend eliminiert das gebildete Hydroxyflavin Wasser. Abschließend wird das NADP⁺ freigesetzt, und das aktive Zentrum steht für den nächsten Zyklus bereit.^{218,229} Dieser Reaktionsmechanismus gilt mit Ausnahme der FMO5 für alle Säugetier FMOs. Wahrscheinlich ist die FMO5 nicht in der Lage diesen stabilen Hydroperoxyflavin Übergangszustand auszubilden, worin vermutlich auch ihr

geringes Substratspektrum begründet liegt. Aufgrund ihrer Primärsequenz ist sie als FMO klassifiziert, wohingegen ihr Reaktionsmechanismus eher der einer *p*-Hydroxybenzoathydroxylase gleicht.²³⁰

Die *N*-Hydroxylierung von biogenen Aminen wie Tyramin und Phenethylamin gefolgt von einer zweiten Oxygenierung zum *trans*-Oxim durch FMOs wurde bereits beschrieben.^{231,232}

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die FMOs möglicherweise eine physiologische Funktion in der Oxidation von L-Arginin zum *N*^o-Hydroxy-L-arginin (NOHA), der biosynthetischen Vorstufe von NO, besitzen. Bisher wurde die Bildung von NOHA ausschließlich für die NOSs beschrieben. NOHA kann im Weiteren entweder durch die NO-Synthase oder durch Cytochrom P450 zu L-Citrullin und NO umgesetzt werden oder es kann durch die Hemmung der Arginase in den NO-Stoffwechsel eingreifen.^{27,29,30} Die Reduktion dieser Verbindung wird in Kap. 4 beschrieben. Für die Untersuchungen wurden die in der Leber lokalisierten Isoenzyme FMO1, FMO3 und FMO5 ausgewählt.

Die FMO1 ist die prävalente Leberform in den meisten Säugetieren außer im Menschen. Wie bereits erwähnt, wird die FMO1 beim Menschen insbesondere in der fetalen Leber und in der erwachsenen Niere exprimiert. Sie scheint somit bedeutsam für den pädiatrischen Arzneistoffmetabolismus und insbesondere für die Entwicklung des Fetus zu sein. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Hydroxylierung von L-Arginin durch die FMO1 untersucht, die eventuell an der fetalen Entwicklung beteiligt sein könnte. Für die Testung stand murine FMO1 zur Verfügung.

Des Weiteren wurden diese Untersuchungen auch mit der humanen FMO3 durchgeführt, da dieses Isoenzym den Hauptteil des FMO-vermittelten Metabolismus in der adulten Leber katalysiert.

Die FMO5 ist die einzige Isoform, für die bisher noch kein physiologisches Substrat identifiziert werden konnte. Sie wird in allen Säugetieren exprimiert und ist im Gegensatz zu den anderen Isoenzymen während der gesamten Entwicklung präsent. Daher kann angenommen werden, dass sie eine bisher noch nicht entdeckte Funktion im Körper einnimmt. Die Inkubationen mit rekombinanter humaner FMO5 sollen klären, ob dieses Enzym an der *N*-Hydroxylierung von L-Arginin beteiligt ist und somit möglicherweise einen neuen Mechanismus der NO-Freisetzung darstellt.

Neben den Inkubationen mit L-Arginin wurde ebenfalls eine mögliche Hydroxylierung von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA) zu N^{δ} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) untersucht. Bisher konnte MA nicht in Säugetieren nachgewiesen werden, sollte diese Substanz jedoch physiologisch vorkommen, kann die Umsetzung durch die FMOs eine Möglichkeit der Bildung von NHAM darstellen, das als Inhibitor der Arginase das NO-generierende System beeinflussen kann (Kap. 3).

5.2 Materialien und Methoden

5.2.1 Materialien

5.2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren kommerziell erhältlich und wurden entweder über Sigma-Aldrich, Fluka, Roth oder Merck bezogen. NOHA wurde von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) erhalten. Methanol Lichrosolv und Acetonitril Lichrosolv wurden von Acros Organics (Geel, Belgien) erworben. 8-DPT wurde von Herrn Prof. Cashman (Human BioMolecular Research Institute, San Diego, USA) und N^{δ} -Methyl-D,L-arginin von Herrn Prof. Steglich (Institut für Organische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.¹⁸⁸ NHAM wurde im eigenen Arbeitskreis von D. Schade synthetisiert.¹⁸⁷

5.2.1.2 Geräte

Zur Durchführung der Inkubationen wurden 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und ein IKA-Vibrax-VXR Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Die Abtrennung des Proteins erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge 2043 (Hettich, Tuttlingen). Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Das Fließmittel für die HPLC wurde mit einem Sonorex Super Rk 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast.

5.2.1.3 Enzyme

Die rekombinant exprimierten humanen FMO3 (hFMO3) und FMO5 (hFMO5) wurden über Sigma-Aldrich bezogen. Die rekombinant exprimierten murine FMO1 (mFMO1), die murine FMO5 (mFMO5) sowie eine humane FMO5 (hFMO5) wurden von Herrn Prof. Cashman (Human BioMolecular Research Institute, San Diego, USA) zur Verfügung gestellt.

5.2.2 Analytische Methoden

5.2.2.1 HPLC-Methode: Methyl-(*p*-tolyl)sulfid

HPLC-Anlage: Waters Breeze HPLC-System mit Waters 717plus Autosampler, Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector und Breeze Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)

Stationäre Phase: Symmetrie C18 5 μm (4,6 x 150 mm, Waters)

Mobile Phase: Acetonitril 50 %
0,1 % Trifluoressigsäure in *Aqua bidest.* 50 %

Flussrate: 1 ml / min

Detektion: 237 nm

Injektionsvolumen: 20 μl

Laufzeit: 20 min

Retentionszeiten:

Methyl-(<i>p</i> -tolyl)sulfoxid	2,1 \pm 0,1 min
Methyl-(<i>p</i> -tolyl)sulfid	14,2 \pm 0,2 min

5.2.2.2 HPLC-Methode: 8-DPT

HPLC-Anlage: Waters Breeze HPLC-System mit Waters 717plus Autosampler, Waters 1525 Binary Pump, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector und Breeze Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 3.30)

Stationäre Phase: Symmetrie C18 5 μm (4,6 x 150 mm, Waters)

Mobile Phase: Acetonitril 50 %

0,1 % Trifluoressigsäure in *Aqua bidest.* 50 %

Flussrate: 1 ml / min

Detektion: 210 nm

Injektionsvolumen: 20 μl

Laufzeit: 15 min

Retentionszeiten:

8-DPT 7,8 \pm 0,2 min

8-DPT-N-Oxid 8,9 \pm 0,2 min

5.2.2.3 HPLC-Methode: L-Arginin-Derivate

HPLC-Anlage: Waters Autosampler 717plus, Waters 600S Controller, Waters 616 Pump, Waters Fluorescence Detector 470, Croco Cil Säulenofen und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)

Stationäre Phase: NovaPak RP-18-Säule 4 μm (4 x 150 mm, VDS Optilab)
Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)

Temperatur: 30 $^{\circ}\text{C}$

Mobile Phase: Eluent A: 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 4,65 86 %

Acetonitril 8 %

Methanol 6 %

Eluent B: Acetonitril 40 %

Methanol 30 %

Aqua bidest. 30 %

Flussrate: 1 ml / min

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	-
10	100	-
15	95	5
19	95	5
22	40	60
25	40	60
27	100	-
33	100	-

Detektion: Fluoreszenz: λ_{ex} : 338 nm; λ_{em} : 425 nm

Injektionsvolumen: 10 μl

Derivat.-Reagenz: 50 mg α -PA gelöst in 1 ml Methanol
+ 9 ml 0,2 M Kaliumborat-Puffer pH 9,4
+ 53 μl 2-Mercaptoethanol

Derivatisierung: Der Autosampler wurde so programmiert, dass 10 μl der Probe mit 14 μl des Derivatisierungs-Reagenzes gemischt wurden und 3 min lang bei RT vor der Injektion reagieren konnten.

Retentionszeiten:

NOHA	13,0	\pm	0,3 min
L-Arginin	14,7	\pm	0,3 min
NHAM	16,7	\pm	0,2 min
MA	18,9	\pm	0,3 min

5.2.2.4 Kalibrierung und Wiederfindung

Es wurde eine Sechspunkt-Kalibrierung von N° -Hydroxy-L-arginin und N° -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin im Bereich von 5 - 100 μM in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 durchgeführt.

Für die Wiederfindung wurden N° -Hydroxy-L-arginin und N° -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin jeweils in Konzentrationen von 5, 10, 25, 50, 75 und 100 μM

mit 50 µg hitzedenaturiertem Protein in 250 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurde der Ansatz mit 75 µl Acetonitril versetzt und anschließend das Protein abzentrifugiert (12.000 g, 5 min). Der Überstand wurde der HPLC zugeführt.

5.2.2.5 LC/MS Methode

Zur Identifizierung der gebildeten Metaboliten wurden die HPLC-Methoden (Kap. 5.2.2.1 und 5.2.2.2) auf die LC/MS übertragen.

HPLC-Pumpe:	HP Series 1100 Binary Pump G1312A		
Entgaser:	HP Degasser G1322A		
UV-Detektor:	HP 1314 a, 220 nm		
Injektor:	Rheodyne 7725 50 µl Probenschleife, manuelle Injektion		
MS:	Esquire-LC (Bruker, Bremen)		
Interface:	Elektronen Spray Ionisation (ESI)+, 200 °C		
Trockengas:	8 l / min		
Nebulizer:	12 psi		
Scan:	50 -800 m / z		
Software:	Agilent ChemStation	HPLC Aufnahme- und Auswertesoftware (Version A.09.01)	
		Esquire Control (Version 6.14) MS Aufnahmesoftware	
		Data Analysis (Version 3.0) MS Auswertesoftware	
Stationäre Phase:	Symmetrie C18 5 µm (4,6 x 150 mm, Waters)		
	Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)		
Säulentemperatur:	RT		
Mobile Phase:	Acetonitril		50 %
	0,1 % Trifluoressigsäure in <i>Aqua bidest.</i>		50 %
Flussrate:	1 ml / min		
Injektionsvolumen:	10 µl		

5.2.3 Biochemische Methoden

5.2.3.1 Muriner FMO1-Assay

Ein Standard-Inkubationsansatz bestand aus 0,4 mM NADPH, 1 mM Substrat (L-Arginin bzw. *N*^δ-Methyl-D,L-arginin) in 250 µl 50 mM Kaliumborat-Puffer pH 9,5. Das Starten der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 60 µg rekombinanter muriner FMO1. Die Inkubation erfolgte über 30 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 75 µl Acetonitril abgestoppt. Die Proben wurden für 5 min geschüttelt und 5 min bei 12.000 g zentrifugiert. Die umgesetzte Menge Substrat wurde per HPLC mit Fluoreszenz-Detektion (Kap. 5.2.2.3) bestimmt.

Zur Kontrolle der Enzymaktivität wurden Inkubationen mit 1 mM Methyl-(*p*-tolyl)sulfid als Substrat durchgeführt. Diese Proben wurden über eine HPLC-Analytik mit UV-Detektion (Kap. 5.2.2.1) ausgewertet.

Darüber hinaus wurden jeweils Inkubationen über 60 min durchgeführt, um zu prüfen, ob durch eine längere Inkubation ein höherer Stoffumsatz zu detektieren ist.

5.2.3.2 Humaner FMO3-Assay

Die Durchführung erfolgte, wie für murine FMO1 beschrieben (Kap. 5.2.3.1), mit dem Unterschied, dass 50 µg rekombinant exprimierte humane FMO3 als Enzymquelle eingesetzt wurde. Die Kontrolle der Enzymaktivität mit 1 mM Methyl-(*p*-tolyl)sulfid als Substrat wurde ebenfalls durchgeführt.

5.2.3.3 Humaner FMO5-Assay

Die Inkubation wurde analog der für die murine FMO1 (Kap. 5.2.3.1) durchgeführt. Als Enzymquelle wurden 50 µg rekombinante humane FMO5 (Quelle: Sigma-Aldrich) oder 120 µg rekombinante humane FMO5 (Quelle: Prof. Cashman) eingesetzt.

Zur Kontrolle der Enzymaktivität wurden Inkubationen mit 0,4 mM 8-DPT als Substrat durchgeführt. Diese Proben wurden über eine HPLC-Analytik mit UV-Detektion (Kap. 5.2.2.2) ausgewertet.

5.2.3.4 Muriner FMO5-Assay

Die Inkubation wurde analog der für die murine FMO1 (Kap. 5.2.3.1) durchgeführt. Als Enzymquelle wurden 60 µg rekombinant exprimierte murine FMO5 eingesetzt.

Die Kontrolle der Enzymaktivität wurde mit 0,4 mM 8-DPT als Substrat durchgeführt und per HPLC vermessen.

5.3 Ergebnisse & Diskussion

5.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode: L-Arginin-Derivate

Die verwendete HPLC-Methode ermöglichte die Trennung von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA), L-Arginin, N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-arginin (MA). Ein repräsentatives Chromatogramm der Standards ist in Abb. 5.1 dargestellt.

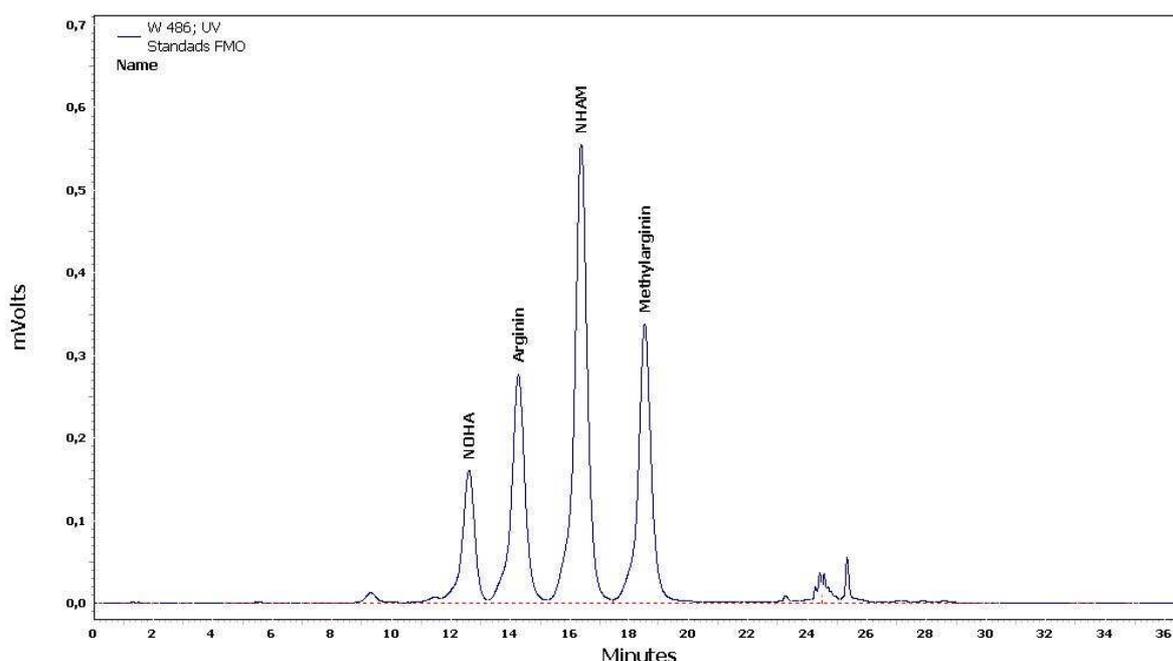


Abb. 5.1: Repräsentatives Chromatogramm der verwendeten HPLC-Analytik zur Trennung von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA), L-Arginin, N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-arginin (MA).

Die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden für NOHA und NHAM waren in dem Konzentrationsbereich zwischen 5 - 100 µM linear ($R^2 > 0,997$). Die Wiederfindungsraten betragen 95 % für NOHA und 90 % für NHAM (Abb. 5.2).

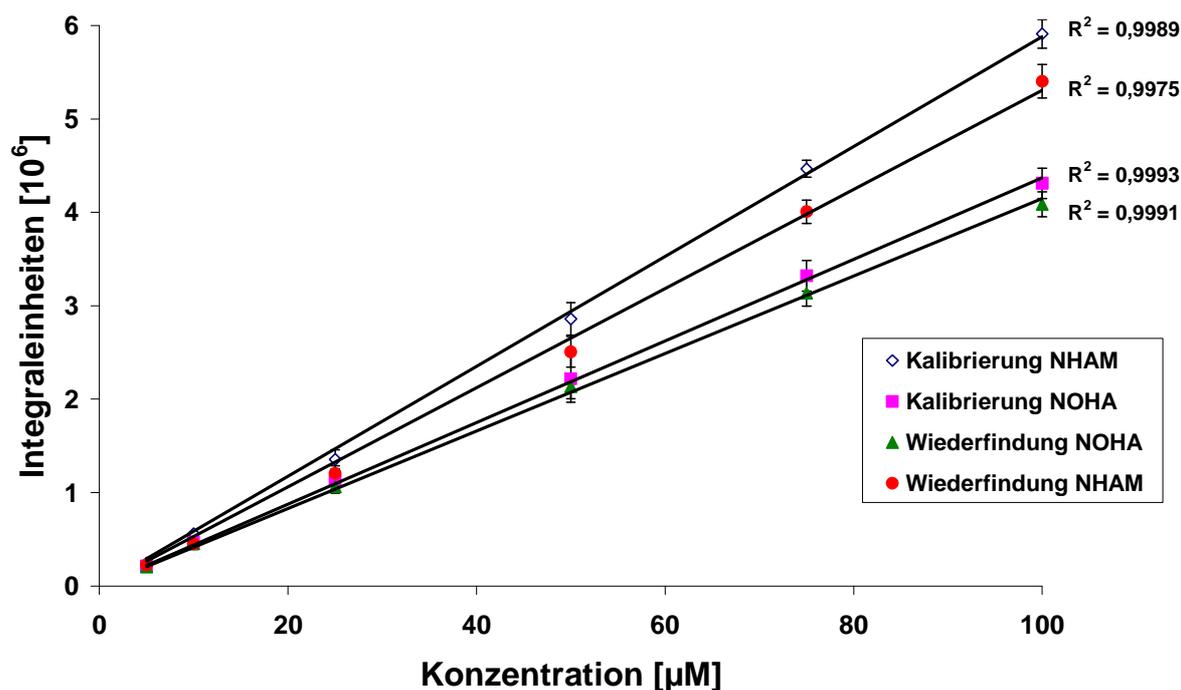


Abb. 5.2: Kalibrierung und Wiederfindung der verwendeten HPLC-Analytik für *N*^ω-Hydroxy-*N*^δ-methyl-L-arginin (NHAM) und *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA). Die ermittelten Integraleinheiten sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

5.3.2 Substratstudien mit FMOs

In allen Kontrollinkubationen mit Methyl-(*p*-tolyl)sulfid konnte eindeutig die Bildung einer neuen Substanz nachgewiesen werden. Nach Literaturangaben katalysieren die FMOs die Oxidation von Methyl-(*p*-tolyl)sulfid zu Methyl-(*p*-tolyl)sulfoxid (Abb. 5.3).²³³ Da kein Standard des Produktes zur Verfügung stand, wurde die Identität dieses neuen Produktes *via* LC/MS nachgewiesen. Es wurde eine Masse (M+H) von 155 g / mol für diesen neuen Metaboliten nachgewiesen entsprechend der Masse von Methyl-(*p*-tolyl)sulfoxid.

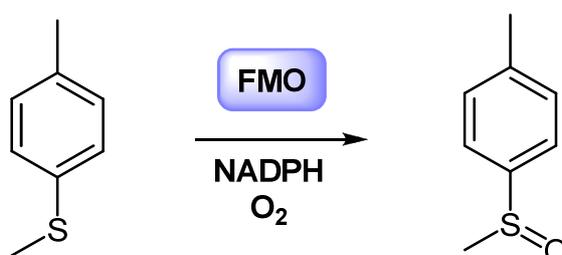


Abb. 5.3: Umsetzung von Methyl-(*p*-tolyl)sulfid durch die flavinhaltigen Monooxygenasen.

Die Kontrollinkubationen für die verwendeten FMO5s wurden mit 8-DPT als Substrat durchgeführt (Abb. 5.4).²²⁵ Auch hier war kein Standard des Reaktionsproduktes verfügbar. Daher wurde die Identität des Reaktionsproduktes ebenfalls über LC/MS nachgewiesen. Die erhaltene Masse des Produktes bestätigte, dass es sich um das 8-DPT-*N*-Oxid handelte.

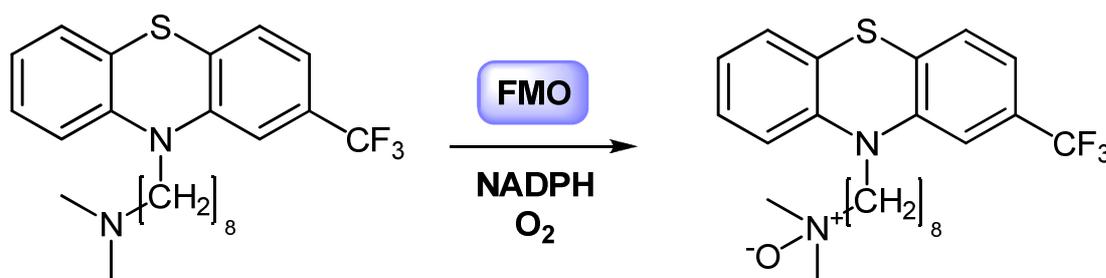


Abb. 5.4: Umsetzung von 8-DPT durch die flavinhaltige Monooxygenase-5.

Für alle im Folgenden angegebenen Enzyminkubationen werden spezifische Aktivitäten für die Kontrollinkubationen angegeben. Hierbei ist anzumerken, dass sowohl für das Methyl-(*p*-tolyl)sulfoxid als auch für das 8-DPT-*N*-Oxid keine Standards zur Verfügung standen, somit sind die angegebenen Werte über eine Kalibrierung des eingesetzten Substrates berechnet worden.

5.3.2.1 Inkubationen mit muriner FMO1

Die Kontrollinkubationen mit muriner FMO1 (mFMO1) und Methyl-(*p*-tolyl)sulfid zeigten eine spezifische Aktivität von $44,4 \pm 1,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Eine Verlängerung der Inkubation auf 60 min führte zu einem erhöhten Substratumsatz, doch war der Anstieg nicht linear in Bezug auf den 30 min Umsatz.

5.3.2.1.1 Substratstudien mit L-Arginin

Es konnte keine Umsetzung von L-Arginin durch die mFMO1 nachgewiesen werden. Weder NOHA noch die Entstehung eines anderen Metaboliten konnte beobachtet werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min führte zu keinem anderen Ergebnis.

5.3.2.1.2 Substratstudien mit *N*^δ-Methyl-D,L-arginin

Eine Umsetzung von *N*^δ-Methyl-D,L-arginin durch die mFMO1 konnte nicht detektiert werden. Auch bei einer Inkubationszeit von 60 min waren keine Metabolite nachweisbar.

5.3.2.2 Inkubationen mit humaner FMO3

Die Kontrollinkubationen mit humaner FMO3 (hFMO3) und Methyl-(*p*-tolyl)sulfid zeigten eine spezifische Aktivität von $40,9 \pm 1,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Eine Verlängerung der Inkubation auf 60 min führte zu einem erhöhten Substratumsatz. Allerdings war der Anstieg nicht linear in Bezug auf den 30 min Umsatz.

5.3.2.2.1 Inkubationen mit L-Arginin

Bei den Inkubationen mit hFMO3 und L-Arginin als Substrat konnte weder nach 30 min noch nach 60 min ein Umsatz detektiert werden.

5.3.2.2.2 Inkubationen mit *N*^δ-Methyl-D,L-arginin

In keiner Probe mit hFMO3 und *N*^δ-Methyl-D,L-arginin als Substrat konnte eine Umsetzung detektiert werden. Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min zeigte keinen Substratumsatz.

5.3.2.3 Inkubationen mit humaner FMO5

Die Kontrollinkubationen mit humaner FMO5 (hFMO5) und 8-DPT zeigten eine geringe Bildung des 8-DPT-*N*-Oxids. Die spezifische Aktivität wurde zu $0,7 \pm 0,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Enzymquelle: Sigma-Aldrich) bzw. zu $1,3 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Enzymquelle: Prof. Cashman) bestimmt. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min führte zu einem Anstieg des Produktes, der jedoch nicht linear in Bezug auf den 30 min Umsatz war.

5.3.2.3.1 Substratstudien mit L-Arginin

Für beide Enzymchargen konnte keine Umsetzung von L-Arginin durch die hFMO5 detektiert werden. Auch der erhöhte Einsatz der Enzymquelle mit 120 µg führte zu keinen detektierbaren Metaboliten. Ebenso führte eine längere Inkubation von 60 min zu keinem anderen Ergebnis.

5.3.2.3.2 Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin

Mit beiden eingesetzten Enzymchargen konnte auch für N^{δ} -Methyl-D,L-arginin keine hFMO5 katalysierte Umsetzung nachgewiesen werden. Auch hier brachte sowohl der erhöhte Enzymsatz von 120 μg als auch eine Inkubationszeitverlängerung auf 60 min kein anderes Ergebnis.

5.3.2.4 Inkubationen mit muriner FMO5

Die murine FMO5 (mFMO5) zeigte für die Umsetzung von 8-DPT eine spezifische Aktivität von $10,8 \pm 1,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min führte zu einem erhöhten Substratumsatz.

5.3.2.4.1 Substratstudien mit L-Arginin

Auch bei den Inkubationen mit mFMO5 konnte keine Umsetzung von L-Arginin beobachtet werden. Eine Inkubationszeit von 60 min führte ebenfalls zu keinen detektierbaren Metaboliten.

Abb. 5.5 stellt ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm der durchgeführten Substratstudien dar. L-Arginin als eingesetztes Substrat ist deutlich zu erkennen, aber bei $t = 13 \text{ min}$ ist kein Signal für NOHA zu detektieren.

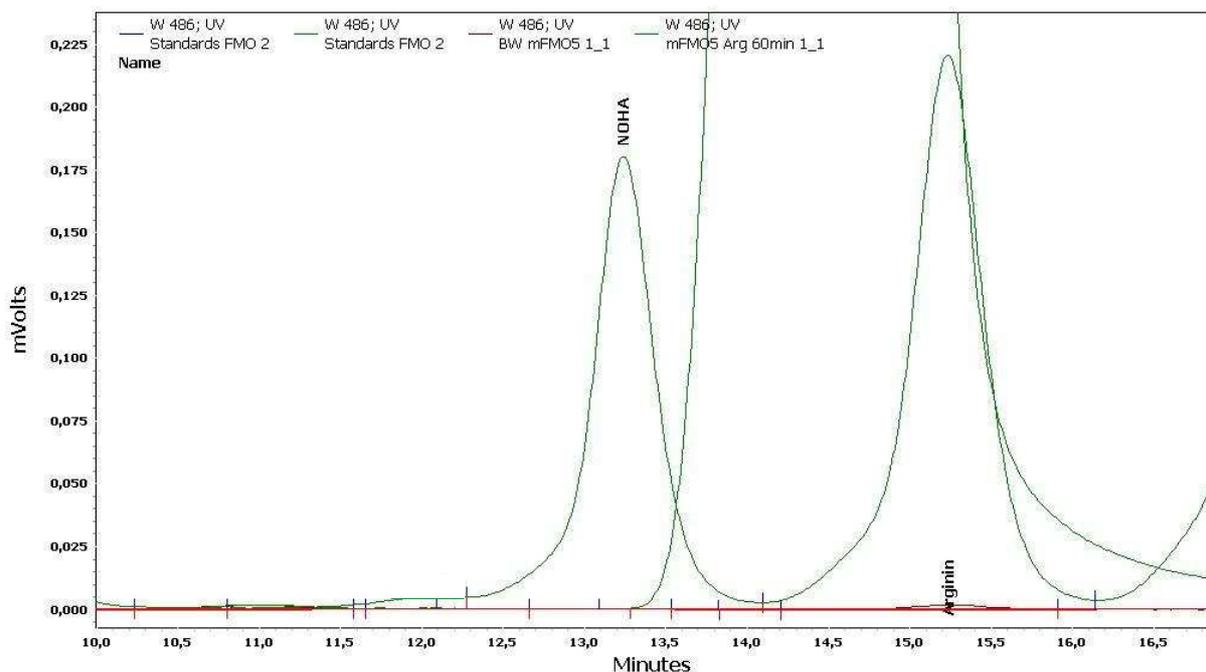


Abb. 5.5: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Substratstudien mit mFMO5 und L-Arginin als Substrat. In den analysierten Proben konnte keine Umsetzung zu N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA) detektiert werden. Ein Chromatogramm der Standards L-Arginin und NOHA wurde über das Chromatogramm gelegt.

5.3.2.4.2 Substratstudien mit *N*^δ-Methyl-D,L-arginin

N^δ-Methyl-D,L-arginin wurde ebenfalls nicht durch die mFMO5 verstoffwechselt. Auch bei einer Inkubation über 60 min konnten keine Bildung von Metaboliten nachgewiesen werden.

5.3.3 Beurteilung der Ergebnisse

Alle durchgeführten Inkubationen zeigten, dass weder L-Arginin noch MA durch die Isoenzyme der FMO umgesetzt werden. Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min führte zu keinem detektierbaren Umsatz der Substrate bei einer Nachweisgrenze von 0,5 µM. Die Aktivität der Enzymquellen wurde durch Kontrollinkubationen mit bekannten Substraten der FMOs (Methyl-(*p*-tolyl)sulfid für FMO1/3 und 8-DPT für FMO5) nachgewiesen. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die FMOs nicht an der Oxidation von L-Arginin-Derivaten beteiligt sind. Somit stellt eine Umsetzung von L-Arginin durch die FMOs keinen neuen Mechanismus zur Bildung von NOHA dar, das im Anschluss entweder über die NO-Synthase oder über die Cytochrom P450-Familie weiter zu L-Citrullin und NO umgesetzt werden könnte. Des Weiteren könnte NOHA bzw. NHAM durch eine Hemmung der Arginase in den NO-Stoffwechsel eingreifen. Aus den hier dargestellten Ergebnissen wird jedoch deutlich, dass die FMOs nicht in die NO-Biosynthese involviert sind.

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, ist für die FMO5 bisher noch kein physiologisches Substrat identifiziert worden. Die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die FMO5 auch nicht an der Verstoffwechslung von L-Arginin-Derivaten beteiligt ist und somit bleibt die physiologische Funktion dieser Isoform weiterhin unklar.

Studien zur Substratspezifität der FMOs zeigten, dass neutrale und einfach positiv geladene Verbindungen als Substrate akzeptiert werden, wohingegen negative oder mehrfach positiv geladene Substanzen zumeist nicht akzeptiert werden. Darüber hinaus besitzen die FMOs eine sehr geringe Affinität zu Zwitterionen wie L-Arginin eines darstellt.²¹⁷ Somit ist es nicht überraschend, dass die untersuchten L-Arginin-Derivate nicht durch die FMOs umgesetzt werden.

5.4 Zusammenfassung

Die flavinhaltigen Monooxygenasen (FMOs) besitzen ein breites Substratspektrum und sind in der Lage, verschiedene Substrate zu *N*-oxygenieren. Eine mögliche Umsetzung von L-Arginin und *N*^δ-Methyl-D,L-arginin (MA) durch die Isoformen der FMO zu *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA) bzw. *N*^ω-Hydroxy-*N*^δ-methyl-L-arginin (NHAM) würde eine bisher unbekannte Funktion der FMOs darstellen und in die komplexe Regulation des NO-generierenden Systems eingreifen, da sowohl eine vermehrte NO-Biosynthese aus NOHA sowie eine Hemmung der Arginase durch NOHA bzw. NHAM denkbar ist. Diese Untersuchung ist insbesondere für die FMO5 sehr interessant, da sie die einzige Isoform darstellt, für die bisher noch kein physiologisches Substrat identifiziert werden konnte, obwohl sie die Hauptform der Leber repräsentiert.

Es wurden Inkubationen dieser Verbindungen mit mFMO1, hFMO3, hFMO5 und mFMO5 durchgeführt. Im Rahmen der Untersuchungen konnte keine Umsetzung der Substanzen detektiert werden. Inkubationen der Enzymquellen mit Methyl-(*p*-tolyl)sulfid bzw. 8-DPT bewiesen die Aktivität der verwendeten Enzymchargen. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass die Isoenzyme der FMO nicht an der *N*-Hydroxylierung von L-Arginin-Derivaten beteiligt sind und keinen bisher unbekanntem Mechanismus in der komplexen Regulation der NO-Biosynthese darstellen.

6 Hemmstudien mit PRMT1

6.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) stellen die Enzyme dar, die physiologisch in Proteinen gebundenes L-Arginin an den N^ω -Atomen mono- bzw. dimethylieren. Durch Abbau der Proteine werden diese N^ω -methylierten L-Arginine freigesetzt und zirkulieren im Blutsystem.

Im Rahmen der Aufklärung einer möglichen physiologischen Funktion von N^δ -methylierten L-Arginin-Derivaten sollte untersucht werden, ob N^δ -Methyl-D,L-arginin (MA) aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu N^ω -Monomethyl-L-arginin (NMMA) die Aktivität der PRMTs regulieren kann. Ein Mechanismus zur Hemmung der PRMTs und somit eine Verringerung der Entstehung von N^ω -methylierten L-Argininen wäre denkbar. Dies würde indirekt die Aktivität der NO-Synthase erhöhen und könnte einen weiteren bisher unbekanntem Mechanismus in der komplexen Regulation der NO-Bildung darstellen.

Die Testung wurde von A. Spannhoff aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Jung (Pharmazeutisches Institut, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) übernommen.

6.2 Materialien und Methoden

Bei dem verwendeten Testsystem handelte es sich um einen Plattenreader Immunoassay. Der Test wurde in Streptavidin-gecoateten 96-well Mikroplatten durchgeführt. Während der gesamten Inkubation wurde die Platte geschüttelt und nach jedem Inkubationsschritt schlossen sich sechs Waschschriffe an, um die ungebundenen Fragmente zu entfernen.

Zuerst wurden die biotinylierten Substrate gebunden. Frühere Untersuchungen zeigten, dass biotinylierte Histonpeptidfragmente, die auf der Oberfläche von Streptavidin-beschichteten Mikroplatten immobilisiert wurden, als Substrate für *Aspergillus nidulans* PRMT1 dienen können.²³⁴ Nach einer Vorinkubation von Inhibitor, *Aspergillus nidulans* PRMT1 und Puffer über 5 min bei Raumtemperatur wurden die gebundenen Substrate in einer enzymatischen Reaktion umgesetzt.

Die umgesetzte Menge wurde mittels eines primären Kaninchen IgG-Antikörpers gegen ADMA ermittelt. Im zweiten Schritt wurde ein Europium-markierter sekundärer Antikörper verwendet. Die Europium-Markierung wurde durch Zugabe von einem Enhancement / chelating cocktail abgespalten. Die Messung erfolgte via Fluoreszenz-Detektion.²³⁵ Das Testprinzip ist schematisch in Abb. 6.1 dargestellt.

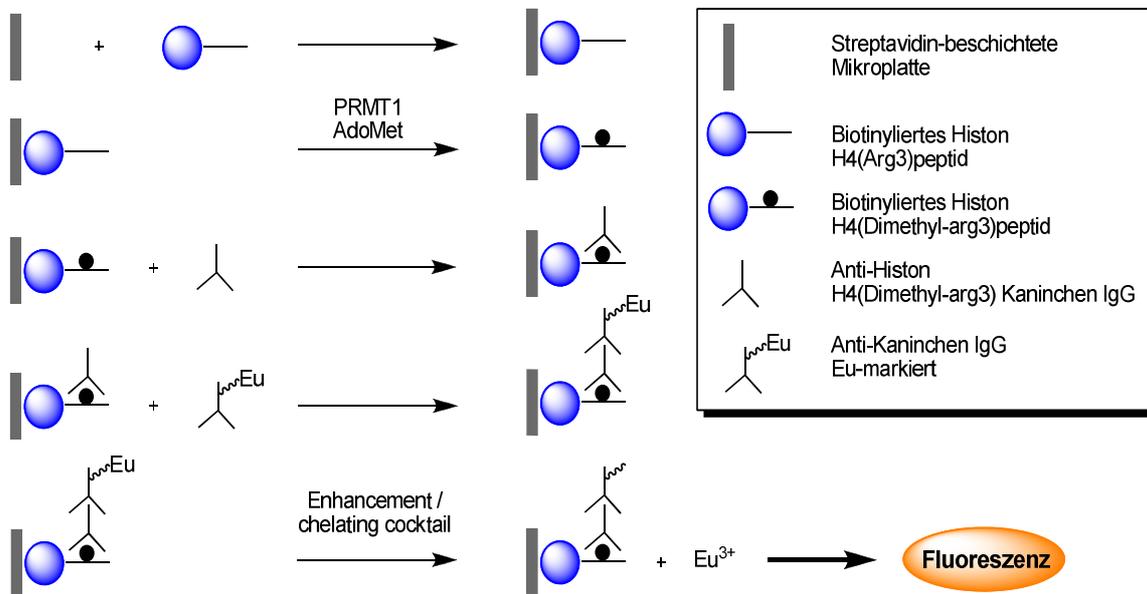


Abb. 6.1: Schematische Darstellung des verwendeten Testsystems. AdoMet, S-Adenosyl-L-methionin; PRMT1, Protein-Arginin-Methyltransferase-1.

6.3 Ergebnisse & Diskussion

N^{δ} -Methyl-D,L-arginin wurde in Konzentrationen von 10 μM und 40 μM eingesetzt. Bei keiner dieser Konzentrationen konnte eine Hemmwirkung auf die *Aspergillus nidulans* PRMT1 detektiert werden. Aus diesem Ergebnis kann somit gefolgert werden, dass eine N^{δ} -Methylierung keinen physiologischen Mechanismus zur Hemmung der PRMTs darstellt. In den durchgeführten Tests wurde nur freies N^{δ} -Methyl-D,L-arginin getestet. Möglicherweise könnte proteingebundenes N^{δ} -methyliertes Arginin eine Hemmwirkung auf die PRMT ausüben. Schließlich stellt das physiologische Substrat der PRMTs auch ein proteingebundenes Arginin dar.

7 Rekombinante Expression humaner DDAH

7.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) stellt ein wichtiges Enzym im NO-generierenden System dar, da es die physiologischen N^{ω} -methylierten L-Arginine, NMMA und ADMA, zu L-Citrullin und Mono- bzw. Dimethylamin abbaut.⁹² Diese N^{ω} -methylierten L-Arginine stellen potente Inhibitoren der NO-Synthase dar, so dass erhöhte Spiegel dieser Substanzen mit verschiedenen NO defizienten Krankheitsbildern wie kardiovaskulären Erkrankungen oder auch Diabetes mellitus in Verbindung gebracht werden.^{106,116,119,236} Aus diesem Grund stellt eine Aktivierung der DDAH einen pharmazeutischen Ansatzpunkt in der Therapie dieser Erkrankungen dar. Darüber hinaus gibt es jedoch, wie in der Einleitung (Kap. 1.5) dargestellt, einige pathologische Zustände, die mit einer erhöhten NO-Biosynthese einhergehen, bei denen eine Hemmung der DDAH und somit eine verminderte NO-Bildung wünschenswert wäre. Hierzu zählen zum Beispiel der septische Schock oder die Therapie von chronischen Schmerzen.

In den vergangenen Jahren wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass es eine Korrelation in der Gewebeexpression der verschiedenen NO-Synthasen und der DDAH-Isoformen gibt. Die DDAH-1 wird insbesondere in den Geweben exprimiert, in denen die nNOS lokalisiert ist, wohingegen die DDAH-2 mit der eNOS und zum Teil mit der iNOS kolokalisiert ist.^{93,94,237} Dies deutet auf eine Isoform-spezifische Regulation der Aktivität der NO-Synthasen durch die Isoformen der DDAH hin. Möglicherweise kann durch selektive DDAH-1-Inhibitoren eine indirekte Isoform-selektive Inhibition der nNOS erreicht werden. Die Hemmung der DDAH-2 hingegen erscheint wenig sinnvoll, da eine verminderte endotheliale NO-Freisetzung einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen darstellt.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Beeinflussung der hDDAH-1-Aktivität durch die N^{δ} -methylierten Analoga der NOS-Katalyse N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA), N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-citrullin (MC) untersucht (Kap. 8). Des Weiteren sollte getestet werden, ob MA als Substrat für hDDAH-1 fungieren kann. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten Inhibitoren für die hDDAH-1 entwickelt werden (Kap. 9). Da die Isoenzyme der hDDAH nicht

kommerziell erhältlich waren, wurde eine Methode zur rekombinanten Expression der humanen DDAH-1 (hDDAH-1) entwickelt.

Darüber hinaus sollte auch die humane DDAH-2 (hDDAH-2) rekombinant exprimiert werden, um die gefundenen hDDAH-1-Inhibitoren (Kap. 9) ebenfalls an der humanen DDAH-2 zu testen und somit Aussagen über die Voraussetzungen für eine Isoform-Selektivität zu treffen. Im Gegensatz zur rekombinanten Expression der DDAH-1 konnte die rekombinante Expression der DDAH-2 bisher lediglich von einem Arbeitskreis beschrieben werden.⁹³

7.2 Materialien & Methoden

7.2.1 Materialien

7.2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits

Alle verwendeten Chemikalien wurden kommerziell erworben (Sigma, Fluka, Roth, Merck). Die verwendeten Restriktionsendonukleasen mit Reaktions-Puffern, Pfu-Puffer sowie die dNTPs wurden über Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Für die Proteinbestimmung wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bzw. das Bio-Rad Proteinassay Reagenz der Firma Bio-Rad (München) verwendet.

Für die Plasmid-Isolierung wurde das Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System der Firma Promega (Mannheim) verwendet, und die DNA-Isolierung aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Nucleotrap-Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren). Ni²⁺-NTA wurde von Qiagen (Hilden) erworben. Die BL-21 and XLI-blue Zelllinien wurden über Stratagene (Waldbronn) bezogen. Die PCR wurde mit *Taq*-Polymerase und PCR-Puffer von Genaxxon (Biberach) durchgeführt. Die Ligationen wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Die Probenvorbereitung für die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC der Firma GE Healthcare (München). Für die SDS-PAGE wurden der peqGOLD Protein-Marker I, der peqGold prestained Protein-Marker III (PeqLab, Erlangen) oder der low molecular weight Marker der Firma Amersham (Freiburg) verwendet. Zum Anfärben der SDS-Gele wurde mit Rotiphorese blau gearbeitet (Roth, Karlsruhe). Der Western-Blot wurde auf einer PVDF-Membran Hybond P (GE Healthcare, München)

zwischen Whatman 3MM Chr Chromatography paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England) durchgeführt. Als Primärantikörper wurde der BSA-freie murine RGS-His Antikörper (Qiagen, Hilden) und als Sekundärantikörper der HRP-konjugierte Ziege-anti-Mouse IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg) verwendet. Die Detektion des Western Blots erfolgte mittels des ECL plus Western Blotting Detektion Reagenz (GE Healthcare, München). Die auftretende Lumineszenz wurde durch Belichtung von ECL-Hyperfilmen (GE Healthcare, München) dokumentiert.

7.2.1.2 Geräte

Elektroblot	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München)
Entwicklungsmaschine:	Cawomat 2000 IR (Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen)
Flachbett-Schüttler:	Bühler Schüttler KL2 (Edmund Bühler, Hechingen)
Gel-Dokumentations-System:	Raytest IDA (Raytest, Straubenhardt) mit UV-Transluminator UVT-20 S/M (Herolab, Wiesloch)
Heizblock:	Techne Dri-Block DB-2D (Thermo-Dux, Wertheim)
Hochdruck-Homogenisator:	French Press (FA078) mit Standard Zelle FA-032 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Inkubatoren:	Minitron (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) Kelvitron T Typ B6420 (Heraeus, Osterode)
Laborzentrifuge:	Multifuge 1S-R (Heraeus, Osterode) Rotoren 75002006 / 75002000
Mikrozentrifugen:	Biofuge pico (Heraeus, Osterode) Zentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg)
PCR-Cycler:	Primus HAT Dualblock (Clemens, Waldbüttelbrunn)
Photometer:	Cary 50 UV-Vis Photometer (Varian, Darmstadt)

	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
Schüttelwasserbad:	Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
SDS-PAGE Kammer:	PerfectBlue Vertikales Doppeltgelsystem Twin S (Peqlab, Erlangen)
Sequenzierer:	DNA Sequencer Model 4200 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg)
Spannungsquelle für Agarosegelelektrophorese:	Electrophoresis Power Supply EPS 300 (Pharmacia Biotech, Freiburg)
Spannungsquelle für SDS-PAGE:	PowerPac 200 (Bio-Rad, München)
Ultrazentrifuge:	Ultrazentrifuge L7-65 (Beckman Coulter, Krefeld)
Zentrifugenkopf:	Beckman Typ 50.2 Ti Rotor, Fixed-Angle
UV-Vis Plattenreader	Cary 50 UV-Vis Photometer (Varian, Darmstadt)

7.2.1.3 Oligonukleotide

Die angegebenen Oligonukleotide wurden über die MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Klonierungs-Primer:

Die Primer für die hDDAH-1 bzw. hDDAH-2 Klonierung wurden so gewählt, dass über einen nichtbindenden DNA-Abschnitt am 5`-Ende des Sense-Primers eine Schnittstelle für BamHI und am 3`-Ende des Anti-Sense-Primers eine für HindIII eingefügt wurde (unterstrichen).

hDDAH-1	DNA-Sequenz (5` - 3`)
Sense-Primer	AAGGATCCATGGCCGGGCTCGGCCAC
Anti-Sense-Primer	GGAAGCTTGCAGCTCAGGAGTCT

7 Rekombinante Expression humaner DDAH

hDDAH-2	DNA-Sequenz (5' - 3')
Sense Primer	TCTGTGTGGATCCATGGGGACG
Anti-Sense-Primer	CCAAGCTTAGGCCCTCAGCTGTG

Sequenzier-Primer (5' IRD 800 markiert):

	DNA-Sequenz (5' - 3')
pBluescript II SK (-)	
T3 Sense-Primer	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7 Anti-Sense-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG
pQE-30 / pQE-30 Elong	
Sense-Primer	CGGATAACAATTTACACAG
Anti-Sense-Primer	GTTCTGAGGTCATTACTGG

Zusätzlich wurde mittels zweier komplementärer Oligonukleotide ein DNA-Doppelstrang erzeugt, der zwischen die Schnittstellen für BamHI (5') und HindIII (3') in den pQE-30 Vektor ligiert (pQE-30 Elong.) wurde.

	DNA-Sequenz (5' - 3')
pQE Elong. Sense	PHO- GATCTGCAGCTGCAGCTGGTATCGAGGGAAGGC CTGCAGCTGCAGCTGCAGCTGGATCCGCAA
pQE Elong. AntiSense	PHO- AGCTTTGCGGATCCAGCTGCAGCTGCAGCTGCA GGCCTTCCCTCGATAACCAGCTGCAGCTGCA

7.2.1.4 DNA-Sequenzen der humanen DDAHs

Die cDNA der hDDAH-1 sowie der hDDAH-2 wurden über das Deutsche Ressourcen Zentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) bezogen. Die codierende DNA der hDDAH-1 (858 Basenpaare) wurde innerhalb eines 1624 Basen umfassenden Inserts zwischen den Restriktionsstellen EcoRV (5') und NotI (3') in den Vektor pCMV-Sport6 eingebracht (Abb. 7.1, 7.3).

```

1 caagaggagc cgacggggcgc tgcagggctc agcgcgcgct gcccgcgga ggaccgccc
61 gcctccgccc ccgcgcgcgc ccctaagcct cccgaagcca tgccgggct cgccacccc
121 gccgcttcg gccgggccac ccacgccgtg gtgggggcgc taccgagtc gctcggccag
181 cacgcgctga gaagcgccaa gggcgaggag gtggacgtcg cccgcgcgga acggcagcac
241 cagctctacg tgggcgtgct gggcagcaag ctggggctgc aggtggtgga gctgccggcc
301 gacgagagcc ttccggactg cgtcttcgtg gaggacgtgg ccgtggtgtg cgaggagacg
361 gccctcatca cccgaccg ggcgcgagc cggaggaagg aggttgacat gatgaaagaa
421 gcattagaaa aacttcagct caatatagta gagatgaaag atgaaaatgc aactttagat
481 ggcggagatg ttttattcac aggcagagaa ttttttgtgg gcctttccaa aaggacaaat
541 caacgaggtg ctgaaatctt ggctgatact tttaaggact atgcagcttc cacagtcca
601 gtggcagatg ggttgcat gaagagttc tgcagcatgg ctgggcctaa cctgatcgca
661 attgggtcta gtgaatctgc acagaaggcc cttaagatca tgcaacagat gagtgaccac
721 cgctacgaca aactcaactgt gcctgatgac atagcagcaa actgtatata tctaaatatc
781 cccaacaaag ggcacgtctt gctgcaccga accccggaag agtatccaga aagtgcaaag
841 gtttatgaga aactgaagga ccatagctg atccccgtga gcatgtctga actggaaaag
901 gtggatgggc tgctcacctg ctgctcagtt ttaattaaca agaaagtaga ctcctgagct
961 gcagagtccc ccccggtagc cggcaagacc gcacaggcaa ggccgatgac tctgtgcccc
1021 ctcctgttgt tttccttgac aatctgattc aatttagtta aaggatgata tagagaaaa

```

Abb. 7.1: Ausschnitt der in den Vektor pCMV-Sport6 eingebrachten DNA-Sequenz. Dunkel: codierende Sequenz der hDDAH-1, unterstrichen: Anlagerungsstellen für die verwendeten PCR-Primer.

Die codierende DNA der hDDAH-2 (858 Basenpaare) wurde innerhalb eines 1261 Basen-umfassenden Inserts zwischen den Schnittstellen EcoRI (5') und XhoI (3') in dem Vektor pOTB7 eingebracht (Abb. 7.2, 7.4).

```

1 ctaaaagcca gagctcccag tccccgaggc ttgaagacgg ggactccctt ctccaccaac
61 tctgtcctcg ggggggtgggg ccccagccga gatcacagcg cgacaggagt ggggggtggcc
121 gctggagaca ggtgaagaaa caagaaaact aagaaatccg agcggttgga gggggagtct
181 gtgtggatgg gatggggacg ccgggggagg ggctgggccc ctgctcccat gcctgatcc
241 ggggagtccc agagagcctg gcgtcggggg aagggtgcggg ggctggcctt cccgctctgg
301 atctggccaa agctcaaagg gagcacgggg tgctgggagg taaactgagg caacgactgg
361 ggctacagct gctagaactg ccacctgagg agtcattgcc gctgggaccg ctgcttggcg
421 acacggccgt gatccaaggg gacacggccc taatcacgcg gcctggagc cccgctcgta
481 ggccagaggt cgatggagtc cgcaaagccc tgcaagacct ggggctccga attgtggaaa
541 taggagacga gaacgcgacg ctggatggca ctgacgttct cttcaccggc cgggagtttt
601 tcgtaggcct ctccaaatgg accaatcacc gaggagctga gatcgtggcg gacacgttcc
661 gggacttcgc cgtctccact gtgccagtct cgggtccctc ccacctgcgc ggtctctgcg
721 gcatgggggg acctcgcact gttgtggcag gcagcagcga cgctgccccaa aaggctgtcc
781 gggcaatggc agtgtgaca gatcaccat atgctccct gacctcca gatgacgcag
841 ctgctgactg tcttttctt cgtoctgggt tgctggtgt gcccccttc ctcctgcacc
901 gtggaggtg ggatctgccc aacagccagg aggcactgca gaagctctct gatgtcacc
961 tggtagctgt gtcctgctca gaactggaga aggtggcgc cgggctcagc tccctctgct
1021 tgggtctcag cacacgcccc cacagctgag ggcctggcct tgggggtactg ctggccaggg
1081 gtaggatagt ataggaagta gaaggggaag gagggttaga tagagaatgc tgaataggca

```

Abb. 7.2: Ausschnitt der in den Vektor pOTB7 eingebrachten DNA-Sequenz. Dunkel: codierende Sequenz der hDDAH-2, unterstrichen: Anlagerungsstellen für die verwendeten PCR-Primer.

7.2.1.5 Vektoren

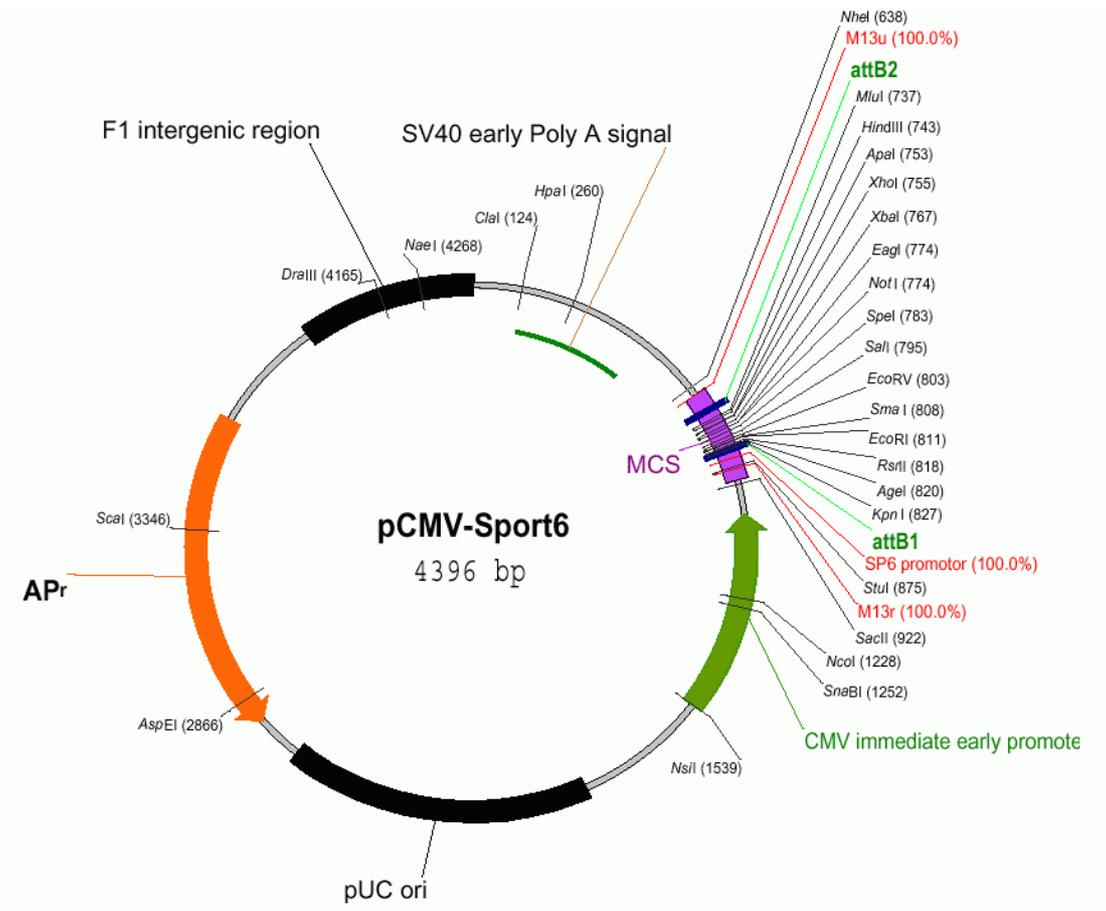


Abb. 7.3: Karte des pCMV-Sport6.

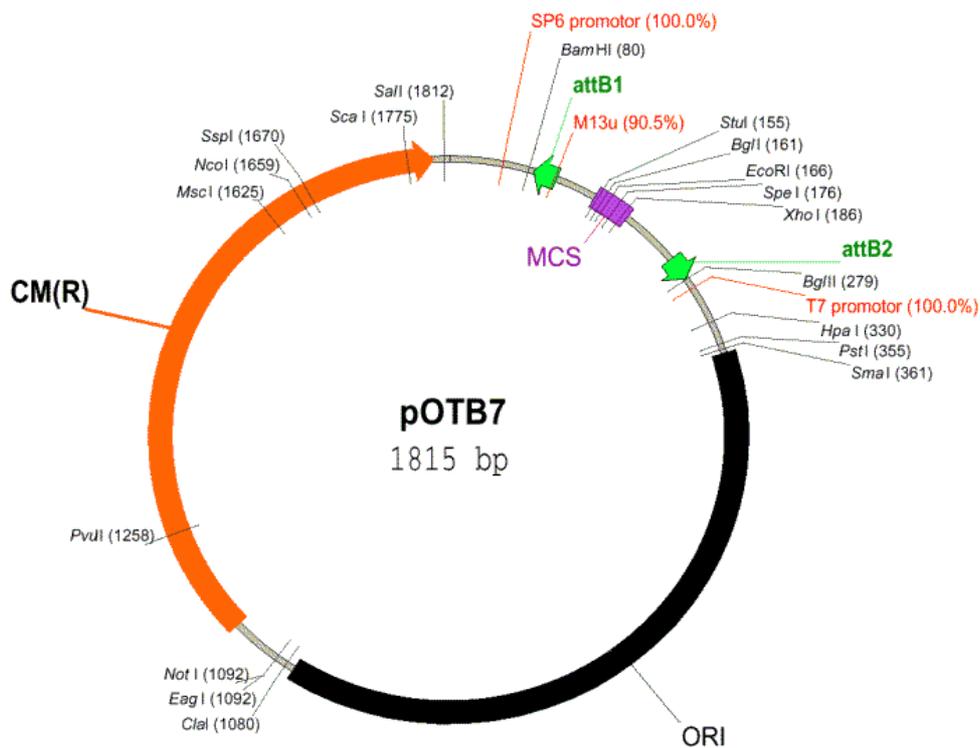
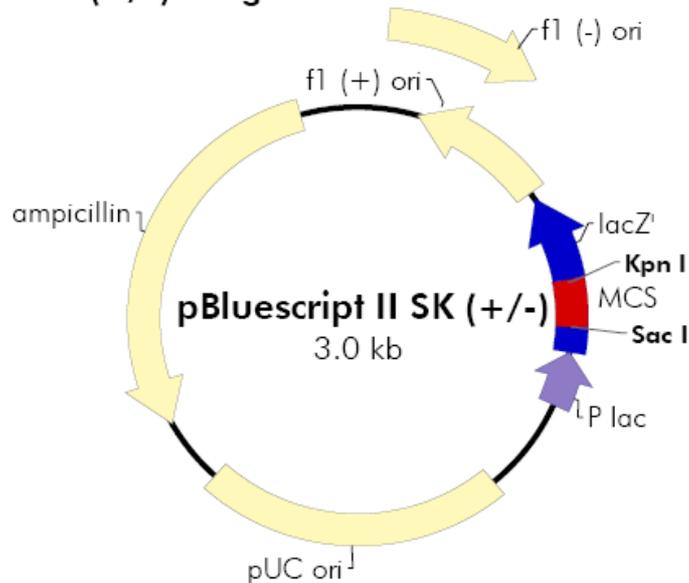


Abb. 7.4: Karte des pOTB7.

Zur Sequenzierung wurde die codierende DNA der hDDAH-1 in den pBluescript II SK (-) (Stratgene, Waldbronn) zwischen die Schnittstellen für BamHI und HindIII ligiert und eine DNA-Sequenzierung durchgeführt (Abb. 7.5).

pBluescript® II SK (+/-) Phagemids



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)

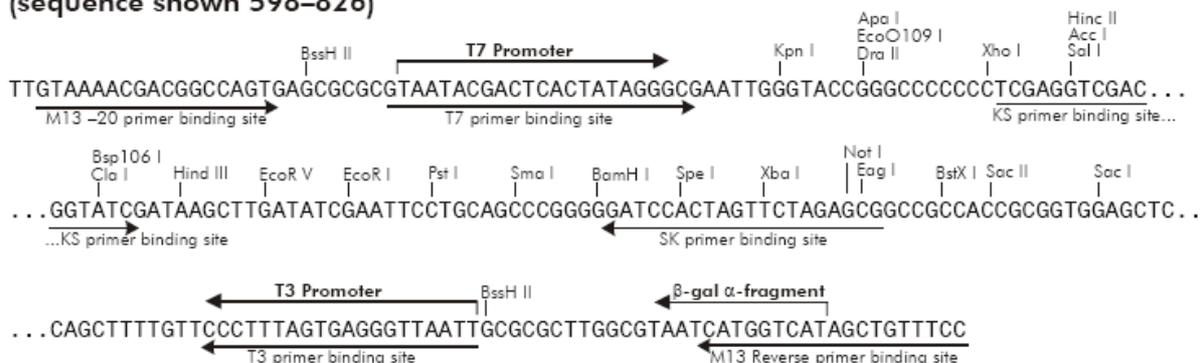


Abb. 7.5: Karte des pBluescript II SK (-) und Sequenzausschnitt der Multiple Cloning Site.

Die Expression der beiden hDDAHs erfolgte mit dem pQE-30 Vektor (Qiagen, Hilden), der für einen aminoterminalen 6xHis-tag codiert (Abb. 7.6). Die codierende DNA wurde jeweils zwischen den Restriktionsschnittstellen für BamHI (5') und HindIII (3') eingefügt.

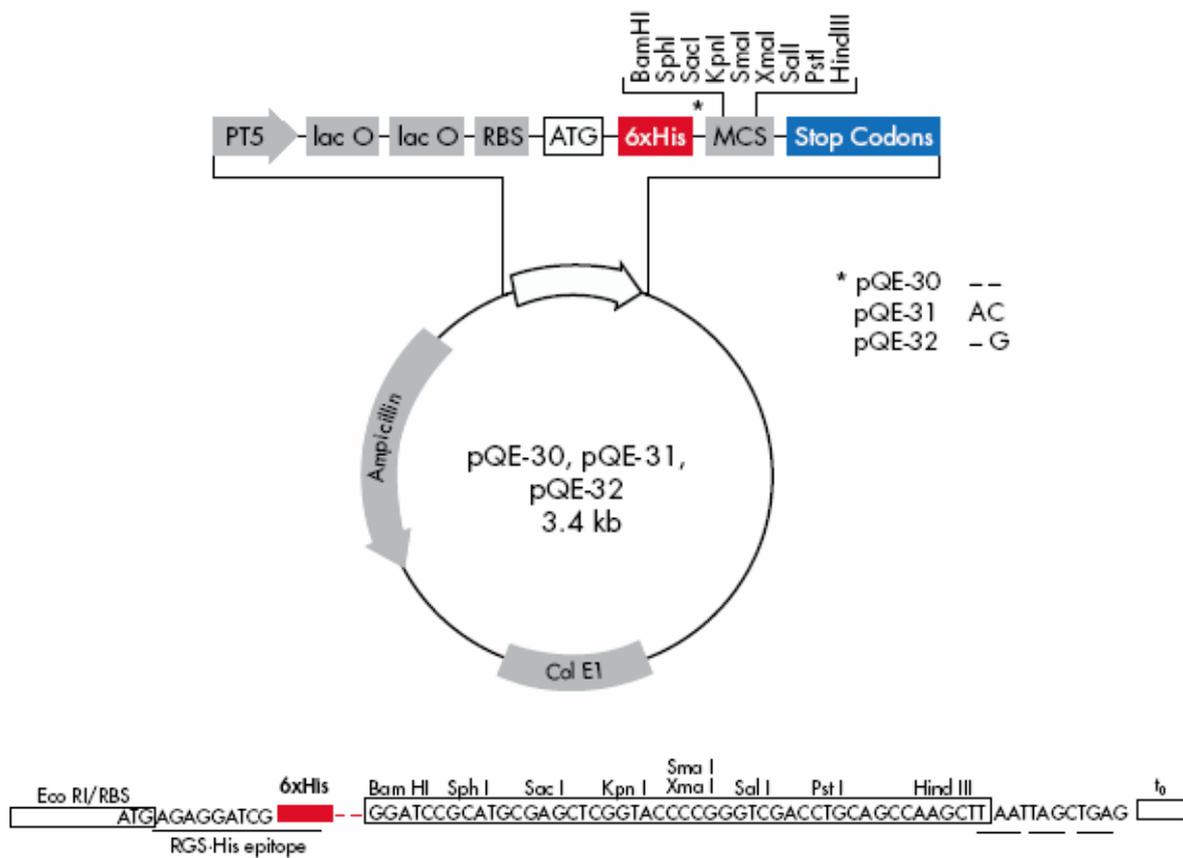


Abb. 7.6: Karte des pQE-30 und Sequenzausschnitt der Multiple Cloning Site.

7.2.1.6 Puffer & Lösungen

Ethidiumbromid-Lösung		Imidazol Waschlösungen x mM	
100 mg	Ethidiumbromid	50 mM	Phosphat-Puffer pH 7,0
10 ml	<i>Aqua bidest.</i>	300 mM	NaCl
		0,5 mM	2-Mercaptoethanol
		1 mM	EDTA
		1 mM	Benzamidin
		10-800 mM	Imidazol
		10 %	Glycerol (v/v)
		1 mM	PMSF
LB-Agar		LB-Medium	
5 g	NaCl	10 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt
10 g	Bacto Trypton	10 g	Bacto Trypton
15 g	Bacto Agar	ad 1000 ml	<i>Aqua bidest.</i>
ad 1000 ml	<i>Aqua bidest.</i>		
10x Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese		MTBS-T-Puffer	
0,25 %	Bromphenolblau (w/v)	10 ml	10x TBS-Puffer
0,25 %	Xylencyanol (w/v)	0,1 ml	Tween 20
30 %	Glycerol (v/v)	5 g	Milchpulver
100 mM	EDTA	ad 100 ml	<i>Aqua bidest.</i>
200 mM PMSF Stammlösung		SDS-Entfärbelösung	
348 mg	PMSF	10 %	Eisessig (v/v)
10 ml	Isopropanol	30 %	Ethanol (v/v)
		60 %	<i>Aqua bidest.</i> (v/v)

7 Rekombinante Expression humaner DDAH

SDS-Ladepuffer		10x SDS-PAGE Kathodenpuffer	
50 mM	Tris-Puffer pH 6,8	0,25 M	Tris-Puffer pH 8,2
200 mM	1,4-Dithiotreitol	1 M	Glycin
4 %	SDS (w/v)	35 mM	SDS
0,2 %	Bromphenolblau (w/v)		
20 %	Glycerol (v/v)		
4x SDS-PAGE Sammelgel-Puffer		4x SDS-PAGE Trenngel-Puffer	
0,5 M	Tris-Puffer pH 6,8	1,5 M	Tris-Puffer pH 8,8
0,4 %	SDS (w/v)	0,4 %	SDS (w/v)
Stammlösung für Wasch-Puffer		50x TAE-Puffer	
100 mM	Phosphat-Puffer pH 7,0	2 M	Tris-Puffer pH 8,0
600 mM	NaCl	50 mM	EDTA
1 mM	2-Mercaptoethanol	76 ml	Eisessig
2 mM	EDTA	ad 1000 ml	<i>Aqua bidest.</i>
2 mM	Benzamidin		
20 %	Glycerol (w/v)		
10x TBS-Puffer pH 7,6		TBS-T-Puffer	
1,35 M	NaCl	100 ml	10x TBS-Puffer
0,2 M	Tris HCl	1 ml	Tween 20
		ad 1000 ml	<i>Aqua bidest.</i>
5x Transfer-Puffer		1x Transfer-Puffer	
25 mM	Tris	10 ml	5x Transfer-Puffer
192 mM	Glycin	10 ml	Methanol
0,0375 %	SDS	30 ml	<i>Aqua bidest.</i>

TSS-Lösung		Zell-Lyse-Puffer	
1 g	NaCl	20 mM	Phosphat-Puffer pH 8,0
0,5 g	Hefeextrakt	150 mM	NaCl
1 g	Bacto Trypton	2 mM	2-Mercaptoethanol
10 mM	PIPES	1 mM	Benzamidin
10 %	PEG 3350 (w/v)	1 mM	PMSF
20 mM	MgCl ₂		
5 %	DMSO (v/v)		
ad 100 ml	<i>Aqua bidest.</i>		

7.2.2 Analytische Methoden

7.2.2.1 HPLC-Methode

Für die Analyse der Proben des DDAH Aktivitäts-Assays (Kap. 7.2.3.22) wurde eine *o*-PA-Vorsäulenderivatisierung mit anschließender Fluoreszenzdetektion der Aminosäuren eingesetzt.

HPLC-Anlage: Waters Autosampler 717plus, Waters 600 Controller, Waters 600 Pump, Waters Fluorescence Detector 470 und EZChrom Elite Client/Server Aufnahme- und Auswertesoftware (Version 2.8.3)

Stationäre Phase: NovaPak RP-18-Säule 4 µm (4 x 150 mm, VDS Optilab)
Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)

Temperatur: 30 °C

Mobile Phase:

Eluent A:	10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 4,65	86 %
	Acetonitril	8 %
	Methanol	6 %
Eluent B:	Acetonitril	40 %
	Methanol	30 %
	<i>Aqua bidest.</i>	30 %

Flussrate: 1 ml / min

Gradientenprofil:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	-
2	100	-
3,5	90	10
12	90	10
16	25	75
25	25	75
28	100	-
35	100	-

Detektion: Fluoreszenz: λ_{ex} : 338 nm; λ_{em} : 425 nm

Injektionsvolumen: 10 μl

Derivat.-Reagenz: 50 mg o-PA gelöst in 1 ml Methanol
+ 9 ml 0,2 M Kaliumborat-Puffer pH 9,4
+ 53 μl 2-Mercaptoethanol

Derivatisierung: Der Autosampler wurde so programmiert, dass 10 μl der Probe mit 14 μl des Derivatisierungs-Reagenzes gemischt wurden und 3 min lang bei RT vor der Injektion reagieren konnten.

Retentionszeiten:

L-Citrullin	12,2 \pm 0,3 min
NMMA	15,8 \pm 0,4 min
Methylamin	23,4 \pm 0,1 min

7.2.2.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Es wurde eine Achtpunkt-Kalibrierung mit L-Citrullin im Bereich von 5 - 150 μM in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 durchgeführt.

Zur Wiederfindung wurde L-Citrullin in denselben Konzentrationen wie bei der Kalibrierung mit 2 μg hitzedenaturierter hDDAH-1 in 75 μl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 über 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend mit 75 μl Acetonitril versetzt. Im Anschluss wurde das Protein abzentrifugiert (12.000 g, 5 min). Die Überstände wurden der HPLC zugeführt.

7.2.3 Methoden

7.2.3.1 Plasmid-DNA Isolierung (Miniprep)

5 ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einem Einzelklon oder der Dauerkultur angeimpft und über Nacht (10 - 18 h) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 2 - 4 ml der Kultur wurden für 1 min bei 12.000 g zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet für die Plasmidpräparation verwendet. Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Wizard-Plus-Plasmid-Purification-Kits entsprechend der Herstellerangaben mit dem Unterschied, dass auf die Zugabe der alkalischen Protease verzichtet wurde. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit 100 µl *Aqua bidest.* eluiert und bei 4 °C gelagert.

7.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung und Aufreinigung der aus PCR oder Restriktionsendonukleasen Verdau erhaltenen DNA-Fragmente wurde eine Agarosegelelektrophorese verwendet.

Zur Herstellung des Gels wurden 0,5 g Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle aufgeköcht bis eine klare Lösung entstand. Verdampftes Wasser wurde ergänzt, und während des Abkühlens 1 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt. Die Agaroselösung wurde in ein Geltablett gegossen und nach dem Abkühlen in die Gelelektrophoresekammer gelegt, die mit 1x TAE-Puffer gefüllt wurde.

Je Probe wurden 10 - 20 µl DNA-Lösung mit 1/10 Volumen Agarosegelelektrophorese Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Laufzeit betrug 20 - 60 min bei einer Spannung von 100 V.

Zur Detektion wurde das Gel im UV-Licht betrachtet und über einen Videoprinter die Bandenverteilung dokumentiert. Als DNA-Marker diente mit EcoRI / HindIII verdaute λ-DNA.

7.2.3.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die DNA-Banden wurden im UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und unter Verwendung des NucleoTrap-Kits gereinigt. Die Durchführung erfolgte gemäß des Herstellerprotokolls mit folgenden Änderungen: Für die Gel-Lyse wurden standardmäßig 500 µl NT1-Lösung verwendet und es

wurden 10 µl Silicea-Matrix eingesetzt. Die Trocknung erfolgte über 1 min bei 56 °C. Die DNA wurde mit 20 - 28 µl Wasser oder Elutions-Puffer eluiert und im Anschluss bei 4 °C gelagert.

7.2.3.4 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Ein typischer Ansatz bestand aus einem Gesamtvolumen von 10 µl folgender Zusammensetzung:

1	µl	des jeweiligen Puffers
je 0,5	µl	der Restriktionsendonukleasen
0,5 - 8	µl	DNA-Lösung
ad 10	µl	<i>Aqua bidest.</i>

Die Inkubationsdauer bei 37 °C betrug zwischen 30 min und 3 h.

Zur Auswertung wurden die Proben über die Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die Größe der DNA-Fragmente über einen Vergleich der erhaltenen Banden mit dem aufgetragenen λ-Marker bestimmt.

Nukleinsäuren aus der PCR wurden vor dem Restriktionsenzym-Verdau über ein Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt (Kap. 7.2.3.3).

7.2.3.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde photometrisch bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte über folgende Formel:

$$c = A_{260nm} * f * \text{Verdünnung} [\mu\text{g} / \mu\text{l}]$$

$$f = 0,02 \text{ (Oligonukleotide, Einzelstrang-DNA)}$$

$$f = 0,04 \text{ (Plasmide, Doppelstrang-DNA)}$$

Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und das Verhältnis A_{260nm} / A_{280nm} bestimmt, welches als Reinheitskriterium für DNA dient und über 1,8 liegen sollte.

Vor dem Durchführen von Ligationen erfolgte häufig nur eine Abschätzung der Konzentration der DNA über einen Intensitätsvergleich der mit Ethidiumbromid gefärbten Banden im UV-Licht auf einem Agarosegel.

7.2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl folgender Zusammensetzung durchgeführt:

0,5	µl	DNA template (Miniprep)
5	µl	PCR-Puffer (10x)
4	µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1	µl	Sense-Primer (20 µM)
1	µl	Anti-Sense-Primer (20 µM)
0,4	µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U / µl)
ad 50	µl	<i>Aqua bidest.</i>

Für die PCR-Amplifikation der hDDAH-1 bzw. hDDAH-2 wurde folgendes Cycler-Programm verwendet:

	T [°C]	Zeit [s]	
1. Denaturierung	94	180	
2. Denaturierung	94	30	} 28 Zyklen
Annealing	45	45	
Extension	72	180	
3. Extension	72	900	
4. Hold	4	∞	

Die näherungsweise Berechnung der Annealingtemperatur erfolgte mit der Formel:

$$T_{\text{Annealing}} = 60 + (0,41 * GC) - \frac{600}{n}$$

GC = Guanin und Cytosin-Anteil in %

n = Basenzahl

7.2.3.7 Annealing von DNA-Einzelsträngen

In den pQE-30 Vektor sollte ein DNA-Fragment hinter der codierenden Sequenz für den 6x-His-tag eingefügt werden. Hierzu wurden zwei komplementäre Nukleotidsequenzen (pQE Elong Sense / Anti-Sense) erworben und von jedem DNA-Einzelstrang 15 µg DNA in Pfu-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Das Annealing wurde durch ein dreiminütiges Erwärmen auf 94 °C und ein anschließendes Abkühlen auf RT mit einer Geschwindigkeit von 0,1 °C / s durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit der 10fachen Menge 2-Butanol versetzt, 1 min gevortext und dann bei 12.000 g für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (12.000 g, 5 min). Im Anschluss wurde das Pellet mit 20 µl *Aqua bidest.* aufgenommen, über eine Agarosegelelektrophorese Verunreinigungen von der doppelsträngigen DNA abgetrennt und die DNA mittels des Nucleotrap aufgereinigt (Kap. 7.2.3.2 und 7.2.3.3) Die gereinigte DNA wurde in den Expressionsvektor pQE-30 ligiert (Kap. 7.2.3.8).

7.2.3.8 Ligation von DNA

Die PCR-Produkte, die Plasmid-DNA sowie die jeweiligen Vektoren wurden mit BamHI und HindIII geschnitten und anschließend über ein Agarosegel von den anderen DNA-Fragmenten getrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt (Kap. 7.2.3.3).

Die Ligation wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits durchgeführt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Um eine effiziente Ligation zu erzielen, entsprach das molare Verhältnis der DNA-Mengen Vektor : Plasmid ca. 1 : 3. Die Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt oder auf dem Agarosegel im UV-Licht abgeschätzt.

Die Ligationszeit betrug zwischen 15 und 20 min bei Raumtemperatur. Es wurden ausschließlich Ligationen mit überhängenden Enden (sticky ends) durchgeführt.

7.2.3.9 Herstellung von kompetenten Zellen

5 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C (bei 200 U / min) inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 100 ml LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zur frühen log-Phase inkubiert ($OD_{600} = 0,3 - 0,4$). Die Kultur wurde in Zentrifugen-Röhrchen überführt und für 10 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1.000 g, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis gehalten und im Anschluss erneut zentrifugiert (1.000 g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in 10 ml eiskalter TSS-Lösung suspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden in Aliquots à 100 µl bei -80 °C eingefroren.

7.2.3.10 Transformation in *E. Coli*

Die Transformation erfolgte entweder in kompetente XLI-blue Zellen für die Dauerkultur oder in kompetente BL-21 Zellen für die Enzym-Expression.

100 µl der kompetenten Zellen wurden über 5 min auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen wurden 10 µl einer 100 mM $CaCl_2$ - / 100 mM $MgCl_2$ -Lösung sowie der gesamte Ligations-Mix pipettiert (Kap. 7.2.3.8) und mit *Aqua bidest.* auf 200 µl aufgefüllt. Es wurde gemischt und die Lösung für 30 min auf Eis gehalten, anschließend für 2 min bei 42 °C erwärmt und wieder für 2 min auf Eis abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden 800 µl LB-Medium gegeben und der Ansatz für ca. 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert (4.000 g, 45 s), 900 µl des Überstandes verworfen, das Pellet in den verbleibenden 100 µl resuspendiert und auf eine antibiotikahaltige LB-Agarplatte aufgebracht, welche bei 37 °C über Nacht inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden entstandene Einzelkolonien in 5 ml flüssiges antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und wiederum bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Plasmid DNA wurde mit Hilfe des Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systems isoliert. Des Weiteren wurde aus dem Rest der Flüssigkultur eine Dauerkultur bei -80 °C (Kap. 7.2.3.13) angelegt.

7.2.3.11 Schnelltransformation von *E. Coli*

100 µl aufgetaute kompetente BL-21 Zellen wurden mit 1 - 4 µl Plasmid-DNA versetzt, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 1 min auf 42 °C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. 60 - 100 µl des Ansatzes wurden auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Methode ist nur für die Retransformation von bereits vorhandenen Minipreps geeignet.

7.2.3.12 Verwendete Antibiotika-Endkonzentrationen

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg / ml
Kanamycin	40 µg / ml
Chloramphenicol	34 µg / ml

7.2.3.13 Anlegen von Dauerkulturen

Von den erfolgreich transformierten *E. Coli* Stämmen wurden Dauerkulturen bei -80 °C angelegt. Hierzu wurde 1 ml der Übernachtskultur mit 0,5 ml Glycerol 80 % versetzt und eingefroren.

7.2.3.14 DNA-Sequenzierung

Die Probenvorbereitung für die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC. Folgende Änderungen im Vergleich zum Standard-Protokoll wurden vorgenommen: 0,7 µl DMSO wurden hinzugefügt und die eingesetzte DNA-Menge betrug 7,1 µl.

Für die PCR-Amplifikation wurde folgendes Cycler-Programm verwendet:

	T	Zeit	
	[°C]	[s]	
1. Denaturierung	95	120	
2. Denaturierung	95	30	} 20 Zyklen
Annealing	55	30	
Extension	72	60	
3. Hold	4	∞	

Die PCR-Proben wurden über einen DNA Sequencer Model 4200 ausgewertet und mittels DNASTAR SeqMan II (GATC Biotech, Konstanz) analysiert.

7.2.3.15 Enzym-Expression

7.2.3.15.1 Expression der hDDAH-1

Für die Enzym-Expression wurde das Expressionsplasmid (pQE-30 mit hDDAH-1) mit Hilfe der Schnelltransformation in BL-21 Zellen transformiert. Von der Agarplatte wurde am nächsten Tag ein Klon selektiert und in Kanamycin- und Ampicillin-haltigem LB-Medium eine Übernachtskultur bei 37 °C angelegt. Am Tag der Expression wurden 200 ml LB-Medium mit einem Zwanzigstel der Übernachtskultur angeimpft und bei 30 °C inkubiert bis die OD₆₀₀ 0,6 erreicht hatte. Die Expression wurde mit Isopropyl-β-thiogalactopyranosid (IPTG) in Konzentrationen zwischen 10 und 100 μM induziert. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Expressionszeiten (2 bis 18 h) und verschiedene Temperaturen (20 bis 30 °C) ausgetestet. Nach Abbruch der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (4.500 g, 4 °C, 10 min). Das Pellet wurde entweder bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert oder zur sofortigen Verwendung in Zell-Lyse-Puffer suspendiert.

Eine Standard-Expression für hDDAH-1 wurde zum späteren Zeitpunkt der Arbeit nach folgendem Schema durchgeführt:

Ein Liter antibiotikahaltigen LB-Mediums wurde mit 50 ml Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,6 und dann erfolgte die Induktion mit 100 μM IPTG. Die Expressionsdauer betrug 4 - 6 h. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren.

7.2.3.15.2 Expression der hDDAH-2

Zur Enzym-Expression wurden die Expressionplasmide (pQE-30 mit hDDAH-2 bzw. pQE-30 Elong mit hDDAH-2) in BL-21 Zellen transformiert. Bis auf folgende Änderungen erfolgte die Expression, wie unter 7.2.3.15.1 beschrieben: Es wurden verschiedene Expressionsversuche mit IPTG-Konzentrationen zwischen 10 μ M und 1 mM durchgeführt und unterschiedliche Expressionstemperaturen zwischen 18 und 37 $^{\circ}$ C ausgetestet.

7.2.3.16 Herstellung: Säuregewaschene Glaskugeln

50 g Glaskugeln (425 - 600 μ m) wurden mit 5,8 M Salzsäure überschichtet und für 1 h bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde die Salzsäure entfernt und die Glaskugeln mindestens 10mal mit dem fünffachen Volumen *Aqua bidest.* gewaschen. Die gewaschenen Glaskugeln wurden für 20 min autoklaviert und im Trockenschrank bei 50 $^{\circ}$ C über Nacht getrocknet.

7.2.3.17 Zell-Lyse

Das Zellpellet wurde in Zell-Lyse-Puffer (~1 ml Zell-Lyse-Puffer pro 100 ml Zellkultur) suspendiert. Zu Beginn der Arbeit erfolgte der Zellaufschluss mit säuregewaschenen Glaskugeln (Kap. 7.2.3.16). Hierzu wurden die suspendierten Zellen in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen gegeben und mit etwa einem Zehntel des Volumens mit säuregewaschenen Glaskugeln versetzt. Das Röhrchen wurde zwischen 15 und 20mal jeweils 20 - 30 s gevortext und zwischenzeitlich auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (12.000 g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) und das Pellet verworfen.

Im späteren Verlauf der Arbeit wurden die Zellen mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Das Zellpellet wurde in 26 ml Zell-Lyse-Puffer suspendiert und die Zellen bei 19.000 psi (4 $^{\circ}$ C) lysiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurden die groben Zellfragmente bei einer Zentrifugation (4.500 g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) abgetrennt und der Überstand mittels Ultrazentrifugation bei 33.000 g für 45 min bei 4 $^{\circ}$ C von den feineren Zelltrümmern befreit. Der Überstand wurde so der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie zugeführt.

7.2.3.18 Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie

7.2.3.18.1 Aufreinigung der hDDAH-1

Über den aminoterminalen 6xHis-tag stand die exprimierte hDDAH-1 der Aufreinigung mittels einer Affinitätschromatographie über Ni²⁺-NTA zur Verfügung.²³⁸ Die durch Zell-Lyse erhaltene Proteinlösung wurde mit Ni²⁺-NTA-Matrix versetzt (25 - 30 µl pro 100 ml Zellkultur). Das Protein wurde bei 4 °C über 1,5 h bei leichtem Schütteln an die Matrix gebunden. Nach dem Binden wurde die Suspension auf eine Miniprep-Säule gegeben und im Anschluss mit Imidazolhaltigen Lösungen gewaschen bzw. das Protein eluiert. Nachdem verschiedene Vorversuche mit Imidazol-Konzentrationen zwischen 10 und 400 mM unternommen wurden, erfolgte die Aufreinigung und Elution im späteren Verlauf der Arbeit nach folgendem Schema (Volumina für 600 ml Zellkultur):

- Waschen mit 1,5 ml 10 mM Imidazol-Waschlösung
- Waschen mit 0,75 ml 20 mM Imidazol-Waschlösung
- Elution mit 0,5 ml 100 mM Imidazol-Waschlösung
- 2x Elution mit je 0,15 ml 100 mM Imidazol-Waschlösung
- Waschen mit 0,5 ml 200 mM Imidazol-Waschlösung

Die erste 100 mM Imidazol-Elutionslösung (500 µl) wurde ein zweites Mal auf die Säule aufgetragen, um eine möglichst vollständige Elution zu erreichen. Die Eluate der 100 mM Waschlösungen wurden anschließend gepoolt und bei -20 °C gelagert.

Für Expressionsansätze mit größeren Kulturen wurden die Volumina entsprechend vergrößert und es wurde zusätzlich ein weiterer Waschschrift mit 2 - 5 ml Waschlösung ohne Imidazol eingeführt.

Die Reinheit der aufgereinigten Enzymlösungen wurde über eine SDS-PAGE kontrolliert (Kap. 7.2.3.20). Darüber hinaus wurden die Enzymlösungen per HPLC auf Verunreinigungen untersucht, die die Analytik beeinträchtigen können. Hierzu wurden 20 - 40 µl der erhaltenen Fraktionen der Affinitätschromatographie nach dem Ausfällen der Proteine mit Acetonitril und anschließender Zentrifugation (12.000 g, 5 min) über die HPLC (Kap. 7.2.2.1) vermessen.

7.2.3.18.2 Aufreinigung der hDDAH-2

Pro 100 ml Zellkultur wurden 20 μl Ni^{2+} -NTA zugefügt und über 1,5 h bei 4 $^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln das Protein an die Matrix gebunden. Für alle Expressionsversuche wurden Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographien mit Imidazol-haltigen Waschlösungen (10 – 800 mM) unternommen. Die jeweils verwendeten Volumina richteten sich nach der jeweiligen Kulturmenge. Die normalerweise verwendeten Kulturmengen betragen zwischen 50 und 300 ml. Die Volumina der Waschlösungen betragen jeweils zwischen 250 und 750 μl .

Alle erhaltenen Fraktionen wurden auf eine SDS-PAGE (Kap. 7.2.3.20) aufgetragen und eine Probe jeder Fraktion auf DDAH-Aktivität (Kap. 7.2.3.22.2) untersucht.

7.2.3.19 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung wurde zu Beginn dieser Arbeit mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits durchgeführt. Hierzu wurde eine Fünfpunkt-Kalibrierung zwischen 5 - 250 μg / ml BSA erstellt und 10 μl der jeweiligen Proteinfraction vermessen. Die Proteinfraction wurde durch Ausfällen mit 10 %iger Trichloressigsäure von anhaftenden Verunreinigungen befreit und das Pellet für die weitere Durchführung mit 300 μl BCA Working Reagenz aufgenommen. 200 μl wurden für die Vermessung in eine 96 well Platte pipettiert und für 1 h bei 44 $^{\circ}\text{C}$ im Cary Mikroplatten-Reader inkubiert. Das Vermessen erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Alternativ wurde im späteren Verlauf der Arbeit der Proteingehalt mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Reagenz ermittelt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben für die Microassay Procedure. Es wurde eine Fünfpunkt-Kalibrierung zwischen 10 - 30 μg / ml BSA erstellt. Die Proben wurden mit Wasser auf 800 μl aufgefüllt und mit 200 μl Bio-Rad Reagenz versetzt. Es wurde gevortext und nach 5 min die Absorption bei 595 nm gemessen.

7.2.3.20 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden SDS-Minigel-Apparaturen verwendet. Es wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem 5 %igen Sammelgel und einem 12,5 %igen oder 15 %igen Trenngel verwendet.

Die angegebenen Mengen sind jeweils ausreichend für 2 Gele:

	Trenngel 12,5 %ig	Trenngel 15 %ig	Sammelgel 5 %ig
<i>Aqua bidest.</i> [ml]	5,25	4,5	2,5
Trenngel-Puffer pH 8,8 [ml]	3	3	-
Sammelgel-Puffer pH 6,8 [ml]	-	-	1
Acrylamid 40 % [ml] (37,5 % Acrylamid : 1 % Bisacrylamid)	3,75	4,5	0,5
TEMED [μ l]	15	15	10
Ammoniumperoxodisulfat 10 % [μ l]	50	50	25

Die Gele wurden auf Vorrat gegossen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Probenvorbereitung wurde das Protein für 30 min bei 37 °C mit SDS-Ladepuffer inkubiert. Die Laufzeiten der SDS-PAGE betragen bei 200 V etwa 1,5 h. Die Anfärbung erfolgte mittels Coomassie-Brilliant-Blau (Rotiphorese blau) über 30 - 60 min. Anschließend erfolgte die Entfärbung über 1 - 3 h mit der SDS-Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechsel der Lösung.

Die Dokumentation der SDS-Gele erfolgte durch Einscannen oder Fotografie der Gele.

7.2.3.21 Western Blot

Für den Western Blot wurde ein 12,5 %iges SDS-Gel verwendet. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels eines Elektro-Blots auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde die PVDF-Membran 10 min in Methanol voräquiliert und das Whatman-Papier mit Transfer-Puffer getränkt. Dann wurden auf dem Elektro-Blot drei Lagen des durchfeuchteten Whatman-Papiers, die PVDF-Membran, das SDS-Gel sowie weitere drei Lagen Whatman-Papier übereinander

gelegt und für 45 min eine Spannung von 25 V angelegt. Anschließend wurden freie Bindungsstellen der Membran über Nacht mit MTBS-T-Puffer blockiert. Am nächsten Tag wurde die Membran für 1 h mit dem RGS-His Antikörper (1:3.000 in MTBS-T-Puffer) inkubiert und mit TBS-T-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde für 1 h mit dem HRP-konjugierten anti-Mouse Antikörper (1:30.000 in MTBS-T-Puffer) inkubiert, anschließend ungebundener Antikörper mit MTBS-T-Puffer abgewaschen und zur Detektion mit ECL Plus Detection Reagenz versetzt. Die Durchführung der Waschschrirte sowie die Zugabe des Detection Reagenz entsprach den Angaben des ECL Plus Detection Kits.

Nach der Inkubationszeit von 5 min wurde die Bandenverteilung aufgenommen. Die Belichtungszeiten betragen je nach Signalintensität zwischen 5 s und 5 min.

7.2.3.22 Aktivitäts-Assay

7.2.3.22.1 hDDAH-1 Aktivitäts-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der rekombinant exprimierten hDDAH-1 wurden 20 µl der erhaltenen Fraktionen aus der Affinitätschromatographie mit 180 µM NMMA in einem Gesamtvolumen von 50 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von der Auftragslösung wurden 30 µl verwendet. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 50 µl Methanol. Die Proben wurden für 5 min geschüttelt, zentrifugiert (12.000 g, 5 min) und dann der HPLC zugeführt.

7.2.3.22.2 hDDAH-2 Aktivitäts-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der rekombinant exprimierten hDDAH-2 wurden Proben des Zellpellets, des ungereinigten Zelllysates sowie von allen Fraktionen der Affinitätschromatographie auf eine DDAH-Aktivität untersucht. Hierzu wurden jeweils 10 – 25 µl der Probe mit 200 µM NMMA in einem Gesamtvolumen 75 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 30 min bis zu 4 h. Das Abstoppen der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von 75 µl Acetonitril. Nach dem Abzentrifugieren des Proteins (12.000 g, 5 min) wurde der Überstand *via* HPLC vermessen.

7.3 Ergebnisse & Diskussion

7.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung HPLC-Methode

Die verwendete HPLC-Methode ermöglicht die Trennung von L-Citrullin, N⁰-Monomethyl-L-arginin (NMMA) und Methylamin. Ein repräsentatives Chromatogramm der Standards ist in Abb. 7.7 dargestellt.

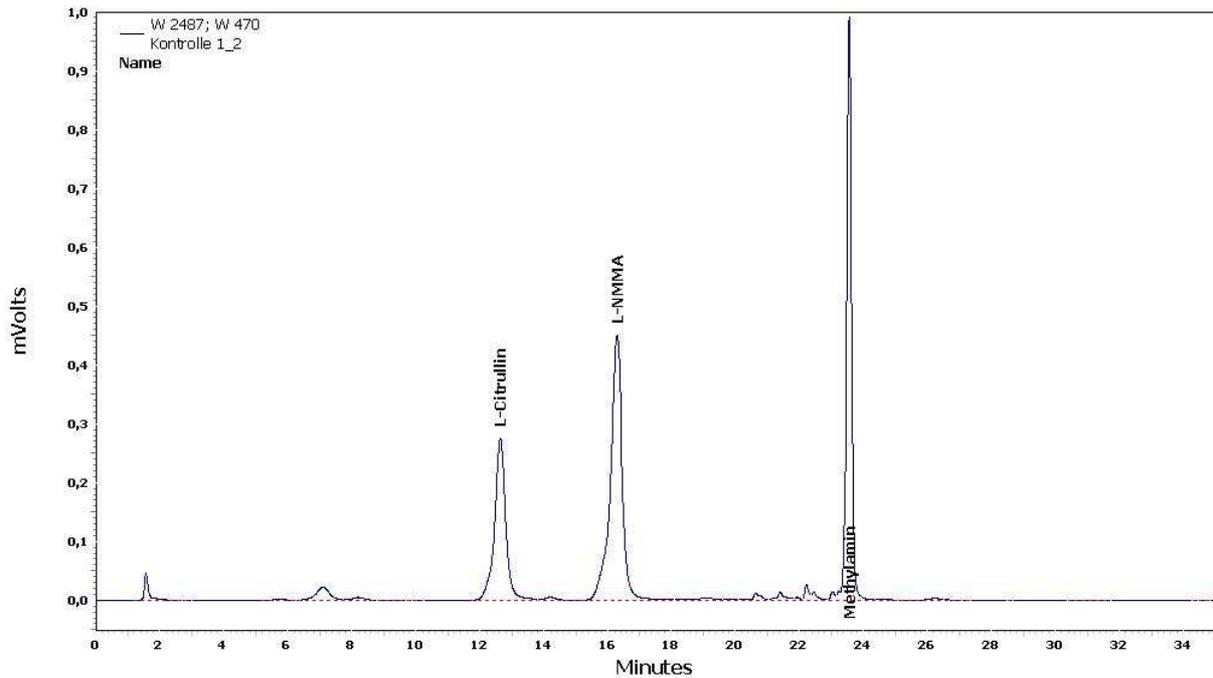


Abb. 7.7: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der verwendeten HPLC-Analytik zur Trennung von L-Citrullin, N^p-Monomethyl-L-arginin (NMMA) und Methylamin.

Die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden für L-Citrullin waren in dem Bereich von 5 - 150 µM linear ($R^2 > 0,997$). Die Wiederfindungsrate für L-Citrullin betrug 107 % (Abb. 7.8).

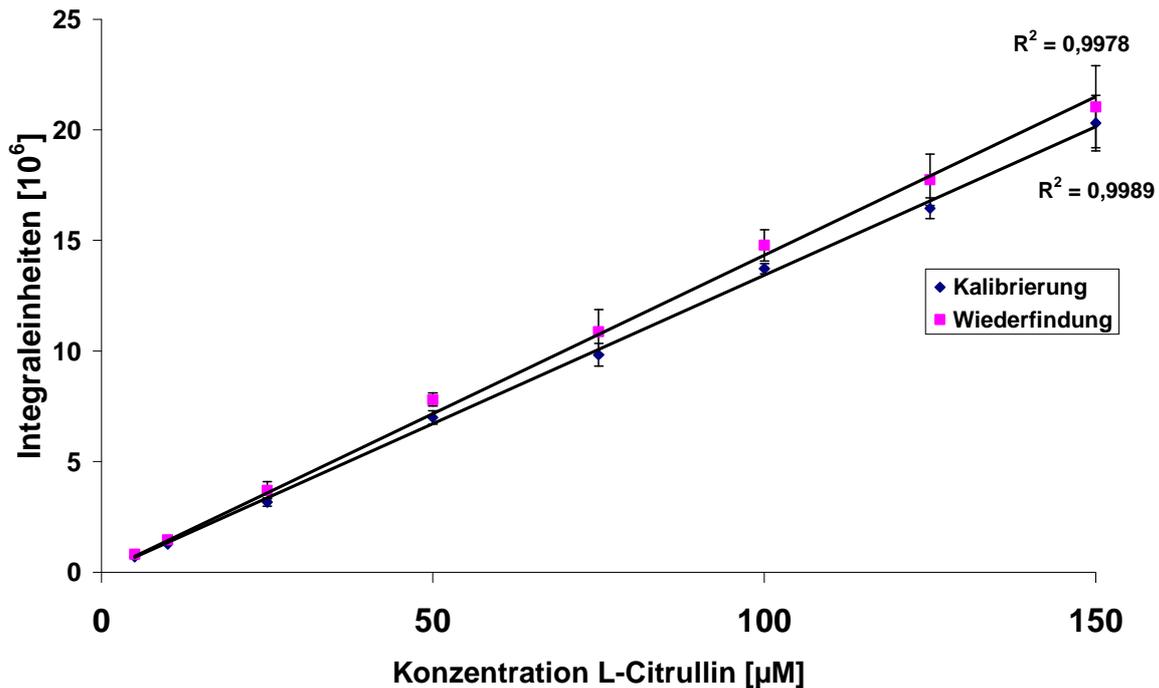


Abb. 7.8: Kalibrierung und Wiederfindung für L-Citrullin. Die ermittelten Integraleinheiten sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

7.3.2 Rekombinante Expression humaner DDAH-1

7.3.2.1 Klonierung der humanen DDAH-1

Über eine PCR wurde an die codierende Sequenz der humanen DDAH-1 Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI (5´) und für HindIII (3´) angehängt. Über diese Schnittstellen wurde die DNA zur Sequenzierung in den pBluescript Sk II Vektor ligiert. Die Sequenzierung ergab eine Abweichung in der Sequenz des PCR-Produktes von der Sequenz der humanen DDAH-1 aus Datenbanken an der Position 534 (Abb. 7.9). Das PCR-Produkt enthält an dieser Position anstelle eines Cytosins ein Thymin. Bei dieser Punktmutation handelt es sich um eine stille Mutation, da es sich um die dritte Base eines Triplets handelt und sowohl TGC als auch TGT für Cystein kodieren. Wahrscheinlich stellt diese Mutation keinen Fehler der PCR sondern eine natürliche DNA-Mutation der Template-DNA dar.

```

1 ATGGCCGGGC TCGGCCACCC CGCCGCCTTC GGCCGGGCCA CCCACGCCGT GGTGCGGGCG
61 CTACCCGAGT CGCTCGGCCA GCACGCGCTG AGAAGCGCCA AGGGCGAGGA GGTGGACGTC
121 GCCCGCGCGG AACGGCAGCA CCAGCTCTAC GTGGGCGTGC TGGGCAGCAA GCTGGGGCTG
181 CAGGTGGTGG AGCTGCCGCGC CGACGAGAGC CTTCCGGACT GCGTCTTCGT GGAGGACGTC
241 GCCGTGGTGT GCGAGGAGAC GGCCCTCATC ACCCGACCCG GGGCGCCGAG CCGGAGGAAG
301 GAGGTTGACA TGATGAAAGA AGCATTAGAA AAACCTCAGC TCAATATAGT AGAGATGAAA
361 GATGAAAATG CAACTTTAGA TGGCGGAGAT GTTTTATTCA CAGGCAGAGA ATTTTTTGTG
421 GGCCTTTCCA AAAGGACAAA TCAACGAGGT GCTGAAATCT TGGCTGATAC TTTTAAGGAC
481 TATGCAGTCT CCACAGTGCC AGTGCCAGAT GGGTTGCATT TGAAGAGTTT CTGTAGCATG
541 GCTGGGCCTA ACCTGATCGC AATTGGGTCT AGTGAATCTG CACAGAAGGC CCTTAAGATC
601 ATGCAACAGA TGAGTGACCA CCGCTACGAC AAACCTCACTG TGCCTGATGA CATAGCAGCA
661 AACTGTATAT ATCTAAATAT CCCCACAAA GGGCACGTCT TGCTGCACCG AACCCCGGAA
721 GAGTATCCAG AAAGTGCAAA GGTTTATGAG AAACCTGAAGG ACCATATGCT GATCCCCGTG
781 AGCATGTCTG AACTGGAAAA GGTGGATGGG CTGCTCACCT GCTGCTCAGT TTTAATTAAC
841 AAGAAAGTAG ACTCCTGA

```

Abb. 7.9: Sequenz der codierenden DNA für humane DDAH-1, die für die Enzym-Expression verwendet wurde. Die Punktmutation an Position 534 ist unterstrichen.

Nach der Bestätigung der Sequenz wurde das hDDAH-1-Insert wiederum über die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII aus dem Plasmid herausgeschnitten und über dieselben Schnittstellen in den Expressionsvektor pQE-30 eingebracht.

Der pQE-30 / hDDAH-1 Expressionsvektor codiert somit für eine hDDAH-1, die gegenüber dem nativen Enzym aminoterminal um einen 12 Aminosäuren umfassenden 6xHis-tag verlängert ist. Die Aminosäuresequenz ist in Abb. 7.10 angegeben:

MRGSHHHHHHGSMAGLGHPAAFGRATHAVVRALPESLGQHALRSAKGEEVDVA
RAERQHQLYVGVLGSKLGLQVVELPADESLPDCVFVEDiVAVVCEETALITRPGAP
SRRKEVDMMKEALEKLQLNIVEMKDENATLDGGDVLFTGREFFVGLSKRTNQRG
AEILADTFKDYAVSTVPVADGLHLKSFCSMAGPNLIAIGSSESAQKALKIMQQMSD
HRYDKLTPDDIAANCIYLNIPNKGHVLLHRTPEEYPESAKVYEKLDHMLIPVSMS
ELEKVDGLLTCCSVLINKKVDS.

Abb. 7.10: Aminosäuresequenz der rekombinant exprimierten humanen DDAH-1. Die Aminosäuren des aminoterminalen 6xHis-tags sind unterstrichen.

7.3.2.2 Expression der humanen DDAH-1

Zur Expression wurde der Expressionsvektor pQE-30 / hDDAH-1 in *E. Coli* BL-21 Zellen eingebracht. Erste Expressionsversuche wurden über 4 h bei 20 °C, 25 °C und 30 °C mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (10 µM, 50 µM, 100 µM) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, mit säuregewaschenen Glaskugeln aufgeschlossen und über eine SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 7.11).

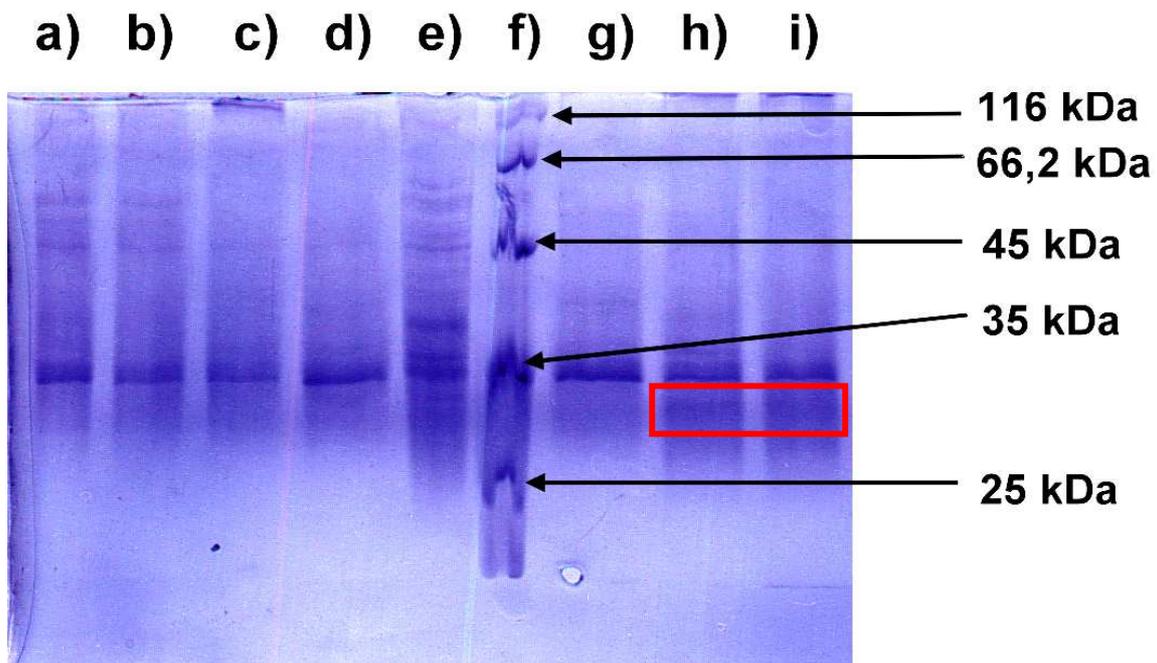


Abb. 7.11: Links: SDS-Gel hDDAH-1 Expression mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen bei unterschiedlichen Temperaturen. a) 20 °C, 100 µM IPTG; b) 25 °C, 10 µM; c) 25 °C, 50 µM; d) 25 °C, 100 µM; e) Kontrolle: BL -21 mit pQE-30; f) peqGold Marker I; g) 30 °C, 10 µM; h) 30 °C, 50 µM; i) 30 °C, 100 µM.

Alle auf dem SDS-Gel aufgetragenen Proben zeigten eine schwache Bande von etwa 32 kDa, was der Größe der 6xHis-tagged humanen DDAH-1 entsprach. Diese Bande war bei 30 °C und einer IPTG-Konzentration von 50 bzw. 100 µM am stärksten ausgeprägt. Deshalb wurden die weiteren Expressionen bei 30 °C und einer IPTG-Konzentration von 100 µM durchgeführt. Weitere Expressionsversuche zeigten, dass eine Verlängerung der Expressionszeit zu einer erhöhten Proteinausbeute führte, so dass eine Expressionsdauer zwischen 4 und 6 h eingehalten wurde.

7.3.2.3 Aufreinigung der exprimierten humanen DDAH-1

Die Aufreinigung der hDDAH-1 erfolgte über eine Affinitätschromatographie mit Ni^{2+} -NTA als Matrix.²³⁸ Es wurden initiale Tests mit unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen zum Waschen und zur Elution der gebundenen hDDAH-1 durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 100 mM Imidazol die hDDAH-1 eluiert wurde. Auch in der Elutionslösung mit 200 mM Imidazol war sehr deutlich hDDAH-1 vorhanden, was insbesondere daran lag, dass das verwendete Volumen an 100 mM Imidazol-Lösung sehr gering war und nicht zur quantitativen Elution ausreichte (Abb. 7.12). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde diese 200 mM Fraktion, sofern sie einen ausreichenden Proteingehalt besaß, ebenfalls für die enzymatische Testung verwendet. Des Weiteren reichte die 30 mM Imidazol Waschlösung schon aus, um einen geringen Teil des Proteins zu eluieren. Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf diesen Waschschriff mit 30 mM Imidazol verzichtet und dafür das Volumen an 10 mM Waschlösung erhöht. In den so aufgereinigten Fraktionen konnte keine Verunreinigung des Proteins per SDS-Gel festgestellt werden.

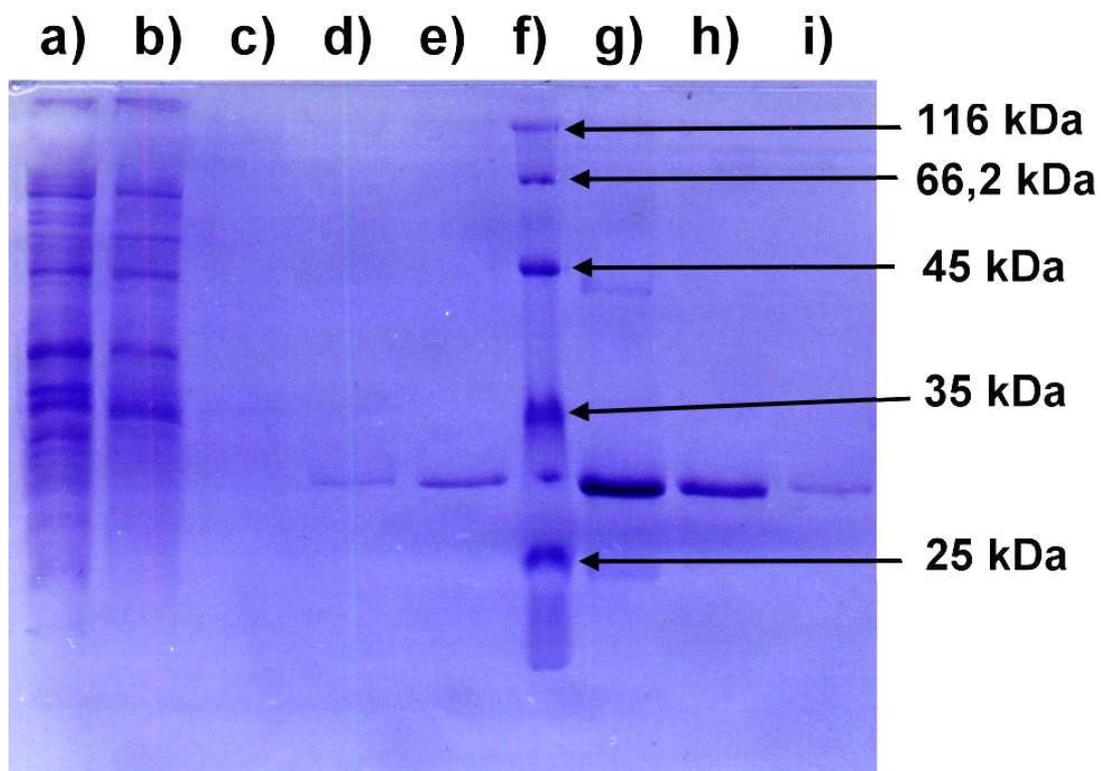


Abb. 7.12: Links: SDS-Gel Aufreinigung mit Ni^{2+} -NTA. a) Kontrolle: BL-21 mit pQE-30; b) Auftragslösung; c) 10 mM Imidazol; d) 20 mM Imidazol; e) 30 mM Imidazol; f) pEqGold Marker I; g) 100 mM Imidazol; h) 200 mM Imidazol; i) 400 mM Imidazol.

Zur Untersuchung der Enzymlösungen auf niedermolekulare Verunreinigungen, die die HPLC-Analytik beeinträchtigen können, wurden die erhaltenen Fraktionen der Affinitätschromatographie nach dem Ausfällen der Proteine mit Acetonitril und anschließender Zentrifugation über die HPLC vermessen. Die Chromatogramme der Auftragslösung sowie der ersten Waschlösungen (10 mM, 20 mM Imidazol) enthalten einen Peak, der mit dem Signal für L-Citrullin ($t = 12,2$ min) koeluiert. Dieses Störsignal konnte als Bestandteil des LB-Mediums identifiziert werden. Bei der gereinigten Enzymlösung (100 mM Imidazol) ist diese Verunreinigung nicht mehr nachzuweisen (Abb. 7.13). Mit Hilfe der durchgeführten Affinitätschromatographie lässt sich somit reine rekombinante hDDAH-1 gewinnen, die keine störenden niedermolekularen Verunreinigungen enthält, welche die HPLC-Analytik beeinträchtigen.

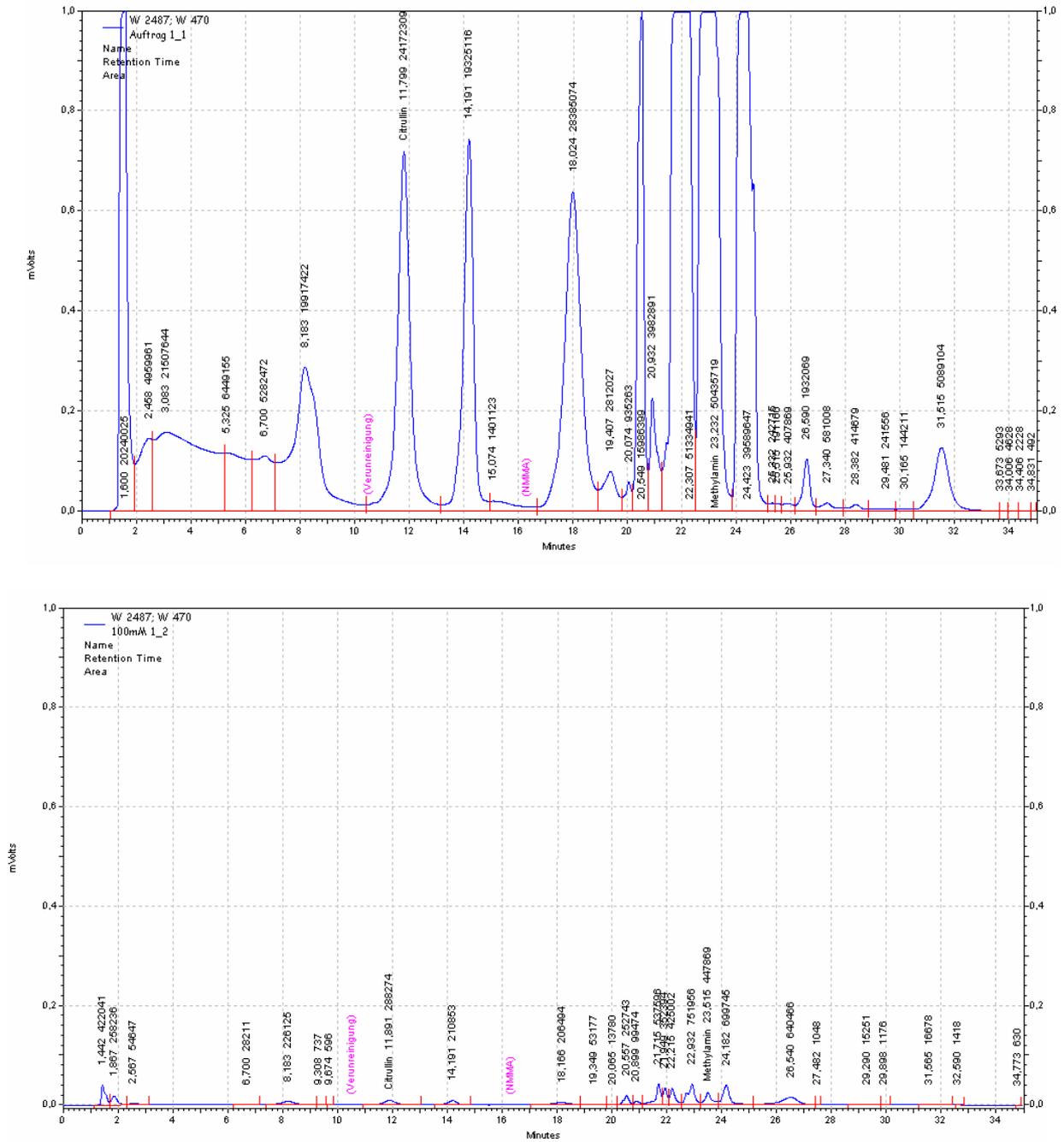


Abb. 7.13: Oben: HPLC-Chromatogramm der Auftragslösung der Affinitätschromatographie. Die nichtaufgereinigte Enzymlösung beinhaltet eine Vielzahl an Verunreinigungen, die die HPLC-Analytik beeinträchtigen.

Unten: HPLC-Chromatogramm der aufgereinigten hDDAH-1 Lösung. Die aufgereinigte Enzymlösung weist nur geringe Verunreinigungen auf, die die HPLC-Analytik der enzymatischen Testung nicht beeinträchtigen, da die dort eingesetzte Enzym-Konzentration wesentlich geringer ist.

7.3.2.4 Bestimmung des Proteingehaltes

Für die erhaltenen gereinigten hDDAH-1 Fraktionen wurde jeweils der Proteingehalt bestimmt. Je nach exprimierter Charge schwankten die erhaltenen Protein-Konzentrationen zwischen 1,5 - 3,3 mg / ml. Aus einer Bakterienkultur mit einem Volumen von einem Liter wurde im Durchschnitt 5,5 mg aufgereinigte hDDAH-1 gewonnen. Damit ist die hier beschriebene Expression und Aufreinigung anderen publizierten Verfahren insbesondere in der Proteinausbeute deutlich überlegen.^{97,239,241}

7.3.2.5 Aktivitätsnachweis der humanen DDAH-1

Der Nachweis der Aktivität der exprimierten hDDAH-1 erfolgte über Inkubationen mit dem natürlichen Substrat NMMA und anschließender Detektion des Produktes der DDAH-katalysierten Hydrolyse, L-Citrullin, per HPLC. Es wurden alle Fraktionen der durchgeführten Affinitätschromatographie auf hDDAH-1 Aktivität untersucht.

In Fraktionen der Auftragslösung und der 10 mM Waschlösung konnte keine hDDAH-1 Aktivität detektiert werden. Stattdessen ist in diesen Proben bei $t = 11,9$ min ein Signal für die Verunreinigung aus dem LB-Medium zu erkennen (Kap. 7.3.2.3). Diese Verunreinigung ist in den anderen Proben nicht enthalten und bestätigt die effektive Aufreinigung durch die Affinitätschromatographie. Die höchste Aktivität konnte in der 100 mM Imidazol-Elutionslösung nachgewiesen werden. Die Fraktionen mit 20 mM bzw. 200 mM Imidazol zeigten etwa ein Achtel der Aktivität der 100 mM Imidazol-Elutionslösung (Abb. 7.14). Der Aktivitätsnachweis belegte, dass die rekombinante aminoterminal 6xHis-tagged hDDAH-1 aktiv ist. Weitere Untersuchungen zur Aktivität sind im Kap. 8 dargestellt.

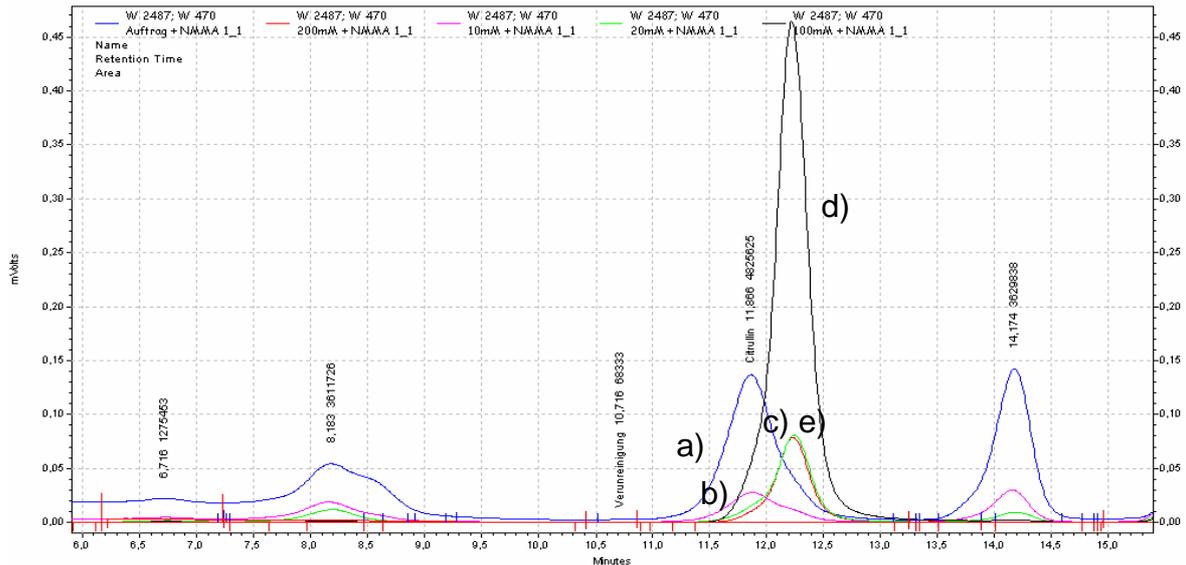


Abb. 7.14: HPLC-Chromatogramm der Proben des hDDAH-1 Aktivitäts-Assays. Das Signal bei $t = 12,3$ min entspricht L-Citrullin, das bei $t = 11,9$ min der Verunreinigung aus dem LB-Medium. a) Auftragslösung; b) 10 mM Imidazol-Waschlösung; c) 20 mM Imidazol-Waschlösung; d) 100 mM Imidazol-Elutionslösung; e) 200 mM Imidazol-Waschlösung.

7.3.3 Rekombinante Expression humaner DDAH-2

7.3.3.1 Klonierung der humanen DDAH-2

Die rekombinante Expression wurde mit zwei verschiedenen Expressionsplasmiden durchgeführt. Zum einen sollte die Expression analog der der humanen DDAH-1 erfolgen. Hierzu wurden über die PCR Schnittstellen für BamHI (5') und HindIII (3') an den Enden der codierende Sequenz für die humane DDAH-2 erschaffen. Dieses Fragment wurde erfolgreich in den Expressionsvektor pQE-30 zwischen BamHI und HindIII ligiert und die Sequenz über eine Sequenzierung bestätigt.

Darüber hinaus wurde ein zweites Expressionsplasmid konstruiert, da aus der Struktur der DDAH-1 ersichtlich ist, dass sich der N-Terminus in einer Kavität nahe des aktiven Zentrums befindet. Für die DDAH-2 existieren bisher keine Röntgenkristallstrukturen, aber es wird angenommen, dass die Isoformen relativ ähnlich aufgebaut sind. Aus diesem Grund wurde in den pQE-30 Vektor ein DNA-Segment eingebracht, das für einen 18 Aminosäuren umfassenden Spacer (AAAAGIEGRPAAAAAAGS) zwischen His-tag und DDAH-2 codiert, um eine

Beeinflussung des aktiven Zentrums durch den stark positiv geladenen His-tag auszuschließen sowie ihn für die Aufreinigung besser zugänglich zu machen. Zusätzlich enthält dieser Spacer eine Faktor Xa Schnittstelle, um den His-tag nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung über eine Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie gegebenenfalls abspalten zu können. Die Struktur dieser DDAH-2 ist der einzigen, bisher beschriebenen rekombinant exprimierten DDAH-2 sehr ähnlich.⁹³

Für die Klonierung dieses Expressionsplasmids wurden zwei komplementäre DNA-Einzelstränge bezogen. Das Annealing dieser Einzelstränge führt zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment mit überhängenden Enden, so dass sich am 5'-Ende der für eine BamHI Schnittstelle passende Überhang befand sowie am 3'-Ende der für eine HindIII Schnittstelle. Dieses Fragment wurde aufgereinigt und über diese Schnittstellen in den Expressionsvektor pQE-30 ligiert. Dabei wurde die genutzte Schnittstelle für BamHI zerstört, jedoch eine neue durch das ligierte Fragment eingebaut. Die Sequenzierung bestätigte die korrekte DNA-Sequenz. In diesen verlängerten pQE-30 Vektor (pQE-30 Elong) wurde über die Schnittstellen für BamHI und HindIII die codierende Sequenz der DDAH-2 eingebracht. Anschließend wurde die Sequenz über eine Sequenzierung bestätigt.

7.3.3.2 Expression und Aufreinigung der humanen DDAH-2

Mit beiden Expressionsplasmiden wurden Expressionsversuche bei unterschiedlichen Temperaturen (18 - 37 °C) und verschiedenen IPTG-Konzentrationen (10 μM - 1 mM) über verschiedene Expressions-Zeiträume (2 - 18 h) unternommen. Nachdem die Zellen abzentrifugiert und lysiert wurden, erfolgte eine Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie. Bei der anschließenden SDS-Page konnte in keiner der eluierten Fraktionen eine charakteristische Bande bei 31 bzw. 32 kDa für die beiden aminoterminal 6xHis-tagged hDDAH-2 detektiert werden. Darüber hinaus konnte auch im SDS-Gel mit Proben des ungereinigten Zelllysats und des Zellpellets keine Bande für die rekombinant exprimierte hDDAH-2 nachgewiesen werden.

7.3.3.3 Western Blot

Nachdem bei der SDS-PAGE keine Expression der hDDAH-2 detektiert werden konnte, sollte mit Hilfe des Western Blots geprüft werden, ob überhaupt eine Expression des Enzyms stattfindet.

Diese Untersuchung wurde nur für Expressionsversuche mit der aminoterminal verlängerten hDDAH-2 durchgeführt. Es konnte eine schwache Bande für die DDAH-2 in Proben des Zelllysates und des Zellpellets identifiziert werden, so dass eine geringe Expression des Enzyms stattfindet, das Protein jedoch wahrscheinlich in inclusion bodies ausfällt.

7.3.3.4 Aktivitäts-Assay der humanen DDAH-2

Zur Bestimmung der DDAH-2-Aktivität wurden sowohl die eluierten Fraktionen der Affinitätschromatographie als auch das Zellpellet und ein ungereinigtes Zellhomogenat verwendet. Es konnte bei keiner der getesteten Fraktionen eine DDAH-Aktivität detektiert werden. Auch längere Inkubationszeiten (bis zu 4 h) führten zu keiner messbaren Aktivität.

Alle Klonierungs- und Expressionsversuche der hDDAH-2 mit dem Expressionsvektor pQE-30 führten zu keiner erfolgreichen Expression der hDDAH-2. Weder konnte im SDS-Gel eine Bande für das Enzym nachgewiesen noch eine enzymatische Aktivität im Zellhomogenat oder den Fraktionen der Affinitätschromatographie detektiert werden.

Auch das Einfügen eines 18 Aminosäuren-umfassenden Spacers zwischen dem 6xHis-tag und der hDDAH-2, der eine Beeinflussung des aktiven Zentrums durch den positiv geladenen His-tag vermindern sollte, führte zu keiner erfolgreichen Expression des Enzyms. Lediglich über einen Western Blot konnte eine schwache Expression des Proteins im Zellpellet und Zelllysat nachgewiesen werden. Eine enzymatische Aktivität dieses Proteins konnte jedoch nicht detektiert werden. Interessanterweise sind die hier durchgeführten Expressionsversuche nahezu identisch mit denen, die in der bisher einzigen erfolgreichen Expression der hDDAH-2 beschrieben wurden. Allerdings ist bei dieser publizierten Expression anzumerken, dass anschließende Testungen nur mit einem Zellhomogenat durchgeführt wurden, obwohl die Expression mit einem aminoterminalen 6xHis-tag

durchgeführt wurde.⁹³ Scheinbar war auch hier die Expression bzw. Aufreinigung der hDDAH-2 nicht problemlos möglich. Darüber hinaus ist bemerkenswert, dass die Veröffentlichung schon aus dem Jahr 1999 datiert und bis zum heutigen Tag keine weiteren Untersuchungen mit der DDAH-2 veröffentlicht wurden. Unveröffentlichte Daten bestätigten, dass die Expression dieser Isoform auch von anderen Arbeitskreisen bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte.²⁴⁰

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine weiteren Versuche zur Expression der hDDAH-2 unternommen, da im Folgenden (Kap. 8 und 9) vorrangig die Hemmung der hDDAH-1 untersucht werden sollte. Eine Testung der Selektivität gegenüber der hDDAH-2 soll Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

Einen möglichen Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten kann die Expression der nativen humanen DDAH-2 darstellen, um zu prüfen, ob die Probleme der Expression bzw. die fehlende Aktivität mit dem His-tag in Verbindung stehen. Sollte dies der Fall sein, könnte möglicherweise die Expression mit einem anderen tag zum Erfolg führen. Alternativ repräsentiert natürlich die Wahl eines anderen Expressionssystems eine Option, die Probleme der Expression zu lösen.

7.4 Zusammenfassung

Die DDAH katalysiert den physiologischen Abbau der N° -methylierten L-Arginine, NMMA und ADMA, die endogene Inhibitoren der NO-Synthase darstellen.²⁸ Somit repräsentiert die Hemmung der DDAH einen indirekten Mechanismus zu NOS-Inhibition. In den vergangenen Jahren wurde eine Kolokalisation von nNOS und DDAH-1 sowie die Koexpression von eNOS und DDAH-2 beschrieben.^{93,94,237} Somit wird eine Isoform-spezifische Regulation der Aktivität der NOSs über die Isoenzyme der DDAH angenommen. Daher kann möglicherweise über einen DDAH-1-selektiven Inhibitor eine selektive Hemmung der nNOS erreicht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivaten auf die Aktivität der humanen DDAH-1 untersucht (Kap. 8) und im Weiteren Inhibitoren für dieses Enzym entwickelt werden (Kap. 9). Daher wurde eine Methode zur rekombinanten Expression humaner DDAH-1 entwickelt.

Zur Expression wurde die codierende DNA der hDDAH-1 in den Expressionsvektor pQE-30 eingebracht. Die mittels dieses Vektors rekombinant exprimierte hDDAH-1 ist gegenüber der nativen hDDAH-1 um einen aminoterminalen 12 Aminosäuren umfassenden 6xHis-tag verlängert, so dass das exprimierte Protein einer Affinitätschromatographie mittels Ni^{2+} -NTA zugänglich ist. Die Affinitätschromatographie ermöglicht die Aufreinigung einer hDDAH-1 Fraktion, deren Reinheit sowohl über eine SDS-PAGE als auch eine HPLC-Methode nachgewiesen wurde. Darüber hinaus wurde die Aktivität des exprimierten und aufgereinigten Enzyms nachgewiesen. Die genauere Charakterisierung der kinetischen Parameter für das exprimierte Enzym ist in Kapitel 8 beschrieben.

Mittlerweile konnte die Expression der humanen DDAH-1 von mehreren Arbeitsgruppen mit verschiedenen tags erfolgreich durchgeführt werden. Doch die hier durchgeführte Expression scheint insbesondere hinsichtlich der Enzymausbeute anderen deutlich überlegen zu sein.²³⁹

Eine Hemmung der hDDAH-2 erscheint aufgrund der Kolokalisation mit der eNOS wenig sinnvoll. Dennoch sollte die Expression der hDDAH-2 zusätzlich erfolgen, um die Selektivität der neu identifizierten DDAH-1-Inhibitoren (Kap. 9) gegenüber der hDDAH-2 zu untersuchen. Obwohl die verwendeten Expressionsbedingungen, mit denen der bisher einzigen publizierten hDDAH-2-Expression nahezu identisch

sind, war eine erfolgreiche rekombinante Expression der hDDAH-2 im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.⁹³ In der publizierten Arbeit erfolgte trotz His-tag keine Aufreinigung des Enzyms sondern ein Testung mit dem Zelllysate, was ebenfalls auf Probleme in der Expression hindeutet. Darüber hinaus zeigen unveröffentlichte Ergebnisse, dass anderen Arbeitskreisen trotz intensiver Bemühungen die erfolgreiche Expression bisher ebenfalls nicht gelungen ist.²⁴⁰ Da im Rahmen dieser Arbeit vorrangig Inhibitoren für die hDDAH-1 (Kap. 9) identifiziert werden sollten, und die Expression der hDDAH-2 lediglich zur Testung der Isoenzym-Selektivität dienen sollte, wurde auf weitere Expressionsversuche der hDDAH-2 verzichtet. Diese Untersuchungen sollen Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

8 Untersuchungen mit rekombinanter humaner DDAH-1

8.1 Einleitung und Zielsetzung

Die N^{ω} -methylierten L-Arginin-Derivate, NMMA und ADMA, stellen endogene Inhibitoren der drei Isoenzyme der NO-Synthase dar. Beide Substanzen werden physiologisch über die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut. Somit kann über eine Modulation der DDAH Aktivität indirekt die Aktivität der NO-Synthase reguliert werden. Aus diesem Grund erlangte dieses Enzym in den vergangenen Jahren vermehrt Interesse in der Regulation des NO-generierenden Systems.^{168,177}

Wie in Kap. 7 beschrieben, wurde die humane DDAH-1 rekombinant exprimiert und in diesem Teil der Arbeit sollte die Charakterisierung der kinetischen Parameter des exprimierten Enzyms erfolgen. Darüber hinaus sollte eine mögliche Hemmung der humanen DDAH-1 (hDDAH-1) durch die N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivate: N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA), N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-citrullin (MC) untersucht werden. Mit Hilfe dieser Studien sollte aufgeklärt werden, ob diese Verbindungen - sofern sie physiologisch in Säugetieren vorkommen - eine Funktion in der Regulation der DDAH-Aktivität einnehmen.

Neben der Hemmung der DDAH durch die N^{δ} -methylierten Verbindungen wurde eine mögliche Umsetzung von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin durch die hDDAH-1 untersucht.

8.2 Materialien und Methoden

8.2.1 Materialien

8.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben gemacht werden, wurden alle verwendeten Chemikalien über Sigma-Aldrich, Fluka, Merck oder Roth bezogen.

NMMA wurde von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) erhalten. Methanol Lichrosolv und Acetonitril Lichrosolv wurden von Acros Organics (Geel, Belgien) erworben.

MA wurde von Herrn Prof. Steglich (Institut für Organische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.¹⁸⁸ MC und NHAM wurden im eigenen Arbeitskreis von D. Schade synthetisiert.¹⁸⁷

8.2.1.2 Geräte

Zur Durchführung der Inkubationen wurden 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und ein IKA-Vibrax-VXR Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Die Abtrennung des Proteins erfolgte durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen). Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Das Fließmittel für die HPLC wurde mit einem Sonorex Super Rk 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast.

8.2.1.3 Enzyme

Die hDDAH-1 wurde, wie in Kapitel 7 beschrieben, exprimiert und aufgereinigt.

8.2.2 HPLC-Methode

Die verwendete HPLC-Methode entsprach der unter 7.2.2.1 angegebenen.

8.2.3 Biochemische Methoden

8.2.3.1 Assay-Validierung

8.2.3.1.1 Untersuchung der pH-Abhängigkeit der hDDAH-1-Katalyse

Um den optimalen pH-Wert für die folgenden Inkubationen zu ermitteln, wurden Inkubationen bei unterschiedlichen pH-Werten in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer mit pH-Werten zwischen 6,0 und 9,0 durchgeführt.

Ein Inkubationsansatz enthielt 4 µg hDDAH-1 in einem Gesamtvolumen von 75 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer des jeweiligen pH-Wertes (6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9). NMMA wurde als Substrat in einer Konzentration von 333 µM eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über 45 min bei 37 °C. Anschließend wurde die Reaktion mit 75 µl Acetonitril abgestoppt, die Proben für 5 min geschüttelt und 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe der HPLC-Analytik (Kap. 8.2.2.) analysiert.

8.2.3.1.2 Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge

Es wurden Inkubationen mit verschiedenen Mengen an hDDAH-1 durchgeführt. Die eingesetzten Mengen variierten zwischen 0,95 und 4,75 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 75 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4. NMMA wurde in einer Endkonzentration von 333 µM eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über 45 min bei 37 °C. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 75 µl Acetonitril. Anschließend wurden die Proben für 5 min geschüttelt und 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC (Kap. 8.2.2.) zugeführt.

8.2.3.1.3 Zeitabhängigkeit der Umsetzung

Die Inkubationen wurden mit 2 µg hDDAH-1 in 75 µl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 durchgeführt. Als Substrat wurde NMMA in einer Konzentration von 200 µM verwendet. Die Inkubationen erfolgten über 20 - 60 min bei 37 °C. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 75 µl Acetonitril abgestoppt, die Proben für 5 min geschüttelt und 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels der HPLC-Analytik (Kap. 8.2.2.) vermessen.

8.2.3.2 K_m -Wert Bestimmung

Die K_m -Wert Bestimmung für die exprimierte hDDAH-1 wurde mit NMMA als Substrat durchgeführt. Hierfür wurden Inkubationen mit 2 μg hDDAH-1 in einem Gesamtvolumen von 75 μl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 durchgeführt. NMMA wurde in Konzentrationen von 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 μM und 1, 2,5, 5, 7,5 und 10 mM eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über 30 min bei 37 °C. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 75 μl Acetonitril beendet, die Proben für 5 min geschüttelt und das Protein abzentrifugiert (12.000 g, 10 min). Die Analyse der Proben erfolgte über die HPLC (Kap. 8.2.2.) und die Auswertung über SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Darüber hinaus wurde der K_m -Wert zusätzlich über den L-Citrullin Plattenreader-Assay bestimmt (Kap. 9.2.3.1.4).

8.2.3.3 Hemmstudien mit N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivaten

MA, NHAM und MC wurden als Inhibitoren in Konzentrationen von 0,1, 1 und 10 mM eingesetzt. Als Substrat wurde NMMA in einer Konzentration von 200 μM eingesetzt. Das Gesamtvolumen eines Inkubationsansatzes betrug 75 μl und wurde mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μg hDDAH-1 gestartet, und die Proben bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 30 min wurde die Inkubation mit 75 μl Acetonitril abgestoppt. Anschließend wurden die Proben für 5 min geschüttelt und dann das Protein bei 12.000 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde der HPLC zugeführt.

Als Vergleich wurden jeweils drei Kontrollinkubationen ohne Inhibitorzusatz durchgeführt. Die in den gehemmten Ansätzen gebildete L-Citrullin-Menge wurde prozentual auf die gebildete L-Citrullin-Menge der Kontrollinkubationen bezogen.

8.2.3.4 Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin

MA wurde in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt und in einem Gesamtvolumen von 75 μl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 mit 2 μg rekombinant exprimierter hDDAH-1 für 30 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Proben wurden, wie unter 8.2.3.3. angegeben, abgestoppt und aufgearbeitet.

8.3 Ergebnisse & Diskussion

8.3.1 Assay-Validierung

8.3.1.1 Untersuchung der pH-Abhängigkeit der hDDAH-1-Katalyse

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der hDDAH-1-Katalyse zeigte, dass das pH-Optimum der hDDAH-1 im schwach Alkalischen liegt. Im Bereich zwischen pH 8,0 und 9,0 konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden (Abb. 8.1). Diese Beobachtungen sind identisch mit denen, die etwa zur gleichen Zeit für rekombinante humane DDAH-1 mit einem vergleichbaren tag veröffentlicht wurden.²⁴¹ In früheren Publikationen wurden das pH-Optimum häufig im leicht Sauren bestimmt, was wahrscheinlich auf das Vorhandensein von Zn^{2+} -Ionen in diesen Untersuchungen zurückzuführen ist. Durch einen niedrigeren pH-Wert werden die inhibierenden Zn^{2+} -Ionen aus dem aktiven Zentrum der DDAH verdrängt und somit ein Anstieg der Enzym-Aktivität bewirkt.⁹⁷

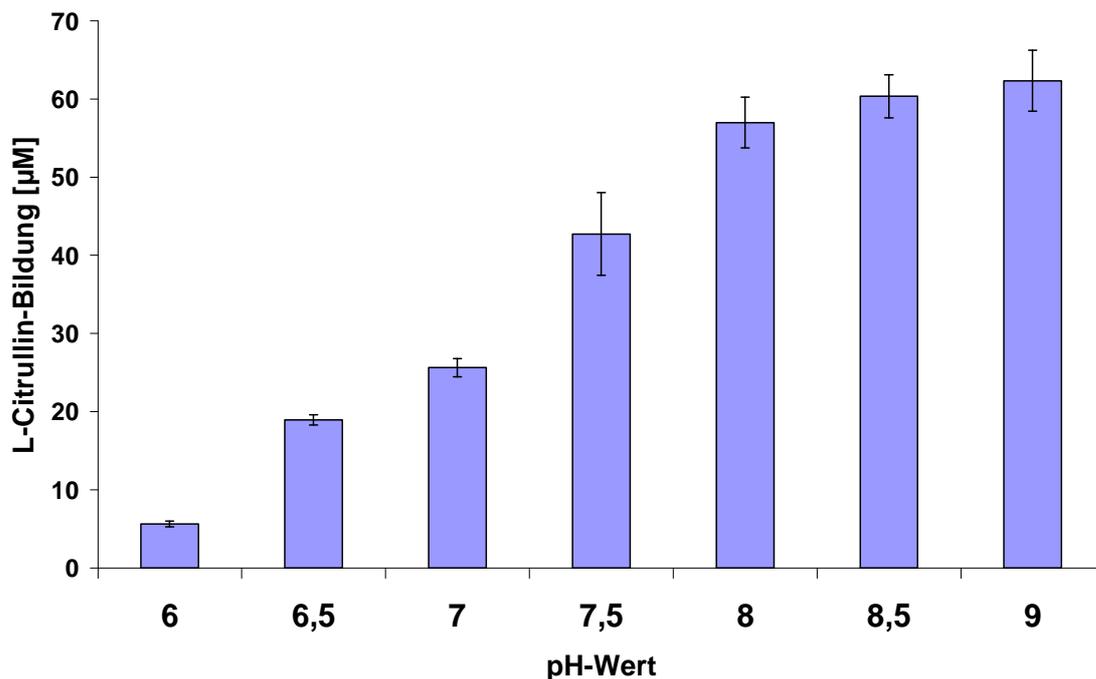


Abb. 8.1: Darstellung der gebildeten L-Citrullin-Konzentrationen in Inkubationen von 2 µg hDDAH-1 mit 333 µM NMMA bei verschiedenen pH-Werten. Bei den angegebenen Daten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt per HPLC vermessen wurden.

Für die weiteren Untersuchungen wurde ein physiologischer pH-Wert von 7,4 gewählt, da die Aktivität bei diesem pH-Wert groß genug ist, um eine ausreichende Detektion der umgesetzten Substratmenge per HPLC zu gewährleisten. Des Weiteren ist die Aktivität bei diesem pH-Wert für die Beurteilung der physiologischen Bedeutung der Testergebnisse am aussagekräftigsten.

8.3.1.2 Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge

Die Untersuchung der Proteinabhängigkeit der hDDAH-1-Katalyse zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Enzymmenge und der gebildeten L-Citrullin-Konzentration (Abb. 8.2).

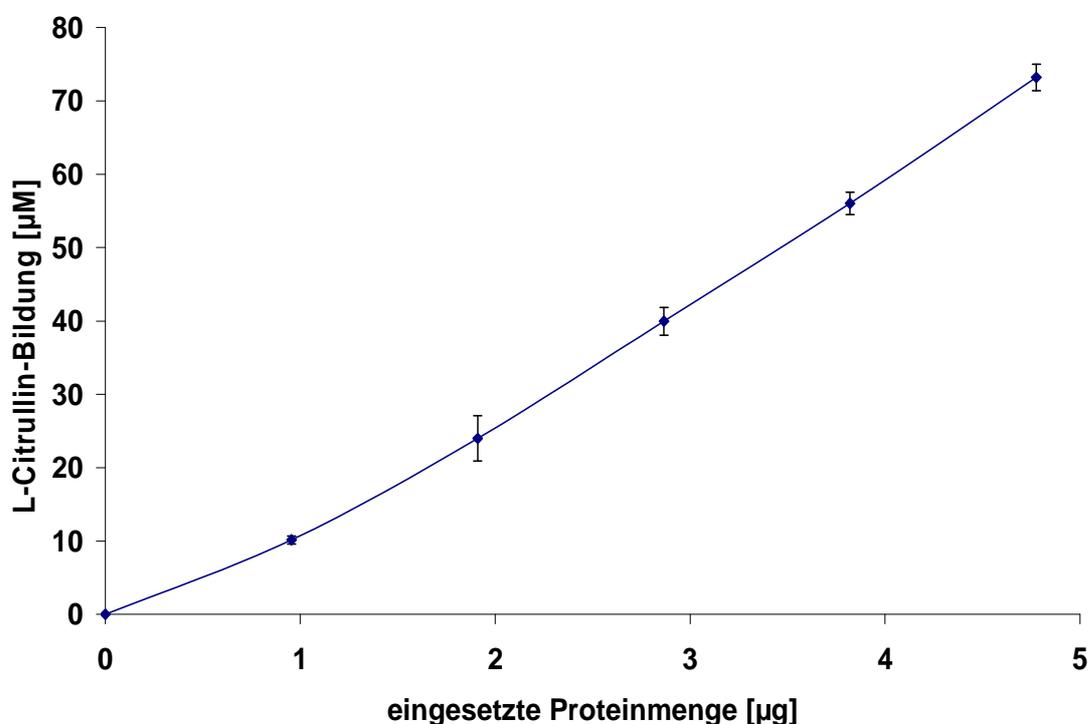


Abb. 8.2: Einfluss der eingesetzten hDDAH-1-Menge auf die enzymatische Bildung von L-Citrullin. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Für die weiteren Inkubationen wurde eine hDDAH-1-Menge von 2 µg pro Ansatz verwendet, da diese Menge über eine ausreichende Aktivität für die Quantifizierung des gebildeten L-Citrullins per HPLC verfügt.

8.3.1.3 Zeitabhängigkeit der Umsetzung

Es wurden Inkubationen über unterschiedliche Zeiten zwischen 20 und 60 min durchgeführt. Der NMMA Umsatz der hDDAH-1-Katalyse ist bei einer Substratkonzentration von 200 μM NMMA und einer Enzymmenge von 2 μg hDDAH-1 pro Ansatz über mindestens 60 min linear (Abb. 8.3).

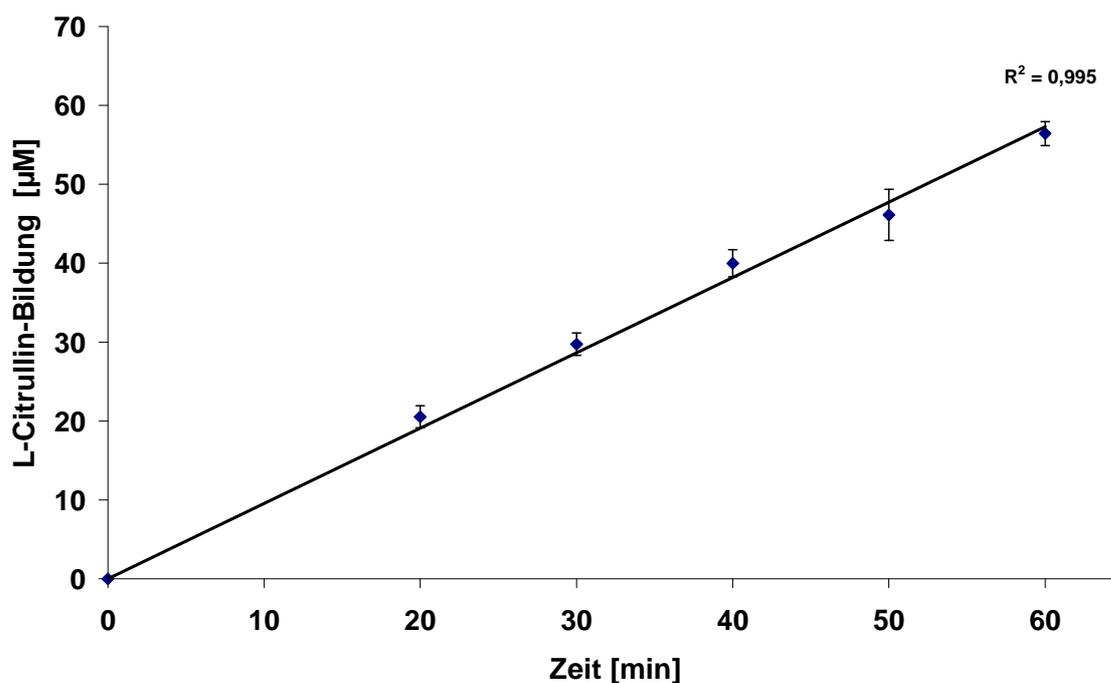


Abb. 8.3: Zeitabhängige Bildung von L-Citrullin durch 2 μg hDDAH-1 in Inkubationen mit 200 μM NMMA als Substrat. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um $MW \pm SD$ aus zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Eine Inkubationszeit von 30 min liefert bereits einen ausreichenden Substratumsatz für die Quantifizierung des Produktes *via* HPLC-Analytik und wurde somit für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

8.3.2 K_m -Wert Bestimmung

Die K_m -Wert Bestimmung für NMMA an hDDAH-1 mittels HPLC-Analytik wurde über eine hyperbole Kurve und über ein Diagramm nach Lineweaver-Burk ausgewertet (Abb. 8.4, 8.5).

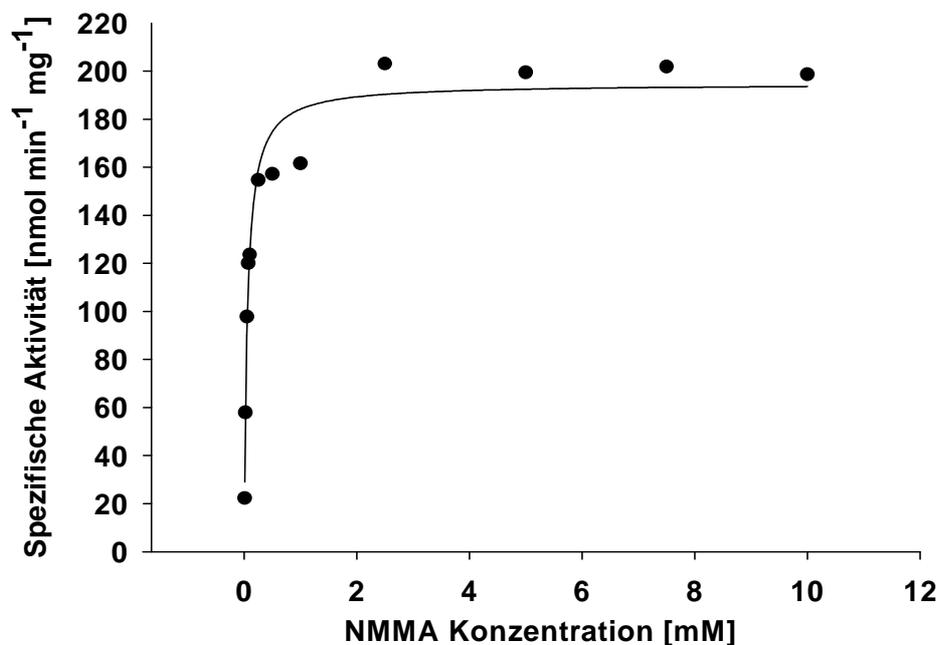


Abb. 8.4: Direkte Darstellung der K_m -Wert Bestimmung für NMMA an humaner DDAH-1.

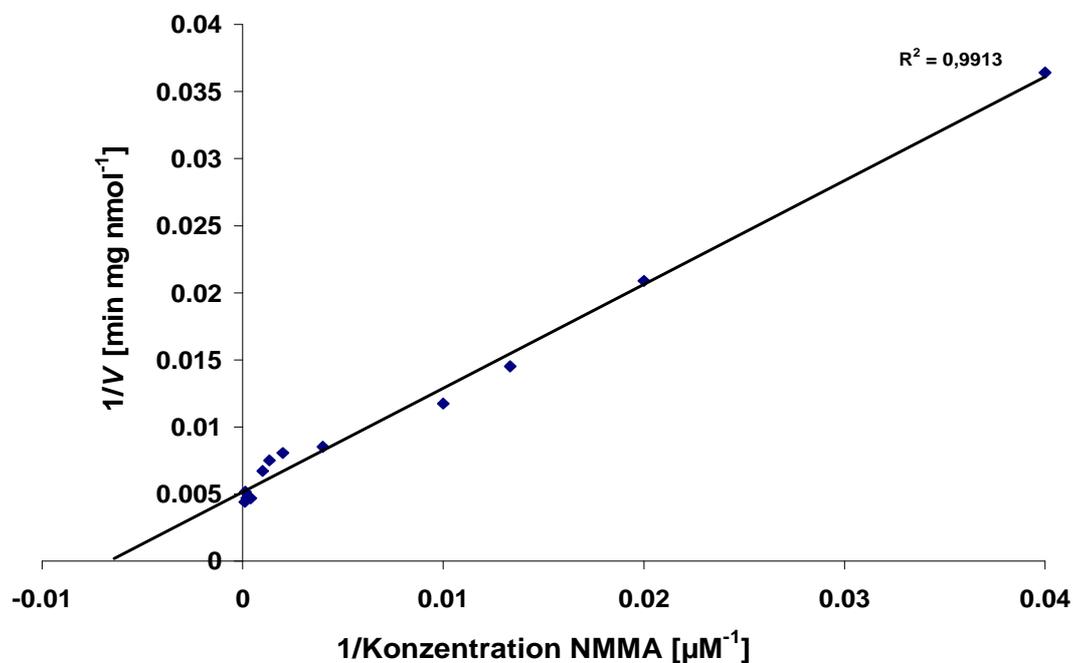


Abb. 8.5: Doppelt-reziproke Darstellung der K_m -Wert Bestimmung für NMMA an humaner DDAH-1 nach Lineweaver-Burk.

Darüber hinaus wurde eine K_m -Wert Bestimmung für NMMA über den Plattenreader-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 9.2.3.1.4), deren Werte hier mit aufgeführt sind (alle ermittelten Daten siehe Tab. 8.1).

Tab. 8.1: Die angegebenen K_m - und V_{max} -Werte für NMMA an hDDAH-1 wurden über unterschiedliche analytische Methoden und Auswerteverfahren bestimmt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um MW \pm SD aus drei oder mehr separaten Bestimmungen.

Analytik	Auswertung			
HPLC	Hyperbole Kurve	K_m -Wert	133 \pm 75	[μ M]
		V_{max}	210 \pm 14	[nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]
HPLC	Lineweaver-Burk	K_m -Wert	164 \pm 80	[μ M]
		V_{max}	223 \pm 34	[nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]
Plattenreader	Hyperbole Kurve	K_m -Wert	106 \pm 17	[μ M]
		V_{max}	154 \pm 24	[nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]

Die bestimmten K_m -Werte liegen im gleichen Rahmen, wie er auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde.^{177,241} Interessanterweise wurde der K_m -Wert für Säugetier DDAH-1 früher höher angegeben, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass in diesen Untersuchungen ein pH-Wert zwischen 6,2 und 6,5 verwendet wurde.^{92,237} Darüber hinaus waren diese Enzyme möglicherweise nicht frei von Zn²⁺-Ionen, was zu einer abweichenden K_m -Wert Bestimmung geführt haben kann.

8.3.3 Hemmstudien mit N^δ-methylierten L-Arginin-Derivaten

Die untersuchten Substanzen zeigten einen sehr geringen Hemmeffekt auf die humane DDAH-1. Eine erste schwache Hemmwirkung konnte ab einer Konzentration von 1 mM MC bzw. NHAM detektiert werden (Abb. 8.6). Bei einer Konzentration von 10 mM konnte durch MC bzw. NHAM der Umsatz auf ca. 50 % reduziert werden. MA zeigt einen deutlich geringeren Effekt, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, dass MA als Racemat vorliegt. Die hDDAH-1 zeigt eine hohe Stereoselektivität, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nur das L-Enantiomer eine Hemmpotenz besitzt. Bei einem Einsatz des L-Enantiomers in

einer Konzentration von 10 mM kann daher von einer stärkeren Hemmwirkung ausgegangen werden, die wahrscheinlich etwa in dem Rahmen von MA und NHAM liegt.

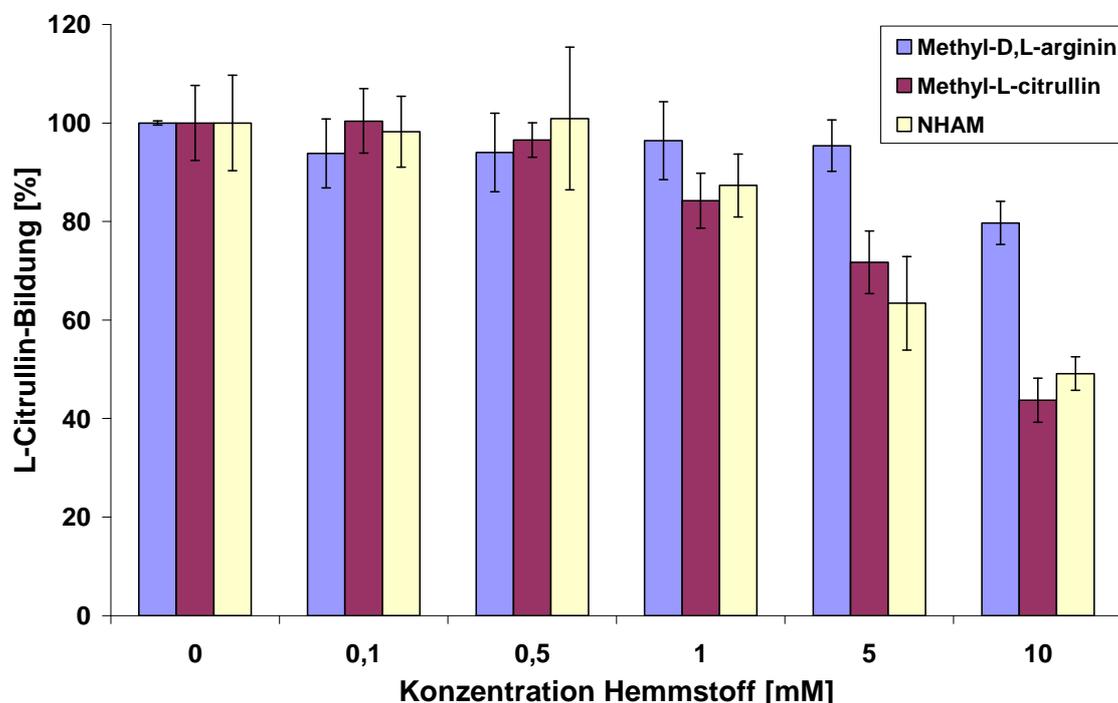


Abb. 8.6: Hemmung der humanen DDAH-1 durch verschiedene Konzentrationen von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA), N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-citrullin (MC). Die prozentualen Werte sind bezogen auf drei Kontrollinkubationen ohne Inhibitorzusatz. Die angegebenen Daten sind $MW \pm SD$ von vier separaten Ansätzen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Insbesondere MC sollte eine hohe Affinität zum aktiven Zentrum besitzen, da L-Citrullin als physiologisches Produkt der DDAH-Katalyse dort gebunden wird. Die Kristallstruktur der bovinen DDAH-1 zeigt, dass eine Wasserstoffbrücke vom N^{δ} -gebundenen Wasserstoffatom des L-Citrullins zum Aspartat 78 des aktiven Zentrums ausgebildet wird (Abb. 8.7).⁹⁵ Eine Methylierung an der N^{δ} -Position führt zum Verlust dieser Wasserstoffbrückenbindung und resultiert höchstwahrscheinlich in einer verringerten Affinität von MC zum aktiven Zentrum. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den Säugetier DDAHs kann diese Beobachtung auf die humane DDAH-1 übertragen werden.

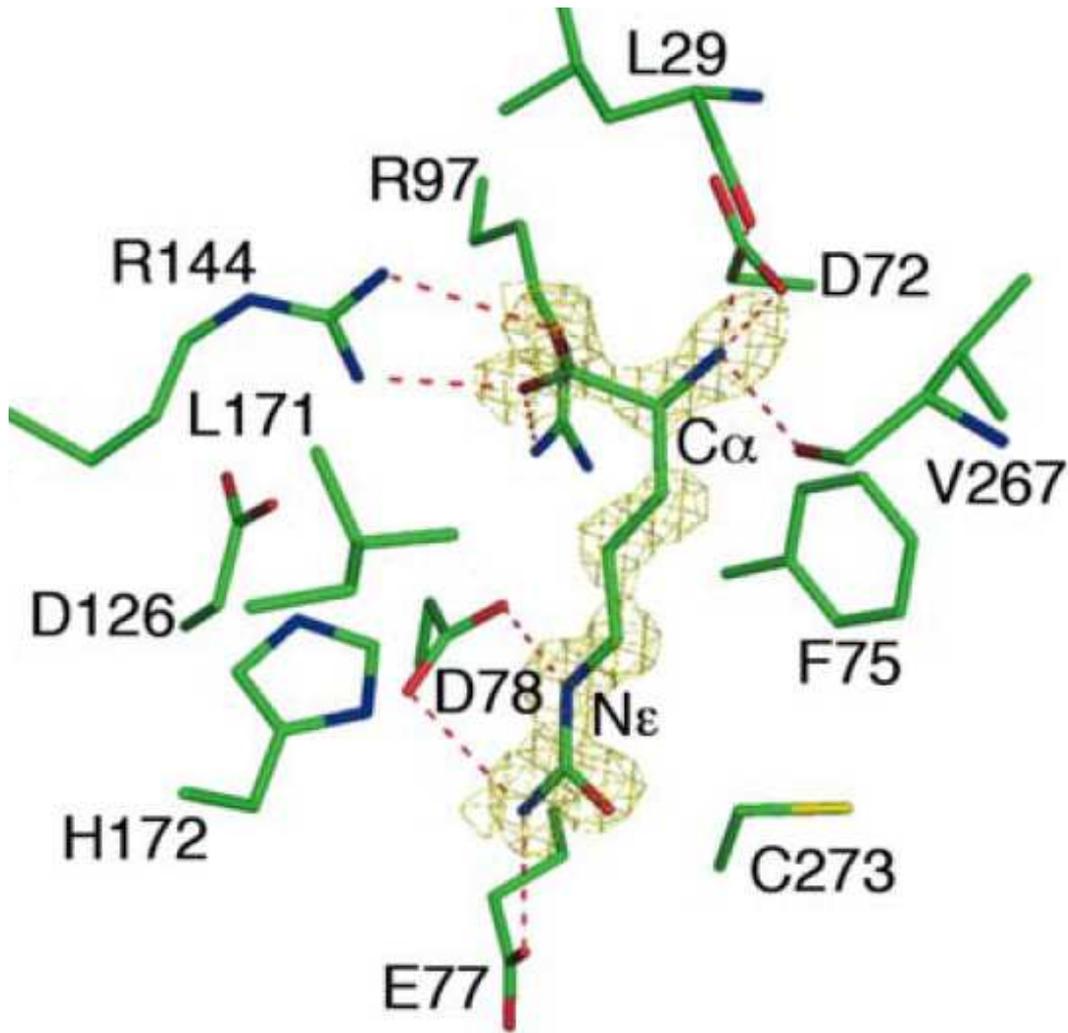


Abb 8.7: Kristallstruktur der bovinen DDAH-1 mit L-Citrullin im aktiven Zentrum.

(Nachdruck aus: Frey et al., Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors. Structure 2006, 14, 901-11, mit Erlaubnis von Elsevier)⁹⁵

In Abb 8.8 ist die Kristallstruktur der *Pseudomonas aeruginosa* DDAH (PaDDAH) dargestellt. Diese Struktur zeigt ebenfalls für das bakterielle Enzym eine Wasserstoffbrücke vom N^{δ} -Wasserstoffatom zum Aspartat 66 der PaDDAH.²⁴² Somit scheint auch beim bakteriellen Enzym diese Wasserstoffbrückenbindung die Affinität zum aktiven Zentrum zu erhöhen. Eine Methylierung an dieser Position führt zu einem Verlust der Wasserstoffbrücke und stellt somit eine Erklärung für die schlechtere Affinität der N^{δ} -methylierten Verbindungen dar.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine N^{δ} -Alkylierung, ebenso wie bei den NOS-Isoenzymen, zu einem Verlust an Affinität zu der DDAH führt. Daher besitzen die N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivate keine physiologische

Funktion in der Modulation der DDAH-Aktivität. Bisher konnte MA nur in Hefezellen, nicht aber in Säugetieren, nachgewiesen werden. Sollte diese Verbindung in Säugetieren vorkommen, dann in Konzentrationen, die weit unter denen liegen, die für eine Hemmung der DDAH benötigt werden.

Aufgrund der schlechten Affinität der N^{δ} -methylierten Substanzen scheint es, als könne eine N^{δ} -Substitution von L-Arginin-Analoga auch keine Option in der Entwicklung von neuartigen DDAH-Inhibitoren darstellen.

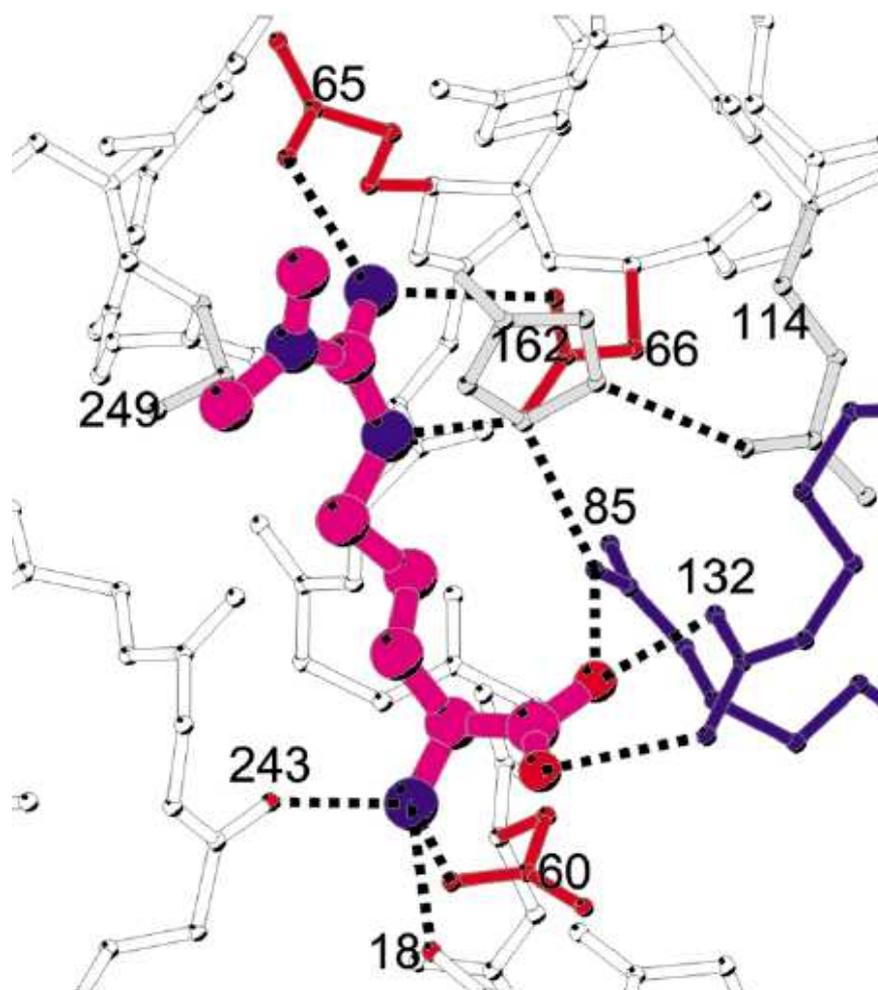


Abb. 8.8: Kristallstruktur der *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) DDAH mit ADMA im aktiven Zentrum.

(Mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd. adaptiert: Murray-Rust et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Nat Struct Biol 2001, 8, 679-83)²⁴²

8.3.4 Substratstudien mit N^{δ} -Methyl-D,L-arginin

Die Säugetier DDAH-1 besitzt eine recht hohe Substratspezifität. Neben NMMA und ADMA sind nur wenige andere Substrate bekannt wie N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-homo-L-arginin für murine DDAH-1, wohingegen das Substratspektrum der PaDDAH breiter erscheint.⁹² Für diese Spezies wurden unter anderem L-Arginin, N^{ω} -Amino-L-arginin, N^{ω} -Hydroxy-L-arginin und S-Methyl-L-thiocitrullin als Substrate identifiziert.^{177,243} Insbesondere S-Methyl-L-thiocitrullin stellt eine mechanistisch bedeutende Verbindung dar, da sie rascher von der PaDDAH umgesetzt wird als die physiologischen Substrate.

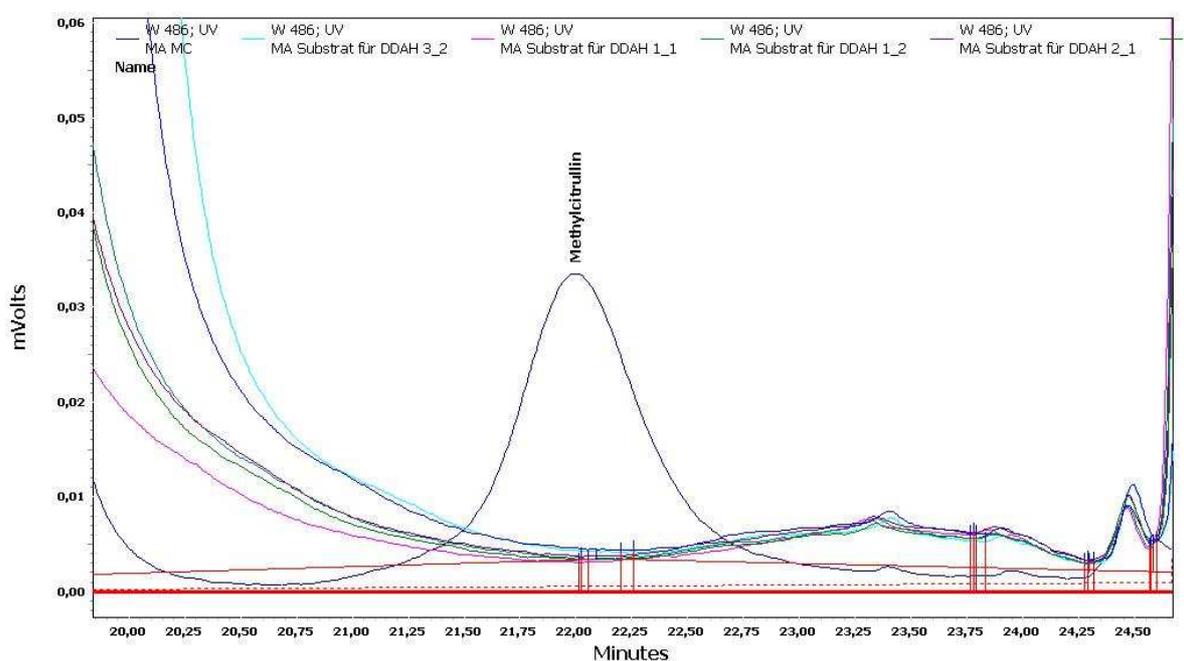


Abb. 8.9: Repräsentative HPLC-Chromatogramme der Inkubationen von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin als Substrat für die hDDAH-1. Bei $t = 22,0$ min konnte in keinem der inkubierten Ansätze ein Signal für N^{δ} -Methyl-L-citrullin detektiert werden. Ein Chromatogramm des Standards N^{δ} -Methyl-L-citrullin wurde über die Chromatogramme gelegt.

Innerhalb dieser Arbeit sollte getestet werden, ob N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA) durch die hDDAH-1 umgesetzt wird. Bei dieser Umsetzung von MA sollten sich, entsprechend des katalytischen Mechanismus der DDAH, N^{δ} -Methyl-L-citrullin (MC) und Ammoniak bilden. Diese Umsetzung konnte in den durchgeführten Substratstudien nicht beobachtet werden. In keinem der inkubierten Ansätze konnte die Bildung von MC bei einer Nachweisgrenze von $0,25 \mu\text{M}$ detektiert werden (Abb. 8.9). Darüber hinaus konnten in den analysierten Proben auch keine

anderen Metaboliten identifiziert werden. Kontrollinkubationen mit NMMA zeigten die Aktivität der verwendeten Enzymquelle.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen kann ein physiologischer Abbau von MA über die hDDAH-1 ausgeschlossen werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu anderen Säugetier DDAHs kann dieses Ergebnis mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf andere Säugetierspezies übertragen werden. Wie oben dargestellt, besitzt die *PaDDAH* ein größeres Substratspektrum und kann möglicherweise diese Umsetzung katalysieren.

8.4 Zusammenfassung

Es wurden Inkubationen mit rekombinant exprimierter humaner DDAH-1 (hDDAH-1) und NMMA als Substrat zur Charakterisierung des Enzyms durchgeführt. Das Enzym besitzt ein pH-Optimum im schwach Alkalischen und einen K_m -Wert für NMMA zwischen 100 und 160 μM mit einer maximalen Umsatzrate von 150 - 220 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Zusätzlich wurde ein *in vitro* hDDAH-1-Assay etabliert, mit dessen Hilfe Hemmstudien mit N^δ -Methyl-D,L-arginin (MA), N^o -Hydroxy- N^δ -methyl-L-arginin (NHAM) und N^δ -Methyl-L-citrullin (MC) durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurde untersucht, ob MA durch die hDDAH-1 umgesetzt wird. Die Inkubationen zeigten zum einen, dass alle drei getesteten Verbindungen schwache Inhibitoren der hDDAH-1 mit IC_{50} -Werten oberhalb von 5 mM darstellen, und zum anderen, dass MA nicht von der hDDAH-1 als Substrat akzeptiert wird.

Die bisher veröffentlichten Kristallstrukturen der DDAH zeigen, dass ADMA und L-Citrullin eine Wasserstoffbrücke vom N^δ -Atom zu einem Aspartat-Rest des aktiven Zentrums ausbilden.^{95,242} Durch eine N^δ -Methylierung kann diese Wasserstoffbrücke nicht mehr ausgebildet werden, was zu einem Affinitätsverlust zum Enzym führt. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine mögliche physiologische Funktion der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten N^δ -methylierten Verbindungen nicht in einer Aktivitätsbeeinflussung der hDDAH-1 zu finden ist. Auch ein physiologischer Abbau von MA durch die hDDAH-1 kann ausgeschlossen werden. Ebenso scheint eine N^δ -Alkylierung von L-Arginin-Analoga zur Entwicklung von DDAH-Inhibitoren nicht erfolgversprechend.

9 Entwicklung von Inhibitoren für die humane DDAH-1

9.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) stellt ein pharmazeutisches Target zur indirekten Modulation der Aktivität der NO-Synthase dar. Eine Hemmung der DDAH führt zu einem reduzierten Abbau der N^G -methylierten L-Arginine, ADMA und NMMA, die endogene Inhibitoren der NO-Synthase darstellen (Kap.1). In den vergangenen Jahren konnte eine Koexpression der DDAH-1 mit der nNOS sowie eine Koloalisation der DDAH-2 mit der eNOS und zum Teil mit der iNOS nachgewiesen werden.^{93,94,237} Demzufolge kann eine Hemmung der DDAH-1 möglicherweise zur therapeutischen Reduktion der Aktivität der nNOS ausgenutzt werden. Inzwischen wurde der Einsatz von selektiven DDAH-1 Inhibitoren erfolgreich *in vivo* zur Therapie von chronischen Schmerzen und des septischen Schocks getestet.¹⁷³ Die Hemmung der DDAH-2 hingegen erscheint wenig sinnvoll, da eine verminderte endotheliale NO-Freisetzung einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen darstellt.

Bisher sind drei verschiedene Klassen an potenten DDAH-Inhibitoren bekannt (Eine Übersicht über die Strukturen dieser Verbindungen ist in Abb. 1.13 gegeben):

- (1) Zum einen liegt die Klasse der Pentafluorphenylsulfonate (IC_{50} 16 - 58 μ M, PaDDAH) vor, die jedoch keine selektiven Inhibitoren für die DDAH darstellen.¹⁸⁰
- (2) Die potenteste Stoffklasse wurde auf Basis der Röntgenkristallstruktur der PaDDAH entwickelt. Es handelt sich um Indolthiobarbitursäure-Derivate mit SR445 als potentesten Vertreter (IC_{50} 2 μ M, PaDDAH).¹⁸¹
- (3) Eine weitere Klasse stellen die L-Arginin-Derivate dar. Der derzeit potenteste Vertreter dieser Gruppe ist das N^G -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257, IC_{50} 22 μ M, murine DDAH).¹⁷¹

Mittlerweile sind Kristallstrukturen der PaDDAH, der bovinen sowie der humanen DDAH-1 publiziert worden.^{95,172,242} Die Kristallstruktur der bovinen DDAH zeigt

deutlich, dass von der α -Aminofunktion des L-Citrullins drei Bindungen zum aktiven Zentrum der DDAH ausgebildet werden (Abb. 8.7): Eine Wasserstoffbrücke zum Aspartat 72 sowie zwei Bindungen zu den Sauerstoffatomen der Peptidbindungen der Aminosäuren Leucin 29 und Valin 267. Die α -Carboxylfunktion geht sogar drei ionische Wechselwirkungen ein: Zwei mit dem Arginin 144 sowie eine mit dem Arginin 97. Darüber hinaus ist in der Kristallstruktur der bovinen DDAH-1 eine Wasserstoffbrücke vom N^{δ} -Atom zum Aspartat 78 zu erkennen. Das Aspartat 78 geht zusätzlich eine weitere Wechselwirkung mit dem N^{ϵ} -Atom ein. Diese Anlagerung im aktiven Zentrum wird durch eine weitere H-Brücke von diesem N^{ϵ} -Atom zum Glutamat 77 stabilisiert. Die Hauptkette des L-Citrullins wird des Weiteren durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Phenylalanin 75 und Leucin 171 im aktiven Zentrum orientiert.⁹⁵

Da die Säugetier DDAHs hochkonserviert sind, können diese Wechselwirkungen auch auf die humane DDAH-1 (hDDAH-1) übertragen werden. Generell ist die Sequenzhomologie zwischen den DDAHs der Säugetiere und bakterieller DDAH relativ gering (~25 - 30 %). Trotzdem sind die Wechselwirkungen zwischen Substrat und dem bakteriellen Enzym mit den oben beschriebenen vergleichbar.^{95,242}

Für die Struktur von hDDAH-1-Inhibitoren scheinen die α -Carboxylfunktion sowie die α -Aminofunktion unverzichtbar, da von ihnen jeweils drei Wasserstoffbrücken zum aktiven Zentrum ausgebildet werden. Ebenfalls erscheint es, dass das N^{δ} -Atom und ein N^{ϵ} -Atom nicht substituiert sein dürfen, da es die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrücken verhindern würde. In Kap. 8 konnte die Bedeutung der Wasserstoffbrücke vom N^{δ} -Atom bereits für N^{δ} -methylierte L-Arginin-Derivate bestätigt werden, die nur eine sehr geringe Affinität zur hDDAH-1 besaßen.

Offensichtlich größere Variationsmöglichkeiten ergeben sich am substituierten N^{ϵ} -Atom, da hier auch voluminösere Substituenten als Methylgruppen toleriert werden, wie die Entdeckung des L-257 zeigt.¹⁷¹ Interessant ist hierbei auch, dass durch diesen größeren Rest eine andere Orientierung des Grundgerüsts im aktiven Zentrum erreicht wird, wie aus Abb. 9.1 ersichtlich ist.¹⁷² Über die Wechselwirkungen, die dieser N^{ϵ} -Substituent im aktiven Zentrum eingeht, ist bisher nicht viel bekannt.

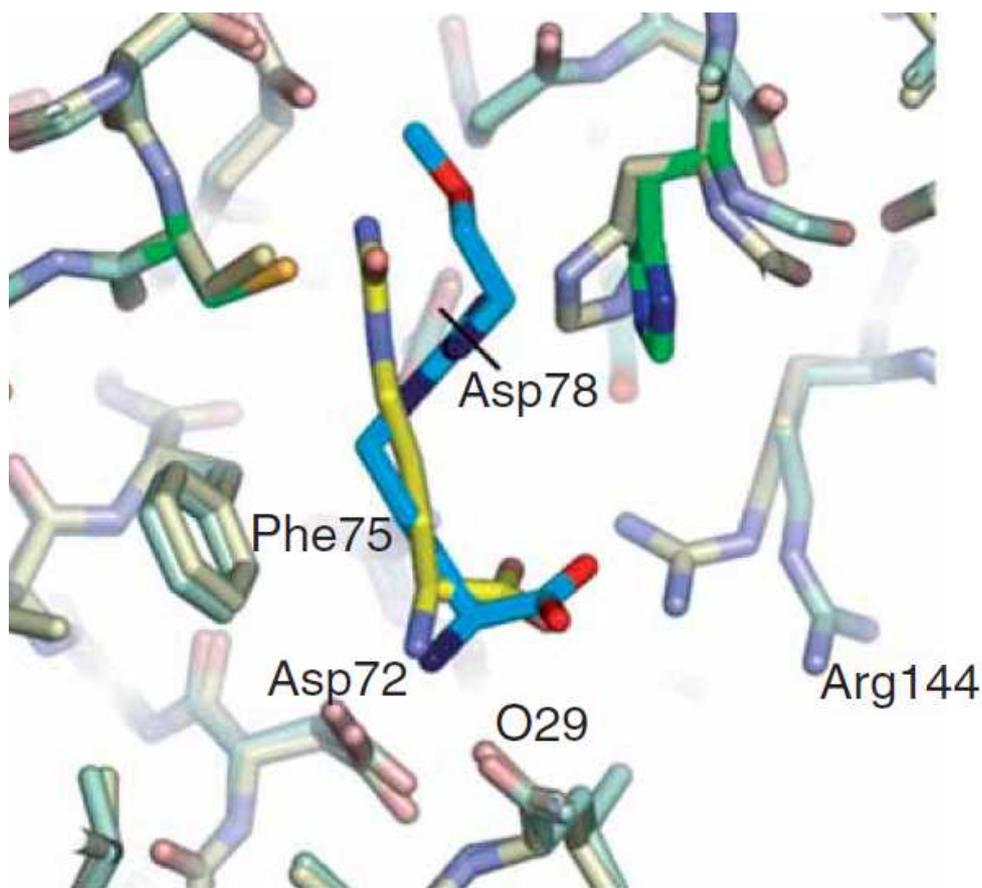


Abb. 9.1: Kristallstruktur der humanen DDAH-1 mit L-Citrullin (gelb) und L-257 (N^0 -(2-Methoxyethyl)-L-arginin) (blau) im aktiven Zentrum.¹⁷²

(Mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd. adaptiert: Leiper et al., Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* 2007, 13, 198-203)

Es ist bemerkenswert, dass L-257 im Rahmen eines Substanz-Screenings auf *nor*-L-Arginin-Basis gefunden wurde. Die potenteste N^0 -Substitution aus diesen Untersuchungen wurde anschließend auf L-Arginin übertragen und führte zu einer um den Faktor 8 potenteren Verbindung.¹⁷¹ Aufgrund dieser Beobachtung wurden ausführlichere Untersuchungen mit Inhibitoren auf L-Arginin-Basis durchgeführt, wobei auch die Selektivität dieser Verbindungen für die hDDAH-1 gegenüber der NO-Synthase untersucht wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue potente Inhibitoren für die hDDAH-1 entwickelt werden. Hierbei sollten insbesondere über Variationen des N^0 -Substituenten von L-Arginin neue Erkenntnisse über die Bindungstasche für diesen Substituenten gewonnen werden. Darüber hinaus wurde im Rahmen eines initialen Substanz-Screenings eine Vielzahl verschiedener Verbindungsklassen wie

Guanidine, Benzamidine, bekannte NOS-Inhibitoren und Forschungssubstanzen aus dem eigenen Arbeitskreis untersucht. Neben den L-Arginin-Derivaten wurden intensivere Untersuchungen mit den strukturell verwandten N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin- bzw. *N*-(2-Methoxyethyl)guanidin-Derivaten durchgeführt.

9.2 Materialien und Methoden

9.2.1 Materialien

9.2.1.1 Chemikalien

Sofern keine weiteren Angaben gemacht werden, wurden alle verwendeten Chemikalien über Sigma-Aldrich, Fluka, Merck oder Roth bezogen.

ABH ((*S*)-2-Amino-6-boronhexansäure), Vinyl-L-NIO (N^{δ} -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin), N^{ρ} -Propyl-L-arginin, 1400W, S-Ethylisothioharnstoff, L-NIL (N^{ϵ} -(1-Iminoethyl)-L-lysin), NMMA und Tetrahydro-L-biopterin (H_4B) wurden über Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) bezogen. L-NIO (N^{δ} -(1-Iminoethyl)-L-ornithin) und Me-NIO (N^{δ} -(1-Iminopropyl)-L-ornithin) wurden von Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA) erhalten. Die getesteten Pyridopyrimidine wurden von F. Friedrich und die substituierten Guanidine von Herrn Prof. Clement zur Verfügung gestellt.²⁴⁴ Alle N^{ρ} -substituierten L-Arginine, bis auf N^{ρ} -Nitro-L-arginin und N^{ρ} -Propyl-L-arginin, sowie die *N*-(2-Methoxyethyl)guanidine wurden ebenso wie MeO-Arg (N^{ρ} -Methoxyl-L-arginin) und decVNIO (*N*-(4-Aminobutyl)but-3-enamidin) im eigenen Arbeitskreis von D. Schade synthetisiert.^{245,246} ENIPO (N^{δ} -(1-Iminopent-3-enyl)-L-ornithin) und Ethyl-L-NIO (N^{δ} -(1-Iminobutyl)-L-ornithin) wurden von BogaR Laboratories LLC (Alpharetta, USA) erworben. Methanol Lichrosolv und Acetonitril Lichrosolv wurden von Acros Organics (Geel, Belgien) erhalten.

9.2.1.2 Geräte

Zur Durchführung der Inkubationen wurden 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Bei den 96-well Platten handelte es sich um klare unbehandelte Mikrotiterplatten der Firma Nunc (Wiesbaden), die mit einer hitzeresistenten Klebefolie (Nunc, Wiesbaden) verschlossen wurden.

Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) inkubiert. Zum Mischen der Proben wurde ein Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen) und ein IKA-Vibrax-VXR Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen) verwendet. Das Protein wurde durch Zentrifugation mit einer Mikroliter-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) abgetrennt. Die pH-Einstellung erfolgte mit einem pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit einer pH-Elektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Das Fließmittel für die HPLC wurde mit einem Sonorex Super Rk 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin) entgast. Die Inkubation der 96-well Platten erfolgte auf einem Schüttelinkubator DTS-4 (LTF Labortechnik, Wasserburg) und die anschließende Derivatisierung bei 95 °C in einem Trockenschrank Heraeus T6060 (Heraeus, Hanau). Die Mikrotiterplatten wurden photometrisch mit Hilfe eines Cary 50 UV-Vis Plattenreader-Photometers (Varian, Darmstadt) vermessen.

9.2.1.3 Enzyme

Die humane DDAH-1 (hDDAH-1) wurde, wie in Kapitel 7 beschrieben, exprimiert und aufgereinigt.

Die rekombinanten Isoenzyme der NO-Synthase (murine nNOS, murine iNOS und bovine eNOS) wurden ebenso wie das Calmodulin von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz) bezogen.

9.2.2 Analytische Methoden

9.2.2.1 HPLC-Methode

Die verwendete HPLC-Analytik entsprach der unter 7.2.2.1 angegebenen.

9.2.2.2 Kolorimetrischer Citrullin Plattenreader-Assay

9.2.2.2.1 Derivatisierung

Für die Derivatisierung von Citrullin wurden zwei Reagenz-Lösungen hergestellt:

Lösung A		Lösung B	
80 mM	Diacetylmonoxim	200 ml	85 % H ₃ PO ₄
2 mM	Thiosemicarbazid	330 ml	96 % H ₂ SO ₄
(Lagerung bei 4 °C => 1 Monat haltbar)		750 mg	NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O
		ad 1000 ml	<i>Aqua bidest.</i>

Das Derivatisierungs-Reagenz (Colder-Reagenz) wurde unmittelbar vor der Derivatisierung durch Mischen von einem Teil Lösung A mit drei Teilen Lösung B hergestellt und vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt aufbewahrt.

Die Derivatisierung erfolgte auf besonders hitzestabilen 96-well Mikrotiterplatten. Die Proben (150 µl) wurden mit 200 µl des Colder-Reagenz versetzt und die Platte zur Verhinderung von Verdunstung mit einer hitzestabilen Klebefolie verschlossen. Im Anschluss erfolgte die Farbentwicklung im Trockenschrank bei 95 °C über 15 - 20 min. Vor dem photometrischen Vermessen wurde gewartet bis die Platte Raumtemperatur erreicht hatte und dann die Farbintensität bei 540,5 nm gemessen. Das Vermessen erfolgte innerhalb von 20 min, da das Reaktionsprodukt nicht stabil ist.²⁴⁷

9.2.2.2.2 Bestimmung des Absorptionsmaximums

Zur Bestimmung des Absorptionsmaximums wurden 150 µl einer 100 µM L-Citrullin-Lösung, wie unter 9.2.2.2.1 angegeben, inkubiert. Mit den derivatisierten Proben wurde eine Aufnahme des Absorptionsspektrums von 400 - 700 nm durchgeführt.

9.2.2.2.3 Nichtenzymatische Hydrolyse von NMMA

Es wurde getestet, ob NMMA unter den Bedingungen der Derivatisierung selber ein farbiges Produkt bildet. Daher wurden 150 µl einer 1250 µM NMMA-Lösung, wie oben beschrieben (Kap. 9.2.2.2.1), inkubiert und anschließend derivatisiert.

9.2.2.2.4 Kalibrierung und Wiederfindung

Es wurde eine Zehnpunkt-Kalibrierung für L-Citrullin in dem Bereich zwischen 2,5 und 135 μM durchgeführt. Für die Wiederfindung wurde L-Citrullin in dem gleichen Konzentrationsbereich eingesetzt und mit 4 μg hitzedenaturiertem Protein versetzt. Die Proben wurden, wie unter 9.2.2.2.1 beschrieben, mit Colder-Reagenz versetzt, inkubiert und photometrisch vermessen.

9.2.3 Biochemische Methoden

9.2.3.1 Hemmstudien mit humaner DDAH-1

9.2.3.1.1 *In vitro* hDDAH-1-Assay (HPLC)

Ein Standard-Inkubationsansatz für die HPLC enthielt NMMA in einer Konzentration von 200 μM in 75 μl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4. Die Inhibitoren wurden in Endkonzentrationen von 1 mM eingesetzt. Durch Zugabe von 2 μg hDDAH-1 wurde die Reaktion gestartet und die Proben für 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Schüttelwasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 75 μl Acetonitril abgestoppt, die Proben für 5 min geschüttelt und zentrifugiert (12.000 g, 5 min). Der Überstand wurde der HPLC zugeführt (Kap. 9.2.2.1).

Zusätzlich wurden jeweils drei Inkubationen ohne Inhibitorzusatz durchgeführt und wie oben angegeben aufgearbeitet. Die in diesen Proben detektierte L-Citrullin-Konzentration wurde gleich 100 % gesetzt und die gebildeten Mengen L-Citrullin in den Proben mit Inhibitorzusatz auf diesen Wert bezogen. Darüber hinaus wurden jeweils zwei Kontrollinkubationen ohne NMMA als Substrat durchgeführt, um eine mögliche Umsetzung des potenziellen Inhibitors durch die hDDAH-1 zu testen.

9.2.3.1.2 IC_{50} -Wert Bestimmung (Plattenreader-Assay)

Die Proben für den Plattenreader-Assay wurden direkt auf der 96-well Mikrotiterplatte inkubiert. Ein Inkubationsansatz bestand aus 150 μl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 mit NMMA in einer Endkonzentration von 300 μM . Der Inhibitor wurde in fünf verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 4 μg rekombinanter hDDAH-1 gestartet. Zusätzlich wurden zwei Ansätze ohne Inhibitorzusatz inkubiert. Die Platte wurde mit einem Deckel verschlossen und über 30 min auf einem Platten-Inkubator bei 37 $^{\circ}\text{C}$

inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 200 μl des Colder-Reagenzes abgestoppt und das gebildete Citrullin, wie oben beschrieben (Kap. 9.2.2.2.1), derivatisiert. Anschließend wurde der IC_{50} -Wert mittels SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) berechnet.

9.2.3.1.3 K_i -Wert Bestimmung (Plattenreader-Assay)

Die K_i -Wert Bestimmung erfolgte, wie unter 9.2.3.1.2 beschrieben, mit dem Unterschied, dass fünf verschiedene NMMA-Konzentrationen (50, 100, 300, 750 und 1250 μM) eingesetzt wurden. Die Inkubationen wurden so durchgeführt, dass jede NMMA-Konzentration jeweils doppelt mit jeder der fünf Inhibitor-Konzentrationen inkubiert wurde. Darüber hinaus wurden Inkubationen mit den verschiedenen NMMA-Konzentrationen ohne Inhibitorzusatz durchgeführt.

Für jede Inhibitor-Konzentration wurde mit SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) der jeweilige K_m -Wert sowie V_{max} bestimmt. Über eine Sekundärauftragung der Inhibitor-Konzentration gegen K_m/V_{max} wurde durch Extrapolation der Ausgleichsgeraden auf die Abszisse der K_{ic} -Wert ermittelt. Eine Auftragung der Inhibitor-Konzentration gegen $1/V_{\text{max}}$ lieferte durch Extrapolation der Ausgleichsgeraden auf die Abszisse den K_{iu} -Wert.

9.2.3.1.4 K_m -Wert Bestimmung (Plattenreader-Assay)

Die Inkubationen für die K_m -Wert Bestimmung für N° -Methoxyl-L-arginin und N° -Pyrrolinyl-L-arginin erfolgten direkt auf der 96-well Mikrotiterplatte. Ein Inkubationsansatz bestand aus 150 μl 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 mit dem jeweiligen Substrat in Konzentrationen von 50, 75, 100, 200, 500, 750, 1000, 2500 und 5000 μM . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 μg rekombinanter hDDAH-1 gestartet und wie oben angegeben (Kap. 9.2.3.1.2) inkubiert und derivatisiert.

Zur K_m -Wert Bestimmung für NMMA wurden Konzentrationen von 50, 100, 300, 750 und 1250 μM NMMA eingesetzt.

Alle Ansätze wurden doppelt hergestellt und die komplette Bestimmung wiederholt.

9.2.3.2 *In vitro* NOS-Assay

Die Testung der Verbindungen an den drei Isoenzymen der NO-Synthase wurde von N. Muschick durchgeführt.²⁴⁸ Zur Testung wurde ein Oxyhämoglobin-Assay mit rekombinanten Isoenzymen der NO-Synthase verwendet.⁵

Oxyhämoglobin wurde entsprechend der Literaturangabe hergestellt.²⁴⁹ Ein Standard-Assay für eNOS und nNOS bestand aus einem Gesamtvolumen von 125 µl und enthielt 1 mM L-Arginin, 100 µM NADPH, 10 µM H₄B, 10 µg/ml Calmodulin, 1 mM CaCl₂ und 170 µM 1,4-Dithiotreitol in 50 mM HEPES-Puffer pH 7,4. Bei Inkubationen mit iNOS wurde auf die Zugabe von Calmodulin verzichtet und CaCl₂ gegen 1 mM MgCl₂ ausgetauscht.

Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen von 100 µM und 1 mM eingesetzt und 5 µM Oxyhämoglobin zugesetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des jeweiligen NOS-Isoenzym (40 µg eNOS, 20 µg iNOS bzw. 0,5 µg nNOS) gestartet und die Bildung von Methämoglobin bei 37°C über 3 min bei 401 nm gemessen. Als interner Standard wurde die Absorption am isosbestischen Punkt (411 nm) gemessen.

9.3.1.1 Bestimmung des Absorptionsmaximums

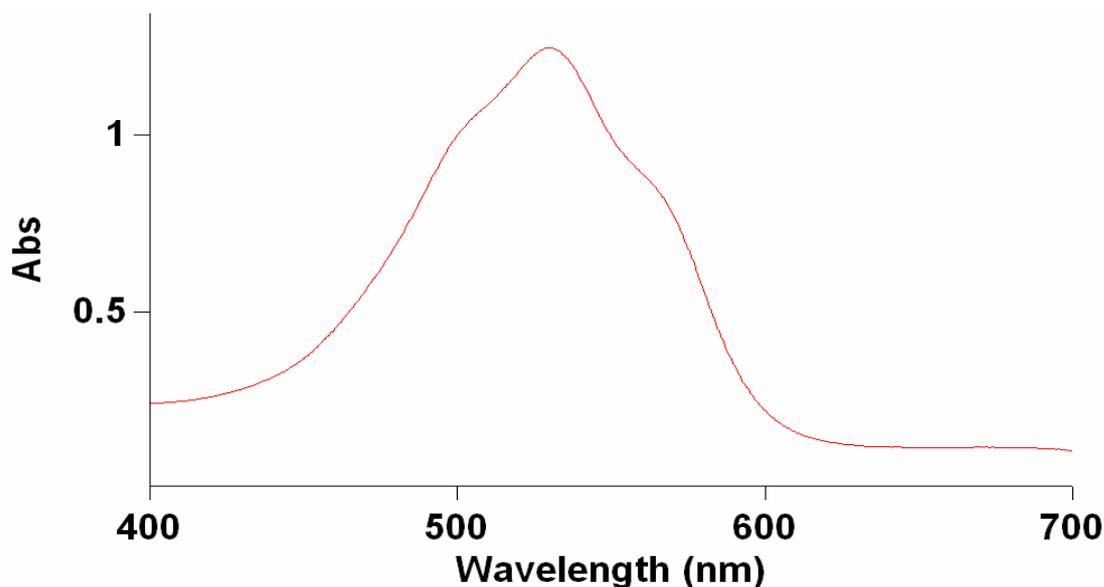


Abb. 9.3: Absorptionsspektrum des gebildeten Farbstoffes der Derivatisierung von 100 μM L-Citrullin mit Diacetylmonoxim in Gegenwart von konzentrierten Säuren, Thiosemicarbazid und Fe^{3+} -Ionen.

Das Absorptionsmaximum des gebildeten Farbstoffes liegt bei 530 nm (Abb. 9.3). Die Messung der Proben für die IC_{50} -, K_i - und K_m -Wert Bestimmung wurde jedoch bei einer Messwellenlänge von 540,5 nm durchgeführt, da entsprechend der Literaturangaben bei dieser Wellenlänge weniger Wechselwirkungen mit anderen Stoffen auftreten und die Absorption nur geringfügig geringer ist.²⁴⁷ Aus diesem Grund wurden Vergleichsmessungen von Proben bei 530 und 540,5 nm vorgenommen. Die Absorption bei 540,5 nm ist im Vergleich zur Absorption bei 530 nm auf 93 % reduziert, dennoch ist die Absorption hoch genug um eine zuverlässige Quantifizierung des gebildeten L-Citrullins in den Proben zu gewährleisten.

9.3.1.2 Nichtenzymatische Hydrolyse von NMMA

Frühere Untersuchungen zeigten, dass L-Arginin unter den Bedingungen der Derivatisierung zu einem geringen Prozentsatz von 0,6 % zu L-Citrullin hydrolysiert, was zu einer leichten Ungenauigkeit in der Bestimmung von Citrullin in diesem Assay führt.²⁴⁷ Aus diesem Grund wurde untersucht, ob diese Hydrolyse auch für NMMA zu beobachten ist. Hierzu wurde NMMA in einer Konzentration von 1250 μM unter den Bedingungen des Assays derivatisiert. Es konnte eine Bildung von 0,5 μM Citrullin detektiert werden, was einer nichtenzymatischen Hydrolyse

von lediglich 0,04 % entspricht. Diese minimale Ungenauigkeit hat keinen Einfluss auf die über diesen Assay ermittelten Citrullin-Konzentrationen.

9.3.1.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden waren über den untersuchten Bereich von 2,5 bis 135 μM linear ($R^2 > 0,993$). Die Wiederfindungsrate für L-Citrullin betrug 90 % (Abb. 9.4).

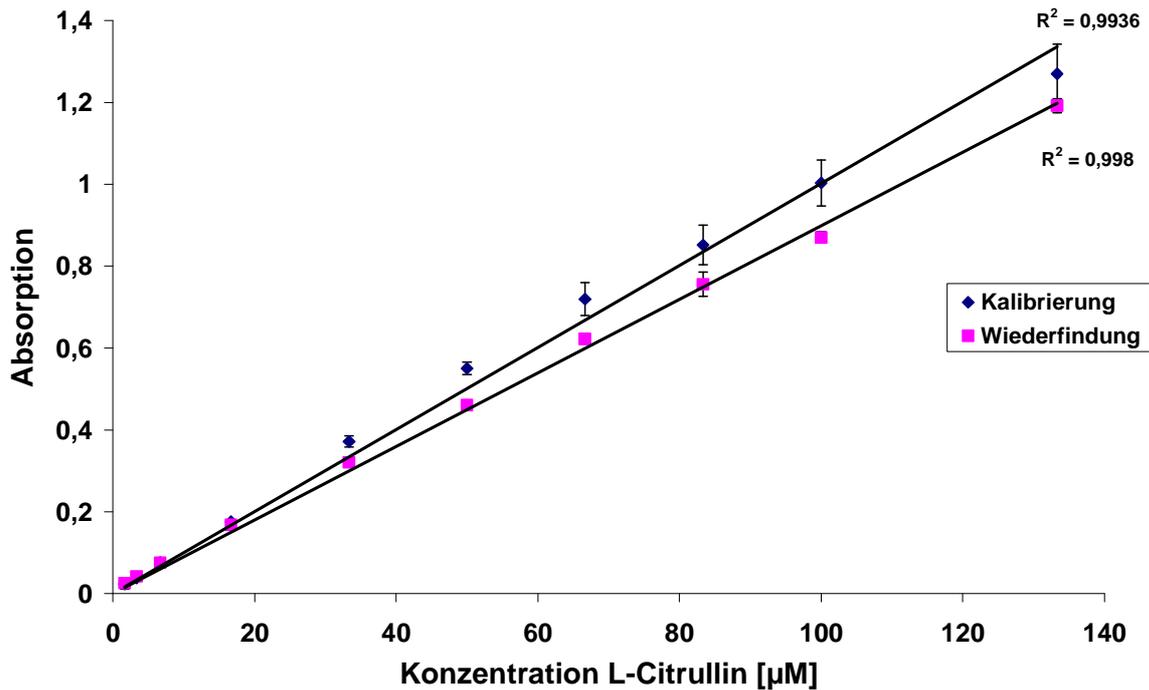


Abb. 9.4: Kalibrierung und Wiederfindung für L-Citrullin für den kolorimetrischen Plattenreader-Assay. Die ermittelten Absorptionen sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Ansätzen, die jeweils dreifach vermessen wurden.

9.3.2 Hemmstudien mit humaner DDAH-1

In einem initialen Substanz-Screening wurden substituierte Guanidine und Benzamide auf eine Hemmwirkung an der hDDAH-1 getestet. Darüber hinaus wurden bekannte NOS-Inhibitoren sowie neuere Forschungssubstanzen aus dem eigenen Arbeitskreis untersucht. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde die Hemmpotenz von N^{δ} -Iminoalk(en)yl-L-ornithin-Derivaten sowie N^{θ} -substituierten L-Argininen bestimmt. Zusätzlich wurden die potentesten Inhibitoren der PaDDAH, die Indolthiobarbitursäuren, als Vergleichsubstanzen erstmalig an der humanen DDAH-1 getestet.

Alle Verbindungen wurden initial in einer Konzentration von 1 mM getestet. Für alle Substanzen, die in einer Konzentration von 1 mM die enzymatische L-Citrullin-Bildung um mehr als 50 % hemmten, wurde im Weiteren eine IC_{50} - und K_i -Wert Bestimmung mit Hilfe des Plattenreader-Assays (Kap. 9.2.3.1.2 bzw. 9.2.3.1.3) durchgeführt und der jeweilige Hemmmechanismus der Substanz ermittelt.

Alle Verbindungen, für die K_i -Werte bestimmt wurden, zeigten einen kompetitiven Hemmmechanismus. Eine nichtkompetitive Hemmung konnte über eine doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk ausgeschlossen werden. Exemplarisch für alle untersuchten Verbindungen ist in Abb. 9.5 die doppelt-reziproke Auftragung der Hemmung von hDDAH-1 durch N^{θ} -Allyl-L-arginin dargestellt. Dieses Diagramm zeigt eindeutig, dass es sich um eine kompetitive und keine nicht-kompetitive Hemmung handelt.

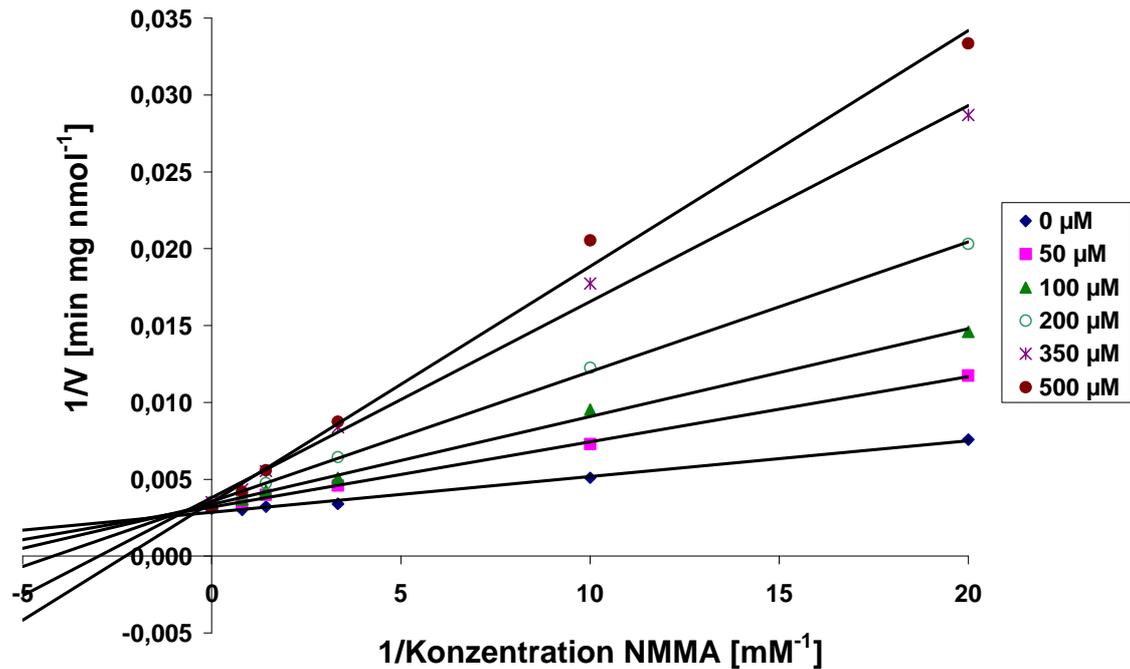


Abb. 9.5: Doppelt-reziproke Darstellung der Hemmung von hDDAH-1 durch *N*^p-Allyl-L-arginin in unterschiedlichen Konzentrationen von 0 – 500 µM.

Zur Bestimmung der K_i -Werte wurde für jede eingesetzte Inhibitor-Konzentration der jeweilige K_m -Wert sowie V_{max} bestimmt. Eine Auftragung der Inhibitor-Konzentration gegen $1/V_{max}$ zeigte für alle Verbindungen eindeutig, dass es sich um keinen unkompetitiven Hemmtyp handelt.

Über eine Auftragung der Inhibitor-Konzentration gegen K_m/V_{max} wurde durch Extrapolation der Ausgleichsgeraden auf die Abszisse der K_{ic} -Wert ermittelt. Das Diagramm für *N*^p-Allyl-L-arginin in Abb. 9.6. ist exemplarisch für alle anderen bestimmten K_{ic} -Werte dargestellt. Im Folgenden wird der K_{ic} -Wert als K_i -Wert bezeichnet.

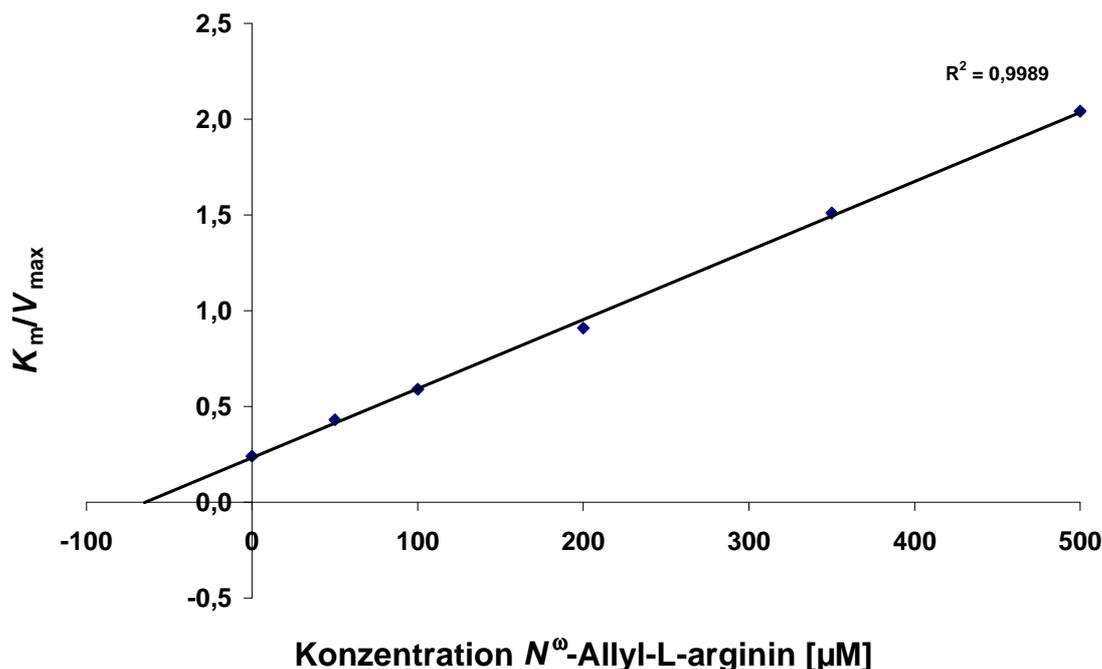


Abb. 9.6: Auftragung der Konzentration von N^ω -Allyl-L-arginin gegen den Quotienten aus K_m und V_{max} zur Bestimmung des K_{ic} -Wertes.

9.3.2.1 Guanidine

Obwohl die Kristallstruktur der bovinen DDAH-1 deutlich die Bedeutung der Aminosäurefunktion für die Bindung im aktiven Zentrum zeigt (Abb. 8.7),⁹⁵ sollten mit Hilfe der Untersuchungen von substituierten Guanidin-Derivaten Erkenntnisse gesammelt werden, ob die Aminosäure-Hauptkette durch einen aromatischen Rest substituiert werden kann bzw. ob zusätzlich von einem zweiten Rest eine weitere Bindungstasche für einen aromatischen Rest erreicht werden kann. Zusätzlich wurde mit *N,N*-Dimethylguanidin getestet, ob die Aminosäure-Hauptkette des ADMA für die Bindung im aktiven Zentrum der DDAH essenziell ist. Die Überlegung, dass einfache Guanidine als Inhibitoren für die DDAH in Frage kommen können, basiert auf der Beobachtung, dass die NO-Synthasen Guanidin-basierte Verbindungen ohne Aminosäurefunktion als Substrate akzeptieren.¹²³ Darüber hinaus sind auch Inhibitoren für die NOSs beschrieben worden, die keine Aminosäurefunktion besitzen wie Methylguanidin oder Aminoguanidin.^{251,252} Diese Entdeckungen sind beachtlich, da die Kristallstrukturen der NO-Synthase ebenso wie die der DDAH-1 zeigen, dass die Aminosäurefunktion von L-Arginin für die Affinität zum aktiven Zentrum eine entscheidende Rolle spielt.^{45,46,56}

Tab. 9.1: Übersicht über die Strukturen der getesteten substituierten Guanidine und deren Hemmwerte auf die hDDAH-1 bei einer Konzentration von 1 mM. Die dargestellten Daten sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

$$\begin{array}{c} R^2-N-R^3 \\ | \\ R^1-N=C-NH_2 \end{array}$$

R ¹	R ²	R ³	Hemmung bei 1 mM [%]
	H	H	9 ± 16
	H	H	< 1
	H	H	< 1
H	H ₃ C—	H ₃ C—	< 1
	H	H	< 1
		H	7 ± 5
			4 ± 12
	H ₃ C—	H ₃ C—	12 ± 9

Tab. 9.1 zeigt eine Übersicht über die getesteten mono-, di- oder trisubstituierten Guanidine und die bestimmten Hemmwerte. Wie hieraus ersichtlich ist, stellt keine der getesteten Verbindungen aus dieser Klasse einen potenten Inhibitor der hDDAH-1 dar. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aminosäurefunktion vermutlich essenziell und eine Wechselwirkung mit der DDAH nicht aufgrund hydrophober Interaktion möglich ist. Somit lassen sich die Beobachtungen, die an den NO-Synthasen erhalten wurden, nicht auf die DDAH übertragen.

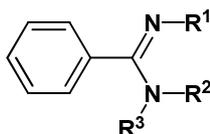
Die in der Einleitung (Kap. 9.1) dargestellten Wechselwirkungen der Guanidinstruktur zum Enzym können hingegen theoretisch auch von den getesteten Guanidinen ausgenutzt werden. Sollten diese Verbindungen zusätzlich

lipophile Wechselwirkungen über die aromatischen Reste im aktiven Zentrum eingehen, dann reichen diese für eine stabile Anlagerung nicht aus. Darüber hinaus ist natürlich denkbar, dass die aromatischen Reste zu voluminös für eine Anlagerung im aktiven Zentrum sind.

9.3.2.2 Benzamidine

Es wurden zwei verschieden substituierte Benzamidine als Inhibitoren der hDDAH-1 getestet (Tab. 9.2). Benzamidine können eine Vielzahl der in der Einleitung (Kap. 9.1) dargestellten Wechselwirkungen zum aktiven Zentrum der DDAH nicht eingehen. Lediglich die drei Wasserstoffbrücken zu Aspartat 78 bzw. Glutamat 77 können ausgebildet werden. Mit Hilfe dieser Verbindungen sollten Erkenntnisse gewonnen werden, ob durch den aromatischen Rest möglicherweise die lipophilen Wechselwirkungen zu Phenylalanin 75 und Leucin 171 verstärkt und hierdurch eine verbesserte Affinität zum Enzym erreicht werden kann. Jedoch zeigte keine dieser Verbindungen eine nennenswerte Hemmung der hDDAH-1. Somit scheinen auch bei dieser Verbindungsklasse weder die Amidfunktion noch die lipophilen Substituenten genügend Wechselwirkungen mit der hDDAH-1 einzugehen, um eine ausreichende Affinität zum aktiven Zentrum zu besitzen.

Tab. 9.2: Übersicht über die Strukturen der getesteten Benzamidin-Derivate und deren Hemmwerte auf die hDDAH-1 in einer Konzentration von 1 mM. Die dargestellten Daten sind MW \pm SD von zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.



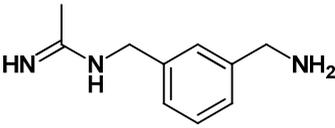
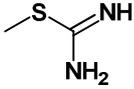
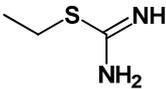
R ¹	R ²	R ³	Hemmung bei 1 mM [%]
	H	H	10 \pm 6
H ₃ C—	H ₃ C—	H ₃ C—	< 1

9.3.2.3 NO-Synthase- und Arginase-Inhibitoren

NO-Synthase-Inhibitoren

Es wurden einige bekannte NOS-Inhibitoren ohne strukturelle Ähnlichkeit zum L-Arginin an der hDDAH-1 getestet (Tab. 9.3). 1400W, ein sehr potenter iNOS-Inhibitor, zeigte nur eine geringe Hemmwirkung auf die hDDAH-1.¹³³ S-Methylisothioharnstoff hingegen stellt einen sehr potenten Inhibitor der hDDAH-1 dar und zeigt somit im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Kap. 9.3.2.1, dass eine Entwicklung von hDDAH-1-Inhibitoren ohne Aminosäurefunktion möglich ist. Allerdings ist der K_i -Wert für die NOS noch wesentlich geringer ($\sim 0,2 \mu\text{M}$ für NOSs; $145 \mu\text{M}$ für hDDAH-1), so dass eine Weiterentwicklung dieser Verbindungsklasse nicht erfolgversprechend erschien, da aus der Substanzklasse eine Vielzahl an Verbindungen mit K_i -Werten für die NOS bis zu $5,2 \text{ nM}$ detektiert wurden.¹³⁴ Die Entwicklung einer Substanz auf dieser Basis mit einer Selektivität für die hDDAH-1 scheint nicht möglich zu sein.

Tab. 9.3: Übersicht über die Strukturen der getesteten NOS-Inhibitoren und deren Hemmwerte auf die hDDAH-1 in einer Konzentration von 1 mM . Die dargestellten Daten sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden. n.b., nicht bestimmt.

Substanz		Hemmung bei 1 mM [%]	K_i [μM]
1400W		29 ± 7	n.b.
S-Methylisothioharnstoff		70 ± 3	145 ± 13
S-Ethylisothioharnstoff		10 ± 4	n.b.

Arginase-Inhibitoren

Die Arginase repräsentiert ein weiteres L-Arginin metabolisierendes Enzym. Die potentesten Inhibitoren für dieses Enzym stellen die Derivate auf Boronsäure-Basis dar. Exemplarisch wurde die Verbindung (S)-2-Amino-6-boronhexansäure (ABH) untersucht, welche als Aminosäure zumindest theoretisch die oben ausgeführten Wechselwirkungen der Aminosäurefunktion zum Enzym (Kap. 9.1) ausbilden kann. Jedoch konnte für die hDDAH-1 nur eine minimale Hemmwirkung detektiert werden (Tab. 9.4).

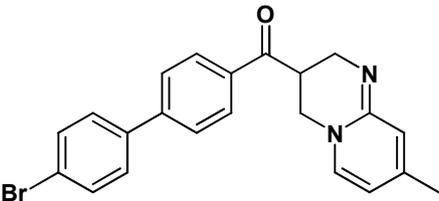
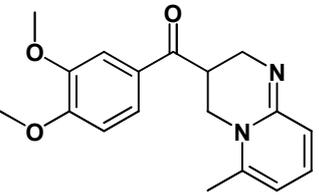
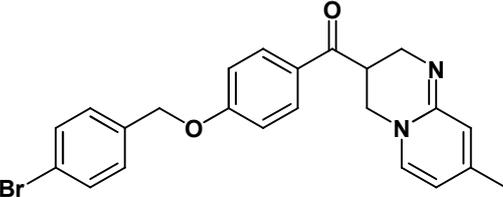
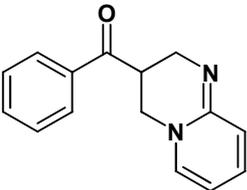
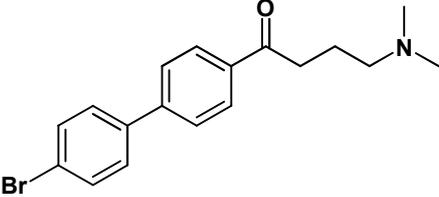
Tab. 9.4: Übersicht über die Struktur des getesteten Arginase-Inhibitor und dessen Hemmwerte auf die hDDAH-1 in einer Konzentration von 1 mM. Die dargestellten Daten sind MW \pm SD von zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Substanz		Hemmung bei 1 mM [%]
ABH		4 \pm 7

9.3.2.4 Pyrido[1,2-a]pyrimidine / Butyrophenone

Bei der Substanzklasse der Pyrido[1,2-a]pyrimidine bzw. Butyrophenone handelt es sich um potente Inhibitoren der NO-Synthase.^{244,253} Obwohl diese Verbindungen keine strukturelle Ähnlichkeit zu den physiologischen Substraten der DDAH besitzen, wurde getestet, ob sie die Aktivität der hDDAH-1 beeinflussen. Die durchgeführten Testungen zeigten, dass zwei dieser Substanzen die hDDAH-1 hemmen, jedoch nicht stark genug, um weitergehend untersucht zu werden (Tab. 9.5).

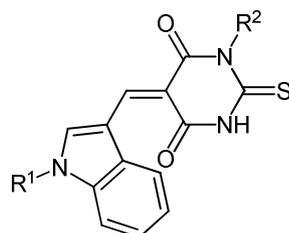
Tab. 9.5: Übersicht über die Strukturen der getesteten Pyrido[1,2-a]pyrimidine bzw. Butyrophenone und deren Hemmwerte auf die hDDAH-1 in einer Konzentration von 1 mM. Die dargestellten Daten sind $MW \pm SD$ von zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden. * aufgrund geringer Löslichkeit wurde die Testung bei 100 μM durchgeführt.

	Hemmung bei 1 mM [%]
	< 1 *
	< 1
	38 \pm 18
	< 1
	29 \pm 14

9.3.2.5 Indolthioarbitursäure-Derivate

Die Indolthioarbitursäuren repräsentieren die derzeit potentesten Inhibitoren der PaDDAH. Bisher wurden lediglich IC₅₀-Werte für die Indolthioarbitursäuren an der bakteriellen DDAH publiziert. Um eine bessere Vergleichbarkeit dieser Verbindungen mit den neu entwickelten Hemmstoffen zu ermöglichen, wurde die Hemmwirkung der beiden besten Verbindungen aus dieser Substanzklasse, SR445 und C741, auf die hDDAH-1 untersucht.¹⁸¹ Entgegen den Angaben von Hartzoulakis *et al.* waren beide Verbindungen im verwendeten Puffer schlecht löslich, so dass sie nur in einer Konzentration von 100 µM mit 20 % DMSO getestet werden konnten.¹⁸¹ Kontrollinkubationen bestätigten die Aktivität der hDDAH-1 bei einem 20 %igen DMSO-Zusatz.

Tab. 9.6: Übersicht über die Strukturen der getesteten Indolthioarbitursäuren und deren Hemmwerte auf die hDDAH-1 in einer Konzentration von 100 µM. Die dargestellten Daten sind MW ± SD von vier separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen wurden diese Verbindungen in einer Konzentration von 100 µM in 20 % DMSO getestet.



Substanz	R ¹	R ²	Hemmung bei 100 µM [%]
SR445	H		< 1
C741		H	< 1

Interessanterweise konnte an der humanen DDAH-1 keine Hemmwirkung sowohl für SR445, dem bisher potentesten Inhibitor der PaDDAH, als auch für C741 detektiert werden (Tab. 9.6). Somit zeigen die hier erhaltenen Daten erstmalig eine Spezies-Selektivität einer DDAH-Inhibitor-Klasse. Obwohl die Sequenzhomologie

zwischen der bakteriellen und den Säugetier DDAHs mit ~25 % relativ gering ist, ist das aktive Zentrum hochkonserviert.²⁴³ Trotzdem wurde bereits gezeigt, dass die DDAHs aus Säugetieren eine höhere Substratspezifität besitzen als das bakterielle Enzym.¹⁷⁷ Möglicherweise gilt dies auch für die Sensitivität gegenüber Inhibitoren, da diese Verbindungen im bakteriellen Enzym Bindungsaffinitäten ausnutzen, die im humanen Enzym nicht zur Verfügung stehen.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Hemmwirkungen an den verschiedenen DDAHs ist möglicherweise, dass die PaDDAH im Gegensatz zur Säugetier DDAH nur als Dimer aktiv ist.²⁴² Eventuell interagiert diese Stoffklasse mit der Dimerisierung des Enzyms und bewirkt über diesen Mechanismus die potente Hemmung.

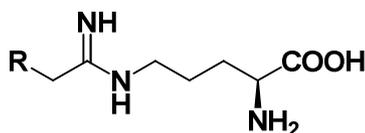
Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den Säugetier DDAH-1s (~92 - 95 %) kann angenommen werden, dass das hier erhaltene Ergebnis auf die anderen Säugetier DDAH-1s übertragen werden kann.^{93,177} Inwieweit das Ergebnis auch auf die DDAH-2s übertragen werden kann, muss im Rahmen weiterer Arbeiten untersucht werden, da die Sequenzhomologie zwischen der hDDAH-1 und den DDAH-2s geringer ist (~50 - 62).^{93,177} Möglicherweise stellt SR445 eine potente Leitstruktur in der Entwicklung von selektiven bakteriellen DDAH-Inhibitoren dar. Diese Inhibitoren können unter anderem therapeutische Anwendung bei chronischen Lungeninfektionen erlangen, da diese häufig durch das pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* verursacht werden. Während der Infektion wird das Lungengewebe vermutlich durch NO geschädigt. Daher wird spekuliert, dass eine Hemmung der bakteriellen DDAH die NO-Biosynthese und somit die Gewebeschäden reduzieren kann.^{181,243}

9.3.2.6 N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivate

9.3.2.6.1 Hemmung der hDDAH-1

Die Substanzklasse der N^{δ} -(1-Iminoethyl)-L-ornithin-Derivate (NIO) besitzt eine sehr hohe strukturelle Verwandtschaft zum L-Arginin mit dem Unterschied, dass die Guanidinstruktur durch eine Amidinfunktion ausgetauscht wurde. Alle getesteten Verbindungen dieser Klasse sind als potente Inhibitoren der NO-Synthese bekannt.^{142,143}

Tab. 9.7: Übersicht über die Strukturen der getesteten N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivate und deren Hemmwerte auf die hDDAH-1. Die dargestellten Daten für die Hemmung bei 1 mM sind $MW \pm SD$ von mindestens vier separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die IC_{50} - und K_i -Wert Bestimmung wurde mindestens doppelt durchgeführt. n.b., nicht bestimmt.

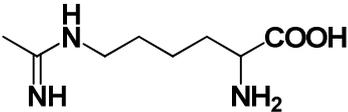


Substanz	R	Hemmung bei 1 mM [%]	IC_{50} [μ M]	K_i [μ M]
Vinyl-NIO		97 ± 3	13 ± 3	2 ± 1
Ethyl-NIO		78 ± 7	70 ± 21	32 ± 6
ENIPO		73 ± 8	79 ± 25	36 ± 3
Methyl-NIO		65 ± 8	300 ± 104	145 ± 15
NIO	H	24 ± 3	n.b.	n.b.

Die Verbindungen dieser Substanzklasse zeigen eine hohe Hemmpotenz auf die hDDAH-1 (Tab. 9.7). Insbesondere Vinyl-NIO repräsentiert einen sehr potenten Inhibitor der hDDAH-1. Der ermittelte K_i -Wert ist um den Faktor 6 geringer als der für L-257 (Tab 9.10). Folglich wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Vinyl-NIO der derzeit potenteste Inhibitor der hDDAH-1 identifiziert. Die strukturell leicht abgeänderten Derivate Ethyl-NIO und ENIPO zeigen einen um den Faktor 15 höheren K_i -Wert. Eine Verkürzung des Substituenten (Methyl-NIO, NIO) resultiert in einem weiteren Affinitätsverlust.

Neben den Verbindungen auf L-Ornithin-Basis wurde getestet, wie sich eine Kettenverlängerung um eine Methyleneinheit in der Hauptkette der Aminosäure auf die Hemmpotenz auswirkt. Hierfür wurde die Hemmpotenz von NIL bestimmt (Tab. 9.8). Der Vergleich der Hemmpotenz von NIL (13 % Hemmung bei 1 mM) und NIO (24 % Hemmung bei 1 mM) zeigt, dass eine Verlängerung der Aminosäure-Hauptkette zu einer Abnahme der Hemmwirkung führt.

Tab. 9.8: Übersicht über die Struktur von *N*^ε-(1-Iminoethyl)-L-lysin (NIL) und dessen Hemmwerte auf die hDDAH-1. Die dargestellten Daten sind *MW* ± *SD* von zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Substanz		Hemmung bei 1 mM [%]
NIL		13 ± 8

Die Verbindungen auf *N*^δ-(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Basis stellen strukturell optimale Substanzen für die Einlagerung im aktiven Zentrum der hDDAH-1 dar. Alle Wasserstoffbrücken, die aus der Kristallstruktur der bovinen DDAH-1 ersichtlich sind (Kap. 9.1, Abb 8.7), können von diesen Verbindungen ausgenutzt werden: Die sechs Wasserstoffbrücken bzw. ionische Wechselwirkungen von der α -Amino- bzw. der α -Carboxylfunktion können ebenso ausgebildet werden wie die drei Wasserstoffbrücken von der Amidinstruktur. Genaue Aussagen über die Wechselwirkung, die der Alk(en)yl-Rest eingeht, können nur anhand einer Röntgenkristallstrukturanalyse getroffen werden. Jedoch scheint es, als ob die Doppelbindung zur Affinität zum Enzym beiträgt, da Vinyl-NIO wesentlich potenter als Ethyl-NIO ist. Darüber hinaus zeigt eine Verkürzung des *N*^δ-Substituenten einen drastischen Verlust an Hemmpotenz, wohingegen eine Verlängerung des Substituenten zu einem geringeren Wirkverlust führt.

9.3.2.6.2 Hemmung der NOS-Isoenzyme

Alle Verbindungen wurden auf eine Hemmwirkung an den drei Isoenzymen der NO-Synthase untersucht. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass alle Verbindungen ebenfalls potente Inhibitoren der NOSs darstellen (Tab. 9.9).

Tab. 9.9: Hemmdaten für die Verbindungen auf N^{β} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Basis an den drei Isoenzymen der NO-Synthase. Die dargestellten Daten sind $MW \pm SD$ von mindestens drei separaten Inkubationen. Die Testung wurde von N. Muschick übernommen.²⁴⁸ Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 9.7 und Tab. 9.8.

Substanz	Hemmung bei 100 μ M [%]			Hemmung bei 1 mM [%]		
	nNOS	eNOS	iNOS	nNOS	eNOS	iNOS
Vinyl-NIO	94 \pm 3	45 \pm 2	84 \pm 1	100 \pm 1	88 \pm 3	100 \pm 1
Ethyl-NIO	34 \pm 8	20 \pm 6	80 \pm 3	100 \pm 1	54 \pm 3	100 \pm 1
ENIPO	12 \pm 11	27 \pm 8	6 \pm 2	70 \pm 8	36 \pm 1	21 \pm 11
Methyl-NIO	77 \pm 2	20 \pm 3	72 \pm 2	100 \pm 1	85 \pm 6	100 \pm 1
NIO	75 \pm 4	80 \pm 5	84 \pm 3	100 \pm 1	100 \pm 1	100 \pm 1
NIL	30 \pm 9	35 \pm 10	100 \pm 1	90 \pm 1	56 \pm 3	100 \pm 1

Die geringste Hemmwirkung wurde für ENIPO detektiert. Diese Beobachtung deckt sich mit Literaturdaten, nach denen die NOSs keine größeren Substituenten als einen Propyl-Rest in der N^{β} -Position des L-Arginins akzeptieren. Eine weitere Verlängerung des Substituenten resultiert in einem Verlust an Affinität zur NO-Synthase.⁵⁶ Möglicherweise stellt eine Verlängerung des N^{β} -Alkenylrestes des ENIPOs eine Option in der Entwicklung selektiver hDDAH-1-Inhibitoren dar. Allerdings zeigen die Ergebnisse in Tab 9.7, dass eine Verlängerung des Substituenten auch die Affinität zur hDDAH-1 senkt. Der potente DDAH-Inhibitor L-257 besitzt einen noch längeren Substituenten und nimmt eine andere Orientierung als L-Citrullin im aktiven Zentrum der DDAH ein (Abb. 9.1).¹⁷² Eventuell kann diese Einlagerung im aktiven Zentrum auch für ENIPO durch eine Verlängerung des N^{β} -Substituenten erreicht werden und zu einer erhöhten Affinität zum aktiven Zentrum führen.

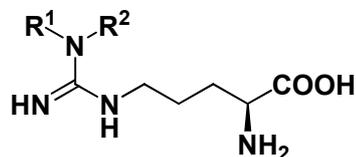
9.3.2.7 N^0 -substituierte L-Arginin-Derivate

9.3.2.7.1 Hemmung der hDDAH-1

Die erhaltenen Ergebnisse aus den Studien auf N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Basis (Kap. 9.3.2.6) wurden im Folgenden auf L-Arginin übertragen. Dementsprechend wurden L-Arginin-Derivate mit N^0 -Alkyl- und N^0 -Alkenylsubstituenten als Inhibitoren für die hDDAH-1 untersucht.

Darüber hinaus wurden eine Vielzahl weiterer N^0 -substituierter L-Arginin-Derivate untersucht wie zum Beispiel N^0 -(2,2,2-Trifluorethyl)-L-arginin (Tfe-Arg), N^0 -(2-Carbamoylethyl)-L-arginin (Carb-Arg) und N^{δ} -[(Aminomorpholino)methyliden]-L-ornithin (MO-Arg) (Tab. 9.10). Ein größeres Substanz-Screening auf L-Arginin-Basis wurde an der hDDAH-1 bisher nicht durchgeführt, da viele Verbindungen aus dieser Klasse als potente Inhibitoren der Isoenzyme der NOS bekannt sind.^{139,140,254} Jedoch ist die Entwicklung von DDAH-selektiven Inhibitoren aus dieser Klasse möglich, wie die Entdeckung von N^0 -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257) verdeutlicht.¹⁷¹ Wie in der Einleitung (Kap 9.1) ausgeführt wurde, ist über die Bindung des N^0 -Substituenten von L-Arginin-basierten Inhibitoren bzw. Substraten wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe der getesteten Verbindungen weitere Erkenntnisse über diese Bindungstasche erhalten werden. Im Vordergrund stand die Untersuchung des Einflusses von Mehrfachbindungen. Neben diesen Verbindungen wurde L-257 als Referenz in dem verwendeten Testsystem getestet. Der K_i -Wert für L-257 wurde zu 13 μM bestimmt und ist somit im Vergleich zu dem von Vinyl-NIO ($K_i = 2 \mu\text{M}$) um den Faktor 6 höher.

Tab. 9.10: Übersicht über die Strukturen der getesteten N^0 -substituierten L-Arginin-Derivate und deren Hemmwerte auf die hDDAH-1. Die dargestellten Daten für die Hemmung bei 1 mM sind $MW \pm SD$ von mindestens vier separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die IC_{50} - und K_i -Wert Bestimmung wurde mindestens doppelt durchgeführt. n.b., nicht bestimmt.



Substanz	R ¹	R ²	Hemmung bei 1 mM [%]	IC ₅₀ [μM]	K _i [μM]
L-257		H	89 ± 2	29 ± 7	13 ± 2
Propyl-Arg		H	60 ± 6	283 ± 12	90 ± 5
Allyl-Arg		H	70 ± 3	207 ± 10	58 ± 9
Butenyl-Arg		H	71 ± 3	189 ± 10	57 ± 9
Propargyl-Arg		H	83 ± 7	55 ± 8	17 ± 5
Tfe-Arg		H	41 ± 1	n.b.	n.b.
Nitro-Arg		H	6 ± 4	n.b.	n.b.
Carb-Arg		H	43 ± 2	n.b.	n.b.
MO-Arg			23 ± 3	n.b.	n.b.
Pyr-Arg			10 ± 4	n.b.	n.b.

Die meisten der Verbindungen aus dieser Substanzklasse zeigen gute Hemmwirkungen. Insbesondere N^0 -Propargyl-L-arginin weist eine sehr potente Hemmwirkung auf, die beinahe der von L-257 entspricht. Die K_i -Werte betragen 13 μM für L-257 und 17 μM für N^0 -Propargyl-L-arginin. Alle anderen untersuchten Substanzen auf L-Arginin-Basis zeigen eine geringere Potenz.

Somit führte die Testung der N^0 -substituierten L-Arginine zu keinen Inhibitoren mit einer stärkeren Hemmpotenz als L-257. Allerdings lassen sich mit Hilfe der Ergebnisse aus Tab. 9.10 neue Erkenntnisse über die Struktur-Aktivitätsbeziehung

gewinnen: Insbesondere Mehrfachbindungen scheinen die Affinität zum aktiven Zentrum der humanen DDAH-1 zu verstärken. Alle im Rahmen der Arbeit untersuchten Verbindungen mit Doppel- oder Dreifachbindung (N^{ω} -Propargyl-, N^{ω} -Allyl- und N^{ω} -(But-3-enyl)-L-arginin) sind potente Inhibitoren der hDDAH-1, während die Verbindungen ohne Mehrfachbindung eine wesentlich schwächere Affinität besitzen. Dies wird deutlich beim Vergleich der K_i -Werte von N^{ω} -Propargyl-L-arginin (17 μ M) und N^{ω} -Allyl-L-arginin (58 μ M) mit N^{ω} -Propyl-L-arginin (90 μ M).

Die Struktur von L-257 hingegen besitzt keine Doppelbindung, stattdessen sind freie Elektronenpaare in der Etherfunktion vorhanden. Diese scheinen im selben Maße an der Bindung zur DDAH-1 beteiligt zu sein, was eine Erklärung für die effektive Hemmung der hDDAH-1 durch L-257 darstellen könnte. Aus diesem Grund wurden Verbindungen mit freien Elektronenpaaren in der N^{ω} -Substitution untersucht wie das Carb-Arg oder das N^{ω} -Nitro-L-arginin. Diese Verbindungen zeigten jedoch nur eine geringe Hemmwirkung (Tab. 9.10).

Als weitere Variation in der N^{ω} -Substitution wurden zyklische Derivate wie MO-Arg und N^{ω} -[(Amino-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)methyliden]-L-ornithin (Pyr-Arg) an der hDDAH-1 getestet. Beide Verbindungen besitzen entweder π -Elektronen oder freie Elektronenpaare, mit denen eine erhöhte Affinität zum aktiven Zentrum erreicht werden sollte. Jedoch zeigten beide Substanzen lediglich eine geringe Hemmpotenz. Dieses Ergebnis ist insbesondere für MO-Arg überraschend, da es sich bei dieser Substanz um ein zyklisches Derivat des L-257s handelt. Pyr-Arg hingegen repräsentiert ein zyklisiertes Derivat des N^{ω} -Allyl-L-arginins und bewirkt ebenfalls eine nur sehr geringe Hemmung des Enzyms. Somit zeigen die im Rahmen der Arbeit erhaltenen Daten, dass eine Zyklisierung des N^{ω} -Substituenten wahrscheinlich keine Option in der Entwicklung von Inhibitoren für die hDDAH-1 darstellt. Über die Bindungstasche für diesen Rest ist trotz publizierter Kristallstrukturen noch nicht viel bekannt, aber es scheint als würde eine Zyklisierung und ein damit verbundener Verlust an Rotationsfreiheit des N^{ω} -Substituenten die Affinität zum aktiven Zentrum reduzieren.

9.3.2.7.2 Hemmung der NOS-Isoenzyme

N^0 -substituierte L-Arginine sind als potente Inhibitoren der NOS bekannt.^{139,140,254} Jedoch zeigt L-257 nur eine minimale Hemmung der NOSs, so dass die Entwicklung von DDAH-selektiven Verbindungen aus dieser Klasse möglich ist.¹⁷¹ Im Rahmen der durchgeführten Hemmstudien mit allen Isoformen der NOS sollten weitere Erkenntnisse gesammelt werden, über welche Modifikation der N^0 -Substitution möglicherweise eine Selektivität für die DDAH erzielt werden kann. Die Hemmstudien zeigten, dass die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten potenten hDDAH-1-Inhibitoren (N^0 -Propargyl-L-arginin und N^0 -Allyl-L-arginin) eine deutliche Hemmung der NOSs bewirken (Tab. 9.11).

Tab. 9.11: Hemmdaten für die N^0 -substituierten L-Arginin-Derivate an den drei Isoenzymen der NO-Synthese. Die dargestellten Daten sind $MW \pm SD$ von mindestens drei separaten Inkubationen. Die Testung wurde von N. Muschick übernommen.²⁴⁸ Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 9.10.

Substanz	Hemmung bei 100 μ M [%]			Hemmung bei 1 mM [%]		
	nNOS	eNOS	iNOS	nNOS	eNOS	iNOS
L-257	4 \pm 12	4 \pm 7	0 \pm 13	12 \pm 8	10 \pm 5	0 \pm 13
Propyl-Arg	68 \pm 3	15 \pm 10	0 \pm 3	100 \pm 1	55 \pm 6	2 \pm 15
Allyl-Arg	68 \pm 2	21 \pm 5	30 \pm 8	100 \pm 1	75 \pm 5	100 \pm 1
Butenyl-Arg	0 \pm 11	16 \pm 5	0 \pm 3	14 \pm 4	35 \pm 5	40 \pm 8
Propargyl-Arg	71 \pm 3	20 \pm 4	58 \pm 4	100 \pm 1	87 \pm 2	100 \pm 1
Tfe-Arg	17 \pm 4	15 \pm 1	0 \pm 9	34 \pm 4	30 \pm 6	23 \pm 6
Nitro-Arg	100 \pm 1	100 \pm 1	91 \pm 8	100 \pm 1	100 \pm 1	100 \pm 1
Carb-Arg	11 \pm 5	15 \pm 10	0 \pm 7	14 \pm 4	37 \pm 6	30 \pm 6
MO-Arg	0 \pm 9	5 \pm 7	3 \pm 2	17 \pm 5	15 \pm 11	22 \pm 6
Pyr-Arg	13 \pm 2	11 \pm 6	36 \pm 9	23 \pm 7	32 \pm 3	52 \pm 2

Eine Ausnahme stellt das N^0 -Butenyl-L-arginin dar, das in einer Konzentration von 100 μ M nur eine geringe Hemmung der NOSs zeigt. Ebenso wie bei den Derivaten auf N^{δ} -(1-Iminoalkenyl)-L-ornithin-Basis scheint eine Verlängerung des N^0 -Substituenten möglicherweise eine Option in der Entwicklung einer Selektivität

für die hDDAH-1 darzustellen. Andere getestete Verbindungen zeigen ebenfalls eine geringe NOS Hemmung, allerdings ist die Hemmpotenz dieser Verbindungen auf die hDDAH-1 nur gering, so dass diese Verbindungen nicht weiter verfolgt wurden.

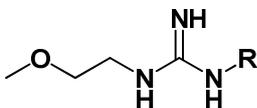
9.3.2.8 *N*-(2-Methoxyethyl)guanidine

9.3.2.8.1 Hemmung der hDDAH-1

Die vorangegangenen Untersuchungen (Kap. 9.3.2.6 und 9.3.2.7) zeigten, dass N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl-L-ornithin- bzw. N^{ϵ} -Alkenyl-L-arginin-Derivate potente Inhibitoren der hDDAH-1 darstellen. Jedoch besitzen diese Verbindungen im Gegensatz zu L-257 keine Selektivität für die DDAH gegenüber der NOS. Wie Abb. 9.1 zeigt, lagert sich L-257 in einer anderen Konformation im aktiven Zentrum der DDAH an als L-Citrullin.¹⁷² Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, mit Hilfe von Variationen in der Aminosäuren-Hauptkette des L-257s eine weitere Optimierung der Hemmpotenz beziehungsweise eine Steigerung der Selektivität für die hDDAH-1 gegenüber der NOS zu erreichen. Hierzu wurden *N*-(2-Methoxyethyl)guanidine mit verschiedenen *N'*-Substituenten getestet, um insbesondere die Signifikanz der α -Carboxyl- bzw. α -Aminofunktion für die Hemmwirkung zu untersuchen.

Die getesteten Substanzen sowie deren Hemmdaten sind in Tab. 9.12 aufgelistet.

Tab. 9.12: Übersicht über die Strukturen der getesteten *N*-(2-Methoxyethyl)guanidine und deren Hemmwerte auf die hDDAH-1. Die dargestellten Daten für die Hemmung bei 1 mM sind $MW \pm SD$ von mindestens vier separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden. Die IC_{50} - und K_i -Wert Bestimmung wurde mindestens doppelt durchgeführt. n.b., nicht bestimmt.



Substanz	R	Hemmung bei 1 mM [%]	IC_{50} [μM]	K_i [μM]
L-257		89 ± 2	29 ± 7	13 ± 2
CbMEG		42 ± 6	n.b.	n.b.
AbMEG		80 ± 5	70 ± 16	18 ± 6
PenMEG		11 ± 9	n.b.	n.b.
3-MeBuMEG		25 ± 6	n.b.	n.b.
TryMEG		19 ± 3	n.b.	n.b.

Die erhaltenen Hemmdaten zeigen, dass der Verlust sowohl der α -Carboxyl- als auch der α -Aminofunktion (PenMEG) zu einer Verbindung mit geringer Hemmpotenz führt. Auch der Einsatz einer verzweigten Alkylkette (3-MeBuMEG) steigert die Hemmpotenz nur geringfügig. Ebenso besitzt das L-257-Analogon ohne α -Aminofunktion (CbMEG) eine schwächere Potenz. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wird der Verlust der α -Carboxylgruppe sehr gut toleriert. Der K_i -Wert für *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin (AbMEG) ist im Vergleich zum L-257 nur geringfügig höher ($18 : 13 \mu M$). Dieser geringe Verlust an Hemmpotenz ist überraschend, da die Kristallstrukturen für L-Citrullin und ADMA deutlich zeigen, dass durch den Verlust der α -Carboxylfunktion drei Wasserstoffbrückenbindungen nicht mehr ausgebildet werden und ein stärkerer Affinitätsverlust zu erwarten wäre (Abb. 8.7).^{95,242} Die Kristallstruktur in Abb. 9.1 zeigt hingegen eine andere Konformation von L-257 im aktiven Zentrum. Diese andere Anlagerung bewirkt ein

Verschieben eines Histidin-Restes der hDDAH-1 und eine andere Orientierung von Arg 144, der Aminosäure, die normalerweise zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur Carboxylgruppe von L-Citrullin ausbildet. Dadurch bildet L-257 keine Wechselwirkungen zu diesem Arginin-Rest aus. Der 2-Methoxyethyl-Rest der untersuchten Guanidine scheint ausreichend zu sein, dass diese Verbindungen ebenfalls die Konformation des L-257s im aktiven Zentrum einnehmen, was als Erklärung dafür dient, dass diese Verbindung keine Carboxylgruppe für eine potente Hemmung benötigt. Durch den Wegfall der α -Carboxylgruppe wird die Selektivität gegenüber der NO-Synthase verbessert (Kap. 9.3.2.8.2) und die pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindung erhöht, da der bevorzugte Absorptionsmechanismus eines Arzneistoffes die passive Diffusion darstellt. Diese ist für eine hydrophile zwitterionische Aminosäure sehr gering. Durch die Entfernung der geladenen Carboxylgruppe ist eine erhöhte Resorption durch passive Diffusion zu erwarten. Aus diesen Gründen scheint die Weiterentwicklung von AbMEG zu einem Arzneistoff aussichtsreicher als die von L-257.

Eine geringe Hemmung bewirkt das TryMEG mit einem Indol-Rest im *N*-Substituenten. Die Entwicklung dieser Verbindung basiert auf der Entdeckung der Indolthiobarbitursäure-Derivate als potente Inhibitoren der PaDDAH. In den durchgeführten Modelling Studien wurde gezeigt, dass sich der Indol-Rest dieser Verbindungen in der PaDDAH dort anlagert, wo normalerweise die Aminosäure-Hauptkette des L-Arginins gebunden wird.¹⁸¹ Wie in Kap. 9.3.2.5 gezeigt wurde, besitzt diese Substanzklasse keine Hemmpotenz für die hDDAH-1. Möglicherweise kann der Indol-Rest nicht im humanen Enzym angelagert werden.

9.3.2.8.2 Hemmung der NOS-Isoenzyme

Die Hemmstudien mit den *N*-(2-Methoxyethyl)guanidin-Derivaten an den Isoformen der NO-Synthase zeigten eine nur sehr geringe Beeinflussung der Aktivität der NOSs und somit eine deutliche Selektivität dieser Verbindungen für die hDDAH-1 gegenüber der NOSs (Tab. 9.13).

Tab. 9.13: Hemmdaten für die *N*-(2-Methoxyethyl)guanidin-Derivate an den drei Isoenzymen der NO-Synthase. Die dargestellten Daten sind $MW \pm SD$ von mindestens drei separaten Inkubationen. Die Testung wurde von N. Muschick übernommen.²⁴⁸ Für eine Übersicht der Strukturen siehe Tab. 9.12.

Substanz	Inhibition at 100 μ M [%]			Inhibition at 1 mM [%]		
	nNOS	eNOS	iNOS	nNOS	eNOS	iNOS
CbMEG	0 \pm 5	4 \pm 9	0 \pm 2	5 \pm 4	13 \pm 4	2 \pm 6
AbMEG	0 \pm 9	4 \pm 6	0 \pm 10	0 \pm 8	13 \pm 5	0 \pm 13
PenMEG	0 \pm 8	0 \pm 1	8 \pm 6	0 \pm 8	0 \pm 4	21 \pm 4
3MeBuMEG	5 \pm 6	14 \pm 2	0 \pm 3	0 \pm 1	19 \pm 10	4 \pm 12
TryMEG	19 \pm 10	12 \pm 5	7 \pm 5	6 \pm 6	17 \pm 1	15 \pm 1

Im Vergleich zu L-257 (Tab. 9.11) zeigt AbMEG eine noch geringere Hemmung der NOS-Isoformen. Möglicherweise kann durch einen Verzicht auf die α -Carboxylfunktion der *N*⁰-substituierten L-Arginin- oder *N*^δ-(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivate eine Selektivität für die hDDAH-1 erzielt werden. Des Weiteren erhalten die entsprechenden Verbindungen, wie unter 9.3.2.8.1 diskutiert, durch den Verzicht auf die α -Carboxylfunktion bessere pharmakokinetische Eigenschaften.

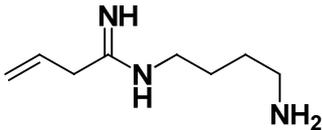
9.3.2.9 *N*-(4-Aminobutyl)but-3-enamidin

9.3.2.9.1 Hemmung der hDDAH-1

In einem weiteren Versuch hDDAH-1 selektive Inhibitoren zu generieren, sollten die erhaltenen Ergebnisse aus den Studien mit *N*-(2-Methoxyethyl)guanidinen (Kap. 9.3.2.8) auf den potentesten Inhibitor der hDDAH-1, Vinyl-NIO (Kap. 9.3.2.6), übertragen werden. Dazu wurde die Hemmpotenz von *N*-(4-Aminobutyl)but-3-enamidin (decVNIO), einem Vinyl-NIO-Analogen ohne α -Carboxylfunktion, getestet. Der Verzicht auf die α -Carboxylfunktion führte bei L-257 zu einem Anstieg des K_i -Wertes um den Faktor 1,5. Wäre dieser Verlust an Hemmpotenz auf das decarboxylierte Vinyl-NIO zu übertragen, würde diese Verbindung einen K_i -Wert von 3 μ M besitzen und möglicherweise eine bessere Selektivität für die hDDAH-1 aufweisen.

Die Hemmstudien zeigten allerdings, dass der Verzicht auf die α -Carboxylfunktion bei Vinyl-NIO zu einem beträchtlichen Verlust an Hemmwirkung führte (Tab. 9.14).

Tab. 9.14: Übersicht über die Struktur von *N*-(4-Aminobutyl)but-3-enamidin (decVNIO) und dessen Hemmwert auf die hDDAH-1. Die dargestellten Daten sind $MW \pm SD$ von vier separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden.

Substanz		Hemmung bei 1 mM [%]
decVNIO		40 ± 6

Dieser Unterschied zwischen den decarboxylierten Verbindungen von L-257 und Vinyl-NIO ist wahrscheinlich anhand der unterschiedlichen Anlagerung im aktiven Zentrum der DDAH-1 zu erklären (Abb. 9.1). Durch die andere Orientierung des L-257s im aktiven Zentrum erreicht ein Histidin-Rest im aktiven Zentrum eine andere Konformation und bewirkt eine von der α -Carboxylfunktion abgewandte Orientierung des Arginins 144, das normalerweise zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu dieser α -Carboxylfunktion ausbildet.¹⁷² Daher wird bei den Substanzen auf *N*-(2-Methoxyethyl)guanidin-Basis der Verlust der

α -Carboxylfunktion toleriert, wohingegen diese funktionelle Gruppe für andere Inhibitoren unverzichtbar erscheint.

9.3.2.9.2 Hemmung der NOS-Isoenzyme

Die Daten aus den Hemmstudien mit den Isoenzymen der NO-Synthase belegen, dass diese Verbindung trotz fehlender α -Carboxylfunktion einen sehr potenten Inhibitor aller Isoformen der NOS darstellt (Tab 9.15). Die Hemmwirkung ist im Vergleich zu Vinyl-NIO etwas geringer, jedoch ist der Verlust an Aktivität an der hDDAH-1 wesentlich stärker, so dass eine Entwicklung von hDDAH-1-selektiven Verbindungen durch Decarboxylierung von N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivaten zu keinem Erfolg führt.

Tab. 9.15: Hemmdaten für *N*-(4-Aminobutyl)but-3-enamidin (decVNIO) an den drei Isoenzymen der NO-Synthase. Die dargestellten Daten sind $MW \pm SD$ von mindestens drei separaten Inkubationen. Die Testung wurde von N. Muschick übernommen.²⁴⁸ Für eine Übersicht der Struktur siehe Tab. 9.14

Substanz	Inhibition at 100 μ M [%]			Inhibition at 1 mM [%]		
	nNOS	eNOS	iNOS	nNOS	eNOS	iNOS
decVNIO	83 \pm 1	51 \pm 2	77 \pm 3	99 \pm 1	56 \pm 8	100 \pm 1

9.3.3 Substratstudien mit humaner DDAH-1

Bei allen getesteten Verbindungen auf L-Arginin-Basis (Kap. 9.3.2.7) ist theoretisch neben einer Hemmung der hDDAH-1 eine enzymatische Verstoffwechselung über dieses Enzym vorstellbar. Wie in Kapitel 8 ausgeführt, ist neben NMMA und ADMA bisher lediglich N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-*homo*-L-arginin als weiteres Substrat für die Säugetier DDAH-1 bekannt.⁹² Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei weitere Substrate für die humane DDAH-1 identifiziert werden.

Die Studien mit N^{δ} -[(Amino-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)methyliden]-L-ornithin (Pyr-Arg) und N^{ρ} -Methoxyl-L-arginin (MeO-Arg) zeigten eine Bildung von L-Citrullin in Abwesenheit des Substrates NMMA und stellen folglich selber Substrate der hDDAH-1 dar (Abb. 9.7).

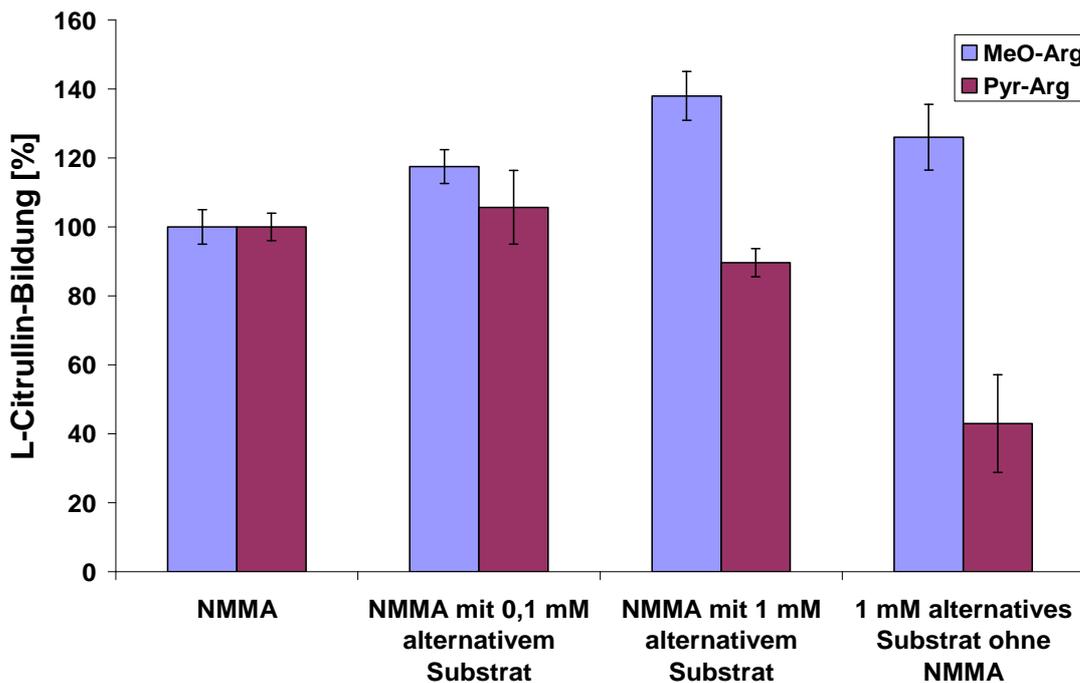
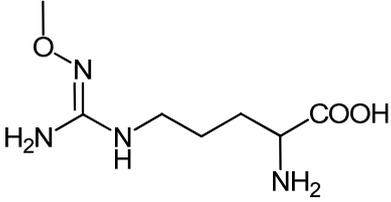
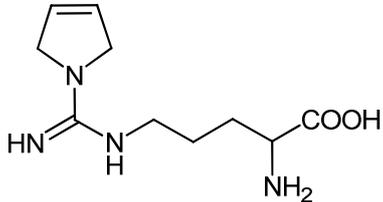
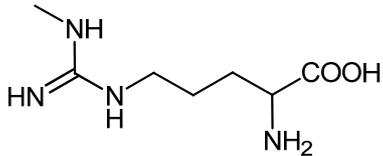


Abb. 9.7: L-Citrullin-Bildung in Inkubationen der alternativen Substrate N^{δ} -[(Amino-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)methyliden]-L-ornithin (Pyr-Arg) und N^{ρ} -Methoxyl-L-arginin (MeO-Arg) mit hDDAH-1 in An- und Abwesenheit von 200 μ M NMMA. Die angegebenen Prozentwerte sind bezogen auf die gebildete L-Citrullin-Menge in einer Inkubation von hDDAH-1 mit 200 μ M NMMA. Die dargestellten Daten sind $MW \pm SD$ von vier separaten Ansätzen, die jeweils doppelt per HPLC vermessen wurden.

Pyr-Arg stellt jedoch ein schlechteres Substrat als NMMA dar. Dies führt dazu, dass es bei einer Inkubation von NMMA zusammen mit Pyr-Arg zu einer geringeren L-Citrullin-Bildung kommt als bei einer Vergleichsinkubation, die nur NMMA enthält, obwohl insgesamt mehr Substrat zur Verfügung steht. Man könnte somit diese Substanz auch als einen schwachen Inhibitor ansehen (Kap. 9.3.2.7). Eine Inkubation mit 1 mM Pyr-Arg als Substrat erreicht nur ca. 40 % der Umsetzung einer Vergleichsinkubation mit 200 μ M NMMA. Die schlechtere Substrateigenschaft zeigt sich ebenfalls in den bestimmten kinetischen Parametern (Tab. 9.16).

MeO-Arg hingegen besitzt eine vergleichbare Affinität zum Enzym und wird genauso rasch umgesetzt wie NMMA. In Abb. 9.5 ist eine höhere L-Citrullin-Bildung in Inkubationen nur mit MeO-Arg detektiert worden als in der Kontrollinkubation mit NMMA. Dies ist darauf zurückzuführen, dass MeO-Arg in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt wurde, wohingegen NMMA in einer Konzentration von 200 μ M verwendet wurde. Sowohl MeO-Arg als auch Pyr-Arg werden wahrscheinlich analog der Katalyse von NMMA umgesetzt, da das Produkt L-Citrullin detektiert werden konnte. Die Strukturen sowie die jeweils bestimmten K_m - und V_{max} -Werte der beiden Verbindungen sind in Tab. 9.16 aufgeführt.

Tab. 9.16: Gegenüberstellung der kinetische Parameter der alternativen Substrate der DDAH-1 und NMMA.

Substanz	K_m [μM]	V_{max} [$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
N^ω -Methoxyl-L-arginin (MeO-Arg) 	130 ± 57	157 ± 7
N^δ -[(Amino-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl) methylen]-L-ornithin (Pyr-Arg) 	161 ± 28	60 ± 6
N^ϵ -Monomethyl-L-arginin (NMMA) 	106 ± 17	154 ± 24

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Pyr-Arg und MeO-Arg erstmalig alternative Substrate für eine Säugetier DDAH identifiziert, bei denen es sich nicht um N^ϵ -methylierte L-Arginin-Derivate handelt.

9.4 Zusammenfassung und Ausblick

In den vergangenen Jahren widmete sich eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten der physiologischen Regulation der NO-Biosynthese durch *N*^o-methylierte L-Arginine.^{106,107,255} Diese Substanzen sind endogene Inhibitoren der NO-Synthase und werden physiologisch durch die DDAH abgebaut.⁹² Eine Hemmung der DDAH repräsentiert somit einen indirekten Mechanismus zur Hemmung der NO-Synthase und kann zur Therapie von Krankheitszuständen eingesetzt werden, die mit einer Überproduktion von NO einhergehen. Erste erfolgreiche *in vivo* Testungen zur Therapie von chronischen Schmerzen sowie des septischen Schockes mit DDAH-1-Inhibitoren konnten bereits durchgeführt werden.^{172,173} Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur Identifikation weiterer potenter Inhibitoren für die hDDAH-1 durchgeführt.

Innerhalb der durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass die Indolthiobarbitursäure-Derivate, die die potentesten Inhibitoren der PaDDAH darstellen, keine Hemmung der hDDAH-1 bewirken. Somit wurde erstmalig im Rahmen dieser Arbeit eine Spezies-Selektivität dieser Verbindungsklasse nachgewiesen. Darüber hinaus wurde mit Vinyl-NIO der bisher potenteste Inhibitor für die hDDAH-1 identifiziert. Neben dieser Substanz wurde eine Vielzahl weiterer potenter Inhibitoren aus der Gruppe der *N*^δ-(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithine und der *N*^o-substituierten L-Arginine gefunden und ein kompetitiver Hemmmechanismus nachgewiesen. Jedoch besitzen diese Verbindungen keine Selektivität für die hDDAH-1, sondern sind ebenfalls potente Inhibitoren aller Isoformen der NO-Synthase. Es wird eine anspruchsvolle Aufgabe sein, diese Derivate so abzuwandeln, dass eine Selektivität für die hDDAH-1 erreicht wird. Eine Option könnte hierbei die Verlängerung des *N*^o-Substituenten der L-Arginin-Derivate bzw. des *N*^δ-Alkenyl-Substituenten der L-Ornithin-Derivate darstellen.

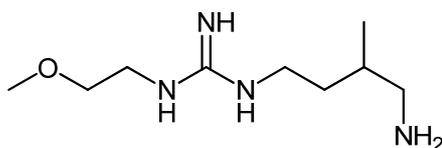
Variationen in der Aminosäure-Hauptkette des *N*^o-(2-Methoxyethyl)-L-arginins (L-257) führten zu der Entwicklung von *N*-(4-Aminobutyl)-*N*'-(2-methoxyethyl)guanidin (AbMEG). Diese Verbindung verfügt im Unterschied zu L-257 über keine α -Carboxylgruppe. Durch die strukturelle Abwandlung kommt es zwar zu einem geringen Verlust der Hemmpotenz für die hDDAH-1, aber dafür

erlangt die Struktur wesentlich bessere pharmakokinetische Eigenschaften sowie eine erhöhte Selektivität gegenüber den Isoenzymen der NO-Synthase.

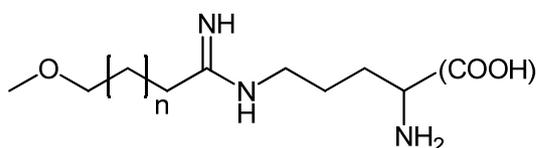
Darüber hinaus konnten anhand der getesteten Verbindungen neue Erkenntnisse für die Struktur-Aktivitätsbeziehung der DDAH-Inhibitoren gewonnen werden. So scheinen insbesondere π -Elektronen oder freie Elektronenpaare in der Bindung zum aktiven Zentrum eine signifikante Bedeutung einzunehmen.

Denkbare Modifikationen zur Entwicklung einer hDDAH-1-Selektivität könnten die im Folgenden aufgeführten Verbindungen darstellen:

- (1) Möglicherweise kann eine weitere Optimierung der Hemmpotenz von AbMEG durch eine Verzweigung in der Hauptkette erreicht werden. Hinweise hierauf konnten aus dem Vergleich von PenMEG und 3-MeBuMEG erhalten werden, da das verzweigte Derivat 3-MeBuMEG eine höhere Affinität als PenMEG aufweist. Die verzweigte Alkylkette kann lipophile Wechselwirkungen zu Phenylalanin 75 und Leucin 171 im aktiven Zentrum eingehen und somit die Affinität dieser Verbindung erhöhen.



- (2) Eventuell kann durch eine Übertragung eines Methoxyalkyl-Restes auf N^{δ} -(1-Iminoethyl)-L-ornithin eine derartige Einlagerung dieser Verbindung im aktiven Zentrum der DDAH erreicht werden, wie sie auch für L-257 nachgewiesen wurde. Diese strukturelle Modifikation könnte zu einer erhöhten Affinität zur hDDAH-1 sowie zu einer Selektivität gegenüber der NO-Synthase führen. Darüber hinaus beinhaltet diese Struktur weitere Modifikationsmöglichkeiten wie den Verzicht auf die Carboxylgruppe.



Neben der Selektivität für die hDDAH-1 gegenüber den Isoformen der NOS muss in zukünftigen Arbeiten auch die Selektivität gegenüber der hDDAH-2 getestet werden.

Des Weiteren wurden innerhalb der Untersuchungen zusätzlich zu den Inhibitoren erstmalig mit N^{δ} -Methoxyl-L-arginin und N^{δ} -Pyrrolinyl-L-arginin zwei alternative

9 Entwicklung von Inhibitoren für die humane DDAH-1

Substrate für die hDDAH-1 identifiziert, bei denen es sich nicht um *N*⁹-methylierte L-Arginin-Derivate handelt.

10 Zusammenfassung und Ausblick

Die methylierten L-Arginine, N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA) und N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA), sind seit einiger Zeit als endogene Inhibitoren der NO-Synthase bekannt und stellen Regulatoren der physiologischen NO-Biosynthese dar. In den vergangenen Jahren konnte insbesondere für ADMA eine Beteiligung an vielen NO-defizienten Krankheitsbildern nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den N^{ω} -methylierten Verbindungen ist jedoch nahezu nichts über N^{δ} -Methyl-L-arginin bekannt, das im Jahr 1998 in Hefezellen identifiziert wurde. Obwohl diese Verbindung bisher nicht in Säugetieren nachgewiesen werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA) sowie seiner potenziellen Metabolite aus der NOS-Katalyse, N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-citrullin (MC), auf die physiologische NO-Biosynthese untersucht. Dazu wurden diese Verbindungen an allen Enzymen des NO-generierenden Systems, bestehend aus NO-Synthase (NOS), Arginase, Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) und Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT), getestet.

Die Untersuchungen an den drei Isoenzymen der NOS zeigten, dass MA von allen Isoenzymen als Substrat akzeptiert wird. Allerdings verläuft die Reaktion nicht analog der physiologischen L-Arginin-Katalyse zu MC, sondern bleibt auf der Zwischenstufe des NHAMs stehen. Alle Isoenzyme zeigen für diese Reaktion eine schlechtere Aktivität (< 36 %) als für die L-Arginin-Katalyse. Die nNOS zeigt hierbei die höchste Aktivität, während die iNOS die geringste Aktivität aufweist. Eine weitere enzymatische Umsetzung von NHAM durch die NOSs konnte ebenfalls nicht in Inkubationen mit NHAM als Substrat detektiert werden. Stattdessen findet eine nichtenzymatische Umwandlung zu N^{δ} -Cyan- N^{δ} -methyl-L-ornithin statt. Diese Umsetzung ist allerdings gering, da innerhalb von zwei Tagen lediglich ein Prozent umgewandelt wird. Darüber hinaus wurden MA, NHAM und MC als Inhibitoren der NOSs getestet. Hierbei zeigte sich, dass die Verbindungen nur sehr schwache Inhibitoren aller drei Isoenzyme mit IC_{50} -Werten im millimolaren Bereich repräsentieren. Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass eine N^{δ} -Methylierung die Affinität zur NOS vermindert. Somit kann eine physiologische

Bedeutung dieser Verbindungen in der Regulation der NOS-Aktivität ausgeschlossen werden. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse, dass eine N^{δ} -Methylierung von L-Arginin-Derivaten auch nicht zur Entwicklung von neuartigen NOS-Inhibitoren ausgenutzt werden kann.

Die Testung der Verbindungen an der Arginase ergab, dass MA weder ein Substrat noch einen Inhibitor für dieses Enzym darstellt. NHAM hingegen repräsentiert einen sehr potenten kompetitiven Inhibitor der Arginase mit einem K_i -Wert von 17 μM . Damit besitzt diese Verbindung sogar einen geringeren K_i -Wert als der literaturbekannte Inhibitor N^{ϵ} -Hydroxy-L-arginin (NOHA). Somit erscheint es, als würde die N^{δ} -Methylierung bei der Arginase die Affinität sogar erhöhen. Genauere Aussagen lassen sich jedoch nur über eine Röntgenkristallstruktur treffen, die Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein soll. Obwohl NHAM ein potenter Inhibitor der Arginase ist, scheint eine physiologische Bedeutung dieser Verbindung unwahrscheinlich, da diese Verbindung enzymatisch durch die NOSs aus MA gebildet werden müsste. Jedoch zeigen die durchgeführten Untersuchungen an der NOS, dass die gebildeten NHAM-Mengen zu gering sind, um die Arginase-Aktivität zu beeinflussen. Allerdings stellt eine N^{δ} -Methylierung von L-Arginin-Derivaten möglicherweise eine Option dar, eine Selektivität gegenüber den Isoenzymen der NOS zu erzielen. Des Weiteren kann über eine Methylengruppen-Verkürzung von NHAM eventuell eine weitere Steigerung der Hemmpotenz für die Arginase erreicht werden, denn eine Verkürzung der Aminosäure-Hauptkette von NOHA zu *nor*-NOHA führt zu einer Steigerung der Hemmpotenz um den Faktor 60 - 80.

MA wurde zusätzlich an der PRMT1 getestet. Diese Testung wurde im Arbeitskreis von Herrn Prof. Jung (Pharmazeutisches Institut, Freiburg) durchgeführt. In dem verwendeten Testsystem konnte keine Hemmung der PRMT1 detektiert werden.

Darüber hinaus wurde eine mögliche Reduktion von NHAM sowie von NOHA, dem physiologischen Intermediat der NOS-Katalyse, untersucht. Für NOHA konnte bereits die Reduktion durch Mikrosomen und Mitochondrien nachgewiesen werden. Diese Reduktion kann einen weiteren physiologischen Regulationsmechanismus der NO-Biosynthese darstellen, da NOHA während der NOS-Katalyse vom aktiven Zentrum abgelöst werden kann. Es wird angenommen, dass NOHA so als Vorstufe von NO im Körper zirkuliert und in Geweben, in denen keine NOS exprimiert wird, NOS-unabhängig über Hämproteine NO freisetzen kann. Eine physiologische

Reduktion schränkt die Bedeutung dieses hypothetischen Mechanismus erheblich ein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NHAM ebenfalls durch Mikrosomen und Mitochondrien zu MA reduziert wird. Darüber hinaus konnte für beide Substanzen nachgewiesen werden, dass die kürzlich identifizierten Isoenzyme der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente (mARC) die Aktivität der Reduktion steigern.

Neben der Reduktion wurde eine mögliche Oxidation von MA und L-Arginin durch die flavinhaltige Monooxygenase (FMO) untersucht. Hierbei sollte geklärt werden, ob dieses Enzym die Oxidation dieser Verbindungen zu NHAM bzw. NOHA katalysieren kann, was wiederum Einfluss auf die NO-Biosynthese haben würde. Insbesondere die Bildung von NOHA über die FMO könnte einen bisher unbekanntem Mechanismus der NO-Bildung darstellen, da die Synthese von NOHA bislang ausschließlich für die NOSs beschrieben wurde. Eine besondere Aufmerksamkeit besaß die FMO5, da sie die einzige Isoform der FMOs darstellt, die sowohl in der fetalen als auch in der adulten Leber exprimiert wird. Bisher konnte jedoch kein physiologisches Substrat für dieses Isoenzym identifiziert werden. Daher sollte geprüft werden, ob dieses unbekannte Substrat möglicherweise L-Arginin darstellt. Die Testungen zeigten jedoch eindeutig, dass weder MA noch L-Arginin durch die Isoenzyme der FMO umgesetzt wird. Somit konnte keine Beteiligung der FMO in der NO-Biosynthese identifiziert werden.

Im Weiteren sollten Untersuchungen an den beiden Isoenzymen der humanen DDAH (hDDAH) vorgenommen werden. Diese Enzyme waren nicht kommerziell erhältlich und somit musste eine Methode zur rekombinanten Expression der DDAHs entwickelt werden. Die entwickelte Methode zur Expression der hDDAH-1 lieferte ein SDS-reines aminoterminal His-tagged Enzym. Hierbei war die Proteinausbeute anderen beschriebenen Verfahren deutlich überlegen. Die anschließende Charakterisierung des Enzyms führte zu K_m - und V_{max} -Werten wie sie auch von anderen Arbeitskreisen angegeben werden. Im Gegensatz dazu konnte die hDDAH-2 im Rahmen dieser Arbeit nicht rekombinant exprimiert werden. Bisher konnte die Expression der hDDAH-2 nur von einem Arbeitskreis beschrieben werden, allerdings war auch dort die Aufreinigung des Proteins nicht möglich. Darüber hinaus zeigen unveröffentlichte Ergebnisse, dass die Expression dieser Isoform auch anderen Arbeitskreisen bisher nicht gelungen ist.

Die Untersuchungen von MA, NHAM und MC an der hDDAH-1 zeigten, dass alle drei Verbindungen nur eine sehr geringe Hemmwirkung mit IC_{50} -Werten im millimolaren Bereich besitzen. Darüber hinaus konnte keine Umsetzung von MA durch die hDDAH-1 detektiert werden. Diese Beobachtung kann mit Hilfe der veröffentlichten Kristallstrukturen der DDAH erklärt werden, denn diese zeigen eine Wasserstoffbrücke von einem Aspartat-Rest des aktiven Zentrums zu ADMA bzw. L-Citrullin. Eine N^{δ} -Methylierung verhindert - wie bei den NOSs - diese wichtige Interaktion und verursacht somit den Affinitätsverlust.

Während der Anfertigung dieser Arbeit rückte die DDAH als pharmazeutisches Target zur indirekten Modulation der NOS-Aktivität vermehrt in den Blickpunkt der Wissenschaft. Mittlerweile konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Hemmung der hDDAH-1 zur Therapie von chronischen Schmerzen und des septischen Schockes ausgenutzt werden kann. Darüber hinaus ist eine Vielzahl weiterer Indikationen denkbar. Aus diesem Grund wurde ein Substanz-Screening zur Entwicklung von neuartigen hDDAH-1-Inhibitoren mit Guanidinen, Benzamidinen, NOS-Inhibitoren, Pyrido[1,2-*a*]pyrimidinen, N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin-Derivaten und N^{ω} -substituierten L-Argininen durchgeführt. Innerhalb dieser Untersuchungen konnte mit N^{δ} -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin (Vinyl-NIO) der derzeit potenteste Inhibitor der hDDAH-1 mit einem K_i -Wert von 2 μ M identifiziert werden. Darüber hinaus wurde eine Vielzahl weiterer potenter hDDAH-1-Inhibitoren (K_i s 17 - 58 μ M) auf N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithin- bzw. L-Arginin-Basis entdeckt, die einen kompetitiven Hemmmechanismus aufweisen. Jedoch zeigen diese potenten Inhibitoren im Gegensatz zu N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin (L-257), einem bekannten DDAH-Inhibitor, keine Selektivität gegenüber den Isoenzymen der NOS. Die Röntgenkristallstruktur dieser Verbindung mit hDDAH-1 offenbart eine andere Anlagerung dieser Verbindung im aktiven Zentrum als sie für L-Citrullin bzw. ADMA beschrieben wurde. Der 2-Methoxyethyl-Rest scheint eine Kavität zu erreichen, die von anderen Verbindungen nicht ausgenutzt wird. Diese Anlagerung resultiert in einer anderen Ausrichtung einiger Aminosäuren im aktiven Zentrum, so dass die Carboxylgruppe von L-257 nur geringe Wechselwirkungen im aktiven Zentrum eingeht. Aus diesem Grund wurden im Weiteren *N*-(2-Methoxyethyl)guanidin-Derivate getestet, mit dem Ziel, die Notwendigkeit der Aminosäurefunktion auszutesten und die Selektivität gegenüber der NOS zu erhöhen. Im Rahmen dieser Testungen konnte mit *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin

(AbMEG) eine Verbindung identifiziert werden, die zwar eine geringfügig schlechtere Hemmpotenz dafür aber eine erhöhte Selektivität für die hDDAH-1 als L-257 aufweist. Diese Verbindung entspricht einem L-257-Analogen ohne Carboxylgruppe. Durch diese Modifikation besitzt diese Verbindung wesentlich bessere pharmakokinetische Eigenschaften als L-257 und kann als neue Leitstruktur in der Inhibitorentwicklung für die hDDAH-1 betrachtet werden. Möglicherweise ist durch die Übertragung eines Methoxyalkyl-Restes auf N^{δ} -(1-Iminoethyl)-L-ornithin die Entwicklung eines potenteren Inhibitors mit einer Selektivität für die hDDAH-1 möglich.

Zusätzlich sollten anhand der durchgeführten Hemmstudien neue Erkenntnisse über die Struktur-Aktivitätsbeziehungen der hDDAH-1 gewonnen werden. Trotz publizierter Kristallstruktur der hDDAH-1 ist bisher nur sehr wenig über die Bindungstasche der N^{δ} -Methylgruppe(n) des NMMA's bzw. ADMA's bekannt. Die erhaltenen Daten zeigen, dass insbesondere π -Elektronen oder freie Elektronenpaare in der Bindung zum aktiven Zentrum eine signifikante Bedeutung einnehmen, da die Untersuchungen auf L-Arginin-Basis zeigten, dass die Hemmpotenz in der Reihenfolge der N^{δ} -Substituenten Propargyl > Allyl > Propyl abnahm.

Des Weiteren zeigten Inkubationen mit Indolthiobarbitursäuren, den potentesten PaDDAH-Inhibitoren, dass diese Substanzgruppe keine Hemmwirkung auf die hDDAH-1 ausübt. Somit wurde erstmalig in dieser Arbeit eine Spezies-Selektivität einer DDAH-Inhibitor-Klasse nachgewiesen. Inhibitoren für bakterielle DDAH können möglicherweise eine Therapieoption in der Behandlung von chronischen Lungeninfektionen darstellen.

11 Literatur

1. PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S.
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **1987**, 327, 524-6.
2. IGNARRO, L. J.
Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl* **1996**, 55, S2-5.
3. IGNARRO, L. J.; CIRINO, G.; CASINI, A.; NAPOLI, C.
Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* **1999**, 34, 879-86.
4. KNOWLES, R. G.; MONCADA, S.
Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci* **1992**, 17, 399-402.
5. HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A.
Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol* **1994**, 233, 250-8.
6. DUCHSTEIN, H. J.; RIEDERER, S.; ERBACH, C.
Aktive Sauerstoffspezies. Ein neues Forschungsgebiet für die Pharmazeutische Chemie. *Pharm Unserer Zeit* **1999**, 28, 197-207.
7. IGNARRO, L. J.
Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* **1990**, 16, 477-83.
8. WOLIN, M. S.; WOOD, K. S.; IGNARRO, L. J.
Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme. *J Biol Chem* **1982**, 257, 13312-20.
9. IGNARRO, L. J.
Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1990**, 30, 535-60.
10. MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A.
Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **1991**, 43, 109-42.
11. RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S.
Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci* **1991**, 12, 87-8.
12. MULLER, S.; GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G.
Vasoprotektion durch vaskulares NO. Molekulare Grundlagen antiatherosklerotischer Wirkungen. *Med Monatsschr Pharm* **2002**, 25, 45-51.
13. BIAN, K.; DOURSOUT, M. F.; MURAD, F.
Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **2008**, 10, 304-10.
14. IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C.
Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr Diab Rep* **2005**, 5, 17-23.

15. FUKUDA, N.; J, O. U.; KURIHARA, S.
Neuronal NO synthase-derived NO: a novel relaxing factor in myocardium? *Circ Res* **2008**, 102, 148-50.
16. HALLINAN, E. A.; HAGEN, T. J.; BERGMANIS, A.; MOORE, W. M.; JEROME, G. M.; SPANGLER, D. P.; STEVENS, A. M.; SHIEH, H. S.; MANNING, P. T.; PITZELE, B. S.
5-Fluorinated L-lysine analogues as selective induced nitric oxide synthase inhibitors. *J Med Chem* **2004**, 47, 900-6.
17. GARTHWAITE, J.
Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* **1991**, 14, 60-7.
18. MONCADA, S.
Nitric oxide. *J Hypertens Suppl* **1994**, 12, S35-9.
19. RAJFER, J.; ARONSON, W. J.; BUSH, P. A.; DOREY, F. J.; IGNARRO, L. J.
Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* **1992**, 326, 90-4.
20. MONCADA, S.; HIGGS, E. A.
Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* **1995**, 9, 1319-30.
21. NEEB, L.; REUTER, U.
Nitric oxide in migraine. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2007**, 6, 258-64.
22. HOBBS, A. J.; HIGGS, A.; MONCADA, S.
Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1999**, 39, 191-220.
23. BRYK, R.; WOLFF, D. J.
Pharmacological modulation of nitric oxide synthesis by mechanism-based inactivators and related inhibitors. *Pharmacol Ther* **1999**, 84, 157-78.
24. WU, G.; MORRIS, S. M., JR.
Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* **1998**, 336 (Pt 1), 1-17.
25. MORRIS, S. M., JR.
Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* **2004**, 134, 2743S-2747S; discussion 2765S-2767S.
26. CLEMENT, B.; KUNZE, T.; HEBERLING, S.
Reduction of *N*^ω-hydroxy-L-arginine to L-arginine by pig liver microsomes, mitochondria, and human liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, 349, 869-73.
27. BOUCHER, J. L.; GENET, A.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; HENRY, Y.; MANSUY, D.
Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of *N*^ω-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, 187, 880-6.
28. ANTHONY, S.; LEIPER, J.; VALLANCE, P.
Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors. *Vasc Med* **2005**, 10 Suppl 1, S3-9.

29. BOUCHER, J. L.; CUSTOT, J.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; LEPOIVRE, M.; TENU, J. P.; YAPO, A.; MANSUY, D.
N^o-hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 203, 1614-21.
30. STUEHR, D. J.; KWON, N. S.; NATHAN, C. F.; GRIFFITH, O. W.; FELDMAN, P. L.; WISEMAN, J.
N^o-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* **1991**, 266, 6259-63.
31. ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G.
Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **2001**, 357, 593-615.
32. GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E.
Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* **2005**, 26, 190-195.
33. HAYNES, V.; ELFERING, S.; TRAASETH, N.; GIULIVI, C.
Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr* **2004**, 36, 341-6.
34. ANDREW, P. J.; MAYER, B.
Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* **1999**, 43, 521-31.
35. STUEHR, D. J.
Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1411, 217-30.
36. MARLETTA, M. A.; HURSHMAN, A. R.; RUSCHE, K. M.
Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* **1998**, 2, 656-63.
37. KNOWLES, R. G.; MONCADA, S.
Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **1994**, 298 (Pt 2), 249-58.
38. MARLETTA, M. A.
Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* **1993**, 268, 12231-4.
39. BOUCHER, J. L.; MOALI, C.; TENU, J. P.
Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors, and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* **1999**, 55, 1015-1028.
40. MAYER, B.; HEMMENS, B.
Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* **1997**, 22, 477-81.
41. ABU-SOUD, H. M.; YOHO, L. L.; STUEHR, D. J.
Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J Biol Chem* **1994**, 269, 32047-50.
42. WHITE, K. A.; MARLETTA, M. A.
Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* **1992**, 31, 6627-31.
43. CRANE, B. R.; ARVAI, A. S.; GHOSH, D. K.; WU, C.; GETZOFF, E. D.; STUEHR, D. J.; TAINER, J. A.
Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* **1998**, 279, 2121-6.

-
44. RAMAN, C. S.; LI, H.; MARTASEK, P.; KRAL, V.; MASTERS, B. S.; POULOS, T. L.
Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* **1998**, 95, 939-50.
45. LI, H.; RAMAN, C. S.; GLASER, C. B.; BLASKO, E.; YOUNG, T. A.; PARKINSON, J. F.; WHITLOW, M.; POULOS, T. L.
Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **1999**, 274, 21276-84.
46. FISCHMANN, T. O.; HRUZA, A.; NIU, X. D.; FOSSETTA, J. D.; LUNN, C. A.; DOLPHIN, E.; PRONGAY, A. J.; REICHERT, P.; LUNDELL, D. J.; NARULA, S. K.; WEBER, P. C.
Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat Struct Biol* **1999**, 6, 233-42.
47. GACHHUI, R.; GHOSH, D. K.; WU, C.; PARKINSON, J.; CRANE, B. R.; STUEHR, D. J.
Mutagenesis of acidic residues in the oxygenase domain of inducible nitric-oxide synthase identifies a glutamate involved in arginine binding. *Biochemistry* **1997**, 36, 5097-103.
48. KLATT, P.; PFEIFFER, S.; LIST, B. M.; LEHNER, D.; GLATTER, O.; BACHINGER, H. P.; WERNER, E. R.; SCHMIDT, K.; MAYER, B.
Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* **1996**, 271, 7336-42.
49. BAEK, K. J.; THIEL, B. A.; LUCAS, S.; STUEHR, D. J.
Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem* **1993**, 268, 21120-9.
50. VENEMA, R. C.; JU, H.; ZOU, R.; RYAN, J. W.; VENEMA, V. J.
Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* **1997**, 272, 1276-82.
51. HURSHMAN, A. R.; MARLETTA, M. A.
Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer. *Biochemistry* **2002**, 41, 3439-56.
52. PRESTA, A.; SIDDHANTA, U.; WU, C.; SENNEQUIER, N.; HUANG, L.; ABU-SOUD, H. M.; ERZURUM, S.; STUEHR, D. J.
Comparative functioning of dihydro- and tetrahydropterins in supporting electron transfer, catalysis, and subunit dimerization in inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry* **1998**, 37, 298-310.
53. KLATT, P.; SCHMID, M.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; WERNER, E. R.; MAYER, B.
The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity, and allosteric interaction with the substrate domain. *J Biol Chem* **1994**, 269, 13861-6.
54. SIDDHANTA, U.; PRESTA, A.; FAN, B.; WOLAN, D.; ROUSSEAU, D. L.; STUEHR, D. J.
Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J Biol Chem* **1998**, 273, 18950-8.

55. MATSUDA, H.; IYANAGI, T.
Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1473, 345-55.
56. LI, H.; POULOS, T. L.
Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* **2005**, 99, 293-305.
57. STUEHR, D. J.; SANTOLINI, J.; WANG, Z. Q.; WEI, C. C.; ADAK, S.
Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem* **2004**, 279, 36167-70.
58. VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B.; MARTASEK, P.; HOGG, N.; MASTERS, B. S.; KAROUI, H.; TORDO, P.; PRITCHARD, K. A., JR.
Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95, 9220-5.
59. GORREN, A. C.; LIST, B. M.; SCHRAMMEL, A.; PITTERS, E.; HEMMENS, B.; WERNER, E. R.; SCHMIDT, K.; MAYER, B.
Tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric oxide synthase: evidence for two identical highly anticooperative pteridine binding sites. *Biochemistry* **1996**, 35, 16735-45.
60. GORREN, A. C.; MAYER, B.
Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1770, 432-45.
61. CLARKE, S.
Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* **1993**, 5, 977-83.
62. PAIK, W. K.; KIM, S.
Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem* **1968**, 243, 2108-14.
63. KRAUSE, C. D.; YANG, Z. H.; KIM, Y. S.; LEE, J. H.; COOK, J. R.; PESTKA, S.
Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* **2007**, 113, 50-87.
64. LIU, Q.; DREYFUSS, G.
In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **1995**, 15, 2800-8.
65. MCBRIDE, A. E.; SILVER, P. A.
State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* **2001**, 106, 5-8.
66. BOFFA, L. C.; KARN, J.; VIDALI, G.; ALLFREY, V. G.
Distribution of N^0, N^0 -dimethylarginine in nuclear protein fractions. *Biochem Biophys Res Commun* **1977**, 74, 969-76.
67. WANG, Y.; WYSOCKA, J.; SAYEGH, J.; LEE, Y. H.; PERLIN, J. R.; LEONELLI, L.; SONBUCHNER, L. S.; McDONALD, C. H.; COOK, R. G.; DOU, Y.; ROEDER, R. G.; CLARKE, S.; STALLCUP, M. R.; ALLIS, C. D.; COONROD, S. A.
Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science* **2004**, 306, 279-83.

-
68. CUTHBERT, G. L.; DAUJAT, S.; SNOWDEN, A. W.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; HAGIWARA, T.; YAMADA, M.; SCHNEIDER, R.; GREGORY, P. D.; TEMPST, P.; BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T.
Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **2004**, 118, 545-53.
69. RAIJMAKERS, R.; ZENDMAN, A. J. W.; EGBERTS, W. V.; VOSSENAAR, E. R.; RAATS, J.; SOEDE-HUIJBREGTS, C.; RUTJES, F. P. J. T.; VAN VEELLEN, P. A.; DRIJFHOUT, J. W.; PRUIJN, G. J. M.
Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro. *J Mol Biol* **2007**, 367, 1118-1129.
70. CHANG, B.; CHEN, Y.; ZHAO, Y.; BRUICK, R. K.
JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* **2007**, 318, 444-7.
71. GARY, J. D.; CLARKE, S.; KIVIE, M.
RNA and Protein Interactions Modulated by Protein Arginine Methylation. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Academic Press: **1998**; Vol. 61, pp 65-131.
72. SHEN, E. C.; HENRY, M. F.; WEISS, V. H.; VALENTINI, S. R.; SILVER, P. A.; LEE, M. S.
Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev* **1998**, 12, 679-91.
73. GREEN, D. M.; MARFATIA, K. A.; CRAFTON, E. B.; ZHANG, X.; CHENG, X.; CORBETT, A. H.
Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J Biol Chem* **2002**, 277, 7752-60.
74. YU, M. C.; BACHAND, F.; MCBRIDE, A. E.; KOMILI, S.; CASOLARI, J. M.; SILVER, P. A.
Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev* **2004**, 18, 2024-35.
75. FABBRIZIO, E.; EL MESSAOUDI, S.; POLANOWSKA, J.; PAUL, C.; COOK, J. R.; LEE, J. H.; NEGRE, V.; ROUSSET, M.; PESTKA, S.; LE CAM, A.; SARDET, C.
Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep* **2002**, 3, 641-5.
76. MIRANDA, T. B.; KHUSIAL, P.; COOK, J. R.; LEE, J. H.; GUNDERSON, S. I.; PESTKA, S.; ZIEVE, G. W.; CLARKE, S.
Spliceosome Sm proteins D1, D3, and B/B' are asymmetrically dimethylated at arginine residues in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, 323, 382-7.
77. MOWEN, K. A.; SCHURTER, B. T.; FATHMAN, J. W.; DAVID, M.; GLIMCHER, L. H.
Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes. *Mol Cell* **2004**, 15, 559-71.
78. JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D.
Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **1996**, 114, 107-32.
79. ASH, D. E.
Structure and function of arginases. *J Nutr* **2004**, 134, 2760S-2764S.
80. KANYO, Z. F.; SCOLNICK, L. R.; ASH, D. E.; CHRISTIANSON, D. W.
Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* **1996**, 383, 554-7.
81. ZHANG, C.; HEIN, T. W.; WANG, W.; CHANG, C. I.; KUO, L.
Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. *FASEB J* **2001**, 15, 1264-6.

82. DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A.
Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2007**, 34, 906-11.
83. BERKOWITZ, D. E.; WHITE, R.; LI, D.; MINHAS, K. M.; CERNETICH, A.; KIM, S.; BURKE, S.; SHOUKAS, A. A.; NYHAN, D.; CHAMPION, H. C.; HARE, J. M.
Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* **2003**, 108, 2000-2006.
84. DAGHIGH, F.; FUKUTO, J. M.; ASH, D. E.
Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, *N*^o-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 202, 174-80.
85. CUSTOT, J.; BOUCHER, J.-L.; VADON, S.; GUEDES, C.; DIJOLS, S.; DEALFORGE, M.; MANSUY, D.
N^o-hydroxyamino- α -amino acids as a new class of very strong inhibitors of arginases. *J Biol Inorg Chem* **1996**, 1, 73-82.
86. COX, J. D.; CAMA, E.; COLLELUORI, D. M.; PETHE, S.; BOUCHER, J.-L.; MANSUY, D.; ASH, D. E.; CHRISTIANSON, D. W.
Mechanistic and metabolic inferences from the binding of substrate analogues and products to arginase. *Biochemistry* **2001**, 40, 2689-2701.
87. WIGAND, R.; MEYER, J.; BUSSE, R.; HECKER, M.
Increased serum *N*^o-hydroxy-L-arginine in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus as an index of an increased nitric oxide synthase activity. *Ann Rheum Dis* **1997**, 56, 330-2.
88. HECKER, M.; SCHOTT, C.; BUCHER, B.; BUSSE, R.; STOCLET, J. C.
Increase in serum *N*^o-hydroxy-L-arginine in rats treated with bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* **1995**, 275, R1-3.
89. MEYER, J.; RICHTER, N.; HECKER, M.
High-performance liquid chromatographic determination of nitric oxide synthase-related arginine derivatives in vitro and in vivo. *Anal Biochem* **1997**, 247, 11-6.
90. VALLANCE, P.; LEIPER, J.
Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2004**, 24, 1023-30.
91. LEIPER, J. M.; VALLANCE, P.
The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Eur J Clin Pharmacol* **2006**, 62 Suppl 13, 33-8.
92. OGAWA, T.; KIMOTO, M.; SASAOKA, K.
Purification and properties of a new enzyme, *N*^o,*N*^o-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* **1989**, 264, 10205-9.
93. LEIPER, J. M.; SANTA MARIA, J.; CHUBB, A.; MACALLISTER, R. J.; CHARLES, I. G.; WHITLEY, G. S.; VALLANCE, P.
Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* **1999**, 343 Pt 1, 209-14.

94. TRAN, C. T.; FOX, M. F.; VALLANCE, P.; LEIPER, J. M.
Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* **2000**, 68, 101-5.
95. FREY, D.; BRAUN, O.; BRIAND, C.; VASAK, M.; GRUTTER, M. G.
Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors. *Structure* **2006**, 14, 901-11.
96. KNIPP, M.; BRAUN, O.; GEHRIG, P. M.; SACK, R.; VASAK, M.
Zn(II)-free dimethylargininase-1 (DDAH-1) is inhibited upon specific Cys-S-nitrosylation. *J Biol Chem* **2003**, 278, 3410-6.
97. KNIPP, M.; CHARNOCK, J. M.; GARNER, C. D.; VASAK, M.
Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1. *J Biol Chem* **2001**, 276, 40449-56.
98. LEIPER, J.; MURRAY-RUST, J.; McDONALD, N.; VALLANCE, P.
S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, 13527-32.
99. KNIPP, M.; BRAUN, O.; VASAK, M.
Searching for DDAH inhibitors: S-nitroso-L-homocysteine is a chemical lead. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 2372-3.
100. WILCKEN, D. E.; SIM, A. S.; WANG, J.; WANG, X. L.
Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. *Mol Genet Metab* **2007**, 91, 309-17; discussion 308.
101. WANG, J.; SIM, A. S.; WANG, X. L.; WILCKEN, D. E.
L-arginine regulates asymmetric dimethylarginine metabolism by inhibiting dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in hepatic (HepG2) cells. *Cell Mol Life Sci* **2006**, 63, 2838-46.
102. STONE, E. M.; COSTELLO, A. L.; TIERNEY, D. L.; FAST, W.
Substrate-assisted cysteine deprotonation in the mechanism of dimethylargininase (DDAH) from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **2006**, 45, 5618-30.
103. HASEGAWA, K.; WAKINO, S.; TANAKA, T.; KIMOTO, M.; TATEMATSU, S.; KANDA, T.; YOSHIOKA, K.; HOMMA, K.; SUGANO, N.; KURABAYASHI, M.; SARUTA, T.; HAYASHI, K.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 increases vascular endothelial growth factor expression through Sp1 transcription factor in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2006**, 26, 1488-94.
104. LINSKY, T. W.; MONZINGO, A. F.; STONE, E. M.; ROBERTUS, J. D.; FAST, W.
Promiscuous partitioning of a covalent intermediate common in the pteinein superfamily. *Chem Biol* **2008**, 15, 467-75.
105. LEIPER, J.; VALLANCE, P.
New tricks from an old dog: nitric oxide-independent effects of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2006**, 26, 1419-20.
106. LEIPER, J.; VALLANCE, P.
Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* **1999**, 43, 542-8.

11 Literatur

107. CARDOUNEL, A. J.; CUI, H.; SAMOUILOV, A.; JOHNSON, W.; KEARNS, P.; TSAI, A. L.; BERKA, V.; ZWEIER, J. L.
Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. *J Biol Chem* **2007**, 282, 879-87.
108. BELTOWSKI, J.; KEDRA, A.
Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* **2006**, 58, 159-78.
109. PETROS, A.; LAMB, G.; LEONE, A.; MONCADA, S.; BENNETT, D.; VALLANCE, P.
Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* **1994**, 28, 34-9.
110. BOGER, R. H.
Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* **2004**, 134, 2842S-2847S; discussion 2853S.
111. BOGER, R. H.
L-Arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2008**, 11, 55-61.
112. BOGER, R. H.; RON, E. S.
L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* **2005**, 10, 14-23.
113. BODE-BOGER, S. M.; SCALERA, F.; IGNARRO, L. J.
The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther* **2007**, 114, 295-306.
114. COOKE, J. P.
Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**, 20, 2032-7.
115. FLISER, D.
Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an 'uraemic toxin' to a global cardiovascular risk molecule. *Eur J Clin Invest* **2005**, 35, 71-9.
116. BOGER, R. H.
Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med* **2006**, 38, 126-36.
117. 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, 572-5.
118. SASAKI, A.; DOI, S.; MIZUTANI, S.; AZUMA, H.
Roles of accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors, enhanced arginase activity, and attenuated nitric oxide synthase activity in endothelial cells for pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2007**, 292, L1480-7.
119. BOGER, R. H.; BODE-BOGER, S. M.; SZUBA, A.; TSAO, P. S.; CHAN, J. R.; TANGPHAO, O.; BLASCHKE, T. F.; COOKE, J. P.
Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* **1998**, 98, 1842-7.

-
120. LIN, K. Y.; ITO, A.; ASAGAMI, T.; TSAO, P. S.; ADIMOOLAM, S.; KIMOTO, M.; TSUJI, H.; REAVEN, G. M.; COOKE, J. P.
Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* **2002**, 106, 987-92.
121. HERMENEGILDO, C.; MEDINA, P.; PEIRO, M.; SEGARRA, G.; VILA, J. M.; ORTEGA, J.; LLUCH, S.
Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, 87, 5636-40.
122. MAAS, R.; WENSKE, S.; ZABEL, M.; VENTURA, R.; SCHWEDHELM, E.; STEENPASS, A.; KLEMM, H.; NOLDUS, J.; BOGER, R. H.
Elevation of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and coronary artery disease in men with erectile dysfunction. *Eur Urol* **2005**, 48, 1004-11; discussion 1011-2.
123. MANSUY, D.; BOUCHER, J. L.
Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free Radic Biol Med* **2004**, 37, 1105-21.
124. NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J.
Nitric oxide-releasing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2003**, 43, 97-123.
125. MOALI, C.; BOUCHER, J. L.; SARI, M. A.; STUEHR, D. J.; MANSUY, D.
Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their *N*^ω-hydroxy derivatives, and *N*^ω-hydroxy-*nor*-L-arginine. *Biochemistry* **1998**, 37, 10453-60.
126. DIJOLS, S.; BOUCHER, J. L.; LEPOIVRE, M.; LEFEVRE-GROBOILLOT, D.; MOREAU, M.; FRAPART, Y.; REKKA, E.; MEADE, A. L.; STUEHR, D. J.; MANSUY, D.
First non- α -amino acid guanidines acting as efficient NO precursors upon oxidation by NO-synthase II or activated mouse macrophages. *Biochemistry* **2002**, 41, 9286-92.
127. DIJOLS, S.; PEROLLIER, C.; LEFEVRE-GROBOILLOT, D.; PETHE, S.; ATTIAS, R.; BOUCHER, J. L.; STUEHR, D. J.; MANSUY, D.
Oxidation of *N*^ω-hydroxyarginine analogues by NO-synthase: the simple, non amino acid *N*-butyl *N*-hydroxyguanidine is almost as efficient an NO precursor as *N*^ω-hydroxyarginine. *J Med Chem* **2001**, 44, 3199-202.
128. JIA, Q.; CAI, T.; HUANG, M.; LI, H.; XIAN, M.; POULOS, T. L.; WANG, P. G.
Isoform-selective substrates of nitric oxide synthase. *J Med Chem* **2003**, 46, 2271-4.
129. RENODON-CORNIERE, A.; DIJOLS, S.; PEROLLIER, C.; LEFEVRE-GROBOILLOT, D.; BOUCHER, J. L.; ATTIAS, R.; SARI, M. A.; STUEHR, D.; MANSUY, D.
N-Aryl *N*-hydroxyguanidines, a new class of NO-donors after selective oxidation by nitric oxide synthases: structure-activity relationship. *J Med Chem* **2002**, 45, 944-54.
130. KANZOW, S.
Charakterisierung der mikrosomalen Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **2008**.
131. CLEMENT, B.
Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev* **2002**, 34, 565-79.

132. LEE, A. J.; NOON, K. R.; JIANMONGKOL, S.; LAU, M.; JENKINS, G. J.; OSAWA, Y.
Metabolism of aminoguanidine, diaminoguanidine, and N° -amino-L-arginine by neuronal NO-synthase and covalent alteration of the heme prosthetic group. *Chem Res Toxicol* **2005**, 18, 1927-33.
133. GARVEY, E. P.; OPLINGER, J. A.; FURFINE, E. S.; KIFF, R. J.; LASZLO, F.; WHITTLE, B. J.; KNOWLES, R. G.
1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **1997**, 272, 4959-63.
134. GARVEY, E. P.; OPLINGER, J. A.; TANOURY, G. J.; SHERMAN, P. A.; FOWLER, M.; MARSHALL, S.; HARMON, M. F.; PAITH, J. E.; FURFINE, E. S.
Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Inhibition by non-amino acid isothioureas. *J Biol Chem* **1994**, 269, 26669-76.
135. MOORE, P. K.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z.; HART, S. L.; BABBEDGE, R. C.
Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol* **1993**, 110, 219-24.
136. WOLFF, D. J.; DATTO, G. A.; SAMATOVICZ, R. A.; TEMPSICK, R. A.
Calmodulin-dependent nitric-oxide synthase. Mechanism of inhibition by imidazole and phenylimidazoles. *J Biol Chem* **1993**, 268, 9425-9.
137. WERNER, E. R.; PITTERS, E.; SCHMIDT, K.; WACHTER, H.; WERNER-FELMAYER, G.; MAYER, B.
Identification of the 4-amino analogue of tetrahydrobiopterin as a dihydropteridine reductase inhibitor and a potent pteridine antagonist of rat neuronal nitric oxide synthase. *Biochem J* **1996**, 320 (Pt 1), 193-6.
138. FARACI, W. S.; NAGEL, A. A.; VERDRIES, K. A.; VINCENT, L. A.; XU, H.; NICHOLS, L. E.; LABASI, J. M.; SALTER, E. D.; PETTIPHER, E. R.
2-Amino-4-methylpyridine as a potent inhibitor of inducible NO synthase activity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **1996**, 119, 1101-8.
139. ZHANG, H. Q.; FAST, W.; MARLETTA, M. A.; MARTASEK, P.; SILVERMAN, R. B.
Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N° -propyl-L-arginine. *J Med Chem* **1997**, 40, 3869-70.
140. OLKEN, N. M.; MARLETTA, M. A.
 N° -allyl- and N° -cyclopropyl-L-arginine: two novel inhibitors of macrophage nitric oxide synthase. *J Med Chem* **1992**, 35, 1137-44.
141. MARTIN, N. I.; BEESON, W. T.; WOODWARD, J. J.; MARLETTA, M. A.
 N° -aminoguanidines from primary amines and the preparation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Med Chem* **2008**, 51, 924-31.
142. BABU, B. R.; GRIFFITH, O. W.
 N^{δ} -(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **1998**, 273, 8882-9.
143. BRETSCHER, L. E.; LI, H.; POULOS, T. L.; GRIFFITH, O. W.
Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel N^{δ} -(iminoalkyl)- and N^{δ} -(iminoalkenyl)-ornithines. *J Biol Chem* **2003**, 278, 46789-97.

144. ALDERTON, W. K.; ANGELL, A. D.; CRAIG, C.; DAWSON, J.; GARVEY, E.; MONCADA, S.; MONKHOUSE, J.; REES, D.; RUSSELL, L. J.; RUSSELL, R. J.; SCHWARTZ, S.; WASLIDGE, N.; KNOWLES, R. G.
GW274150 and GW273629 are potent and highly selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **2005**, 145, 301-12.
145. NARAYANAN, K.; SPACK, L.; MCMILLAN, K.; KILBOURN, R. G.; HAYWARD, M. A.; MASTERS, B. S.; GRIFFITH, O. W.
S-alkyl-L-thiocitrullines. Potent stereoselective inhibitors of nitric oxide synthase with strong pressor activity in vivo. *J Biol Chem* **1995**, 270, 11103-10.
146. FURFINE, E. S.; HARMON, M. F.; PAITH, J. E.; KNOWLES, R. G.; SALTER, M.; KIFF, R. J.; DUFFY, C.; HAZELWOOD, R.; OPLINGER, J. A.; GARVEY, E. P.
Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J Biol Chem* **1994**, 269, 26677-83.
147. ULHAQ, S.; CHINJE, E. C.; NAYLOR, M. A.; JAFFAR, M.; STRATFORD, I. J.; THREADGILL, M. D.
Heterocyclic analogues of L-citrulline as inhibitors of the isoforms of nitric oxide synthase (NOS) and identification of N⁵-(4,5-dihydrothiazol-2-yl)ornithine as a potent inhibitor. *Bioorg Med Chem* **1999**, 7, 1787-96.
148. COWART, M.; KOWALUK, E. A.; DAANEN, J. F.; KOHLHAAS, K. L.; ALEXANDER, K. M.; WAGENAAR, F. L.; KERWIN, J. F., JR.
Nitroaromatic amino acids as inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *J Med Chem* **1998**, 41, 2636-42.
149. DEMOUGEOT, C.; PRIGENT-TESSIER, A.; MARIE, C.; BERTHELOT, A.
Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **2005**, 23, 971-978.
150. HOLOWATZ, L. A.; KENNEY, W. L.
Up-regulation of arginase activity contributes to attenuated reflex cutaneous vasodilatation in hypertensive humans. *J Physiol* **2007**, 581, 863-72.
151. JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A.; PEYTON, K. J.; DURANTE, W.
Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2005**, 288, R1057-1062.
152. ZHANG, C.; HEIN, T. W.; WANG, W.; MILLER, M. W.; FOSSUM, T. W.; McDONALD, M. M.; HUMPHREY, J. D.; KUO, L.
Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension* **2004**, 44, 935-943.
153. BAGNOST, T.; BERTHELOT, A.; BOUHADDI, M.; LAURANT, P.; ANDRE, C.; GUILLAUME, Y.; DEMOUGEOT, C.
Treatment with the arginase inhibitor N⁶-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* **2008**, 26, 1110-8.
154. YANG, Z.; MING, X. F.
Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep* **2006**, 8, 54-9.
155. HOLOWATZ, L. A.; THOMPSON, C. S.; KENNEY, W. L.
L-Arginine supplementation or arginase inhibition augments reflex cutaneous vasodilatation in aged human skin. *J Physiol* **2006**, 574, 573-81.

156. SAKAI, Y.; MASUDA, H.; KIHARA, K.; KUROSUKI, E.; YAMAUCHI, Y.; AZUMA, H.
Involvement of increased arginase activity in impaired cavernous relaxation with aging in the rabbit. *J Urol* **2004**, 172, 369-73.
157. MASUDA, H.; YANO, M.; SAKAI, Y.; KIHARA, K.; YAMAUCHI, Y.; AZUMA, H.
Modulation of intrinsic cavernous tone and nitric oxide production by arginase in rabbit corpus cavernosum. *J Urol* **2004**, 171, 490-4.
158. KIM, N. N.; COX, J. D.; BAGGIO, R. F.; EMIG, F. A.; MISTRY, S. K.; HARPER, S. L.; SPEICHER, D. W.; MORRIS, S. M., JR.; ASH, D. E.; TRAISH, A.; CHRISTIANSON, D. W.
Probing erectile function: S-(2-boronoethyl)-L-cysteine binds to arginase as a transition state analogue and enhances smooth muscle relaxation in human penile corpus cavernosum. *Biochemistry* **2001**, 40, 2678-2688.
159. BUGA, G. M.; WEI, L. H.; BAUER, P. M.; FUKUTO, J. M.; IGNARRO, L. J.
N^o-Hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am J Physiol* **1998**, 275, R1256-R1264.
160. SINGH, R.; PERVIN, S.; KARIMI, A.; CEDERBAUM, S.; CHAUDHURI, G.
Arginase activity in human breast cancer cell lines: N^o-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res* **2000**, 60, 3305-3312.
161. INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I.
The inhibition of arginase by N^o-hydroxy-L-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages. *J Exp Med* **2001**, 193, 777-84.
162. KROPF, P.; FUENTES, J. M.; FAHRNICH, E.; ARPA, L.; HERATH, S.; WEBER, V.; SOLER, G.; CELADA, A.; MODOLELL, M.; MULLER, I.
Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J* **2005**, 19, 1000-2.
163. REID, K. M.; TSUNG, A.; KAIZU, T.; JEYABALAN, G.; IKEDA, A.; SHAO, L.; WU, G.; MURASE, N.; GELLER, D. A.
Liver I/R injury is improved by the arginase inhibitor, N^o-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2007**, 292, G512-7.
164. COLLELUORI, D. M.; ASH, D. E.
Classical and Slow-Binding Inhibitors of Human Type II Arginase. *Biochemistry* **2001**, 40, 9356-9362.
165. COX, J. D.; KIM, N. N.; TRAISH, A. M.; CHRISTIANSON, D. W.
Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. *Nat Struct Biol* **1999**, 6, 1043-7.
166. CUSTOT, J.; MOALI, C.; BROLLO, M.; BOUCHER, J. L.; DELAFORGE, M.; MANSUY, D.; TENU, J. P.; ZIMMERMANN, J. L.
The new α -amino acid N^o-hydroxy-nor-L-arginine: a high-affinity inhibitor of arginase well adapted to bind to its manganese cluster. *J Am Chem Soc* **1997**, 119, 4086-4087.
167. SHIN, H.; CAMA, E.; CHRISTIANSON, D. W.
Design of amino acid aldehydes as transition-state analogue inhibitors of arginase. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 10278-84.
168. SINGH, J. P.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase: a new therapeutic target for the modulation of nitric oxide and angiogenesis. *Curr Opin Investig Drugs* **2007**, 8, 736-41.

169. DAYOUB, H.; ACHAN, V.; ADIMOOLAM, S.; JACOBI, J.; STUEHLINGER, M. C.; WANG, B. Y.; TSAO, P. S.; KIMOTO, M.; VALLANCE, P.; PATTERSON, A. J.; COOKE, J. P.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* **2003**, 108, 3042-7.
170. MACALLISTER, R. J.; PARRY, H.; KIMOTO, M.; OGAWA, T.; RUSSELL, R. J.; HODSON, H.; WHITLEY, G. S.; VALLANCE, P.
Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* **1996**, 119, 1533-40.
171. ROSSITER, S.; SMITH, C. L.; MALAKI, M.; NANDI, M.; GILL, H.; LEIPER, J. M.; VALLANCE, P.; SELWOOD, D. L.
Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Med Chem* **2005**, 48, 4670-8.
172. LEIPER, J.; NANDI, M.; TORONDEL, B.; MURRAY-RUST, J.; MALAKI, M.; O'HARA, B.; ROSSITER, S.; ANTHONY, S.; MADHANI, M.; SELWOOD, D.; SMITH, C.; WOJCIAK-STOTHARD, B.; RUDIGER, A.; STIDWILL, R.; McDONALD, N. Q.; VALLANCE, P.
Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* **2007**, 13, 198-203.
173. NANDI, M.; LEIPER, J.
Vorträge anlässlich des *4th International Symposium on ADMA*, Bregenz, Österreich, 28. - 29. Aug. **2008**.
174. SMITH, M. A.; VASAK, M.; KNIPP, M.; CASTELLANI, R. J.; PERRY, G.
Dimethylargininase, a nitric oxide regulatory protein, in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* **1998**, 25, 898-902.
175. ABE, T.; TOHGI, H.; MURATA, T.; ISOBE, C.; SATO, C.
Reduction in asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **2001**, 312, 177-9.
176. KOSTOUROU, V.; ROBINSON, S. P.; CARTWRIGHT, J. E.; WHITLEY, G. S.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis. *Br J Cancer* **2002**, 87, 673-80.
177. KNIPP, M.
How to control NO production in cells: N^G, N^G -dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase as a novel drug target. *Chembiochem* **2006**, 7, 879-89.
178. VALLANCE, P.; LEIPER, J.
Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* **2002**, 1, 939-50.
179. STONE, E. M.; SCHALLER, T. H.; BIANCHI, H.; PERSON, M. D.; FAST, W.
Inactivation of two diverse enzymes in the amidinotransferase superfamily by 2-chloroacetamide: dimethylargininase and peptidylarginine deiminase. *Biochemistry* **2005**, 44, 13744-52.
180. VALLANCE, P.; BUSH, H. D.; MOK, B. J.; HURTADO-GUERRERO, R.; GILL, H.; ROSSITER, S.; WILDEN, J. D.; CADDICK, S.
Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and arginine deiminase (ADI) by pentafluorophenyl (PFP) sulfonates. *Chem Commun (Camb)* **2005**, 5563-5.

181. HARTZOULAKIS, B.; ROSSITER, S.; GILL, H.; O'HARA, B.; STEINKE, E.; GANE, P. J.; HURTADO-GUERRERO, R.; LEIPER, J. M.; VALLANCE, P.; RUST, J. M.; SELWOOD, D. L.
Discovery of inhibitors of the penten superfamily protein dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH), by virtual screening and hit analysis. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, 3953-6.
182. ZOBEL-THROPP, P.; GARY, J. D.; CLARKE, S.
 δ -N-methylarginine is a novel posttranslational modification of arginine residues in yeast proteins. *J Biol Chem* **1998**, 273, 29283-6.
183. NIEWMIERZYCKA, A.; CLARKE, S.
S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *J Biol Chem* **1999**, 274, 814-24.
184. OLSSON, I.; BERREZ, J. M.; LEIPUS, A.; OSTLUND, C.; MUTVEI, A.
The arginine methyltransferase Rmt2 is enriched in the nucleus and co-purifies with the nuclear porins Nup49, Nup57 and Nup100. *Exp Cell Res* **2007**, 313, 1778-89.
185. MCBRIDE, A. E.; ZURITA-LOPEZ, C.; REGIS, A.; BLUM, E.; CONBOY, A.; ELF, S.; CLARKE, S.
Protein arginine methylation in *Candida albicans*: role in nuclear transport. *Eukaryot Cell* **2007**, 6, 1119-29.
186. CHERN, M. K.; CHANG, K. N.; LIU, L. F.; TAM, T. C.; LIU, Y. C.; LIANG, Y. L.; TAM, M. F.
Yeast ribosomal protein L12 is a substrate of protein-arginine methyltransferase 2. *J Biol Chem* **2002**, 277, 15345-53.
187. SCHADE, D.; TÖPKER-LEHMANN, K.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.
Synthetic approaches to N^{δ} -methylated L-arginine, N^{ω} -hydroxy-L-arginine, L-citrulline, and N^{δ} -cyano-L-ornithine. *J Org Chem* **2008**, 73, 1025-30.
188. KLEIN, C.; SCHULZ, G.; STEGLICH, W.
Umwandlung von ω -Guanidino- und ω -Ureido- α -aminosäuren in α -Ketosäuren und deren heterocyclische Folgeprodukte. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1623-1637.
189. PATCHETT, M. L.; MONK, C. R.; DANIEL, R. M.; MORGAN, H. W.
Determination of agmatine, arginine, citrulline and ornithine by reversed-phase liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. *J Chromatogr* **1988**, 425, 269-76.
190. TÖPKER, K.
 N^{δ} -substituierte Argininderivate: Synthesen und ihre Umsetzungen mit NO-Synthasen und Cytochrom P450. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **1998**.
191. LUZZI, S. D.; MARLETTA, M. A.
L-arginine analogs as alternate substrates for nitric oxide synthase. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, 15, 3934-41.
192. CLAGUE, M. J.; WISHNOK, J. S.; MARLETTA, M. A.
Formation of N^{δ} -cyanoornithine from N^{ω} -hydroxy-L-arginine and hydrogen peroxide by neuronal nitric oxide synthase: implications for mechanism. *Biochemistry* **1997**, 36, 14465-73.
193. MAYER, B.; KLATT, P.; WERNER, E. R.; SCHMIDT, K.
Kinetics and mechanism of tetrahydrobiopterin-induced oxidation of nitric oxide. *J Biol Chem* **1995**, 270, 655-9.

-
194. BABU, B. R.; FREY, C.; GRIFFITH, O. W.
L-arginine binding to nitric-oxide synthase. The role of H-bonds to the nonreactive guanidinium nitrogens. *J Biol Chem* **1999**, 274, 25218-26.
195. FELDMAN, P. L.; CHI, S.; SENNEQUIER, N.; STUEHR, D. J.
Synthesis of the L-arginine congener L-Indospicine and evaluation of its interaction with nitric oxide synthase. *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, 6, 111-114.
196. CHEN, P. F.; TSAI, A. L.; BERKA, V.; WU, K. K.
Mutation of Glu-361 in human endothelial nitric-oxide synthase selectively abolishes L-arginine binding without perturbing the behavior of heme and other redox centers. *J Biol Chem* **1997**, 272, 6114-8.
197. LI, H.; SHIMIZU, H.; FLINSPACH, M.; JAMAL, J.; YANG, W.; XIAN, M.; CAI, T.; WEN, E. Z.; JIA, Q.; WANG, P. G.; POULOS, T. L.
The Novel Binding Mode of *N*-Alkyl-*N*-hydroxyguanidine to Neuronal Nitric Oxide Synthase Provides Mechanistic Insights into NO Biosynthesis. *Biochemistry* **2002**, 41, 13868-13875.
198. VASANITS, A.; KUTLAN, D.; SASS, P.; MOLNAR-PERL, I.
Retention/quantitation properties of the *o*-phthaldialdehyde-3-mercaptopropionic acid and the *o*-phthaldialdehyde-*N*-acetyl-L-cysteine amino acid derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **2000**, 870, 271-287.
199. CLEMENT, B.; SCHMITT, S.; ZIMMERMANN, M.
Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm (Weinheim)* **1988**, 321, 955-6.
200. CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M. H.; WOHLERS, H.
Cytochrome P450 dependent *N*-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the *N*-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide. *Biochem Pharmacol* **1993**, 46, 2249-67.
201. CHENAIS, B.; YAPO, A.; LEPOIVRE, M.; TENU, J. P.
N^o-hydroxy-L-arginine, a reactional intermediate in nitric oxide biosynthesis, induces cytostasis in human and murine tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1993**, 196, 1558-65.
202. RENAUD, J. P.; BOUCHER, J. L.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; MANSUY, D.
Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of *N*^o-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in no synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s. *Biochem Biophys Res Commun* **1993**, 192, 53-60.
203. HAVEMEYER, A.; BITTNER, F.; WOLLERS, S.; MENDEL, R.; KUNZE, T.; CLEMENT, B.
Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* **2006**, 281, 34796-802.
204. KADLUBAR, F. F.; ZIEGLER, D. M.
Properties of a NADH-dependent *N*-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **1974**, 162, 83-92.
205. BERNHEIM, M. L.
The hydroxylamine reductase of mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **1969**, 134, 408-13.

206. BERNHEIM, M. L.
The reduction of hydroxylamine and some aryl hydroxamates by liver mitochondria from mammals and birds. *Enzymologia* **1972**, 43, 167-76.
207. CLEMENT, B.; LOMB, R.; MOLLER, W.
Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J Biol Chem* **1997**, 272, 19615-20.
208. GRÜNEWALD, S.
Dissertation in Vorbereitung. Christian-Albrechts-Universität Kiel.
209. CLEMENT, B.; DEMESMAEKER, M.; LINNE, S.
Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanabenz and reduction of the *N*-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem Res Toxicol* **1996**, 9, 682-8.
210. CLEMENT, B.; MAU, S.; DETERS, S.; HAVEMEYER, A.
Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([1-[(2*s*)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyl]oxy]-acetic acid). *Drug Metab Dispos* **2005**, 33, 1740-7.
211. YASUKOCHI, Y.; MASTERS, B. S.
Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c(cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J Biol Chem* **1976**, 251, 5337-44.
212. HAVEMEYER, A.
Mitochondriale Benzamidoximreduktion: Identifizierung des molybdencofaktorabhängigen Enzymsystems. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **2006**.
213. KURIAN, J. R.; BAJAD, S. U.; MILLER, J. L.; CHIN, N. A.; TREPANIER, L. A.
NADH cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, 311, 1171-8.
214. ZIEGLER, D. M.; MITCHELL, C. H.
Microsomal oxidase. IV. Properties of a mixed-function amine oxidase isolated from pig liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **1972**, 150, 116-25.
215. ZIEGLER, D. M.
Flavin-containing monooxygenases: enzymes adapted for multisubstrate specificity. *Trends Pharmacol Sci* **1990**, 11, 321-4.
216. CASHMAN, J. R.
Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chem Res Toxicol* **1995**, 8, 166-81.
217. KRUEGER, S. K.; WILLIAMS, D. E.
Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol Ther* **2005**, 106, 357-87.
218. CASHMAN, J. R.
Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 338, 599-604.

219. MOTIKA, M. S.; ZHANG, J.; CASHMAN, J. R.
Flavin-containing monooxygenase 3 and human disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2007**, 3, 831-45.
220. KOUKOURITAKI, S. B.; SIMPSON, P.; YEUNG, C. K.; RETTIE, A. E.; HINES, R. N.
Human hepatic flavin-containing monooxygenases 1 (FMO1) and 3 (FMO3) developmental expression. *Pediatr Res* **2002**, 51, 236-43.
221. FURNES, B.; FENG, J.; SOMMER, S. S.; SCHLENK, D.
Identification of novel variants of the flavin-containing monooxygenase gene family in African Americans. *Drug Metab Dispos* **2003**, 31, 187-93.
222. CASHMAN, J. R.; ZHANG, J.
Human flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2006**, 46, 65-100.
223. LAWTON, M. P.; CASHMAN, J. R.; CRESTEIL, T.; DOLPHIN, C. T.; ELFARRA, A. A.; HINES, R. N.; HODGSON, E.; KIMURA, T.; OZOLS, J.; PHILLIPS, I. R.
A nomenclature for the mammalian flavin-containing monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities. *Arch Biochem Biophys* **1994**, 308, 254-7.
224. OVERBY, L. H.; BUCKPITT, A. R.; LAWTON, M. P.; ATTA-ASAFO-ADJEI, E.; SCHULZE, J.; PHILPOT, R. M.
Characterization of flavin-containing monooxygenase 5 (FMO5) cloned from human and guinea pig: evidence that the unique catalytic properties of FMO5 are not confined to the rabbit ortholog. *Arch Biochem Biophys* **1995**, 317, 275-84.
225. ZHANG, J.; CERNY, M. A.; LAWSON, M.; MOSADEGHI, R.; CASHMAN, J. R.
Functional activity of the mouse flavin-containing monooxygenase forms 1, 3, and 5. *J Biochem Mol Toxicol* **2007**, 21, 206-15.
226. FISHER, M. B.; LAWTON, M. P.; ATTA-ASAFO-ADJEI, E.; PHILPOT, R. M.; RETTIE, A. E.
Selectivity of flavin-containing monooxygenase 5 for the (S)-sulfoxidation of short-chain aralkyl sulfides. *Drug Metab Dispos* **1995**, 23, 1431-3.
227. OHMI, N.; YOSHIDA, H.; ENDO, H.; HASEGAWA, M.; AKIMOTO, M.; HIGUCHI, S.
S-oxidation of S-methyl-esonarimod by flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes. *Xenobiotica* **2003**, 33, 1221-31.
228. ATTA-ASAFO-ADJEI, E.; LAWTON, M. P.; PHILPOT, R. M.
Cloning, sequencing, distribution, and expression in *Escherichia coli* of flavin-containing monooxygenase 1C1. Evidence for a third gene subfamily in rabbits. *J Biol Chem* **1993**, 268, 9681-9.
229. ZIEGLER, D. M.
An overview of the mechanism, substrate specificities, and structure of FMOs. *Drug Metab Rev* **2002**, 34, 503-11.
230. SCHREUDER, H. A.; PRICK, P. A.; WIERENGA, R. K.; VRIEND, G.; WILSON, K. S.; HOL, W. G.; DRENTH, J.
Crystal structure of the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase-substrate complex refined at 1.9 Å resolution. Analysis of the enzyme-substrate and enzyme-product complexes. *J Mol Biol* **1989**, 208, 679-96.
231. LIN, J.; CASHMAN, J. R.
Detoxication of tyramine by the flavin-containing monooxygenase: stereoselective formation of the trans oxime. *Chem Res Toxicol* **1997**, 10, 842-52.

232. LIN, J.; CASHMAN, J. R.
N-oxygenation of phenethylamine to the trans-oxime by adult human liver flavin-containing monooxygenase and retroreduction of phenethylamine hydroxylamine by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **1997**, 282, 1269-79.
233. RETTIE, A. E.; LAWTON, M. P.; SADEQUE, A. J.; MEIER, G. P.; PHILPOT, R. M.
Prochiral sulfoxidation as a probe for multiple forms of the microsomal flavin-containing monooxygenase: studies with rabbit FMO1, FMO2, FMO3, and FMO5 expressed in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **1994**, 311, 369-77.
234. TROJER, P.; DANGL, M.; BAUER, I.; GRAESSLE, S.; LOIDL, P.; BROSCHE, G.
Histone methyltransferases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a novel enzyme with a unique substrate specificity. *Biochemistry* **2004**, 43, 10834-43.
235. SPANNOFF, A.; HEINKE, R.; BAUER, I.; TROJER, P.; METZGER, E.; GUST, R.; SCHULE, R.; BROSCHE, G.; SIPPL, W.; JUNG, M.
Target-based approach to inhibitors of histone arginine methyltransferases. *J Med Chem* **2007**, 50, 2319-25.
236. ACHAN, V.; BROADHEAD, M.; MALAKI, M.; WHITLEY, G.; LEIPER, J.; MACALLISTER, R.; VALLANCE, P.
Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**, 23, 1455-9.
237. BOGUMIL, R.; KNIPP, M.; FUNDEL, S. M.; VASAK, M.
Characterization of dimethylargininase from bovine brain: evidence for a zinc binding site. *Biochemistry* **1998**, 37, 4791-8.
238. HOCHULI, E.; DOBELI, H.; SCHACHER, A.
New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* **1987**, 411, 177-84.
239. KIMOTO, M.; TSUJI, H.; OGAWA, T.; SASAOKA, K.
Detection of *N*^o,*N*^o-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys* **1993**, 300, 657-62.
240. Diskussionen anlässlich des *4th International Symposium on ADMA*, Bregenz, Österreich, 28. - 29. Aug. **2008**.
241. FORBES, S. P.; DRUHAN, L. J.; GUZMAN, J. E.; PARINANDI, N.; ZHANG, L.; GREEN-CHURCH, K. B.; CARDOUNEL, A. J.
Mechanism of 4-HNE mediated inhibition of hDDAH-1: implications in NO regulation. *Biochemistry* **2008**, 47, 1819-26.
242. MURRAY-RUST, J.; LEIPER, J.; MCALISTER, M.; PHELAN, J.; TILLEY, S.; SANTA MARIA, J.; VALLANCE, P.; MCDONALD, N.
Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* **2001**, 8, 679-83.
243. STONE, E. M.; PERSON, M. D.; COSTELLO, N. J.; FAST, W.
Characterization of a transient covalent adduct formed during dimethylarginine dimethylaminohydrolase catalysis. *Biochemistry* **2005**, 44, 7069-78.
244. FRIEDRICH, F.
Synthese von Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitoren. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **2007**.

-
245. SCHADE, D.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.
Efficient synthesis of optically pure N^{ω} -alkylated L-arginines. *Synthesis* **2008**, 15, 2391-2397.
246. SCHADE, D.
Synthese von Stickstoffmonoxid-modulierenden L-Arginin-Derivaten und Prodrugs für Hydroxyguanidine. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **2008**.
247. KNIPP, M.; VASAK, M.
A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Anal Biochem* **2000**, 286, 257-64.
248. MUSCHICK, N.
Dissertation in Vorbereitung. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
249. SCHULZ, K.; KERBER, S.; KELM, M.
Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂⁻ in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide* **1999**, 3, 225-34.
250. LORENTZ, K.; KOCH, H.
Bestimmung von Ornithin-Carbamyl-Transferase mittels Fearon-Reaktion. I. Citrullinbestimmung. *Z Klin Chem Klin Biochem* **1971**, 9, 215-9.
251. HASAN, K.; HEESSEN, B. J.; CORBETT, J. A.; MCDANIEL, M. L.; CHANG, K.; ALLISON, W.; WOLFFENBUTTEL, B. H.; WILLIAMSON, J. R.; TILTON, R. G.
Inhibition of nitric oxide formation by guanidines. *Eur J Pharmacol* **1993**, 249, 101-6.
252. CORBETT, J. A.; MCDANIEL, M. L.
Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Methods Enzymol* **1996**, 268, 398-408.
253. BUß, U. M.
Untersuchungen von Pyrido[1,2-a]pyrimidinen und strukturverwandten Verbindungen als Hemmstoffe von NO-Synthasen. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **2006**.
254. FAST, W.; LEVSKY, M. E.; MARLETTA, M. A.; SILVERMAN, R. B.
 N^{ω} -propargyl-L-arginine and N^{ω} -hydroxy- N^{ω} -propargyl-L-arginine are inhibitors, but not inactivators, of neuronal and macrophage nitric oxide synthases. *Bioorg Med Chem* **1997**, 5, 1601-8.
255. LEIPER, J. M.
The DDAH-ADMA-NOS pathway. *Ther Drug Monit* **2005**, 27, 744-6.

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. B. Clement

Für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsgebietes sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater sehr herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. E. Beitz möchte ich für die vorübergehende Aufnahme in seinem Arbeitskreis zur rekombinanten Expression der DDAH danken.

Herrn HD Dr. T. Kunze danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Tipps auf dem Gebiet der Analytik und Enzymkinetik.

Dennis möchte ich besonders für die hervorragende Zusammenarbeit und die Vielzahl an Synthesen danken, die er für unser gemeinsames Projekt durchgeführt hat.

Bei Anja B., Anja K., Dana, Nikola, Thomas B. und Thomas K. bedanke ich mich für die absolut unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 6. Semesters und die unterhaltsamen Stunden während der Praktikumszeiten.

Binghua, Christina, Dana, Dorothea, Julia und Nadine danke ich für die freundliche Unterstützung bei der molekularbiologischen Arbeit.

Antje, Meike, Sanja und Herrn Prof. Dr. J. Cashman danke ich für die bereitgestellten Enzymquellen für die Reduktions- und Oxidationsstudien.

Danksagung

Darüber hinaus danke ich insbesondere den Korrekturlesern der vorliegenden Arbeit Joscha, Nikola, Tina und Uwe für die akribische Durchsicht und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Sven möchte ich danken für die Einarbeitung in die HPLC-Analytik und ausgezeichnete Unterstützung bei technischen Problemen.

Dennis und Lars gilt besonderer Dank für das stets nette Arbeitsklima und die unterhaltsame Zeit im gemeinsamen Büro.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen für die gute Arbeitsatmosphäre am Institut danken. Hierbei gilt mein Dank insbesondere allen nicht namentlich erwähnten.

Im Weiteren möchte ich mich bei Andreas, Dennis, Joscha, Lars, Momme, Robert und Uwe für die schönen Fussball-Stunden abseits des Institutes bedanken.

Tina möchte ich ganz besonders für die vielen gemeinsamen Jahre danken und dafür, dass sie mir immer zur Seite steht.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die immerwährende Unterstützung und ihr Verständnis danken, dass sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im Oktober 2008

Jürke Kotthaus

Persönliche Daten

Name	Jürke Kotthaus
Geburtsdatum	12. September 1978
Geburtsort	Stade
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1985 bis 1989	Grundschule Stadtmitte Bremervörde
1989 bis 1991	Orientierungsstufe Bremervörde
1991 bis 1998	Allgemeinbildendes Gymnasium Bremervörde
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

Aug. 1998 bis Sep. 1999 Zivildienst im Rettungsdienst des DRK Bremervörde

Studium

WS 1999 bis WS 2003	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Jan. 2004 bis Jun. 2004	Pharmaziepraktikum in der Einhorn-Apotheke, Kiel
Jul. 2004 bis Dez. 2004	Pharmaziepraktikum bei der Schering AG, Berlin
Februar 2005	Erteilung der Approbation als Apotheker

Promotion und Weiterbildung

seit April 2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement

Mai 2008 Fachapotheker für pharmazeutische Analytik

Eigene Veröffentlichungen:

J. KOTTHAUS, D. SCHADE, K. TÖPKER-LEHMANN, E. BEITZ, B. CLEMENT

N^δ-Methylated L-arginine derivatives and their effects on the nitric oxide generating system.

Bioorganic and Medicinal Chemistry **2008**, 16, 2305-2312.

D. SCHADE, K. TÖPKER-LEHMANN, J. KOTTHAUS, B. CLEMENT

Synthetic Approaches to *N*^δ-methylated L-arginine, *N*^ω-hydroxy-L-arginine, L-citrulline, and *N*^δ-cyano-L-ornithine.

Journal of Organic Chemistry **2008**, 73, 1025-1030.

D. SCHADE, J. KOTTHAUS, B. CLEMENT

Efficient synthesis of optically pure *N*^ω-alkylated L-arginines.

Synthesis **2008**, 15, 2391-2397.

J. KOTTHAUS, D. SCHADE, N. MUSCHICK, E. BEITZ, B. CLEMENT

Structure-activity relationship of novel and known inhibitors of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1: alkenyl-amidines as new leads.

Bioorganic and Medicinal Chemistry **2008**, 16, 10205-10209.

B. CLEMENT, J. KOTTHAUS, D. SCHADE

Inhibitoren der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase.

Patent, DE 10 2008 061 247.2, **2008**

B. CLEMENT, J. KOTTHAUS, D. SCHADE

Derivate von *N*(omega)-Hydroxy-L-arginin zur Behandlung von Krankheiten

Patent, DE 10 2009 004 203.2, **2009**

Posterbeiträge zu Tagungen:

J. KOTTHAUS, D. SCHADE, K. TÖPKER-LEHMANN, B. CLEMENT

Synthesis and testing of N^{δ} -methyl-L-citrulline as a novel inhibitor of nitric oxide synthases.

XIXth International Symposium on Medicinal Chemistry, ISMC 2006, 29. August - 2. September 2006, Istanbul, Türkei.

J. KOTTHAUS, B. CLEMENT

N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginine: Formation by NOSs and its application as potent inhibitor of arginase.

DPhG Jahrestagung 2007, 10. - 13. Oktober 2007, Erlangen, Deutschland.

J. KOTTHAUS, D. SCHADE, B. CLEMENT

Synthesis and SARs of novel and known inhibitors of human DDAH-1:

Alkenyl-amidines and guanidines as promising leads.

4th International Symposium on ADMA, 28. - 29. August 2008, Bregenz, Österreich.

In den vergangenen Jahren konnte N^{δ} -Methylarginin in Hefezellen identifiziert werden. Obwohl dieser Verbindung bisher nicht in Säugetieren nachgewiesen werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von N^{δ} -Methyl-D,L-arginin (MA), N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginin (NHAM) und N^{δ} -Methyl-L-citrullin (MC) auf das NO-generierende System bestehend aus NO-Synthase, Arginase und der Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle Verbindungen sehr schwache Inhibitoren der NO-Synthase darstellen. Darüber hinaus konnte eine enzymatische Hydroxylierung von MA zu NHAM durch alle drei Isoenzyme der NO-Synthase detektiert werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese Verbindung einen potenten Inhibitor der Arginase darstellt, wohingegen alle getesteten Verbindungen auf die Aktivität der DDAH lediglich einen geringen Einfluss besitzen. Aufgrund der erhaltenen Daten erscheint eine physiologische Bedeutung der N^{δ} -methylierten L-Arginin-Derivate in der Regulation des NO-generierenden Systems unwahrscheinlich.

Darüber hinaus wurde eine mögliche physiologische Reduktion von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin und NHAM untersucht. Hierbei konnte insbesondere die Beteiligung der Isoenzyme der mitochondrialen Amidoxim-reduzierenden Komponente an der mitochondrialen Reduktion nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde getestet, ob eine Hydroxylierung von L-Arginin bzw. MA durch die Isoenzyme der flavinhaltigen Monooxygenase (FMO) stattfindet und möglicherweise einen bisher unbekanntem Mechanismus in der NO-Biosynthese darstellt. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die FMOs diese Verbindungen nicht umsetzen.

In den vergangenen Jahren konnte vermehrt gezeigt werden, dass eine Hemmung der DDAH einen neuartigen Ansatzpunkt zur indirekten Inhibition der NO-Synthase darstellt. Insbesondere eine Hemmung der DDAH-1 erscheint vielversprechend, da eine Kollokalisierung dieser Isoform mit der nNOS nachgewiesen wurde. Aus diesem Grund wurde eine Methode zur rekombinanten Expression humaner DDAH-1 entwickelt. An diesem rekombinanten Enzym wurde ein Substanz-Screening zur Entwicklung neuartiger hDDAH-1 Inhibitoren durchgeführt. Im Rahmen dieser Studien mit N^{ω} -substituierten L-Argininen sowie N^{δ} -(1-Iminoalk(en)yl)-L-ornithinen wurde der derzeit potenteste Inhibitor der hDDAH-1 identifiziert sowie neue Informationen über die Struktur-Aktivitätsbeziehungen gewonnen. Des Weiteren wurde eine neue Leitstruktur für die Entwicklung selektiver hDDAH-1-Inhibitoren auf N -(2-Methoxyethyl)guanidin-Basis identifiziert.

In 1998 N^{δ} -methylarginine was detected in yeast cells. Although this compound has not been identified in mammals, a potential modulation by N^{δ} -methyl-D,L-arginine (MA) and its presumed metabolites of NOS-catalysis N^{α} -hydroxy- N^{δ} -methyl-L-arginine (NHAM) and N^{δ} -methyl-L-citrulline (MC) was examined thoroughly with the NO-generating system consisting of NO-synthase, arginase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH).

These studies demonstrated that all N^{δ} -methylated L-arginine derivatives are weak inhibitors of NOS isoforms. Moreover, all NOSs were capable of hydroxylating MA to NHAM. In addition, NHAM represents a potent inhibitor of arginase, whereas all tested compounds had only minor effects on DDAH. Concluding from these findings, a physiological relevance of N^{δ} -methylated L-arginine derivatives within the NO-generating system seems to be rather unlikely.

Furthermore, a physiological N -reduction of N^{α} -hydroxy-L-arginine and NHAM was investigated showing that both compounds are reduced by microsomes and mitochondria. Moreover, the involvement of the newly identified mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) in mitochondrial reduction was confirmed. In addition, a hydroxylation of L-arginine and MA by the flavincontaining monooxygenases (FMOs) was investigated to elucidate whether this could be a novel mechanism for NO-biosynthesis. The findings clearly show that FMOs are not capable of hydroxylating these compounds.

During the last years inhibition of DDAH turned out to be a new strategy to indirectly affect NO formation. Particularly, inhibition of DDAH-1 appears promising since this isoform is collocated with nNOS. Thus, a method for the expression of recombinant human DDAH-1 was developed and several different compounds were tested to design novel DDAH-1 inhibitors. Based on N^{α} -substituted L-arginines and N^{δ} -(1-iminoalk(en)yl)-L-ornithines the most potent inhibitor of hDDAH-1 so far described was identified and new informations about structure-activity relationship were gained. In addition, a novel lead for hDDAH-1 inhibitors based on N -(2-methoxyethyl)guanidine was identified.